

Biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion des Thrombopoietin-Rezeptors c-Mpl in Thrombozyten

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Diplom-Biochemiker Harald Schulze
geboren am 21. November 1969 in Alfeld / Leine

1999

Referat: Prof. Dr. Jürgen Alves
Abteilung Biophysikalische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferat: Prof. Dr. Karl Welte
Abteilung Kinderheilkunde IV
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 22.06.1999

ZUSAMMENFASSUNG

Thrombopoietin (TPO) ist innerhalb der Blutbildung das entscheidende Zytokin für die Megakaryopoese und Thrombozytopoese. Der TPO-Rezeptor c-Mpl wird nur auf megakaryozytären Vorläufern im Knochenmark und auf Plättchen, die durch Abschnürung von Megakaryozyten entstehen, exprimiert.

An Thrombozyten von Gesundspendern wurden die durch TPO-Stimulation aktivierten Signalwege untersucht. Dabei konnte durch Detektion phosphorylierter Proteine neben der Aktivierung des Jak-Stat-Signalwegs auch die des Raf-MAPK-Signalwegs nach TPO-Stimulation gezeigt werden. Es wird gezeigt, daß die Januskinase Jak2 unmittelbar nach Stimulation der Thrombozyten mit TPO aktiviert wird. Außerdem konnten die Tyrosinphosphorylierungen des Rezeptors c-Mpl und der Transkriptionsfaktoren Stat3, Stat5a und Stat5b detektiert werden. Die Aktivierung von Stat1 α konnte erstmalig durch Gelretardation im SDS-Gel und elektrophoretische Shift-Assays (EMSA) in TPO-stimulierten Thrombozyten nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die durch TPO induzierte Bildung der Homodimere von Stat1 α , Stat3, Stat5a und Stat5b wie der Heterodimere Stat1/Stat3 und Stat5a/Stat5b in Plättchen gezeigt werden. Die Bildung der verschiedenen Dimere und deren Bindung an DNA erfolgte nicht zeitgleich, sondern mit unterschiedlichen Kinetiken, wobei Stat5 nach 1 Minute und Stat3 nach 5 Minuten TPO-Stimulation aktiviert wurde. Die Aktivierung von Stat1 war erst nach 20-30 Minuten deutlich nachweisbar.

Es konnte die Protein-Expression der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 in Thrombozyten gezeigt werden. Nach TPO-Stimulation wurde im wesentlichen ERK2 phosphoryliert. Die Aktivierung von ERK2 konnte nach 5 Minuten TPO-Stimulation nachgewiesen werden und erreichte ihr Maximum nach 30 Minuten. Diese Aktivierungskinetik entsprach der von Stat1. Obwohl Stat1 und Stat3 einen Serinrest in einem MAPK-Substratmotiv aufweisen, konnte keine TPO-abhängige Veränderung der Serinphosphorylierungen von Stat1 und Stat3 nachgewiesen werden.

Bei Charakterisierungen der nach TPO-Stimulation in Thrombozyten gebildeten Stat5-Komplexe konnte das Adapterprotein CrkL in allen Stat5-DNA-Komplexen identifiziert werden. Dabei zeigte sich, daß CrkL im wesentlichen mit Stat5b, aber nicht mit Stat5a assoziiert ist.

Die am Gesundspender etablierten Methoden wurden zur Charakterisierung möglicher Defekte in der Thrombozytopoese bei Patienten mit kongenitaler amegakaryozytärer Thrombozytopenie (CAMT) und bei der Thrombozytopenie mit bilateraler Radiusaplasie (TAR-Syndrom) angewandt. Bei CAMT- und bei TAR-Patienten wurde ein Defekt der Signaltransduktion in Thrombozyten nach TPO-Stimulation nachgewiesen: Die fehlende Induktion tyrosinphosphorylierter Proteine in den Plättchen kann einer fehlenden Reaktivität der megakaryozytären Vorläufer auf TPO in diesen Thrombozytopenien entsprechen.

Da zwei TAR-Patienten im c-mpl-Gen keine Mutation aufwiesen, kann ein mutierter c-Mpl-Rezeptor als Ursache der Thrombozytopenie im TAR-Syndrom ausgeschlossen werden.

Bei einem TAR-Patienten konnte zusätzlich gezeigt werden, daß Jak2 in Thrombozyten nach TPO-Stimulation nicht phosphoryliert wird. Daher kann die Thrombozytopenie im TAR-Syndrom auf einen Defekt in der frühen Signaltransduktion von c-Mpl lokalisiert werden.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methodik kann die Signaltransduktion von TPO und seinem Rezeptor c-Mpl an primären Zellen untersucht werden, die das Geschehen im Megakaryozyten gut widerspiegeln. Dadurch ist es auch möglich, die molekularen Ursachen, die zu einer angeborenen Thrombozytopenie führen, genauer zu charakterisieren.

STICHWORTE:

Thrombopoietin / Thrombozyten / Signaltransduktion

ABSTRACT

During hematopoiesis thrombopoietin (TPO) is the pivotal cytokine for megakaryopoiesis and thrombocytopoiesis. The proto-oncogene product c-Mpl is the receptor for TPO. Its expression is restricted to cells of the megakaryocytic lineage in the bone marrow and to platelets that are derived from megakaryocytes.

This work deals with the signaling pathways in thrombocytes from healthy donors. It describes that proteins of the Jak-Stat pathway as well as of the Raf-MAPK pathway become activated in platelets after TPO-stimulation. It could be demonstrated that the Janus kinase Jak2 is activated immediately after stimulation. Moreover, tyrosine phosphorylation of c-Mpl and of the transcription factors Stat3, Stat5a and Stat5b could be detected. The activation of Stat1 α could be shown by mobility retardation in an SDS gel and by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) in TPO-stimulated platelet lysates. Heterodimers of Stat1/3 and Stat5a/5b as well as homodimers of Stat1 α , Stat3, Stat5a and Stat5b are formed after incubation of platelets with TPO. The formation of the Stat dimers occurred with different kinetics. Stat5 activation is detectable after 1 minute, Stat3 after 5 minutes and Stat1 after 20 to 30 minutes. The MAP kinases ERK1 and ERK2 are expressed in human platelets. After TPO stimulation mainly ERK2 becomes phosphorylated. The activation could be detected after 5 minutes of TPO stimulation with a maximum after 20 to 30 minutes. Although the kinetic was comparable to that of Stat1 and both, Stat1 and Stat3 contain a serine residue which is a MAPK substrate, no TPO-dependent alterations of the serine phosphorylation of Stat1 or Stat3 could be detected.

Analyses of the Stat5 complexes that are formed in human platelets after TPO stimulation revealed that the adapter protein CrkL is present in these complexes and mainly associated with Stat5b, but not with Stat5a.

The established methods were used to characterize the defects in the thrombocytopoiesis in patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) or from thrombocytopenia with absent radii (TAR-syndrome). It could be demonstrated that CAMT patients and TAR patients have a defect in the signal transduction pathways. TPO stimulation of platelets of the patients did not lead to induction of intracellular phosphorylations. This might reflect a defective reactivity to TPO also present in the megakaryocytic progenitor cells. As two TAR patients did not have any mutation in the c-mpl gene, a mutated c-Mpl receptor can be excluded as the reason for thrombocytopenia in these patients. Furthermore, it could be shown that in one TAR patient Jak2 is present, but did not become activated after TPO stimulation. So, thrombocytopenia in TAR syndrome might be due to a defect early in the signaling pathway of TPO.

In summary, with the help of established methods during this work it is possible to analyze the signal transduction of TPO in primary cells which might reflect in part the situation in megakaryocytes. So, it becomes possible to further characterize the molecular defects leading to congenital thrombocytopenia.

KEYWORDS:

Thrombopoietin / Platelets / Signal transduction

INHALT

1.....	Einleitung	1
1.1.....	Hämatopoese	1
1.2.....	Megakaryopoese und Thrombozyten	3
1.3.....	Thrombopoietin: TPO	5
1.4.....	Der TPO-Rezeptor c-Mpl	7
1.5.....	Die Signaltransduktion des TPO-Rezeptors	9
1.6.....	Thrombozytopenien	11
1.7.....	TAR-Syndrom und Kongenitale Amegakaryozytäre Thrombozytopenie	12
2.....	Material und Methoden	13
2.1.....	Material	13
2.1.1.....	Chemikalien	13
2.1.2.....	Antikörper	13
2.2.....	Häufig verwendete Lösungen	14
2.3.....	Verwendete DNA-Sequenzen und Zelllinien	14
2.3.1.....	Primer	14
2.3.2.....	Responsible dsDNA-Elemente	15
2.3.3.....	Verwendete Zelllinien	15
2.4.....	Biochemische Untersuchungen zur Signaltransduktion	15
2.4.1.....	Isolation und Stimulation der Thrombozyten	15
2.4.2.....	SDS-Polyacrylamidelektrophorese	16
2.4.3.....	Western Blotting	17
2.4.3.1.....	Ponceau-Färbung	18
2.4.3.2.....	Immunologische Färbung	18
2.4.3.3.....	Mehrfaches Detektieren mit Antikörpern	18
2.4.4.....	Immunpräzipitation	19
2.4.5.....	Elektrophoretischer Gelretardationsassay (EMSA)	20
2.5.....	Molekularbiologische Methoden	21
2.5.1.....	Isolation von RNA und DNA	21
2.5.2.....	Die Amplifikation von DNA und RNA mittels PCR	22
2.5.2.1.....	Der Reverse-Transkription-Ansatz	22
2.5.2.2.....	Der PCR-Ansatz	22
2.5.2.3.....	Detektion der amplifizierten DNA in Agarose-Gelen	23
2.5.3.....	Methoden zur Sequenzierung von klonierten PCR-Fragmenten	23
2.5.3.1.....	Ligation von PCR-Produkten	23
2.5.3.2.....	Transformation von Bakterien	24
2.5.3.3.....	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	25
2.5.3.4.....	PIC-Extraktion	25
2.5.3.5.....	Sequenzierung von Plasmid-DNA	26
2.6.....	FACScan-Analysen von Thrombozyten	26
2.7.....	Zellkultur	27
2.8.....	Markierung von TPO mit FITC	27

3.....	Ergebnisse	29
3.1.....	TPO wirkt synergistisch mit Plättchenaktivatoren wie ADP und TRAP	29
3.2.....	Proteinbiochem. Untersuchungen zur Signaltransduktion von c-Mpl	30
3.2.1.....	Tyrosinphosphorylierungen von TPO, Thrombin und TRAP	30
3.2.2.....	Nachweis verschiedener Signalmoleküle in Plättchen: Übersicht	32
3.2.2.1.....	Nachweis von Shc, ERK2 und Vav in Blutplättchen	32
3.2.3.....	Nachweis von c-Mpl in der Zelllinie DAMI und in Plättchen	34
3.2.4.....	TPO induziert die Tyrosinphosphorylierung der Januskinase Jak2	38
3.2.5.....	Megakaryozytäre Zelllinien und Plättchen exprimieren Stat3	40
3.2.6.....	TPO induziert die Aktivierung von Stat1- und Stat3-Komplexen mit DNA	41
3.2.7.....	Untersuchungen zur Serinphosphorylierung von Stat1 und Stat3	46
3.2.8.....	Nachweis der Tyrosinphosphorylierungen von Stat5a und Stat5b	49
3.2.9.....	Dimere von Stat5a und Stat5b binden an DNA	51
3.3.....	Proteinbiochemische Untersuchungen an Plättchen von Patienten	57
3.3.1.....	Thrombozyten von Patienten mit CAMT zeigen keine tyrosinphosphorylierbaren Proteine nach Stimulation mit TPO	57
3.3.2.....	Plättchen von TAR-Patienten zeigen keine Reaktivität auf TPO	60
3.3.3.....	In Plättchen von TAR-Patienten wird Jak2 nach TPO-Stimulation nicht phosphoryliert	62
3.4.....	Untersuchungen zur zytoplasmatischen Domäne von c-mpl bei einem Patienten mit schwerer Thrombozytopenie und Down-Syndrom	63
4.....	Diskussion	66
4.1.....	TPO-induzierte Tyrosinphosphorylierungen von Proteinen in Thrombozyten	66
4.2.....	Die Aktivierung von Stat1 und Stat3 in TPO-stimulierten Thrombozyten	69
4.3.....	Die Aktivierung von Stat5a und Stat5b in TPO-stimulierten Thrombozyten	74
4.4.....	Untersuchungen an Thrombozyten von Patienten	78
4.4.1.....	Patienten mit angeborener amegakaryozytärer Thrombozytopenie (CAMT)	79
4.4.2.....	Untersuchungen an Thrombozyten von TAR-Patienten	80
4.4.3.....	Untersuchungen eines Patienten mit Thrombozytopenie und Down-Syndrom	82
4.5.....	Ausblick	83
5.....	Zusammenfassung	85

Literatur

ABKÜRZUNGEN

α	anti-
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintrisphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CAMT	kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie
CD	cluster of differentiation - Oberflächenantigen
cDNA	komplementäre DNA
c-mpl	TPO-Rezeptor-Gen
c-Mpl	TPO-Rezeptor (= c-mpl-Genprodukt)
cpm	Counts per Minute (Zählrate pro Minute)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i> (Gelshift-Assay)
FACScan	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Scanner
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Foetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Erdbeschleunigung
G α M	Goat-anti-mouse (Ziege-anti-Maus)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IEP	Isoelektrischer Punkt
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Iso-propyl- β -D-thiogalacto(pyrano)sid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KM-MNC	Knochenmark-mononukleäre Zellen
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS mit Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRP	Plättchen-reiches Plasma
PTB	Phosphotyrosin-bindend(e Domäne)
rhTPO	rekombinantes humanes Thrombopoietin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
Rt	Raumtemperatur
RT	reverse Transcriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TAR	<i>thrombocytopenia with absent radii</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPO	Thrombopoietin
TRAP	Thrombin-Rezeptor-Agonist-Peptid
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit - Enzymeinheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumeneinheit

...το γὰρ αὐτὸ νοεῖν ἐστὶν τε καὶ εἶναι .

(...denn dasselbe ist Denken [Erkennen] und Sein)

PARMENIDES, 500 v.Chr.

Das Experiment hat innerhalb der Wissenschaft den Sinn, die Tatsachen in einer Weise festzustellen, die der jeweiligen Situation der Theorie besonders angemessen ist. Das Tatsachenmaterial, der Stoff wird von außen geliefert. Die Wissenschaft besorgt seine klare, übersichtliche Formulierung, so daß man die Kenntnisse handhaben kann, wie man will. Für den Gelehrten ist das Aufnehmen, Umformen, Durchrationalisieren des Tatsachenwissens, gleichviel, ob es sich um ein möglichst eingehendes Darlegen des Stoffes wie in der Historie und den beschreibenden Zweigen anderer Wissenschaften oder um die Zusammenfassung von Datenmassen und das Gewinnen allgemeiner Regeln wie in der Physik handelt, seine besondere Art der Spontaneität, die theoretische Betätigung. Der Dualismus von Denken und Sein, Verstand und Wahrnehmung ist ihm natürlich.

Max HORKHEIMER, *Traditionelle und kritische Theorie*, 1937

Aus Prioritätsgründen wurden Teile der Arbeit bereits veröffentlicht:

G.Strauß, M.Ballmaier, H.Schulze, J:Bogenberger, H.Riehm, K.Welte
"Die Bedeutung von Thrombopoietin (TPO) und seines Rezeptors c-Mpl in der
Regulation der Thrombozytopoese bei Thrombozytopenien"
Klin. Pädiatrie **208** (1996), 168-171

H.Schulze, M.Ballmaier, G.Strauß, K.Welte
"Children with abnormal thrombocytopoiesis (TAR-syndromes, Glanzmann's
thrombasthenia) show differences in thrombopoietin signal transduction"
Klin. Pädiatrie **208**: (1996), 263

M.Ballmaier, H.Schulze, G.Strauß, K.Cherkaoui, N.Wittner, S.Lynen, S.Wolters,
J.Bogenberger, and K.Welte
"Thrombopoietin in Patients with Congenital Thrombocytopenia and Absent Radii:
Elevated Serum Levels, Normal Receptor Expression, But Defective Reactivity to
Thrombopoietin"
Blood **90** Vol. 2 (1997), 612-619

H.Schulze, M.Germeshausen, K.Cherkaoui, M.Cremer, G.Strauß, K.Welte,
M.Ballmaier
"Increased in vitro-reactivity to thrombopoietin of bone marrow mononuclear cells of a
patient suffering from severe thrombocytopenia: a pre-leukemic status?"
Klin. Pädiatrie **209** (1997), 293

M.Ballmaier, H.Schulze, M.Cremer, C.Folman, G.Strauß, K.Welte
"Defective c-Mpl Signaling in the Syndrome of Thrombocytopenia with Absent Radii"
Stem Cells **16** (suppl.2) (1998), 177-184

M.Cremer, H.Schulze, G.Linthorst, C.Folman, S.Wehnert, G.Strauß, A.E.G.K. von
dem Borne, K.Welte, and M.Ballmaier
"Serum levels of thrombopoietin, IL-11 and IL-6 in pediatric thrombocytopenia"
Anal. Hematol, *in press*,

M.Eilers, H.Schulze, K.Welte, M.Ballmaier
"Thrombopoietin acts synergistically on Ca²⁺-mobilization in platelets caused by ADP
or Thrombin Receptor Agonist Peptide (TRAP)"
Biochem. Biophys. Res. Comm. *in press*,

H.Schulze, M.Ballmaier, K.Welte, and M.Germeshausen
"Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b
Homo- and Heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets"
Experimental Hematology, *in Revision*

1. EINLEITUNG

1.1. HÄMATOPOESE

Als Hämatopoese bezeichnet man den zellulären Teilungs- und Reifungsprozeß in den blutbildenden Organen, aus dem die Blutzellen hervorgehen. Beim erwachsenen Menschen findet die Hämatopoese im Knochenmark statt. Da alle Blutzellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen sie fortwährend neu gebildet werden. In dem derzeitigen Modell der Hämatopoese geht man davon aus, daß alle reifen Blutzellen von einer kleinen Population von Stammzellen abstammen. Die Stammzellen werden in einer kurzen Spanne der Embryonalentwicklung gebildet und sind im Stroma des Knochenmarks eingebettet. Sie befinden sich überwiegend in der G_0 -Phase des Zellzyklus und teilen sich entsprechend selten (PORTER-PHARR & OGAWA 1985). Nach einer mitotischen Teilung können zwei neue omnipotente Tochterzellen entstehen oder es erfolgt ein Übergang in die Ausdifferenzierung, bei der letztlich alle Typen von Blutzellen entstehen können (vgl. Abb.1).

Die Benennung von Blut-Vorläuferzellen erfolgt nach *in vitro*-Testsystemen, bei denen aus Knochenmarkzellen in Gegenwart von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren in einem halbfesten Medium Zell-Kolonien wachsen. Dabei werden die einzelnen Zellen, die die Basis für die Kolonie bilden, als *colony-forming units* (CFUs) bezeichnet, die Spezifizierung der CFUs erfolgt über die sich entwickelnde Vielfalt an Zelltypen in der entstehenden Kolonie: z.B. CFU-GEMM, aus der **G**ranulozyten, **E**rythrozyten, **M**onozyten und **M**egakaryozyten hervorgehen.

Innerhalb der Hämatopoese werden zwei Reihen grundlegend unterschieden: zum einen die lymphoide Reihe, in der B- und T-Lymphozyten gebildet werden, und zum anderen die myeloide Reihe, aus der sich Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten entwickeln können. Innerhalb der Granulozyten werden eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten unterschieden.

Die Hämatopoese steht unter der Kontrolle von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die die normale, konstitutive Hämatopoese regulieren, aber auch auf besondere Situationen wie Infektion oder Blutung spezifisch reagieren können.

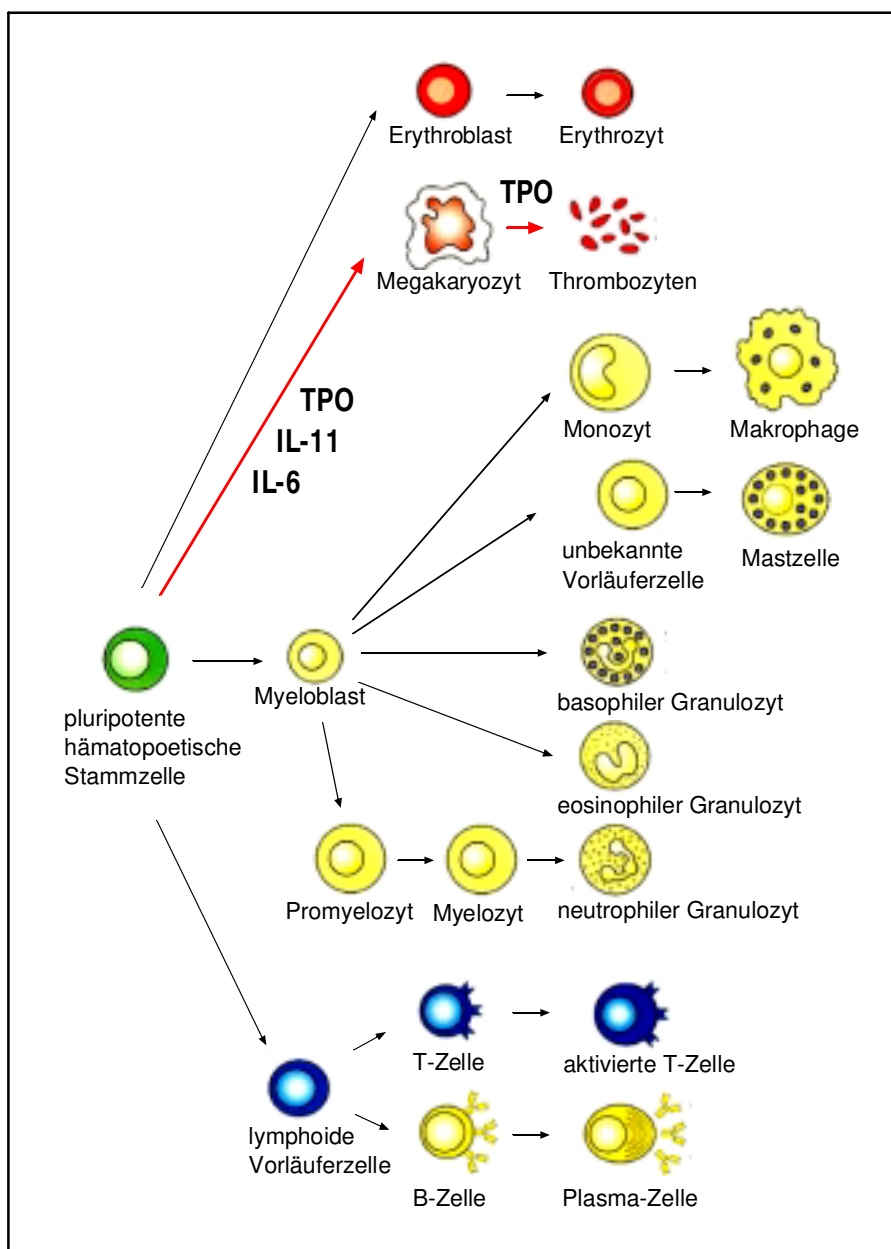


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese. Verändert nach HERBST, A., Dissertation 1998, Universität Hannover

Zu diesen Zytokinen gehören neben zahlreichen Interleukinen auch Kolonie-stimulierende Faktoren (CSFs) und einzelne hämatopoetische Faktoren wie Stammzellfaktor (SCF), Erythropoietin (EPO) und Thrombopoietin (TPO). Die Einteilung der Faktoren und Interleukine ist nicht streng einheitlich und spiegelt oftmals die historische Entdeckung der Faktoren wider: so wird IL-3 auch als Multi-CSF bezeichnet und TPO oder IL-5 könnte man auch als CSFs bezeichnen.

Die Zytokine unterscheiden sich stark in ihrer Spezifität: so ist IL-3 ein pleiotroper Faktor, der die Ausdifferenzierung von allen Zellreihen aus sehr frühen myeloiden

Vorläuferzellen (CFU-GEMM) bewirken kann. EPO dagegen wirkt sehr spezifisch auf die Entwicklung der Erythrozyten. Verschiedene Zytokine mit pleiotroper Wirkung (IL-3, GM-CSF) können die Proliferation von frühen Vorläuferzellen induzieren, die Ausdifferenzierung zu einem bestimmten Blutzelltyp hingegen erfordert zumeist einen spezifischen Wachstumsfaktor für diese Reihe. Fehlt dieser Faktor, so gehen die bereits determinierten Zellen in den programmierten Zelltod über: es kommt zur Apoptose.

Die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wirken aber nicht nur regulierend auf die Zellbildung von der Stammzelle bis zur reifen Blutzelle, sondern können häufig auch die entsprechenden reifen Zellen aktivieren (z.B. G-CSF, IL-5, TPO usw.). Die Stimulation der reifen Zellen konnte u.a. durch Aktivierung von Signalübertragungswegen (siehe auch 1.4.) nachgewiesen werden (z.B. (RAUPRICH *et al.* 1995) für G-CSF oder (MIYAKAWA *et al.* 1995) für TPO).

Proliferation und Differenzierung der Stammzellen im Knochenmark werden auch durch direkten Kontakt mit der "Mikroumgebung" reguliert. So bilden Stromazellen neben löslichen auch Zellmembran-gebundene hämatopoetische Faktoren und Zell-Adhäsionsmoleküle, die als Signale für die Hämatopoese dienen.

1.2. MEGAKARYOPOESE UND THROMBOZYTEN

Die Thrombozyten (Blutplättchen) sind maßgeblich an der zellulären wie plasmatischen Phase der Blutstillung beteiligt. Da sie auch Immunkomplexe und Viruspartikel phagozytieren können (LÖFFLER & PETRIDES 1997), wird ihnen zusätzlich eine Bedeutung bei Immunreaktionen zugeschrieben.

Megakaryozyten entstehen aus diploiden Vorläuferzellen im Knochenmark, wobei die genauen Mechanismen, die die Vorläuferzelle zum Megakaryozyten ausreifen lassen, noch unverstanden sind. Die ersten nachweisbaren megakaryozytären Zellen besitzen etwa die Größe von Lymphozyten und sind in zytochemischen Färbungen Acetylcholinesterase-positiv. Diese Zellen können noch mitotische Zellteilungen durchführen, bevor das Stadium der Endomitose beginnt und sie polyploid werden. In diesem frühen Stadium treten auch die ersten spezifischen Oberflächenantigene auf, die sich zum Teil noch später auf den Thrombozyten befinden.

Wenn Zellen als megakaryozytäre Zellen auch morphologisch erkennbar werden, haben sie zumeist die Fähigkeit der Zellteilung (d.h der Zytokinese) schon verloren, während sich die Zellkerne weiterhin endomitotisch teilen. Der erste Schritt in der Entwicklung der Polyploidie sind die **Megakaryoblasten**. Diese haben verschiedene Größen und Polyploiditätsgrade, hauptsächlich jedoch $4n$, $8n$ und $16n$.

Die reiferen Megakaryoblasten lassen sich deutlich basophil anfärben und werden deshalb auch als **basophile Megakaryozyten** bezeichnet. Sie sind durch eine intensive Entwicklung von Nukleoli und assoziierter RNA-Synthese charakterisiert. Im gesamten zytoplasmatischen Raum sind Polyribosomen verteilt und es findet eine intensive Proteinbiosynthese statt. Während dieser zytoplasmatischen Reifung erreicht der basophile Megakaryozyt seine maximale Ploidität. Die Signale, die zum Abstellen der endomitotischen Replikationsmaschinerie führen, sind bislang unbekannt. Zwei Drittel aller basophilen Megakaryozyten besitzen jetzt eine $16n$ -Ploidität, jeweils ein Sechstel eine $8n$ - bzw. $32n$ -Ploidität.

Im dritten Reifungsstadium geht die basophile Anfärbbarkeit zurück und es entstehen **granuläre Megakaryozyten**, deren Granula lichtmikroskopisch durch azurophile Romanowsky-Färbung sichtbar gemacht werden können. Dieses Stadium repräsentiert die Mehrheit an megakaryozytären Zellen im Knochenmark. Die Proteinbiosynthese bleibt bei frühen granulären Megakaryozyten zunächst bestehen, aber mit Zunahme der Anzahl der Granula und der Größe des Megakaryozyten, verlieren die Polyribosomen immer mehr an Bedeutung.

Die reifen Megakaryozyten nehmen eine amöboide Form an und wandern in die Knochenmarksinusoide. Hier werden Abschnürungen des Zytosols mit Hilfe mikrotubulärer Pseudopodien als **Thrombozyten** an den Blutstrom abgegeben. Jeder Megakaryozyt setzt etwa 2500 Blutplättchen frei. Aber auch vollständig reife Megakaryozyten können in das Sinusoid übergehen und entsprechend im zentralvenösen Blut bzw. in der Lunge gefunden werden. Ob die Freisetzung von Thrombozyten aus Megakaryozyten in der Lunge ein wesentliches Element in der Freisetzung der Blutplättchen in die Peripherie ist, wird noch diskutiert (zur Megakaryopoese siehe CHESTERMAN & PENINGTON 1993).

Thrombozyten haben eine Lebensdauer von 8-12 Tagen, ihre Selbsterhaltung ist durch die Ausstattung mit Enzymen der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs sowie mit Mitochondrien gewährleistet. Plättchen besitzen neben mitochondrialer

DNA auch noch geringe Mengen an stabiler mRNA, so daß Proteinbiosynthese noch stattfinden kann (z.B. Faktor XIII = Fibrin-stabilisierender Faktor; LÖFFLER & PETRIDES, ebd.).

Thrombozyten besitzen drei Arten von Granula: in den **dichten Granula** (*dense granules*) befinden sich neben ADP, ATP, GDP, GTP und Phosphat noch Calcium und Serotonin. Die **α -Granula** enthalten neben plättchen-spezifischen Proteinen (Plättchenfaktor 4, PDGF) auch Plasmaproteine (Blutfaktoren, Kallikrein, Thrombospondin), die zum großen Teil an der Adhäsion von Plättchen an verletztem Subendothel beteiligt sind.

In der Membran der Thrombozyten sind verschiedene Glykoproteine verankert, die für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte verantwortlich sind; andere Glykoproteine werden erst nach Aktivierung der Plättchen auf der Oberfläche nachweisbar und verweisen dann als Marker auf die Degranulation bestimmter Granula (CD62P, CD63).

1.3. THROMBOPOIETIN: TPO

Ein Wachstumsfaktor, der gezielt die Thrombopoese anregt, wurde seit über 30 Jahren postuliert. Auch für die anderen Zellreihen gibt es spezifische Wachstumsfaktoren: so reguliert Erythropoietin (EPO) die Erythropoese und der Granulozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor (G-CSF) fördert gezielt die Bildung von neutrophilen Granulozyten.

Wenn man die verschiedenen Entwicklungsstadien der Megakaryopoese betrachtet, so liegt es nahe, für die Differenzierung von pluripotenten Vorläuferzellen zu Megakaryoblasten und Megakaryozyten einen Wachstumsfaktor anzunehmen, der diese Entwicklung reguliert. Ein solcher Faktor sollte in einem CFU-Assay insbesondere die Differenzierung zu Megakaryozyten erhöhen und wäre nach der Nomenklatur ein Megakaryozyten-Kolonie-stimulierender Faktor: ein Mega-CSF (oder Megapoietin).

Die Freisetzung von Thrombozyten aus Megakaryozyten sollte einem weiteren Faktor obliegen, um auf Schwankungen der Plättchenzahl im Blut schnell reagieren zu können. Ähnlich wie Erythropoietin, das spät in der Regulation der Erythropoese einsetzt, sollte ein *Thrombopoietin* als Wachstumsfaktor gezielt die Plättchen

freisetzung regulieren und für den letzten Teil der Thrombozytogenese verantwortlich sein: der eigentlichen Thrombopoese.

Verschiedene Zytokine sind zwischenzeitlich als Thrombopoetine diskutiert worden: IL-6, IL-11, der *leukemia inhibitory factor* (LIF) sowie der *c-Kit-ligand* (KL) wurden wegen verschiedener Effekte auf die Thrombozytenproduktion als Thrombopoetine vorgeschlagen (für Review: KAUSHANSKY 1995)). Allerdings ergaben selbst toxische Dosen der vermuteten Thrombopoetine nicht die erhofften Erhöhungen der Thrombozytenzahl im peripheren Blut (ZEIDLER *et al.* 1992). Weiterhin korrelierten die Serumspiegel nicht mit der Plättchenzahl, was für einen Regulator der Thrombopoese gelten sollte.

Erst 1990 gab es einen ersten Erfolg: Untersuchungen von SOUYRI *et al.* zum **Myeloproliferativen Leukämie-Virus** (MPLV) - einem murinen Retrovirus, das Knochenmark infizieren kann - ergaben, daß dieses Virus Teile eines zellulären Protoonkogens (*c-mpl*) in das Gen seines Hüllproteins transduziert hatte (SOUYRI *et al.* 1990). Das *c-mpl*-Gen kodiert für ein Oberflächenprotein, das eine Homologie zu der Superfamilie der hämatopoetischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren aufwies, insbesondere zu den Rezeptoren von G-CSF und EPO. Die Expression des humanen *c-mpl*-Gens ist in hohem Maße auf Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen, Blutplättchen, CD 34⁺-Vorläuferzellen in der foetalen Leber bzw. im adulten Knochenmark beschränkt.

Der Einsatz von anti-sense-Oligonukleotiden gegen *c-mpl* hatte in Kolonieformierenden-Assays weder Einfluß auf die Erythropoese noch auf die Granulozytopoese, sondern einzig auf die Megakaryopoese (METHIA *et al.* 1993).

Erst Mitte 1994 wurde der Ligand von vier unabhängigen Gruppen aufgereinigt und kloniert (DESAUVAGE *et al.* 1994; BARTLEY *et al.* 1994, *et al.* 1994, LOK *et al.* 1994; KUTER *et al.* 1994) und liegt inzwischen als rekombinantes humanes Thrombopoietin (rhTPO) vor.

Thrombopoietin hat verglichen mit anderen Zytokinen eine eher ungewöhnliche Struktur: es ist mit über 300 Aminosäuren (und verschiedenen Spleißvarianten) relativ lang. Die N-terminale Domäne hat eine hohe Homologie zu Erythropoietin und wird auch als EPO-Domäne bezeichnet. Am Ende dieser Domäne befinden sich zwei benachbarte Arginine, die als potentielle Spaltstelle diskutiert worden sind, jedoch konnte bisher keine biologische Spaltungsaktivität nachgewiesen werden.

Nach den beiden Argininresten folgt eine 18 Aminosäuren-lange Domäne, die eine hohe O-Glykosylierung aufweist und vermutlich für die Halbwertszeit der biologischen Aktivität von TPO eine sehr wichtige Rolle spielt (FOSTER 1995). Die C-terminale Domäne weist verschiedene O- und N-Glykosylierungsstellen auf, die weitere Funktion dieser Domäne ist aber noch unklar.

Die cDNA für Thrombopoietin kodiert für ein 35 kDa-Protein, während das Molekulargewicht des natürlichen TPO aber ca. 70 kDa ist, was auf eine starke Glykosylierung schließen läßt.

Das TPO-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosomen 3 lokalisiert: 3q26 - 3q27. Es umfaßt fünf Exons, deren flankierende Nukleotidsequenzen ein hohes Alignment mit denen der fünf Exons des Erythropoietin-Gens aufweisen. Vermutlich existieren aber noch ein oder zwei Exons in der 5'-nicht-codierenden Region (KAUSHANSKY 1995).

TPO wirkt auf Megakaryozyten (z.B. durch Veränderung ihrer Ploidität) und vermittelt in einem gesteigerten Maß die Oberflächenexpression von CD41 (gpIIb/IIIa-Komplex) auf kultivierten CD34⁺-Vorläuferzellen. Inzwischen ist gezeigt worden, daß TPO auch eine Bedeutung als früher hämatopoetischer Wachstumsfaktor zukommt (SOLAR *et al.* 1998). Da TPO allein das Wachstum von Megakaryozyten-Kolonien im CFU-Assay bewirken kann (DESAUVAGE *et al.* 1994; LOK *et al.* 1994), wird es auch als ein Mega-CSF angesehen.

TPO stimuliert die Bildung von reifen Thrombozyten in *in vitro*-Assays (ZEIGLER *et al.* 1994) und führt zu einer drastischen Steigerung der Plättchenzahl in Versuchstieren (FARESE *et al.* 1995; ULICH *et al.* 1995).

1.4. DER TPO-REZEPTOR: c-MPL

1990 wurde ein virales Onkogen v-Mpl als ein trunkierter Zytokinrezeptor beschrieben (SOUYRI *et al.* 1990). Die cDNA für das homologe humane c-Mpl wurde 1992 kloniert (VIGON *et al.* 1992) und aufgrund von Homologien als Mitglied in die hämatopoetischen Zytokinrezeptor-Superfamilie eingeordnet.

Das Protein besteht aus einer einzigen transmembranen Polypeptidkette. Zunächst sind zwei verschiedene Spleißvarianten des Rezeptors beschrieben worden (ebd.): Mpl-P und Mpl-K, die sich nur im C-terminalen, zytoplasmatischen Bereich des

Proteins unterscheiden. Der extrazytoplasmatische Bereich des Rezeptors besteht aus 463 Aminosäuren, die sich in zwei ca. gleich große Domänen einteilen lassen. Jede Domäne weist vier Cysteinreste in einem charakteristischem Abstand auf, 14 β -Stränge sowie ein C-terminales WSXWS-Motiv. Diese Domäne ist inzwischen in mehr als 20 verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. EPO, G-CSF, Prolactin sowie verschiedene Interleukine) nachgewiesen worden und wird auch als *cytokine-receptor-homology*-Domäne (CRH-Domäne) bezeichnet. Das WSXWS-Motiv scheint für die Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden verantwortlich zu sein (BAZAN 1990; KISHIMOTO *et al.* 1994).

Der transmembrane Bereich des c-Mpl-Proteins umfaßt 22 Aminosäuren. Die beiden Spleißvarianten unterscheiden sich auf der zytoplasmatischen Seite nach neun gemeinsamen Aminosäuren: das kürzere Mpl-K-Protein besitzt in den folgenden 66 Aminosäuren einen hohen Anteil an Prolin (12%), während die Hauptform, das c-Mpl-P-Protein, einen hohen Anteil an Prolin und Serin aufweist (12%, 11,5%). Auch die bei Zytokinrezeptoren weit verbreiteten *Box1*- und *Box2*-Motive, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen, sind für c-Mpl gefunden worden (BAUMANN *et al.* 1994).

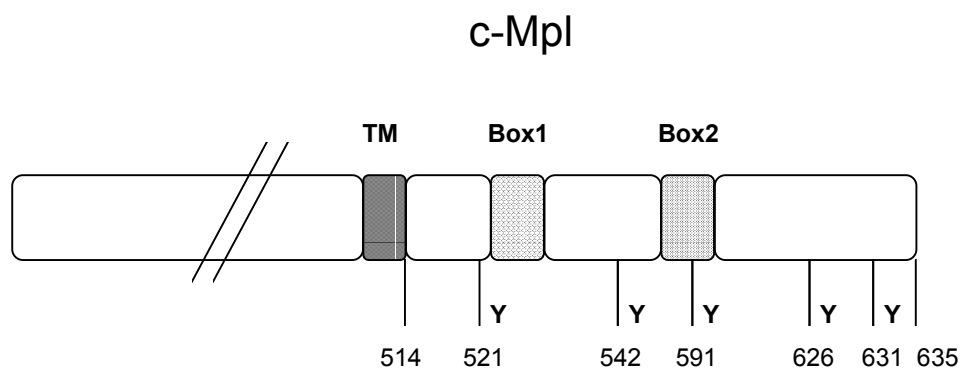


Abb. 2: Struktur der zytoplasmatischen Domäne des c-Mpl-(P)-Proteins. Der Rezeptor besitzt zwei homologe Motive, die als *Box1* und *Box2* bezeichnet werden und eine wichtige Rolle bei der Transduktion proliferativer Signale spielen. Die zytoplasmatische Domäne besitzt außerdem 5 Tyrosinreste, deren Position in der Abbildung angegeben ist.

Inzwischen wurden weitere Spleißvarianten des Rezeptors beschrieben (KILADJIAN *et al.* 1995), darunter auch eine lösliche Form Mpl-S, deren physiologische Funktion noch unklar ist. Die Expression des Rezeptors ist auf die Zellen der megakaryo

zytären Reihe der Hämatopoese beschränkt. Die errechneten Molekulargewichte für das unglykosylierte Protein betragen 65 kDa für c-Mpl-K und 71 kDa für c-Mpl-P (VIGON *et al.* 1992).

1.5. SIGNALTRANSDUKTION DES TPO-REZEPTORS

Damit die Homöostase eines komplexen Lebewesens aufrecht erhalten werden kann, müssen Zellen mit anderen Zellen kommunizieren können. Dazu sind während der Evolution verschiedene Systeme wie Hormone, die Übertragung von Nervenimpulsen an Synapsen oder ein direkter Zell-Zell-Kontakt mittels Adhäsionsmolekülen entstanden. Um ein Signal sehr schnell und mit sparsamen Mitteln sehr vielen Zellen mitteilen zu können, hat sich bei der Kommunikation mittels Hormonen - zu denen die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren im weitesten Sinne gezählt werden können - ein System durchgesetzt, bei dem der eigentliche (erste) Botenstoff nicht in die Zielzelle eindringt, sondern das Signal mittels hochspezifischer und hochaffiner Rezeptoren für das Hormon mittels **second messenger** an das Zellinnere weitergibt. Sehr häufig werden dabei Proteine kaskadenartig aktiviert oder inaktiviert, indem Phosphatgruppen von ATP durch Kinasen auf Proteine übertragen werden oder durch Phosphatasen vom Protein abgespalten werden. Der Rezeptor c-Mpl besitzt im Gegensatz zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen keine intrinsische Kinaseaktivität, vermittelt aber dennoch - wie alle Mitglieder der Zytokinrezeptor-Superfamilie - nach Bindung des Liganden eine Reihe von intrazellulären Phosphorylierungen. OHASHI *et al.* zeigten an der rekombinanten Zelllinie FDCP, daß es nach Stimulation mit TPO zu Tyrosinphosphorylierungen von Shc, SH-PTP2, Jak2, Tyk2, Vav, Cbl, Stat3 und Stat5 (OHASHI *et al.* 1995) kommt. DRACHMAN *et al.* konnten zeigen, daß es in der BaF3-Zelllinie, die mit dem murinen c-Mpl transfiziert ist, auch zur Phosphorylierung des Rezeptors selber kommt (DRACHMAN *et al.* 1995).

In welcher Form das Signal in den ersten Schritten der Signalkaskade transduziert wird, ist aber weiterhin unbekannt. Vermutlich wird zunächst ein Mitglied der Janus-Kinase-Familie (Jak2) an den Rezeptor gebunden und an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Substrate der aktivierten Janus-Kinasen sind die Stat-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*), die ebenfalls an Tyrosinen phosphoryliert werden. Stat-Proteine besitzen außerdem eine SH2-Domäne, die Bindungen an

tyrosinphosphorylierte Proteine ausbilden kann. Auf diese Weise können phosphorylierte Stat-Proteine homo- oder heterodimerisieren.

Die Stat-Dimere translozieren in den Kern und können dort als Transkriptionsfaktoren die Transkription von Genen induzieren (vgl. Abb.3).

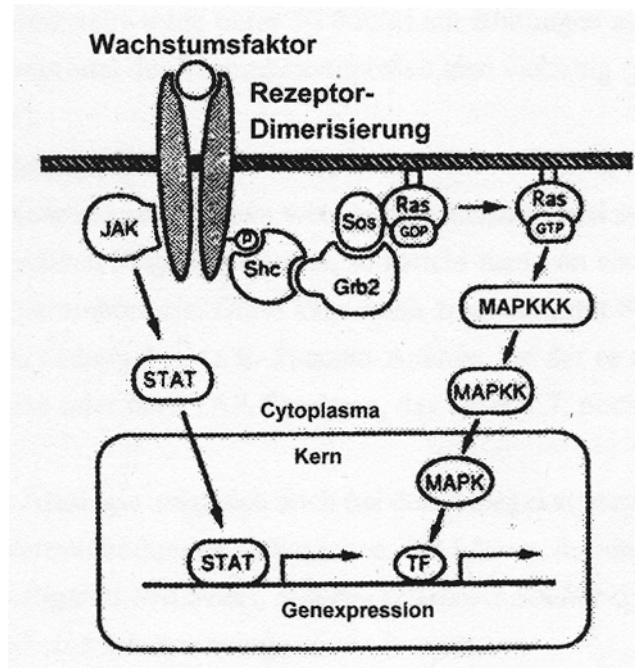


Abb.3: Modell für zwei Signalübertragungswege von Zytokinrezeptoren (entnommen: SCHULZE, Diplomarbeit 1996)

Neben dem Jak-Stat-Signalübertragungsweg, kann es zur Aktivierung eines weiteren Wegs kommen. Nach Phosphorylierung des Rezeptors kann Shc als Adaptermolekül über eine SH2-Domäne an den Rezeptor binden und auf diese Weise die Assoziation weiterer Proteine an den Rezeptor vermitteln (Grb2, Sos). Sos kann als Guaninnukleotid-Freisetzungsfaktor GDP von dem Protoonkogen Ras freisetzen, so daß Ras durch anschließende Bindung von GTP aktiviert wird.

Ras ist das Schlüsselprotein des Mitogen-Aktivierendes Protein (MAP)-Kinase-Signalübertragungswegs: Es initiiert eine Kaskade von Phosphorylierungen: die Serin/Threonin-Kinase MAPKKK (=Raf im Fall der RTKs), die Tyrosin/Threoninkinase MAPKK (=MEK) und die Serin/Threonin-Kinase MAPK, die nach Translokation in den Nukleus einige Transkriptionsfaktoren phosphorylieren kann (z.B. Jun/Fos) und so zur Transkription von Genen führt.

Inwieweit die beiden Signalübertragungswege sich den Phänomenen Proliferation und Differenzierung von Zellen zuordnen lassen, ist erst in Ansätzen geklärt.

1.6. THROMBOZYTOPENIEN

Die Normwerte von Thrombozyten im peripheren Blut liegen bei gesunden Personen zwischen 150 -400.000/ μ l. Sinkt die Zahl der Thrombozyten unter 100 - 150.000/ μ l, so spricht man von Thrombozytopenien, wobei erst bei Thrombozytenzahlen unter 30.000/ μ l mit Blutungen zu rechnen ist.

Hinsichtlich der Ursache unterscheidet man (BEGEMANN & RASTETTER 1993):

1. Angeborene (kongenitale) Thrombozytopenien

Sofern in Knochenmarksausstrichen, durch die fehlende oder unzureichende Megakaryopoese bedingt, wenige oder keine Megakaryozyten vorliegen, spricht man von einer Amegakaryozytären Thrombozytopenie. Diese kann isoliert vorliegen (CAMT, siehe 1.7.) oder zusätzlich mit Skelettanomalien oder anderen Mißbildungen einhergehen (z.B. dem beidseitigen Fehlen beider Speichen = TAR-Syndrom, das unter 1.7. noch näher beschrieben wird).

Andere angeborene Thrombozytopenien sind durch eine Vielfältigkeit der Ätiologie gekennzeichnet. Sie können dominant (*May-Hegglin-Anomalie*, *Sebastian-Platelet-Syndrom*), rezessiv (*Bernard-Soulier-Syndrom*) oder X-chromosomal (*Wiskott-Aldrich-Syndrom*, *X-linked thrombocytopenia*) vererbt werden.

2. Erworbene Thrombozytopenien:

a) Nichtimmunologische Ursachen

Auch einige erworbene Thrombopenien zeigen eine reduzierte oder ineffektive Megakaryozytopoese. Diese kann z.B. durch bestimmte Medikamente, organische Lösungsmittel oder ionisierende Strahlung verursacht sein. Ebenso können Vitamin B₁₂- oder Folsäuremangel sowie Splenomegalie oder lokale Thrombusbildung zu einer erworbenen Thrombozytopenie führen.

Die nichtimmunologische Thrombozytopenie kann auch Begleitphänomen einer allgemeinen Infektionskrankheit oder einer aplastischen Anämie sein. Sie kann aber auch durch verdrängende Systemerkrankungen entstehen (z.B. bei einer Leukämie) oder bei einer Verbrauchskoagulopathie auftreten. Daneben werden bestimmte

klinische Syndrome wie die Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) oder das Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) zu den möglichen Ursachen für nicht-immunologische Thrombozytopenien gezählt.

b) Immunologisch bedingte Thrombozytopenien

Alloantikörper gegen Thrombozyten können bei einer Bluttransfusion oder bei einer Schwangerschaft auftreten, allergisch induzierte Antikörper können z.B. nach Verabreichung verschiedener Medikamente auftreten.

Autoantikörper werden beim systemischen Lupus erythematodes (SLE), bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) oder bei der idiopathischen Thrombozytopenie (ITP) - der häufigsten Form der Thrombozytopenie - gebildet.

1.7. TAR-SYNDROM UND KONGENITALE AMEGAKARYOZYTÄRE THROMBOZYTOPENIE (CAMT)

Die erste klinische Beschreibung einer Thrombozytopenie mit einer beidseitigen Aplasie der Radien erfolgte 1929 durch Greenwald (GREENWALD & SHERMAN 1929). Die Assoziation der Symptome zum TAR-Syndrom (*thrombocytopenia with absent radii*) erfolgte aber erst 1969 durch Hall (HALL *et al.* 1969). Inzwischen sind mehr als hundert Fälle beschrieben. Zusätzlich zur Radiusaplasie können noch weitere Fehlfunktionen wie Herzfehler oder Nierenanomalien auftreten.

Die Blutungsneigung ist bei Neugeborenen manifest, die Thrombozytenfunktion ist eingeschränkt. Das Knochenmark von Patienten ist amegakaryozytär oder besitzt abnorme Megakaryozyten, die Myelopoese ist hyperplastisch. Das TAR-Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Pathogenese tritt etwa ab der 6.-8. Schwangerschaftswoche auf. 70% der Kinder überleben das erste Jahr und haben danach eine weitestgehend normale Lebenserwartung.

Die kongenitale Amegakaryozytäre Thrombozytopenie ist eine isolierte angeborene, schwere Thrombozytopenie mit unzureichenden Megakaryozyten im Knochenmark. Die CAMT geht sehr häufig nach vier bis acht Jahren in eine allgemeine aplastische Anämie über, die dann nur noch kurativ durch eine Knochenmarktransplantation behandelt werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1. CHEMIKALIEN

Alle Chemikalien wurden - soweit nicht anders vermerkt - von Merck, Darmstadt im höchsten Reinheitsgrad bezogen.

ADP	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Gibco BRL
Aprotinin	Sigma
Apyrase (Grad VIII aus Kartoffeln)	Sigma
Acetylsalicylsäure (ASS)	Sigma
Bisacrylamid	Kodak
bovines Thrombin	Behring
Bromphenolblau	Fluka
BSA (Fraktion V)	Sigma
DEPC	Fluka
ECL-Detektionskit	Amersham
EGTA	Sigma
Ethanol absolut	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
HEPES	Seromed
Leupeptin	Sigma
Marker VI (DNA-Standard)	Roche Diagnostics
NaCl - physiolog. Lösung	Fresenius
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Prostaglandin E1	Sigma
Protein A-Agarose	Upstate Biotechnology Inc.
Proteinbestimmungs kit	Biorad, München
RNAzol-B	WAK-Chemie
TPO	Kirin Brewery, Japan
TRAP (SFLNLR)	Bachem
Tris-Base, Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Serva
Tween-20	Biorad

2.1.2. ANTIKÖRPER

Kaninchen - α -Cbl	Santa Cruz
Kaninchen - α -CrkL	Santa Cruz
Kaninchen - α -Maus-Ig, FITC-gekoppelt	Immunotech

Kaninchen - α -Maus, HRP-gekoppelt	Immunotech
Kaninchen - α -Stat1 α/β (Klon E-23)	Santa Cruz
Kaninchen - α -Stat1 α (Klon C-24)	Santa Cruz
Kaninchen - α -Stat3	Santa Cruz
Kaninchen - α -Stat5a	Santa Cruz
Kaninchen - α -Vav	Santa Cruz
Maus - α -CD 41, PE-gekoppelt	Immunotech - Klon: P2
Maus - α -CD 62P, FITC-gekoppelt	Immunotech - Klon: CLB-Thromb/6
Maus - α -c-Mpl	Genzyme
Maus - α -ERK2	Santa Cruz
Maus - α -phospho-ERK	Santa Cruz
Maus - α -Stat5b	New England Biolabs
Maus - IgG1 - Isotypkontrolle	Immunotech - Klon: 679.1Mc7
rekombinanter α -Tyrosinphosphat	Transduction Laboratories
Schwein- α -Kaninchen Ig, HRP-gekoppelt	Immunotech
Ziege- α -Maus-Ig, PE-gekoppelt	Immunotech
Ziege- α -Maus-Ig, HRP-gekoppelt	Immunotech

2.2. HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer):

137 mM	NaCl	
2,7 mM	KCl	
10 mM	Na ₂ HPO ₄ ,	pH 7,2
5,5 mM	KH ₂ PO ₄	

Tris-Borat-EDTA-(TBE-)Puffer - für die Molekularbiologie

89 mM	Tris-HCl	pH 8,3
89 mM	Borsäure	
2,5 mM	EDTA	

Tris-Borat-EDTA (TBE-)Puffer - für Gelretardationsassays (EMSA)

100 mM	Tris-Base
100 mM	Borsäure
2 mM	EDTA

2.3. VERWENDETE DNA-SEQUENZEN UND ZELLINIEN

2.3.1. PRIMER

MPL5	5' GGA ATG GTT GGC AAT GTG GGT GGT (Mpl-P)	rv Exon 12
MPL6	5' TGT AAG GAG CCG CGG CGA GTC (Mpl-K)	rv Intron 10
MPL7	5' GGA GTC CTG AGA TGA GGC AGC TTC C	rv Exon 5
MPL8	5' AGG GAG ATC CCA TCA GGT TCG C	rv Exon 5
MPL9	5' GGA GAA GGC CAT CAG GAC TGG AAG G	fw Exon 8
MPL10	5' TGT AAA CGG TAG CGA GAT CGC GG	rv Exon 9

MPL11	5' GAG ATC TCC AGT GGG CAT CTG G	fw Exon 8
MPL12	5' CAG GTA TCT GAG ACT GTG GC	rv Exon 11
MPL13	5' GCT CTG TCC AGG GAA CTG GG	rv Exon 12
MPL14	5' AGC TGC GCG CCA GGC TCA AC	fw Exon 9
MPL15	5' CAG TTT CCT GCA CAC TAC AG	fw Exon 10
MPL16	5' GTC TGC TTC TCT TCC TTC TC	fw Intron 10
MPL17	5' CTG CTT TAA TCC AGC GCC TC	fw Intron 11
MPL18	5' GGC AGG GTT GGT GGT GGG CA	rv Intron 11
MPL19	5' GGC CAC CGC ACG CTT CTT TG	fw Intron 8
MPL20	5' TCC ACC GCC AGT CTC CTG CC	rv Intron 10
MPL21	5' CTC GTG GTC GGA CCC AAC TAG	fw Intron 8
MPL22	5' GTT TAC ACC GGT TCG GCT CCA C	rv Intron 10
MPL23	5' ATC TCC TTG GTG ACC	fw Intron 8
MPL24	5' AGA TCT GGG GTC ACA CAG AG	rv Intron 10
ACT3	5' TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG	
ACT4	5' GAT CTC CTT CTG CAT CCT GTC GGC	

2.3.2. RESPONSIBLE dsDNA-ELEMENTE

m67	5' TTCATTTCCCGTAAATCCCTA
S5RE	5' TTTCTAGGAATT

2.3.3. VERWENDETE ZELLINIEN

Dami	humane megakaryozytäre Leukämiezelllinie
HEL	humane Erythroleukämie
HL-60	humane myelomonozytäre Leukämiezelllinie
K562	humane Erythroleukämie
M-07e	humane megakaryozytäre Leukämiezelllinie
MHH-255	humane megakaryozytäre Leukämiezelllinie
U937	humane monozytäre Leukämiezelllinie

2.4. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SIGNALTRANSDUKTION

2.4.1. ISOLATION UND STIMULATION DER THROMBOZYTEN

Die Isolierung von Thrombozyten aus Vollblut und die Stimulation mit rhTPO wurde weitgehend wie beschrieben (MIYAKAWA *et al.* 1995) durchgeführt. Dazu wird dem Spender Blut in 3-ml Citratmonovetten abgenommen und diese werden 20 min bei 200 g zentrifugiert. Das Plättchen-reiche Plasma (PRP, obere Phase) wird vorsichtig abgenommen, um mechanischen Streß und eine Kontamination mit weißen oder roten Blutzellen zu vermeiden.

Zur Verhinderung der Aggregation und Degranulation der Plättchen wird jeweils 1 ml PRP mit 167 µl einer vorgewärmten (37°C) Acetylsalicylsäurelösung maximaler Lösbarkeit (2,5 g/l = final 2µM) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar nach Zugabe von 1,1 µl einer Prostaglandin E₁-Stammlösung in absolutem Ethanol (1 mM = final 1µM) werden die Plättchen für 10 min bei 800 g zu einem weichen Pellet zentrifugiert.

Das Pellet wird einmal mit 1 ml eines modifizierten Hepes-Tyrode-Puffer (+ 20 U/ml Apyrase) gewaschen und anschließend in rekalkifiziertem (final = 1mM) Hepes-Tyrode-Puffer (mit Apyrase) resuspendiert, so daß die Plättchenkonzentration $1 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^9$ Plättchen/ml beträgt. Beim Gesundspender wird das Pellet in ca. 500µl Puffer resuspendiert.

Hepes-Tyrode-Puffer (MIYAKAWA, 1995)

10 mM	HEPES
129 mM	NaCl
8,9 mM	NaHCO ₃
0,8 mM	KH ₂ PO ₄
0,8 mM	MgCl ₂
5,6 mM	Glucose
(1mM	CaCl ₂)

Die Stimulationsexperimente werden unmittelbar nach dem Resuspendieren durchgeführt

Werden größere Mengen Blut abgenommen, so werden alle resuspendierten Plättchen gesammelt und pro Ansatz 60-75 µl (entsprechend $2 \cdot 3 \cdot 10^7$ Thrombozyten pro Spur im Totallysat sowie ca. $5 \cdot 10^7$ Thrombozyten bei der Immunpräzipitation) der Suspension eingesetzt.

Die Stimulation wird durch Zugabe von einem Volumen 2x-Probenpuffer beendet. Wenn nicht anders beschrieben, findet eine Stimulation mit einer finalen Konzentration von 250 ng/ml TPO statt.

2x-Probenpuffer (MIYAKAWA, 1995)

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

2.4.2. SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (LAEMMLI, 1970)

Zur Auftrennung der Proteine wird ein diskontinuierliches Gelsystem (modifiziert nach (LAEMMLI 1970)) verwendet. Um Moleküle zwischen 30 und 250 kDa auftrennen zu können, wird ein 7,5%iges Trenngel eingesetzt.

Die Gele werden als 14cm breite und 1,5 mm dicke Flachbettgele gegossen, wobei das Trenngel 10-11 cm, das Sammelgel 3-4 cm lang ist.

Alle Proben werden mit einem Volumen 2x-Probenpuffer versetzt, für 5 min gekocht und anschließend mit Hilfe einer Spritze in die Probentaschen des Kamms pipettiert. Bis die Proben das Trenngel erreicht haben, wird eine Spannung von ca. 80 V angelegt. Zur Auftrennung der Proteine wird eine konstante Spannung von 180 V bei Gellauf tagsüber bzw. von 40-50 V bei einem Gellauf über Nacht angelegt. Die

Elektrophorese wird beendet, wenn die Bande des Frontmarkers (Bromphenolblau) den unteren Rand des Trenngels erreicht hat.

Die Molekulargewichtszuordnung erfolgt durch Verwendung von Molekulargewichtsstandards (high range, Sigma).

Die Proteine werden entweder direkt mit Coomassie gefärbt oder im Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Trenngel (7,5%)

375 mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS
7,5% (w/v)	Acrylamid
0,2% (w/v)	Bisacrylamid
0,08% (w/v)	APS
0,2% (v/v)	TEMED

Sammelgel (3%)

125mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS
3% (w/v)	Acrylamid
0,08 % (w/v)	Bisacrylamid
0,04% (w/v)	APS
0,07% (v/v)	TEMED

Elektrodenpuffer

25 mM	Tris-Base; pH 8,3-8,5
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

2.4.3. WESTERN-BLOTTING (SEMI-DRY) (TOWBIN *et al.* 1979)

Als Blotapparatur dienen Semi-Dry-Blotkammern von Sartorius und Hoefer. Die Kathoden- und Anodenplatten werden mit bidestilliertem Wasser gespült. Die zugeschnittenen Filterpapiere (Schleicher & Schuell, Dassel) werden in Transferpuffer äquilibriert. Die Blotting-Membran (Nitrocellulose, Satorius, Göttingen) wird 5 min in Wasser und anschließend 5 min in Transferpuffer äquilibriert.

15 Filterpapiere werden auf die Anodenplatte gelegt, darauf die Nitrocellulosemembran und darüber das Gel. Dabei ist es wichtig, Luftblasen zu vermeiden. Auf das Gel kommen wieder 15 Filterpapiere und abschließend die feuchte Anodenplatte.

Transfer-Puffer

48 mM	Tris-Base; pH 8,9-9,3
39 mM	Glycin
0,0375% (w/v)	SDS

2.4.3.1. Ponceau-Färbung

Die geblotteten Proteine können auf der Nitrocellulosemembran durch Färbung mit einer Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt werden. Der Blot wird durch den Blockingpuffer entfärbt.

Ponceau-Färbelösung

0,1% (w/v)	Ponceau S
5% (v/v)	HAc

2.4.3.2 Immunologische Färbung

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Membran, wird der Blot für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (PBS-T, 1% BSA) inkubiert. Der erste Antikörper wird in einer entsprechenden Verdünnung in Blockingpuffer über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Der Blot wird am nächsten Tag zweimal kurz mit PBS-T gespült. Anschließend wird einmal für 15 min und dreimal für fünf min mit PBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Der sekundäre, Peroxidase (HRP)-konjugierte Antikörper wird nach dem Waschen für 1-2 Stunden auf einem Rüttler bei RT inkubiert. Er wird in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Im Fall des rekombinanten Anti-Tyrosinphosphat-Antikörpers, der direkt Peroxidase (HRP)-konjugiert ist, wird das Waschen nach der Antikörperinkubation sowie die zweite Antikörperinkubation weggelassen.

Die Detektion erfolgt über verstärkte Chemolumineszenz (ECL = *enhanced chemoluminescence*) mittels einer Reaktionslösung nach Angaben des Herstellers (Amersham, Braunschweig). Es wird einmal für 15 min und viermal für fünf min mit PBS-T gewaschen. Die Membran wird aus der Waschlösung entnommen und eine Minute in der Detektionslösung inkubiert. Anschließend wird die Membran in Folie eingelegt. Die Exposition erfolgt in einer Kassette mit den Filmen Cronex-4 oder Microvision C (beide Du Pont, Bad Homburg) für 5 Sekunden bis zu zwei Stunden, die Röntgenfilme werden in der Röntgenabteilung der Kinderklinik der MHH entwickelt.

2.4.3.3. Mehrfaches Detektieren mit Antikörpern

Zur wiederholten Detektion einer Membran mit verschiedenen Antikörpern müssen erst alle gebundenen Antikörper von der Membran entfernt werden. Dazu wird der Blot nach der Detektion direkt mit Stripping-Puffer versetzt und für 30 min bei 50°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Strippingpuffer:

100 mM	2-Mercaptoethanol (2-MESH)
2% (w/v)	SDS
62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,7

Kann die Membran nicht direkt ge"strippt" werden, so wird sie mit PBS-T in Folie eingeschweißt und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert.

Nach der Inkubation wird die Membran zweimal kurz mit PBS-T gespült und dann zweimal für 10-15 min mit einem großen Volumen PBS-T gewaschen. Anschließend wird der Blot für eine Stunde bei Rt mit Blocking-Puffer inkubiert und dann erneut mit Antikörper(n) detektiert.

2.4.4. IMMUNPRÄZIPITATION

Die Immunpräzipitation dient der Aufreinigung von spezifischen Proteinen z.B. aus Zellen oder biologischem Material. Dazu nutzt man die Affinität von Antikörpern zu ihren Antigenen aus. Da jeder Antikörper zwei Antigen-bindende Domänen besitzt (Fab-Domänen) kommt es zu einer Kreuzvernetzung und der Ausbildung eines größeren Antigen-Antikörper-Komplexes. Die Ausbildung dieses Komplexes läßt nur relativ geringe Schwankungen in den Konzentrationen von Antigen und Antikörper zu (bei Überschuß einer Substanz kommt es nicht mehr zu einer Präzipitation des Komplexes), daher kann das Präzipitieren durch Zugabe von Protein A-Agarose-Beads erleichtert werden.

Protein A ist ein bakterielles Protein, das die Fc-Domäne von vielen Antikörpern binden kann. Durch Konjugation mit Agarose-Beads können die so gebundenen (*captured* = gefangenen) Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zentrifugation isoliert werden. Bei der Immunpräzipitation werden außer den Antikörper-gebundenen Proteinen zumeist noch weitere Proteine co-präzipitiert. Diese Proteine haben dann in der Regel affine Protein-Protein-Interaktionen mit dem zu präzipitierenden Antigen in der Zelle ausgebildet. Da diese Interaktionen unter anderem von dem Phosphorylierungsgrad des primären Antigens abhängen, können durch Nachweis der co-präzipitierten Proteine weitere Schlüsse auf die Signaltransduktion erfolgen.

Zur Immunpräzipitation werden die Plättchen genauso behandelt wie unter 2.4.1. (Isolation und Stimulation der Plättchen) beschrieben. Die Stimulation wird aber nicht durch 2x-Probenpuffer, sondern durch Zugabe von 1 Vol. Lysis-Puffer beendet.

Lysis-Puffer

15 mM	HEPES
150 mM	NaCl
1 mM	PMSF
10 mM	EGTA
1 mM	Natriumvanadat
0,8 µg/ml	Leupeptin
2% (v/w)	Triton X-100

pH 7,4

Nach 20 min auf Eis werden die Lysate für 20 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 h mit Protein A-Agarose-beads inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wird der Überstand wieder in ein neues Gefäß überführt und für 2 Stunden oder über Nacht mit dem Antikörper präzipitiert. Die Antigen-Antikörper-Immunkomplexe werden für 2 Stunden oder über Nacht durch Zufügen von 100 µl Protein A-Agarose-Beads "gefangen".

Die Beads werden anschließend dreimal mit je 800 µl eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen.

RIPA-Puffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
1%	NP-40
0,25%	Natrumdesoxycholat
150 mM	NaCl
1 mM	EGTA
1 mM	PMSF
1 µg/ml	Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin
1 mM	Natriumvanadat
1 mM	NaF

Zur Auftrennung der Immunpräzipitation in einer SDS-PAGE (siehe 2.4.1) werden die Beads mit 50 µl 2x-Probenpuffer versehen und für 5 min gekocht. Nach kurzem Anzentrifugieren kann der Überstand auf das Gel aufgetragen oder bei -20°C weggefroren werden.

2.4.5. ELEKTROPHORETISCHER GELRETARDATIONSASSAY (EMSA)

Die Plättchenstimulation wird durch ein kurzes Abzentrifugieren (30 Sekunden bei 2000 g) beendet und das weiche Pellet wird nach dem Entfernen des Überstands in einem kleinen Volumen EMSA Lysepuffer gelöst. Die Lysate werden 20 Minuten auf Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand bis zum Experiment bei -20 °C gelagert.

EMSA-Lysepuffer

10 mM	Tris-HCl, pH 7,05
50 mM	NaCl
30 mM	Natriumpyrophosphat
50 mM	NaF
5 µM	ZnCl ₂
100 µM	Na ₃ VO ₄
1 % (v/v)	Triton X-100
je 2,5 µg/ml	Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A
5 U /ml	α2-Makroglobulin
0,15 mM	Benzamidin
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

In der Bindereaktion werden jeweils 10 µg Protein der hergestellten Lysate aus unstimulierten bzw. mit TPO stimulierten Plättchen für 30 Minuten mit dem radioaktiven Oligonukleotid in einem Bindepuffer bei Raumtemperatur inkubiert.

EMSA-Bindepuffer

10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	Dithiothreitol (DTT)
0,05 %	Trockenmilchpulver (Glücksklee, Deutschland)
5 % (v/v)	Glycerol
40 µg / ml	Poly (dl;dC), poly (dl;dC) (Pharmacia, Freiburg)

Supershift-Experimente erfolgen durch zusätzliche Zugabe von (wenn nicht anders angegeben) 1 µg des jeweiligen Antikörpers oder BSA zur Bindereaktion. Anschließend werden pro Ansatz ca. 25000 cpm der 5'-³²P-Phosphat-markierten Oligonukleotide zugegeben. Zur Detektion von Stat1 und Stat3 wird ein Bereich aus dem Promotor von *c-fos* gewählt (hSIE: **human c-Sis inducible element**), der durch eine Mutation (m67) noch höher affin für die Stat-Moleküle ist. Als Bindungsstelle für Stat5 wird ein Konsensus-Motiv aus Promotoren einiger Interferon-induzierbarer Gene gewählt und als **Stat5-responsible element** (S5RE) bezeichnet.

m67	5' TTCATTTCCCGTAAATCCCTA
S5RE	5' TTTCTAGGAATT

Markierung der Oligonukleotide mit ³²P-γ-ATP

Jeweils 100 ng der komplementären Oligonukleotid-Einzelstränge werden zusammen mit 1,2 MBq ³²P-γ-ATP (5000 Ci/mmol) und 20 U T4-Polynukleotidkionase (Biolabs, New England) bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt eine fünfminütige Inaktivierung des Enzyms und Denaturierung der Oligos bei 95°C. Der Reaktionsansatz wird dann langsam abgekühlt, um die Hybridisierung der komplementären Oligos zu gewährleisten. Zur Trennung der markierten Oligonukleotide von freien Nucleotiden werden Nucleo-Trap-Säulen (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Zur Messung der spezifischen Aktivität des markierten Oligos wird ein Aliquot in einem β-Counter (LKB Rackbeta, Pharmacia, Freiburg) gezählt.

Die Komplexe werden nach der Beendigung der Bindereaktion in einer 5 %igen nicht-denaturierendem Polyacrylamidelektrophorese in einem 0,5 x TBE-Puffer aufgetrennt, die Gele werden für eine Stunde in einem Gelrockner bei 60°C und einem Ölrotationspumpenvakuum getrocknet und die Banden durch Autoradiographie auf Kodakfilmen (Biomax MS) nach Inkubation bei -80°C visualisiert.

2.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.5.1. ISOLATION VON DNA UND RNA AUS BLUTZELLEN UND ZELLINIEN

Die **DNA**-Isolationen werden mit Hilfe des *DNA-isolation-tissue-kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. $1 \cdot 10^7$ Zellen werden in 200 µl PBS aufgenommen und mit 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 200 µl des Lysepuffers AL versetzt. Nach 15 sec Vortexen werden die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl Ethanol und erneutem Vortexen wird die Probe über eine mit Puffer äquilibrierte Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 8000 Upm, Microfuge, Eppendorf). Die DNA wird zweimal mit je 500 µl Waschpuffer AW auf der Säule gewaschen (1 min, 8000 Upm) und anschließend mit 200 µl Elutionspuffer AE nach 5minütiger Inkubation von der Säule eluiert (1 min, 8000 Upm). Die Konzentration der genomischen DNA wird durch photometrische Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt, wobei eine optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. DNA wird bei 4°C gelagert.

Die **RNA**-Isolation folgt einer modifizierten Einschrittmethode von CHOMCZYNSKI und SACCHI (CHOMCZYNSKI & SACCHI 1987) mit RNAzol B (WAK-Chemie, Bad Homburg). $5 \cdot 10^6$ Zellen werden mit 1 ml RNAzol versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen in

der Pipettenspitze homogen lysiert. Zur RNA-Extraktion wird 0,1 ml Chloroform zugesetzt, für 15 sec gevortext und anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 15 min bei 12000 g (4°C) wird eine Phasentrennung erreicht. Die obere, RNA-enhaltende wässrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe eines Vol. Isopropanol auf Eis für 15 min gefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 12000 g wird das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wird es in 10 bis 20 µl DEPC-behandeltem ddH₂O gelöst. Die Konzentration der RNA wird durch photometrische Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt, wobei eine optische Dichte von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. RNA wird bei -20°C gelagert.

2.5.2. DIE AMPLIFIKATION VON DNA UND RNA MITTELS PCR

Bei der Untersuchung von RNA muß diese vor der Amplifikation in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (SAIKI *et al.* 1985; MYERS & GELFAND 1991) zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt mit Hilfe einer reversen Transkriptase (HARBARTH & VOSBERG 1988).

2.5.2.1. Der Reverse-Transkription-Ansatz

1 µg	RNA / 20 µl-Ansatz
50 mM	Tris-HCl, pH 8,3
50 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
0,5 mM	Spermidin
je 200 µM	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
0,1 µM	<i>Random-Hexamer-Primer</i> (finale Konzentration: 0,5 µg/µg RNA)
0,7 U	RNasin
100 U	M-MLV (Promega, Mannheim) / µg RNA

Der gesamte Ansatz umfaßt je nach Menge der zur Verfügung stehenden RNA zwischen 20 und 40 µl.

Die in DEPC-behandeltem Wasser gelöste RNA wird zunächst zusammen mit den verwendeten Primern für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis gestellt. Nach Zugabe der anderen oben aufgeführten Reagenzien erfolgte die reverse Transcription für 60 min bei 37°C. Die entstandene cDNA wird entweder sofort in einer PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.5.2.2. Der PCR-Ansatz

10 mM	Tris-HCl, pH 8,3
50 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂
0,1 µM	Primer (jeweils sense und antisense)
0,5 -1 U	Taq-Polymerase

In einem 25µl-PCR-Ansatz werden 2-5 µl aus dem cDNA-Ansatz verwendet. Die für die PCR notwendigen Desoxynukleotidtriphosphate stammen aus der RT-Reaktion, die finale Konzentration beträgt in der Regel 20 µM pro Nukleotid.

Der PCR-Ansatz wird zunächst für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 35-40 Zyklen nach folgendem Protokoll:

30 - 60 sec	94°C
60 sec	55°C - 60°C
60 - 120 sec	72°C

Zum Abschluß wird noch einmal für 7 min bei 72°C inkubiert, um eine vollständige Kettenverlängerung zu ermöglichen.

2.5.2.3. Detektion der amplifizierten DNA in Agarose-Gelen

8µl der amplifizierten DNA werden mit 2µl eines 5x-Loading-Buffer versetzt und in eine Tasche eines 1,5%igen Agarose-Gels pipettiert. Die Elektrophorese findet in TE-Puffer bei 80 - 120 V statt. Als Längenstandard dient der Marker VI (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Detektion erfolgt im UV-Licht durch Ethidiumbromid-Interkalation.

Marker VI (Roche Diagnostics)

2176 / 1766 / 1230 / 1033 / 653 / 517 / 453 / 394 / 298 (2x) / 234 (2x) / 220 / 154 bp

2.5.3. METHODEN ZUR SEQUENZIERUNG VON KLONIERTE PCR-FRAGMENTEN

2.5.3.1. Ligation von PCR-Produkten

Die für die Sequenzierung generierten PCR-Produkte werden zur weiteren Amplifikation in den pCR script SK(+)-Vektor kloniert. Dazu werden die PCR-Produkte in einem präparativen Agarosegel (1,5%) aufgetrennt, über ein Extraktionsverfahren mit Glasmilch (Qiaex II Gel Extraction Kit) aufgereinigt und in 20-30 µl bidest. H₂O aufgenommen. Die PCR-Produkte werden dann mit T4-DNA-Ligase in den mit Srf I geschnittenen Vektor ligiert. Die Verwendung der Restriktionsendonuklease Srf I in dem Ligationsansatz hält eine hohe Konzentration an geschnittenem Plasmid aufrecht, die Srf I-Schnittstelle ist erst durch Ligation eines PCR-Produktes nicht mehr vorhanden.

Der Reaktionsansatz für die Ligation mit dem Rapid Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) setzt sich wie folgt zusammen:

Vektor	0,5-1 µl	entspr. 5 - 10 ng Plasmid-DNA
PCR-Produkt	7-7,5 µl	entspr. 100 - 1000 ng
5x-DNA-Verdünnungspuffer	2 µl	
2x-DNA-Ligationspuffer	10 µl	
Srf I	1 µl	
<u>T4-DNA-Ligase</u>	<u>1 µl</u>	
	ca. 20 µl	

Bei dem Ansatz wird ein Vektor-zu-Insert-Verhältnis von ca. 1:40 bis 1:100 eingesetzt. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert, bevor er für die Transformation von Bakterien verwendet wird.

2.5.3.2. Transformation von Bakterien

Die Plasmid-DNA wird nach der Ligation der PCR-Produkte zur Amplifikation in Bakterienzellen eingesetzt. Für die Transformation wird der E. coli-Stamm JM 107 verwendet, der zur Verbesserung seiner Aufnahmefähigkeit von Plasmid-DNA kompetent gemacht wird. Mit dem verwendeten Protokoll (INOUE *et al.* 1990) wurden mit den JM 107 E. coli-Bakterien Transformationseffizienzen von 10^5 bis 10^7 transformierte Bakterien / μg Plasmid-DNA erreicht.

Zu jedem Ligationsansatz werden 100 - 150 μl der kompetenten E. coli JM 107 gegeben. Das Gemisch wird für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor die Proben für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt werden. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wird jedem Ansatz 450 μl SOC-Medium zugesetzt; anschließend werden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert.

SOB-Medium

20 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
500 mg/l	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
	pH 7,0

Das Medium wird vor Verwendung autoklaviert.

SOC-Medium

20 mM	Glucose in SOB-Medium
-------	--------------------------

Nach der Transformation werden die Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen. Dazu werden die Proben kurz anzenrifugiert (14000 Upm, Eppendorf-Microfuge, 5sec), ein Teil des Überstandes wird verworfen und das Bakterienpellet in dem restlichen Volumen resuspendiert. Diese Suspension wird auf einer LB-Agarplatte (100 μg Ampicillin / l LB-Agar) ausgestrichen. Auf jede Agarplatte werden noch IPTG (20 μl 200 mM IPTG-Lösung) und X-Gal (10% (w/v) X-Gal) ausgestrichen, um ein Blau-Weiß-Screening zur Positivselektion Insert-tragender Klone zu ermöglichen.

Nach einer Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht werden 3 ml LB-Kulturen mit den gewachsenen Kolonien (nach dem Blau-Weiß-Screenen) zur negativen Selektion von Bakterien mit leerem Vektor) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

LB-Medium

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl
	pH 7,0

LB-Agar

1,5 % (w/v) Bacto-Agar
in LB-Medium

2.5.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die transformierten Bakterienzellen werden zur Gewinnung von Plasmid-DNA unter alkalischen Bedingungen mit SDS lysiert (BIRNBOIM & DOLY 1979).

1,5 ml einer 3 ml LB-Übernachtkultur werden pelletiert (14000 Upm, Eppendorf-Microfuge, 10 sec) und in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 werden die Bakterien für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Mittels Zugabe von 200 µl 3M Natriumacetatlösung (Puffer P3) werden genomische DNA, Proteine und SDS ausgefällt und durch Zentrifugation (14000 Upm, Beckman CS-15R, 10 min) abgetrennt. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Volumen absolutem Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetatlösung (pH 5,5) und Inkubation für 30 Minuten bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (14000 Upm, Beckman CS-15R, 10 min) wird das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 50 µl bidest. H₂O gelöst.

Puffer P1

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNase A

Puffer P2

200 mM	NaOH
1% (w/v)	SDS

Puffer P3

3M	Natriumacetat, pH 5,5
----	-----------------------

2.5.3.4. PIC-Extraktion

Um die Plasmide sequenzieren zu können, muß die aus der Mini-Präparation erhaltene Plasmid-DNA noch weiter aufgereinigt werden, da Proteine die Sequenzierreaktion stören. Diese Aufreinigung erfolgt mittels einer PIC-Extraktion (Phenol-Isoamylalkohol-Chloroform im Verhältnis 25:1:24). Hierzu werden 50 µl der Plasmid-DNA-Lösung aus der Plasmid-Minipräparation auf 100 µl mit ddH₂O aufgefüllt, mit 1 Volumen PIC versetzt und für eine Minute gevortext. Nach der Zentrifugation (14000 Upm, Eppendorf-Microfuge, 1 min) wird der Überstand abgenommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 10µl 3M Natriumacetatlösung und 2 Volumen absolutem Ethanol für 30 Minuten bei -20°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation (14000 Upm, Beckman CS-15R, 20 min, 4°C) wird das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 10 µl bidest. H₂O aufgenommen.

2.5.3.5. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Um eventuell vorhandene Mutationen im c-mpl-Gen nachzuweisen, erfolgt eine Sequenzierung der Plasmide. Die Sequenzierung wird nach der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden (SANGER *et al.* 1977) durchgeführt. Die Primer sind von den T3- und T7-Promotorsequenzen abgeleitet und mit einem infrarot-fluoreszierenden Chromophor (IR-800) markiert. Der Cycle-Sequenzierungsansatz setzt sich wie folgt zusammen (Thermosequenase-Kit RPN2438, Amersham, Braunschweig):

700 ng	Plasmid-DNA
1-10% (v/v)	DMSO
1 pmol	IR-800-Primer (T3 bzw. T7)
jew. 2µl	dNTP / ddNTP - Gemisch (mit Thermosequenase und Puffer)

Nach einer initialen Denaturierung von 2 Minuten bei 95°C werden anschließend 30 Zyklen mit folgenden Parametern durchgeführt:

15 sec	95°C
20 sec	60°C
60 sec	70°C

Nach Beendigung der Reaktion werden zu den Ansätzen 3 µl eines Formamidhaltigen Stop-Puffers gegeben. Die Auftrennung der Fragmente aus der Cycle-Sequenzier-Reaktion erfolgt in einem 6%igen Polyacrylamidgel. Die Fluorophormarkierten Primer werden mit einem Laser angeregt und die Fluoreszenz wird detektiert und halbautomatisch ausgewertet (LI-COR One-Laser-System, MWG-Biotech, Ebersberg). Der Vergleich der resultierenden Sequenzen mit der Wildtyp-c-mpl-Sequenz (Acc. No. M90102 für c-mpl-P bzw. U68162 für Exons 11 und 12) erfolgt manuell. Um eindeutige Sequenzierergebnisse zu erhalten und mögliche Polymerasefehler ausschließen zu können, werden jeweils 15 - 20 Klone mit dem entsprechenden Insert sowohl in sense- als auch in antisense-Richtung (hier: durch Verwendung der markierten Primer T3 und T7) sequenziert.

2.6. FACScan-ANALYSEN VON THROMBOZYTEN

Thrombozyten können wegen ihrer geringen Größe gut im FACS von anderen Zellen diskriminiert werden. Dabei macht man sich die Lichtstreuungseigenschaften der Zellen (*forward scatter*, *side scatter*) zunutze.

Für die Messung von Oberflächenmarkern stehen zwei Fluoreszenzkänale zur Verfügung, in dem die Verteilung von Antigenen gemessen werden kann, die mit Fluorophor-markierten Antikörpern gefärbt wurden. Als Fluorophore werden Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Emissionsmaximum bei 517 nm) und Phycoerythrin (PE, Emissionsmaximum bei 560 nm) verwendet. Bei Doppelfluoreszenzmessungen kann mittels einer Kompensation die im PE-Wellenlängenfenster gemessene langwellige FITC-Fluoreszenz eliminiert werden.

Plättchen lassen sich aufgrund ihrer geringen Größe schwer von kleinen korpuskulären Bestandteilen, die als Verunreinigungen in Lösungen auftreten, trennen, da diese ähnliche Lichtstreuungseigenschaften wie die Thrombozyten zeigen können. Daher werden alle zur FACScan-Messung verwendeten Lösungen durch ein

0,22 µm-Filter filtriert. Als Material für die Analysen dient Citratblut vom Normalspender oder von thrombozytopenischen Patienten.

Für die **Analyse des c-Mpl Rezeptors** auf der Thrombozytenoberfläche werden 5 µl Plättchen-reiches Plasma (PRP) zunächst für 10 min mit 20 µl einer Lösung humanen IgG-Antikörpers (Gamma-Guard, 1:5 in FACS-Puffer) vorinkubiert, um Fc-Rezeptoren abzusättigen und somit eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden.

FACS-Puffer

0,1% Natriumazid
0,5% BSA
in PBS, pH 7,2

Anschließend werden 10 µl eines monoklonalen Antikörpers gegen c-Mpl zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die Thrombozyten werden danach dreimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 20 µl einer 1:20 Verdünnung eines FITC-markierten Antikörpers (polyklonale Kaninchenantikörper gegen Maus-Immunglobuline - RAM-FITC) aufgenommen und weitere 15 min inkubiert. Die Messung erfolgt nach weiteren drei Waschschritten und Aufnahme der Zellen in 200 µl FACS-Puffer.

Für die **Stimulationsexperimente** werden 5µl Vollblut oder 5 µl PRP in 60 µl AB-Serum-haltigem PBS (1%) mit oder ohne TPO für 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 5µl der Stimulantien (ADP, TRAP oder PBS als Blindwert) zupipettiert. Die Stimulation wird durch Zugabe von 1 ml 1% Formaldehydlösung beendet und die Plättchen werden durch Inkubation für 20 Minuten auf Eis fixiert. Nach dem Zentrifugieren wird das Pellet in 10µl Antikörperlösung mit direkt markierten Antikörpern resuspendiert und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Plättchen zweimal in filtriertem FACS-Puffer gewaschen und für die Messung resuspendiert.

Alle Analysen werden an einem Durchflußzytometer (FACScan, Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

2.7. ZELLKULTUR

Alle in 2.3.3 beschriebenen Zelllinien werden - sofern nicht anders beschrieben - in RPMI 1640 mit 10% FKS kultiviert. Die Inkubation erfolgt bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂.

Die Kultivierung von mononukleären Zellen aus Knochenmark erfolgt in kleinen Kulturflaschen oder 6-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden) unter den gleichen Bedingungen wie bei den Zelllinien beschrieben.

2.8. MARKIERUNG VON TPO MIT FITC

Zur durchflußzytometrischen Untersuchung der Bindung von TPO an seinen Rezeptor c-Mpl auf Thrombozyten und c-mpl-transfizierten Zelllinien wird TPO kovalent an das Fluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gebunden. Die Durchführung der Markierungen erfolgt gemäß den Anweisungen des Herstellers (F-6433, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen). Die Bindung erfolgt durch nukleophilen Angriff von (ε)-Aminogruppen des Proteins an die Isothiocyanat-Gruppe von FITC. Die gebildete Phenylthiocarbonyl-Gruppe des Addukts ist bei pH 7,0 stabil. 200 µl des rekombinanten TPOs (0,2 mg/ml) werden in einer PBS-äquilibrierten Sephadex G-15-Säule (Pharmacia) umgepuffert und mit 1 mg/ml BSA stabilisiert. Die Reaktion wird

durch Zugabe von Hydroxylamin gestoppt und das markierte TPO durch eine Sephadex G-15-Säule von freiem FITC getrennt. Nach Proteinbestimmung wird das FITC-markierte TPO für die Stimulation von Thrombozyten eingesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. TPO WIRKT SYNERGISTISCH MIT PLÄTTCHENAKTIVATOREN WIE ADP ODER TRAP

Thrombozyten werden im Rahmen der Wundheilung nach Stimulation verschiedener Rezeptoren wie dem Fibrinogenrezeptor (gp IIb/IIIa, CD41), dem von-Willebrandt-rezeptor (gplb/V/IX), dem ADP-Rezeptor oder dem Thrombinrezeptor aktiviert. Die Plättchenaktivierung kann zu der Exozytose verschiedener Plättchengranula führen, wobei danach mit der Granulamembran assoziierte Proteine auf der Oberfläche der aktivierten Plättchen erscheinen. Die durchflußzytometrische Detektion dieser Marker auf der Plättchenoberfläche wird als Nachweis der Plättchenaktivierung gewertet.

Die Stimulation von Thrombozyten mit dem schwachen Agonisten ADP, mit dem starken Agonisten Thrombin oder mit einem Thrombin-Rezeptor-Agonist-Peptid TRAP (SFLLRN) führt nach der Exozytose der α -Granula zur Neoexpression des Aktivierungsmarkers CD62P (P-Selectin) auf der Plättchenoberfläche.

Die Inkubation von Plättchen mit TPO allein hatte keinen Einfluß auf die Expression von CD62P, denn die Histogrammkurve ist deckungsgleich mit der als Negativkontrolle verwendeten Isotypkontrolle (siehe Abb. 4 oben). Eine Stimulation mit ADP oder TRAP hingegen führte zu einer deutlichen Aktivierung der Plättchen. Dies konnte durch den Nachweis von CD62P auf der Plättchenoberfläche gezeigt werden (siehe Abb. 4 unten, schwarze Kurve). Eine Vorstimulation der Plättchen mit TPO verstärkte die aktivierende Wirkung von ADP oder TRAP, es kam zu einer erhöhten Exozytose von α -Granula und damit zu einer erhöhten Expression von CD62P (graue Kurve). Dadurch konnte die synergistische Wirkung von TPO mit ADP oder TRAP eindeutig gezeigt werden.

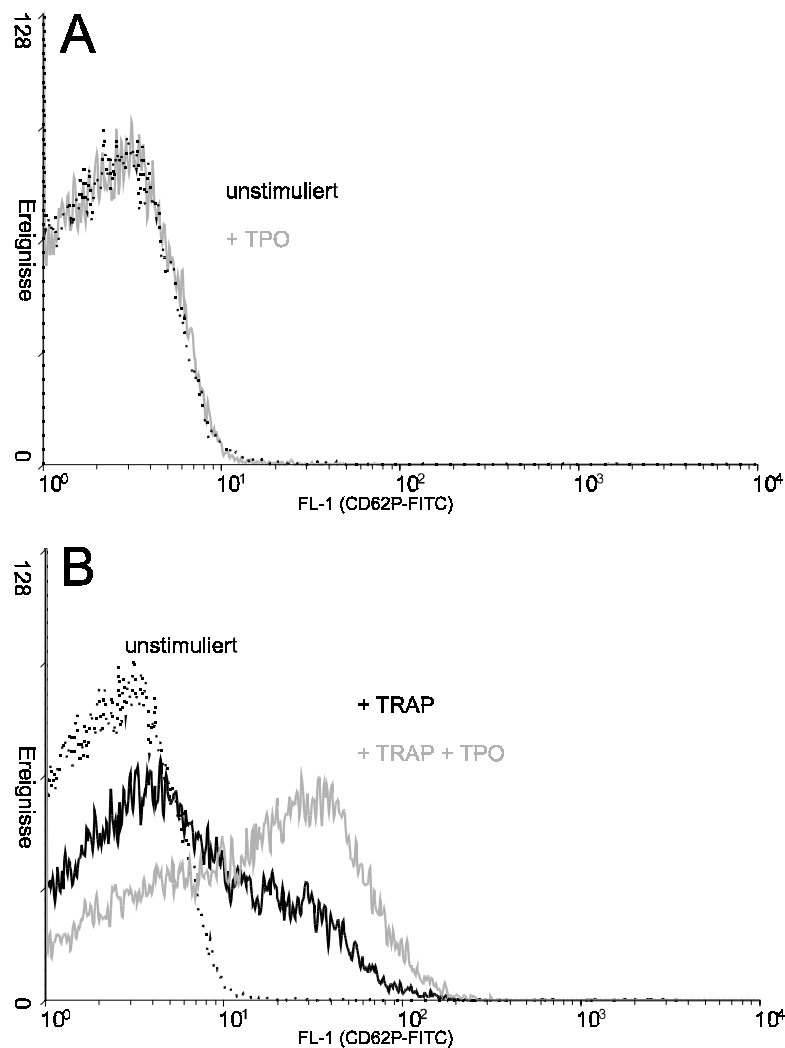


Abb 4: TPO wirkte synergistisch mit TRAP auf die Plättchenaktivierung. Stimulierte Thrombozyten wurden mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit einem α -CD62P-Antikörper inkubiert. Die Messung der Thrombozyten erfolgte dann am FACScan. TPO hatte allein keine aktivierende Wirkung, konnte aber mit TRAP die Expression von CD62P auf den Thrombozyten verstärken.

3.2. PROTEINBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SIGNALTRANSDUKTION VON c-MPL

3.2.1. TPO INDUZIERT ANDERE TYROSINPHOSPHORYLIERUNGEN VON PLÄTTCHENPROTEINEN ALS THROMBIN ODER TRAP

c-Mpl, der Rezeptor für TPO, gehört zur Zytokinrezeptorsuperfamilie, deren Mitglieder Gemeinsamkeiten in ihrer Struktur und in der Signaltransduktion zeigen. Die Rezeptoren haben, anders als die Rezeptortyrosinkinasen, keine intrinsische

Kinaseaktivität. Trotzdem kommt es nach Stimulation des Rezeptors mit dem Liganden zur Aktivierung einer Kaskade intrazytoplasmatischer Proteinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen, zumeist von Tyrosinresten. Diese Kaskade wird durch rezeptorassoziierte zytoplasmatische Kinasen vermittelt, die nach Aktivierung des Rezeptors eine Auto- oder Kreuzphosphorylierungsaktivität aufweisen und nach ihrer Selbstaktivierung weitere zytoplasmatische Substrate phosphorylieren können. Um zu untersuchen, ob Thrombin und Thrombopoietin gleiche Signalmoleküle aktivieren, wurden gewaschene Blutplättchen mit TPO, Thrombin und einem Thrombin-Rezeptor-Agonist-Peptid (TRAP) stimuliert. Nach 5 Minuten wurde die Stimulation durch Zugabe von 2x-Probenpuffer beendet, die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit Hilfe eines α -Tyrosin-Antikörpers detektiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß TPO und Thrombin die Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine in Thrombozyten bewirken. Nach TPO-Stimulation wurde ein ca. 120 kDa großes Protein phosphoryliert, dessen Bande deutlich detektierbar war. Thrombin hingegen führte zu der Induktion von Proteinbanden, deren entsprechende Molekulargewichte größer als 130 kDa waren. Interessanterweise zeigte TRAP (ein Rezeptoragonist, ohne proteolytische Aktivität), das ebenso wie Thrombin zur Plättchenaktivierung (CD62-Expression) führt, im Western Blot keine stimulationsabhängigen Banden (siehe Abb. 5).

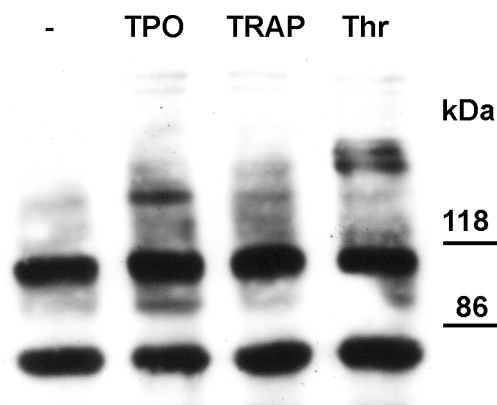


Abb. 5: TPO, TRAP und Thrombin induzieren unterschiedliche Proteinbanden in Thrombozyten. Die Thrombozyten wurden nach der Stimulation lysiert und die Proteine nach einem Western Blot mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper detektiert. Man erkennt deutlich, daß TPO und Thrombin zur Aktivierung unterschiedlicher Proteine führen.

3.2.2. NACHWEIS VERSCHIEDENER SIGNALMOLEKÜLE IN PLÄTTCHEN: ÜBERSICHT

Bei der Stimulation von Blutplättchen mit niedrigen Konzentrationen von TPO zwischen 10 und 50 ng/ml konnte im wesentlichen die Induktion einer Bande bei ca. 120 kDa detektiert werden. Bei der Stimulation von Thrombozyten mit TPO-Konzentrationen, die etwa 100-fach höher waren (bis 2 µg/ml), konnten weitere Banden detektiert werden, die stimulationsabhängig im Thrombozytenlysat immunreaktiv gegen den α -Tyrosinphosphat-Antikörper waren. Dabei konnten Proteinbanden mit einem ungefähren Molekulargewicht von 40, 65, 95-100 und >120 kDa detektiert werden (siehe Abb. 22, links).

Im folgenden wurde versucht zu klären, welche Proteine mit den entsprechenden Molekulargewichten durch die TPO-Stimulation in Plättchen tyrosinphosphoryliert werden. Dazu wurde zunächst nach Molekülen geschaut, deren Molekulargewicht mit den gefundenen Proteingrößen übereinstimmt. Durch den Nachweis von Proteinen, die für bestimmte Signalwege repräsentativ sind, sollte auf diese Weise auch geklärt werden, welche Signalwege in Thrombozyten nach TPO-Stimulation aktiviert werden.

3.2.2.1. Nachweis von Shc, ERK2 und Vav in Blutplättchen

Drei Signaltransduktionsmoleküle aus unterschiedlichen Signalwegen wurden auf Proteinexpression in Plättchen getestet. Dabei wurden die gefundenen Proteinbanden im Western Blot mit den induzierten Banden tyrosinphosphorylierter Proteine nach TPO-Stimulation (Abb. 22, rechts) verglichen .

Das Adapterprotein **Shc** rekrutiert Proteine in die Nähe des Rezeptors und führt häufig über die Bindung von Nukleotidaustauschfaktoren (z.B. Sos oder Vav) zur Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs.

ERK2 ist eine MAP-Kinase aus dem Raf-MAPK-Signalweg. Die MAPK-Mitglieder können Transkriptionsfaktoren aktivieren oder noch weitere Kinasen phosphorylieren. Für die Megakaryozytopoese scheinen die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 wichtig zu sein (NAGATA & TODOKORO 1995; YAMADA *et al.* 1995; WHALEN *et al.* 1997; Rouyez *et al.* 1997).

Vav ist ein Protein, das als Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) mit den GTPasen Ras, Rac und Rho wechselwirken kann und so eine Rolle bei dem Rearrangement des Zytoskeletts und der Exozytose von Vesikeln spielt, also bei Prozessen, die auch im Rahmen der Thrombozytenaktivierung von Bedeutung sind.

Zunächst wurde die Expression des Adapterproteins Shc analysiert. Dazu wurden TPO-stimulierte und unstimulierte Thrombozyten lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit einem Antikörper gegen Shc inkubiert. Der verwendete Antikörper ist immunreaktiv mit den drei Shc-Isoformen p46, p52 und p66. In den untersuchten Lysaten konnte aber nur p66 nachgewiesen werden (siehe Abb. 6 rechts). Entsprechend liegt Shc in Plättchen als p66-Isoform vor. Der Vergleich der tyrosinphosphorylierten Bande mit entsprechendem Molekulargewicht von 66 kDa in Abb. 22 mit der hier gefundenen Shc-Bande verweist darauf, daß p66 Shc durch TPO phosphoryliert wird.

Im folgenden sollte geklärt werden, ob ERK2 in Plättchen nach TPO-Stimulation vorhanden und phosphoryliert wird. Dazu wurden Plättchenlysate in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine nach Western Blot mit einem α -ERK2-Antikörper inkubiert. Dabei konnte deutlich die Expression von ERK2 durch eine Bande bei 42 kDa nachgewiesen werden, die auch einer tyrosinphosphorylierten Bande im α -Tyrosinphosphat-Blot entsprach (siehe Abb. 6 Mitte, Abb. 15 und Abb. 22).

In Thrombozyten liegt also p42 ERK2 vor und wird durch TPO-Stimulation tyrosinphosphoryliert.

Aufgrund einer intensiven, TPO-induzierten Bande bei 95 - 100 kDa im α -Tyrosinphosphat-Blot (Abb. 22), sollte die Expression von Vav in Thrombozyten untersucht werden. Dabei wurden Totallysate von Plättchen in der Elektrophorese aufgetrennt und die Proteine nach Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Vav detektiert. Dabei konnte Vav als ein Protein bei ca. 100 kDa detektiert werden (siehe Abb. 6 links). Entsprechend liegt p95 Vav in Thrombozyten vor und wird nach TPO-Stimulation phosphoryliert.

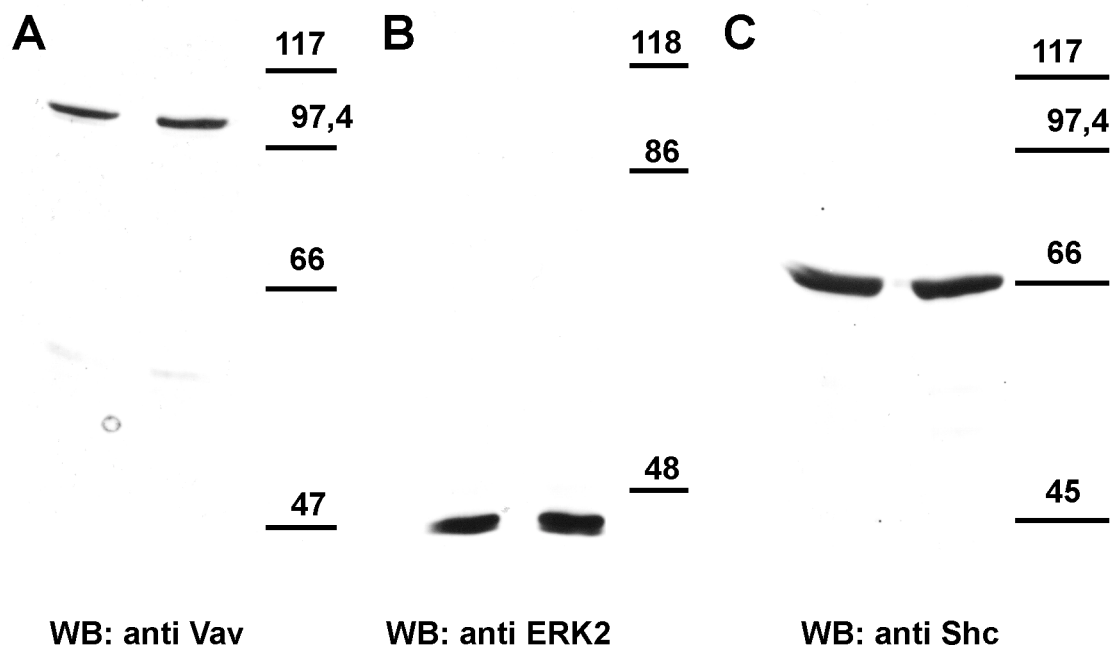


Abb 6: Nachweis von p66 Shc, p42 ERK2 und p95 Vav in Thrombozytenlysaten. Unstimulierte und TPO-stimulierte Thrombozyten wurden jeweils lysiert und nach SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern gegen Shc, ERK2 bzw. Vav inkubiert. Von den drei Shc-Varianten konnte nur p66 in Thrombozyten nachgewiesen werden. ERK2 und Vav konnten in Thrombozytenlysaten ebenfalls nachgewiesen werden. Dabei konnte kein Unterschied zwischen unstimulierten (jeweils linke Spur) und TPO-stimulierten Plättchen (jeweils rechte Spur) nachgewiesen werden.

3.2.3. NACHWEIS VON C-MPL IN DER ZELLINIE DAMI UND IN PLÄTTCHEN

Die ersten Reaktionen der Signaltransduktion, die unmittelbar nach der Stimulation des Rezeptors mit dem Liganden erfolgen, beinhalten zytoplasmatische Wechselwirkungen wie Phosphorylierungen des Rezeptors oder Protein-Protein-Interaktionen. Dazu sollten Vorexperimente mit einer megakaryozytären Zelllinie, die c-Mpl deutlich exprimiert, klären, ob sich der Rezeptor aus Totallysaten immunpräzipitieren lässt und ob der Rezeptor im Rahmen der TPO-Signaltransduktion in Thrombozyten phosphoryliert wird oder nicht. Weiterhin sollte ein in der Abteilung hergestellter monoklonaler Antikörper gegen c-Mpl charakterisiert und mit einem kommerziell erhältlichen verglichen werden.

DAMI ist eine humane megakaryozytäre Zelllinie, deren Zellen sowohl linienspezifische Marker wie CD41 trägt als auch den TPO-Rezeptor c-Mpl

exprimieren. Mit Hilfe dieser Zelllinie sollte ein spezifisches Signal für c-Mpl nach der Immunpräzipitation des Zelllysats mit den verschiedenen Antikörpern nachweisbar sein. Dafür wurden DAMI-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase serumfrei gewaschen und anschließend zu einem Zellpellet zentrifugiert. Das Pellet wurde lysiert und aliquotiert. Dann wurde jeweils eine Immunpräzipitation mit den verschiedenen Antikörpern α -c-Mpl durchgeführt (siehe 2.4.4). Beide Präzipitate wurden kreuzweise mit einem Antikörper α -c-Mpl der Firma Genzyme (Gz) und dem bei uns in der Arbeitsgruppe hergestellten Antikörper (SW) nach dem Western Blot detektiert. Als Negativkontrolle diente der Lysepuffer ohne Zellen.

Es konnte eine DAMI-spezifische Bande bei 90-95 kDa detektiert werden, sofern die IP mit dem Gz- oder SW-Antikörper und die anschließende Detektion mit dem Gz-Antikörper durchgeführt wurde. Ein Signal mit gleichem Molekulargewicht ließ sich auch detektieren, wenn mit Gz präzipitiert und mit SW detektiert wurde (siehe Abb. 7). Diese Bande konnte nicht nachgewiesen werden, wenn sowohl IP als auch der Western Blot mit dem SW-Antikörper durchgeführt wurden. Es ergaben sich zusätzlich einige unspezifische Banden, die auch in den zellfreien Proben nachgewiesen werden konnten, was an den verwendeten Beads und Antikörpern liegen kann.

c-Mpl ließ sich also mit dem Gz- und dem SW-Antikörper aus DAMI-Zellen präzipitieren und mit dem Gz-Antikörper nachweisen. Der SW-Antikörper ist ein IgM-Antikörper und das *Capturen* mußte bei der IP daher mit α -IgM-Beads erfolgen, so daß auf den Einsatz des eigenen Antikörpers im folgenden verzichtet wurde.

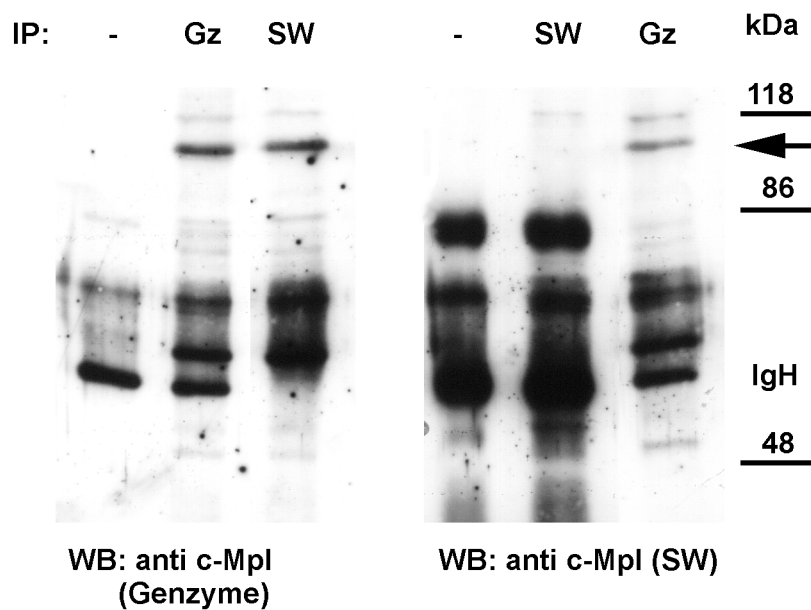


Abb. 7: Nachweis des TPO-Rezeptors c-Mpl in der megakaryozytären Zelllinie DAMI. DAMI-Zellen wurden zum einen mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper (Gz), zum anderen mit einem in der Abteilung hergestellten monoklonalem (SW) Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden kreuzweise mit den verwendeten Antikörpern detektiert. Dabei wurde jeweils eine Bande bei ca. 90 kDa in den mit Gz-präzipitierten bzw. mit Gz-detektierten Spuren als c-Mpl detektiert.

Aufgrund der schlechten Präzipitationseigenschaften des in unserer Arbeitsgruppe hergestellten Antikörpers und der Tatsache, daß der kommerziell erhältliche Antikörper von der Firma wegen veränderter Eigenschaften vom Markt genommen wurde, konnten die Ergebnisse zunächst nicht auf Plättchen übertragen werden. Später wurde ein von Dr. Shimosaka (Kirin, Japan) zur Verfügung gestelltes Kaninchen- α -c-Mpl-Antiserum sowohl für die Immunpräzipitation von c-Mpl wie auch für die anschließende Detektion von c-Mpl nach dem Western Blot verwendet. Hierfür wurden gewaschene Plättchen mit TPO (250 ng/ml) für 5 Minuten stimuliert und dann durch Zugabe von Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation gegen c-Mpl durchgeführt, die Präzipitate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western Blot mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper detektiert. Zur Kontrolle wurde der Blot anschließend gestrippt und dann mit α -c-Mpl-Antiserum inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Bande auf Höhe von 90 kDa nach der ersten Inkubation mit dem α -Tyrosinphosphat-Antikörper nur in der TPO-

stimulierten Probe nachzuweisen war (siehe Abb. 8, oben). Das Molekulargewicht entsprach dem für den glykosylierten c-Mpl-Rezeptor erwarteten Gewicht.

Nach dem Strippen konnten beim Reproben mit dem α -c-Mpl-Antiserum unspezifische Banden sowohl in unstimulierten und stimulierten Plättchenlysaten als auch in der Spur mit der Pufferkontrolle (ohne Plättchen) nachgewiesen werden. Das spezifische Signal für c-Mpl, das dem Molekulargewicht der Tyrosinphosphat-Proteinbande entsprach, war jedoch nur bei stimulierten und unstimulierten Plättchen schwach nachzuweisen (siehe Abb. 8, unten). Damit konnte gezeigt werden, daß das Signal, das mit dem α -Tyrosinphosphat-Antikörper gefunden wurde, ein Thrombozyten-spezifisches Protein ist, das sich auch in unstimulierten Plättchen nachweisen läßt. Dieses Ergebnis zeigte somit, daß c-Mpl in Blutplättchen detektierbar ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß c-Mpl nach Stimulation der Thrombozyten mit TPO im Rahmen seiner Signaltransduktion tyrosinphosphoryliert wird.

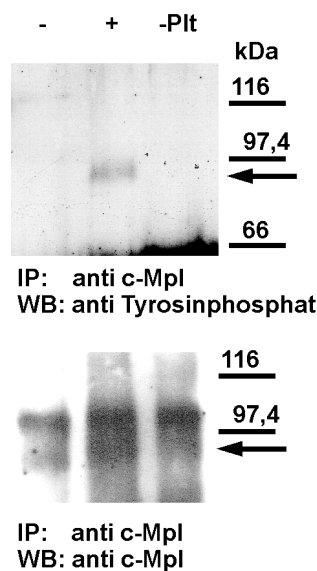


Abb. 8: c-Mpl ist in Blutplättchen vorhanden und wird nach Stimulation mit TPO tyrosinphosphoryliert. Blutplättchen wurden unstimuliert (-) oder für 5 Minuten mit 250 ng/ml TPO stimuliert (+) und anschließend lysiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne Plättchen verwendet (-Plt). Nach der IP von c-Mpl wurden die Präzipitate zunächst mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper inkubiert (oben). Nach dem Strippen der Membran wurde der Blot zum Nachweis gleicher Proteinbeladung mit dem α -c-Mpl-Antiserum inkubiert. Dabei konnte das spezifische Signal nur in den beiden Spuren mit Plättchen nachgewiesen werden.

3.2.4. TPO INDUZIERT DIE TYROSINPHOSPHORYLIERUNG DER JANUSKINASE JAK2

Die nachgewiesene Tyrosinphosphorylierung von c-Mpl in Blutplättchen nach Stimulation mit TPO verwies auf die Aktivierung von zytoplasmatischen Kinasen, da der Rezeptor selbst keine Kinaseaktivität besitzt. Aufgrund von Vorergebnissen anderer Arbeitsgruppen an TPO-stimulierten Zelllinien (PALLARD *et al.* 1995), sollte im folgenden untersucht werden, ob die Januskinase Jak2 eine Rolle in der TPO-Signaltransduktion in Plättchen spielt.

Zunächst wurden unstimulierte und TPO-stimulierte Thrombozyten lysiert und anschließend alle Tyrosinphosphat-tragenden Proteine mit einem IP-geeigneten α -Tyrosinphosphat-Antikörper (4G10) präzipitiert. Nach der Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese und ihrer Immobilisierung im Western Blot wurde die Membran mit einem Antikörper gegen Jak2 inkubiert. Dabei konnte durch Nachweis eines spezifischen Signals mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa in der Spur mit den TPO-stimulierten Thrombozyten gezeigt werden, daß Jak2 in Blutplättchen vorhanden ist, nicht konstitutiv phosphoryliert vorliegt und nach TPO-Stimulation tyrosinphosphoryliert wird (siehe Abb. 9). Dieses Signal stimmt gut mit dem in der Literatur beschriebenen Molekulargewicht von Jak2 überein (MIYAKAWA *et al.* 1995).

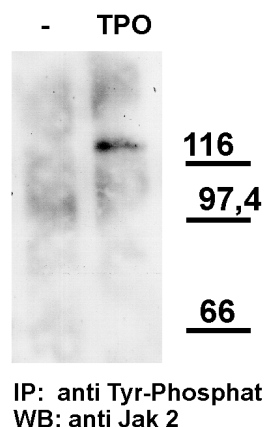


Abb. 9: Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von Jak2 in Blutplättchen nach Stimulation mit TPO. Unstimulierte (-) und stimulierte Thrombozyten (TPO) wurden lysiert und die Proteine mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper präzipitiert. Die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit einem α -Jak2-Antikörper detektiert. Dabei konnte eine Bande von 120 kDa in der Spur mit den TPO-stimulierten Thrombozyten nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Kinetik dieser Phosphorylierung von Jak2 wurden weitere Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei wurde die Stimulation von Aliquots der Thrombozytensuspension zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe des Lyse-puffers beendet. Als Inkubationszeiten wurden 90 Sekunden sowie 3, 5 und 10 Minuten gewählt. Ein unstimuliertes Aliquot der Zellsuspension sowie eine Probe, in der sich ausschließlich Resuspendierungspuffer befand, dienten als Negativkontrollen. Diese verschiedenen Lysate wurden in Immunpräzipitationen von Jak2 eingesetzt und die Präzipitate nach Elektrophorese und Western Blot zunächst gegen Tyrosinphosphat detektiert. In allen TPO-stimulierten Proben war eine Bande bei ca. 120 kDa nachweisbar, wobei die Signalstärke von 90 Sekunden bis zu 10 Minuten zunahm (siehe Abb. 10, oben).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Tyrosinphosphorylierung von Jak2 in Thrombozyten sofort mit Beginn der TPO-Stimulation (innerhalb der ersten 90 Sekunden) einsetzt und bei andauernder Inkubation von Plättchen (bis 10 Minuten) weiter ansteigt. In der unstimulierten Probe konnte genau wie in der Probe ohne Plättchen kein Signal nachgewiesen werden. Als Nachweis, daß in allen Spuren gleiche Mengen Protein vorhanden war, wurde der Blot gestrippt und mit einem Antikörper gegen Jak2 inkubiert. Dabei wurde in allen plättchenhaltigen Proben ein Signal bei 120 kDa detektiert, auch in der unstimulierten Probe. Die Signalstärke war in allen Spuren gleich (siehe Abb. 10, unten). Die Negativkontrolle mit Puffer war bei dieser Detektion negativ. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß Jak2 in Thrombozyten vorhanden ist, nicht konstitutiv phosphoryliert vorliegt, sondern im Rahmen der Signaltransduktion von c-Mpl schon nach 90 Sekunden nach TPO-Stimulation der Plättchen tyrosinphosphoryliert wird. Die Tyrosinphosphorylierung von Jak2 nimmt mit längerer Stimulationsdauer bis zu mindestens 10 Minuten kontinuierlich zu.

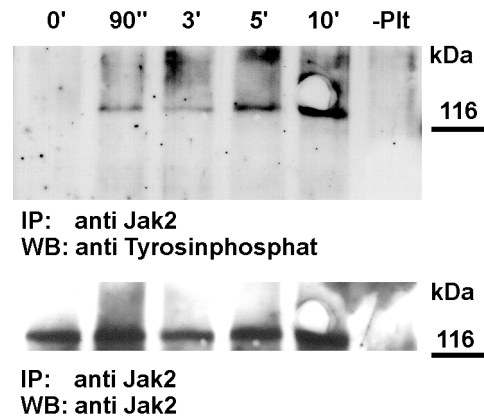


Abb. 10: Jak2 wird in Thrombozyten unmittelbar nach Stimulation mit TPO tyrosinphosphoryliert. Dazu wurde die Stimulation der Plättchen mit TPO zu den angegebenen Zeitpunkten beendet und anschließend eine IP gegen Jak2 durchgeführt. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung erfolgte nach SDS-PAGE und Western Blot mit einem spezifischen Antikörper. Die gleiche Beladung der Spuren wurde nach dem Strippen der Membran durch Inkubation mit einem α -Jak2-Antikörper nachgewiesen.

3.2.5. MEGAKARYOZYTÄRE ZELLINIEN UND THROMBOZYTEN EXPRIMIERN STAT3

Stat-Moleküle sind zytoplasmatische Substrate der aktivierten Januskinasen. In anderen Systemen ist Jak2 in der Lage, Stat1, Stat3 oder Stat5 zu phosphorylieren, woraufhin es zur Dimerisierung und Translokation der Stat-Dimere in den Zellkern kommt. Aufgrund von Vorexperimenten an Zelllinien (SATTLER *et al.* 1995) sollte untersucht werden, ob der Transkriptionsfaktor Stat3 in megakaryozytären Zelllinien und Blutplättchen exprimiert wird. Dazu wurden verschiedene Zelllinien und Thrombozyten als Ausgangsmaterial verwendet. Die Zellen wurden serumfrei gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer aufgenommen und anschließend eine IP gegen Stat3 durchgeführt. Nach Auftrennung der Präzipitate in SDS-PAGE und Western Blot wurde die Membran mit einem α -Stat3-Antikörper inkubiert. In allen Zelllinien (siehe Abb. 11) sowie in Thrombozyten (siehe Abb. 16, unten) konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 94 kDa identifiziert werden. Dies zeigt, daß Stat3 in allen untersuchten hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.

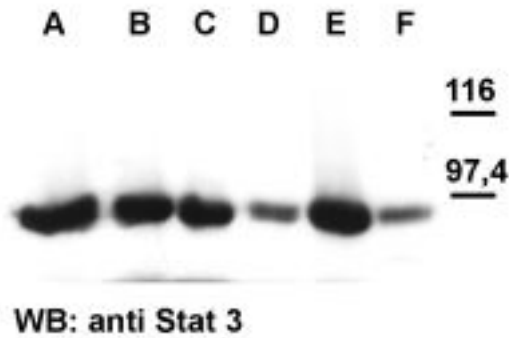


Abb. 11: Stat3 wird in verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die serumfrei gewaschenen Zellen wurden lysiert. Anschließend wurde das Lysat gegen Stat3 immunpräzipitiert. Die Proteine wurden nach Elektrophorese und Western Blot mit einem α -Stat3-Antikörper detektiert. Dabei konnte in allen untersuchten hämatopoetischen Zelllinien die Expression des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden. **A:** M-07e, **B:** MHH-255, **C:** K562, **D:** U937, **E:** HEL, **F:** HL-60.

Die Expression von Stat3 konnte in folgenden Zelllinien (siehe 2.3.3.) nachgewiesen werden: in megakaryozytären Zelllinien (M-07e, MHH-255), in Erythroleukämie-Zelllinien (K562, HEL) und in myeloiden Zelllinien (U937, HL-60). Darüberhinaus konnte die Expression von Stat3 in Plättchen gezeigt werden (Abb. 16).

3.2.6. TPO INDUZIERT DIE AKTIVIERUNG VON STAT1- UND STAT3-KOMPLEXEN MIT DNA

Nachdem bisher gezeigt werden konnte, daß in Thrombozyten Jak2 und Stat3 vorhanden sind und daß Jak2 durch Stimulation mit TPO phosphoryliert und damit aktiviert wird, wurde weiter untersucht, ob auch Stat3 in Thrombozyten aktiviert wird. Es konnte gezeigt werden, daß Stat3 nach TPO-Stimulation in Thrombozyten tyrosinphosphoryliert wird. Dabei konnten die Stat3-spezifischen Signale im Tyrosinphosphat-Blot innerhalb einer TPO-Stimulationskinetik erst zu späteren Zeitpunkten bezogen auf die Jak2-Signale nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß Stat3 in Thrombozyten durch Jak2 phosphoryliert wird.

Im folgenden sollte untersucht werden, ob die phosphorylierten Stat-Moleküle in Thrombozyten noch dimerisieren und an DNA binden können. Zur DNA-Bindung der Stat-Dimere wurden Lysate unstimulierter und stimulierter Thrombozyten mit einer radioaktiv markierten Konsensussequenz für Stat1 und Stat3 (m67) inkubiert und die gebildeten Komplexe mit *Supershift*-Antikörpern charakterisiert (siehe Abb. 12, A).

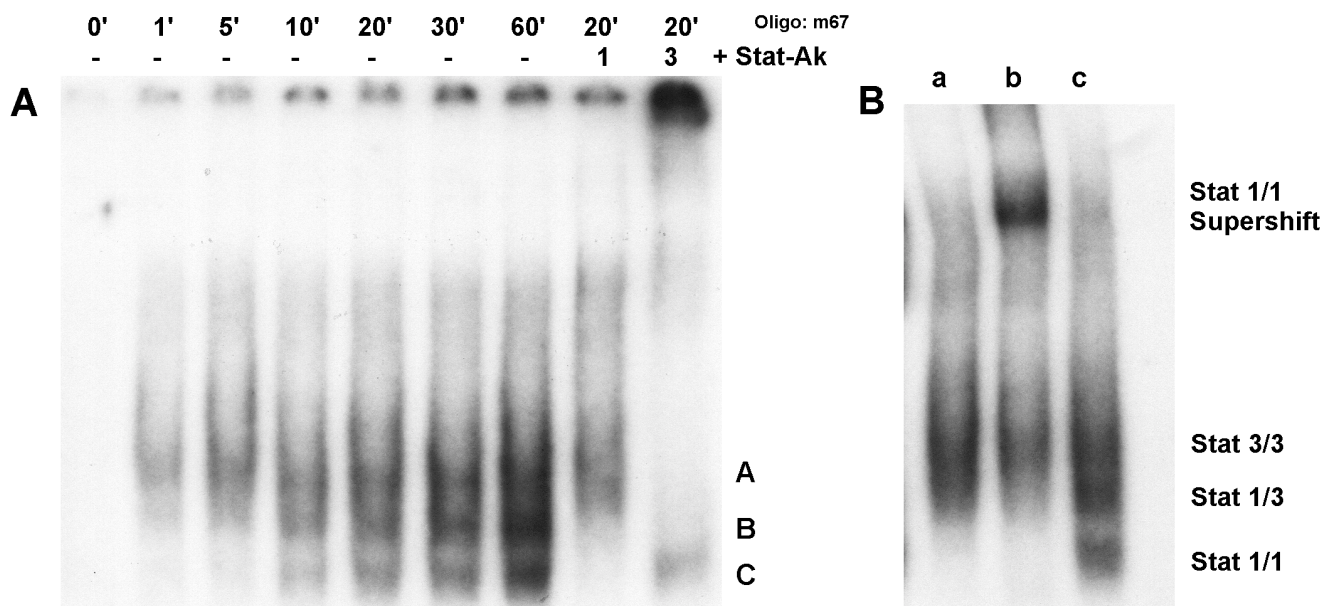


Abb. 12: (A) TPO aktiviert Stat1 und Stat3 und induziert die Bindung der Homodimere Stat1/1 und Stat3/3 sowie des Stat1/3-Heterodimers an m67. Unstimulierte und TPO-stimulierte Thrombozyten wurden zentrifugiert und in EMSA-Lysepuffer lysiert. Jeweils 10 μ g Protein der Lysate wurden in einer Bindereaktion mit dem radioaktiv-markierten DNA-Oligonukleotid m67 inkubiert. Dabei konnte die Bildung von drei Komplexen (A, B, C) nachgewiesen werden, die jeweils unterschiedliche Kinetiken aufwiesen. Durch die *Supershift*-Antikörper in der Bindereaktion konnten Stat1 und Stat3 in den Komplexen nachgewiesen werden. (B) Zur Bestätigung der Aktivierung von Stat1 nach TPO-Stimulation in Plättchen wurden jeweils 10 μ g Protein von stimulierten Plättchenlysaten mit drei verschiedenen α -Stat1-Antikörpern inkubiert. **a:** α -Stat1 α/β , **b:** α -Stat1 α , **c:** α -Stat1-Tyrosin 701-phosphat.

Zunächst konnte die Bildung von drei Komplexen nachgewiesen werden, die mit ihren zunehmenden Signalstärken verschiedene Bindungskinetiken an die DNA aufwiesen. Die an die m67-Sequenz bindenden Stat-Komplexe werden in der Literatur als SIF-A (Stat3/3), SIF-B (Stat1/3) und SIF-C (Stat1/1) bezeichnet. Die Analyse der *supershift*-Experimente bestätigte, daß auch die in Thrombozyten gebildeten Komplexe aus Stat1 und Stat3 bestehen.

Der elektrophoretisch langsam wandernde Komplex A in Abb. 12 ließ sich ausschließlich mit einem α -Stat3-Antikörper "*supershiften*" und besteht folglich aus einem Stat3-Homodimer. Durch die Zugabe eines α -Stat1 α/β -Antikörpers ließ sich zeigen, daß sich der Komplex C (der hier am schnellsten wandernde Komplex) nur aus Stat1-Molekülen zusammensetzt. Da sich der Komplex B sowohl durch den α -

Stat3-Antikörper als auch durch den α -Stat1-Antikörper *shiften* ließ, konnte dieser als ein Stat1/Stat3-Heterodimer identifiziert werden. Die Zusammensetzung der nach TPO-Stimulation in Plättchen gefundenen Stat1/Stat3-Komplexe entspricht den auch in anderen hämatopoetischen Zellen gefundenen Komplexen SIF-A, -B und -C.

Es konnte somit eindeutig eine Aktivierung und DNA-Bindung von Stat1 und Stat3 in Thrombozyten als Folge der Stimulation mit TPO nachgewiesen werden.

Anhand der unterschiedlichen Inkubationszeiten der Plättchen mit TPO konnte weiterhin festgestellt werden, daß sich nicht alle drei Komplexe gleichzeitig bilden, sondern daß Stat3 in Plättchen schneller als Stat1 aktiviert wird: Als erstes ist nach ca. einer Minute der TPO-Stimulation der Stat3/3-Komplex (A) in der DNA-Bindung nachweisbar. Das Stat1/3-Heterodimer bindet etwas verzögert (5-10 Minuten) an m67, während das Stat1-Homodimer erst nach 10 Minuten Stimulation an dem Oligo detektierbar wurde.

Während sich mit dem α -Stat3-Antikörper ein *Supershift* der Stat3-Komplexe an m67 nachweisen ließen, konnte mit dem Stat1-Antikörper - dessen Paratop gegen die SH2-Domäne von Stat1 gerichtet ist und der somit die beiden Spleißprodukte Stat1 α und Stat1 β erkennt - zwar ein Verschwinden der spezifischen Stat1-Komplex-Bande nachgewiesen werden, aber keine gel-retardierte *Supershift*-Bande. Deshalb wurden zwei weitere α -Stat1-Antikörper in *Supershift*experimenten eingesetzt (siehe Abb 12, B).

In weiteren Bindereaktionen wurde neben dem oben beschriebenen α -Stat1 α/β -Antikörper, ein α -Stat1 α -Antikörper, der gegen den C-Terminus von Stat1 α gerichtet ist und somit Stat1 β nicht erkennt und ein Antikörper, der spezifisch das für die Dimerisierung verantwortliche Tyrosin 701-phosphat von Stat1 erkennt, eingesetzt. In *Supershift*experimenten konnte gezeigt werden, daß der α -Stat1 α -Antikörper zu einer sichtbaren Gelretardation aller Stat1-enthaltenden Komplexe führt, während der Tyrosinphosphat-Antikörper keine *Supershift*-Bande zeigte, aber darüber hinaus auch nicht in der Lage war, die Stat1-Komplex-Bande zum Verschwinden zu bringen. Dieses Experiment bestätigte, daß Stat1 in Thrombozyten nach der Stimulation mit TPO aktiviert wird und funktional an entsprechende DNA binden kann. Darüberhinaus zeigte der Einsatz des α -Stat1 α -Antikörpers, daß der gesamte Stat1/1-Komplex *shiftable* war. Somit kann die Bildung von Stat1 β /1 β -Homodimeren ausgeschlossen

werden, in Thrombozyten bilden sich nach 10-minütiger Inkubation mit TPO Stat1 α /1 α oder Stat1 α /1 β -Dimere.

Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von Stat1 in Thrombozyten konnte nach Immunpräzipitation von Stat1 aus Lysaten unstimulierter bzw. TPO-stimulierter Plättchen unter Verwendung eines α -Tyrosinphosphat-Antikörpers nicht erbracht werden.

Die Detektion von Stat1-Proteinen in Totallysaten von Plättchen nach Western Blot bestätigte die These von der Aktivierung von Stat1 in Thrombozyten. Zur Erstellung dieser Lysate wurde die Stimulation der eingesetzten Thrombozyten mit TPO zu den der EMSA-Stimulation entsprechenden Zeitpunkten beendet (siehe Abb 13).

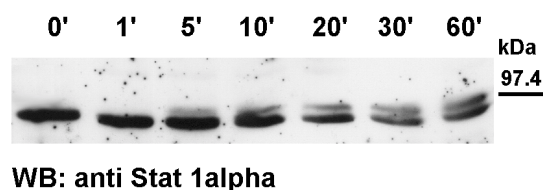


Abb. 13: Indirekter Nachweis der Stat1-Aktivierung in Thrombozyten nach Stimulation mit TPO. Thrombozyten wurden für die angegebene Zeit mit TPO stimuliert. Nach der Lyse wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western Blot mit einem α -Stat1 α -Antikörper inkubiert. In unstimulierten Thrombozyten konnte ein Protein bei 91 kDa als Stat1 α identifiziert werden. Nach 5 bis 10 Minuten Stimulationsdauer konnte eine zusätzliche, gelretardierte Bande detektiert werden, deren Intensität mit der TPO-Stimulationsdauer bis 60 Minuten zunahm, während die Intensität der p91-Hauptbande weiter abnahm.

Bei unstimulierten Plättchen und in Plättchen, die nur eine Minute mit TPO stimuliert worden waren, konnte ein Signal bei ca. 91 kDa detektiert werden, das der Stat1 α -Spleißvariante entspricht. Nach 5-minütiger TPO-Stimulation konnte ein zweites und zunächst signal-schwaches immunreaktives Protein detektiert werden, das ein etwas höheres Molekulargewicht aufwies. Während die Signalintensität dieses Proteins mit der TPO-Stimulationsdauer der Plättchen bis zu einer Stunde kontinuierlich zunahm, verringerte sich zeitgleich die Intensität des p91-Signals. Bei einer Stimulationsdauer von einer Stunde geht von beiden Proteinen jeweils ein Signal gleicher Intensität aus. Da die Phosphorylierung von Proteinen häufig zu einer Retardierung in der SDS-PAGE führt und der in dieser Untersuchung nachgewiesene Shift mit der Kinetik von

Stat1 im EMSA korreliert, kann dieses Experiment als Bestätigung für die Aktivierung und, aufgrund der Theorie der Stat-Dimerisierung nach Tyrosinphosphorylierung, für die Tyrosinphosphorylierung von Stat1 α im Rahmen der c-Mpl-Signaltransduktion in Thrombozyten angesehen werden.

Bei Verwendung des Stat1 α/β -Antikörpers wurde in Totallysaten nach dem Western Blot neben dem p91-Signal von Stat1 α eine weitere Bande bei kleinerem Molekulargewicht (p84) detektiert, bei der es sich um Stat1 β handelt (siehe Abb. 14). Diese p84-Bande ist von der Intensität deutlich schwächer als die von p91 (Stat1 α), was bei der Detektion des gleichen Epitops innerhalb der Stat1-Spleißvarianten mit der tatsächlichen Proteinmenge von Stat1 α und Stat1 β in Thrombozyten korreliert. Die Stat1 β -Bande ist sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Plättchen nachweisbar und wird nach TPO-Stimulation nicht retardiert. Hingegen kann auch hier die Gelretardierung der p91-Bande nach ca. 5 minütiger Stimulation der Thrombozyten mit TPO nachgewiesen werden.

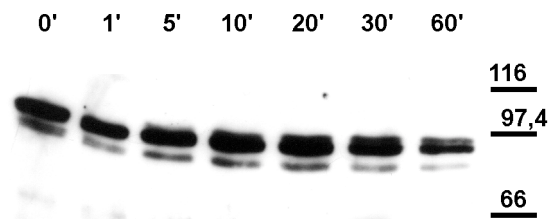


Abb 14: Die TPO-Stimulation von Plättchen führt nicht zu einer gelretardierten Form von Stat1 β . Thrombozyten wurden für die angegebenen Zeiten mit TPO stimuliert und anschließend lysiert. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit einem α -Stat1 α/β -Antikörper inkubiert. Dabei konnte die Aktivierung von Stat1 α im Verlauf der Stimulation gezeigt werden, während Stat1 β aus TPO-stimulierten Zellen keine Gelretardierung aufweist.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Stat1 α in Thrombozyten nach TPO-Stimulation aktiviert wird. Die Aktivierung erfolgte spät während der TPO-Stimulation. Stat1 α wird in Thrombozyten in größerem Ausmaß exprimiert als Stat1 β . Diese Spleißvariante wurde zudem nicht in der Weise nach TPO-Stimulation aktiviert, daß es zu einer Gelretardierung im Western Blot kam. Daraus ist abzuleiten, daß sich in TPO-stimulierten Thrombozyten vorrangig Stat1 $\alpha/1\alpha$ -Homodimere bilden und an DNA binden.

Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von Stat1 sollte außerdem mit einem Antikörper gegen Tyrosin 701-phosphat von Stat1 im Western Blot von Thrombozytentotalysaten erbracht werden. Mit diesem Antikörper ließen sich jedoch keine spezifischen Signale mit den erwarteten Molekulargewichten nachweisen, obwohl der Antikörper in Kontrollexperimenten in mit Phorbol ester stimulierten A431 Zellysaten ein Protein bei 90 kDa erkannt hat.

3.2.7. UNTERSUCHUNGEN ZUR SERINPHOSPHORYLIERUNG VON STAT1 UND STAT3

Die Phosphorylierung der Stat-Moleküle durch die Janus-Kinasen erfolgt an einem C-terminal gelegenen Tyrosinrest. Danach kommt es zur Bindung an die SH2-Domänen anderer Stat-Moleküle und somit zur Homo- bzw- Heterodimerisierung. Die Konformationsänderung nach Dimerisierung legt eine nukleäre Lokationssequenz frei, die zur Translokation der Dimere in den Nucleus führt.

Stat1, Stat3, Stat4 und Stat5 haben zusätzlich zu dem phosphorylierbaren Tyrosinrest noch einen Serinrest, der in einem PXSP-Motiv liegt und damit ein Substrat für einige Mitglieder der MAP-Kinase-Familie (ERK1 und ERK2) ist. Da die Phosphorylierung des Serinrestes in Stat-Molekülen neben der Tyrosinphosphorylierung ebenfalls einen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität der Stat-Dimere hat und unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung erfolgt, wurde zunächst untersucht, ob die MAP-Kinase ERK2 in Plättchen nach Stimulation mit TPO tyrosinphosphoryliert und damit aktiviert wird und ob es dann mit Aktivierung des MAPK-Signalwegs eine Verknüpfung mit dem aktivierten Jak-Stat-Signalweg in Thrombozyten gibt.

Mit Hilfe von Antikörpern, die ERK1 und ERK2 erkennen, konnte gezeigt werden, daß sowohl ERK1 als auch ERK2 (siehe Abb. 15 unten) in Plättchen vorliegen. Durch Inkubation der Thrombozytenlysate mit einem weiteren Antikörper, der sowohl phosphoryliertes ERK1 wie auch phosphoryliertes ERK2 erkennt, konnte außerdem die Kinetik der Aktivierung von ERK1 und ERK2 untersucht werden. In Abb. 15 oben kann man erkennen, daß hauptsächlich phospho-ERK2 (p42) nach TPO-Stimulation in Thrombozyten entsteht. Neben einer schwachen konstitutiven Bande von ERK2 bei

42 kDa konnte eine deutliche Tyrosinphosphorylierung innerhalb von 5 bis 10 Minuten TPO-Stimulation detektiert werden, die ihr Maximum nach 30 Minuten hatte. Eine schwächere Bande bei 44 kDa (phospho-ERK1) zeigte die Aktivierung von ERK1 in geringerem Ausmaß als ERK2 mit einer vergleichbaren Kinetik wie bei ERK2.

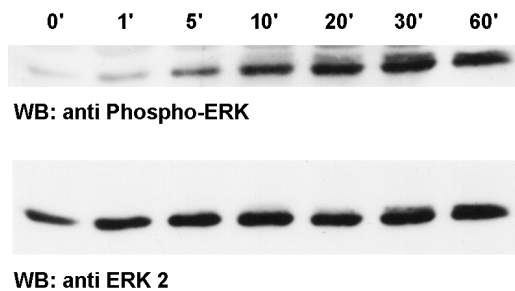


Abb. 15: Nachweis der Phosphorylierung von ERK2 nach TPO-Stimulation in Thrombozyten. Unstimulierte und TPO-stimulierte Plättchen wurden nach den angegebenen Zeiten der Stimulation lysiert und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot wurden die Proteine mit einem α -phospho-ERK (1/2)-Antikörper inkubiert. Neben einer schwachen konstitutiven Phosphorylierung von ERK2 (p42) konnte eine deutliche Aktivierung nach 5 Minuten TPO-Stimulation detektiert werden. Das Maximum der Phosphorylierung war nach 30 Minuten Stimulation erreicht. ERK1 (p44) wurde in geringerem Ausmaß aktiviert und zeigte eine mit ERK2 vergleichbare Kinetik. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung wurde der Blot nach dem Strippen mit einem α -ERK2-Antikörper detektiert.

Die Aktivierung von ERK2 in Thrombozyten innerhalb von 5 bis 10 Minuten TPO-Stimulation legt nahe, daß die PXSP-Motive von Stat1 und Stat3 von der aktivierten Kinase phosphoryliert werden können. Zum Nachweis der Serinphosphorylierungen wurden Stat1 und Stat3 aus unstimulierten und stimulierten Thrombozytenlysaten immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE und Western Blot mit einem Antikörper gegen Serinphosphat detektiert. Dabei konnten keine Banden mit den erwarteten Molekulargewichten von Stat1 und Stat3 detektiert werden. Nach der Detektion wurde die erfolgreiche Immunpräzipitation von Stat1 und Stat3 aus den Thrombozytenlysaten durch Strippen und erneutes Detektieren mit dem α -Stat1- bzw. α -Stat3-Antikörper überprüft. Dabei konnten die erwarteten Banden nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Während die verwendeten Tyrosinphosphat-Antikörper den modifizierten Aminosäurerest weitgehend unabhängig von der Umgebung erkennen, sind die

Serinphosphat-Antikörper in ihrer Erkennung stärker von den benachbarten Aminosäuren abhängig. Um die nach Detektion mit dem α -Serinphosphat-Antikörper erhaltenen Ergebnisse, daß weder Stat1 noch Stat3 serinphosphoryliert werden, zu validieren, wurden Thrombozytenlysate nach den entsprechenden Stimulationszeiten im Western Blot mit einem Antikörper detektiert, der spezifisch Serin 727-phosphat in Stat3 erkennt (siehe Abb. 16).

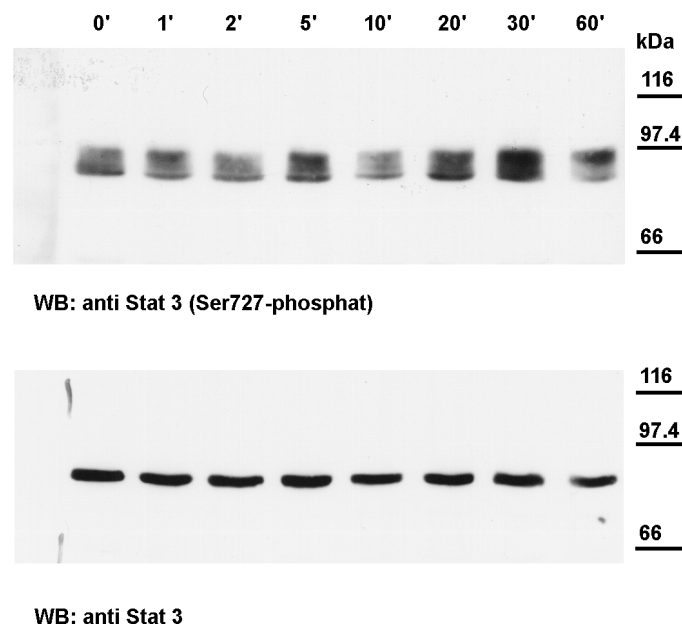


Abb. 16: Nachweis einer konstitutiven Serin-727-Phosphorylierung von Stat3 in Thrombozyten, die nach Stimulation mit TPO nicht moduliert wird. Unstimulierte und TPO-stimulierte Plättchen wurden nach den angegebenen Zeiten der Stimulation lysiert. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE getrennt und nach dem Western Blot mit einem α -Stat3-Serin 727-phosphat-Antikörper inkubiert. Dabei konnten neben einer scharfen Bande bei ca. 92 kDa unscharfe Signale bei etwas höherem Molekulargewicht detektiert werden. Die Intensitäten dieser Signale zeigten keinerlei TPO-Abhängigkeit. Zum Nachweis gleicher Proteinbeladung wurde der Blot nach dem Strippen mit einem α -Stat3-Antikörper inkubiert.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß Stat3 in Thrombozyten entweder nicht oder konstitutiv am Serinrest 727 phosphoryliert vorliegt. Dabei konnte in den Thrombozytenlysaten keinerlei Abhängigkeit von TPO nachgewiesen werden (siehe Abb. 16 oben). Neben der Detektion einer immunreaktiven Proteinbande mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 92 kDa, konnte außerdem bei etwas höherem Molekulargewicht ein unscharfes Signal nachgewiesen werden. Beide

Banden zeigten keine Kinetik und waren auch schon in unstimulierten Plättchen nachweisbar. Nach dem Strippen der Membran und erneutem Detektieren mit einem α -Stat3-Antikörper konnte die gleichmäßige Beladung von allen Spuren mit Stat3 bestätigt werden. Mit diesen Daten kann eine Modulierung der Serinreste (727) in Stat1 und Stat3 als Reaktion auf die Stimulation mit TPO weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.

3.2.8. NACHWEIS DER TYROSINPHOSPHORYLIERUNGEN VON STAT5A UND STAT5B

Im Rahmen der Signaltransduktion von c-Mpl wird neben Stat1 und Stat3 auch Stat5 oder ein Stat5-ähnlicher Faktor in Blutplättchen aktiviert (PALLARD *et al.* 1995; MIYAKAWA *et al.* 1996; SATTLER *et al.* 1995). Zur weiteren Identifizierung von aktivierten Stat-Molekülen nach TPO-Stimulation in Thrombozyten sollte als nächstes untersucht werden, ob die beiden unterschiedlichen Genprodukte Stat5a und Stat5b in Thrombozyten exprimiert werden und ob sie im Rahmen der c-Mpl-Signaltransduktion in Plättchen tyrosinphosphoryliert werden.

Mittels Immunpräzipitation von Stat5a und Stat5b aus Lysaten von unstimulierten oder TPO-stimulierten Thrombozyten konnte durch Verwendung zweier nicht-kreuzreaktiver Antikörper gezeigt werden, daß sowohl Stat5a als auch Stat5b in Thrombozyten vorliegt. Beide Faktoren werden nach 5-minütiger Stimulation der Blutplättchen mit TPO tyrosinphosphoryliert (siehe Abb. 17 A und B).

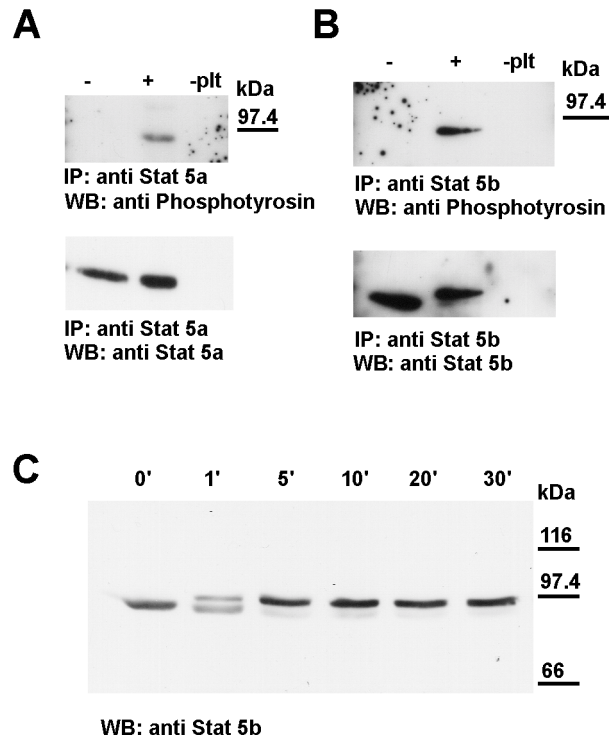


Abb. 17: Nachweis der Aktivierung von Stat5a und Stat5b in Thrombozyten nach TPO-Stimulation. **(A,B)** Unstimulierte (-) und für 5 Minuten mit TPO (+) stimulierte Plättchen wurden lysiert und die Präzipitate in der SDS-PAGE getrennt. Nach dem Western Blot wurden die Präzipitate mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper detektiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne Plättchen aufgetragen (-Plt). Dabei konnte nur in den mit TPO stimulierten Plättchenproben eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht für Stat5a **(A)** und Stat5b **(B)** detektiert werden. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung wurden die Blots gestriipt und mit den entsprechenden α -Stat5-Antikörpern detektiert. **(C)** Zur Untersuchung der Kinetik der Aktivierung von Stat5b wurden unstimulierte und TPO-stimulierte Plättchenlysate nach dem Western Blot mit dem α -Stat5b-Antikörper inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß Stat5b bereits innerhalb einminütiger TPO-Stimulation in Thrombozyten phosphoryliert wird, was zu einer Gelretardierung führte.

Nach dem erneuten Detektieren der Western Blots mit den entsprechenden α -Stat5-Antikörpern konnte gezeigt werden, daß zum einen jeweils gleiche Mengen an Stat-Protein aufgetragen waren und zum anderen Stat5b aus unstimulierten Plättchen im SDS-PAGE weiter wandert als Stat5b aus Plättchen, die mit TPO stimuliert worden waren (siehe Abb. 17, B oben). Zur Bestätigung dieses Shifts von Stat5b in stimulierten Plättchen wurden Thrombozyten für die angegebenen Zeiten mit TPO inkubiert und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion nach Western Blot mit einem α -Stat5b-Antikörper bestätigte diesen *Shift*. Die Stimulation von Thrombozyten

mit TPO für eine Minute führte zur Reduktion der Signalintensität von Stat5b auf die Hälfte, während ein zweites immunreaktives Protein bei etwas höherem Molekulargewicht mit gleicher Intensität nachweisbar war (Abb 17 C). Nach fünf Minuten Stimulation konnte in den Lysaten fast ausschließlich die langsamer wandernde Spezies nachgewiesen werden, während das schneller wandernde Signal für Stat5b kaum mehr detektierbar war und mit andauernder Stimulationszeit immer schwächer wurde. Für Stat5a konnte eine vergleichbare Gelretardierung trotz nachgewiesener Tyrosinphosphorylierung nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Stat5a und Stat5b in Thrombozyten vorhanden sind und daß beide Genprodukte in Thrombozyten innerhalb der ersten Minuten der TPO-Stimulation tyrosinphosphoryliert werden.

3.2.9. DIMERE VON STAT5A UND STAT5B BINDEN AN DNA

Die Tyrosinphosphorylierung von Stat5a und Stat5b legte nahe, daß sich auch funktionale Dimere bilden, die in der Lage sind, an DNA zu binden. Zur Untersuchung der DNA-bindenden Stat5-Komplexe, wurden EMSAs durchgeführt. Dazu wurden Plättchen für die angegebene Zeit mit TPO stimuliert, bevor sie mit EMSA-Lysepuffer lysiert wurden. Die Sequenz des markierten Oligonukleotids wurde als Konsensus-Sequenz aus Promotoren von Interferon-induzierbaren Genen entnommen, die Stat5 binden .

Bei Inkubation der Thrombozytenlysate mit dem radioaktiv-markierten *Stat5-responsible element* (S5RE) wurden nach elektrophoretischer Trennung zwei Hauptbanden detektiert, wobei die langsamer wandernde Bande bereits nach 1 Minute TPO-Stimulation deutlich detektierbar war und sich auch bei längerer Stimulation der Thrombozyten mit TPO nicht mehr in der Intensität änderte. Die im Gel weiter wandernde zweite Bande war erst bei längerer TPO-Stimulation (ab 30 Minuten) der Plättchen als intensives Signal erkennbar, wies aber dennoch eine viel schwächere Intensität als die obere Bande auf (siehe Abb 18, A) Da die Kinetik dieser zweiten Bande in ihrer zunehmenden Intensität nach 30 Minuten TPO-Stimulation der Plättchen an die Kinetik der Stat1-Homodimerbindung an m67 erinnerte (siehe 3.2.6), wurde untersucht, ob Stat1-Homodimere auch an das S5RE binden. Die Zugabe von α -Stat1-Antikörper (aber nicht von α -Stat3-Antikörper) in die Bindereaktion mit S5RE

fürte zum Verschwinden dieser Bande (Abb. 18 A) wie auch an m67 für Stat1 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß Stat1 aus Plättchen nach TPO-Stimulation an das vorliegende Stat5-reponsible Element (S5RE) bindet.

Anschließend wurde die Zusammensetzung des Komplexes am S5RE untersucht, der sich bereits nach einer Minute TPO-Stimulation gebildet hatte und sich in seiner Signalintensität auch bei längerer Stimulationsdauer der Plättchen nicht änderte. Dazu wurden die Antikörper α -Stat5a und α -Stat5b jeweils in verschiedenen Bindereaktionen eingesetzt. Beide Antikörper führten zum Nachweis von langsamer wandernden *Supershift*-Komplexen, aber keiner der Antikörper allein war in der Lage, die gesamte Bande zu *shiften* (siehe Abb. 18, B). Auch eine Kombination beider Antikörper führte nur zum *Shift* eines Teils dieses Komplexes. Anschließend wurden beide Antikörper in größerer Konzentration eingesetzt, um ein unvollständiges *Shiften* auszuschließen. Dabei konnte aber keine Veränderung der Bandenintensitäten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was auf eine ausreichende Antikörpermenge schließen ließ.

Das Muster der nicht "geschifteten" Sub-Komplexe und die Verwendung von nicht kreuzreagierenden Antikörpern legte den Schluß nahe, daß sowohl Stat5a/5a wie Stat5b/5b-Homodimere aus TPO-stimulierten Thrombozyten an S5RE binden. Darüberhinaus konnte bei der Verwendung beider Antikörper in einem Bindeansatz auch eine sehr langsam wandernde Bande (*Super-Supershift*) nachgewiesen werden, bei der es sich um Stat5a, Stat5b sowie die beiden entsprechenden Antikörper handeln könnte. Da diese Bande weder bei Verwendung von α -Stat5a- noch bei α -Stat5b-Antikörpern allein detektiert werden konnte, ergab sich die Annahme eines Stat5a/5b-Heterodimers.

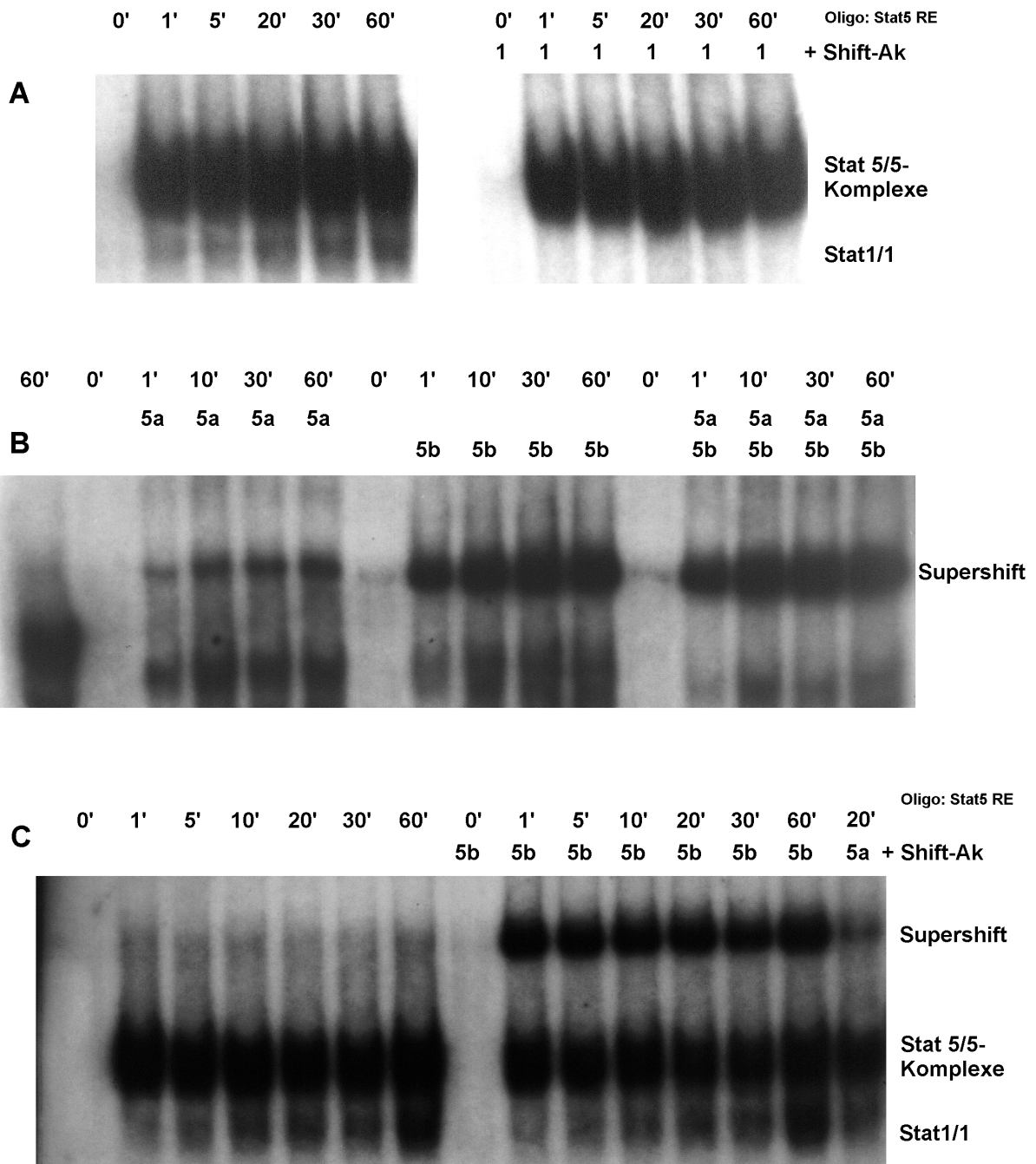


Abb 18: Stat5a und Stat5b bilden Komplexe, die an DNA binden können. Unstimulierte und TPO-stimulierte Thrombozytenlysate wurden mit den angegebenen Antikörpern oder BSA für 30 Minuten mit dem radioaktiv-markierten Oligo S5RE inkubiert. Die Komplexe wurden in einer 5%igen PAGE getrennt und nach Trocknung des Gels nach Autoradiographie detektiert. **(A)** Nach TPO-Stimulation banden zwei Komplexe mit unterschiedlicher Kinetik an S5RE. Der schneller wandernde Komplex hatte eine

langsame DNA-Bindung und ließ sich mit einem α -Stat1-Antikörper vollständig verdrängen, während der langsamere wandernde Komplex bereits nach 1 Minute detektierbar ist. **(B)** Der langsamere wandernde Komplex besteht aus Stat5a und Stat5b, aber auch beide Antikörper können den Komplex nicht vollständig *shiften*. **(C)** Stat5b-Komplexe banden innerhalb von einer Minute an S5RE und behielten ihre Intensität für mindestens 60 Minuten.

Das Adapterprotein p39 CrkL bindet im Rahmen der Signaltransduktion an Stat5 und liegt auch in den Komplexen mit DNA vor (ODA *et al.* 1998; OTA *et al.* 1998; FISH *et al.* 1999; OZAKI *et al.* 1998). Da CrkL auch in Plättchen exprimiert wird und nach TPO-Stimulation der Thrombozyten tyrosinphosphoryliert wird (ODA *et al.* 1996a), wurde untersucht, ob CrkL auch in den S5RE-bindenden Komplexen, die sich in Thrombozyten nach TPO-Stimulation bilden, vorliegt. Der Zusatz von 1 μ g α -CrkL-Antikörper in den Bindeansatz mit TPO-stimulierten Thrombozytenlysaten und dem S5RE-Oligo führte zu der Entstehung eines langsamer wandernden *Supershifts* und einer Abschwächung der Intensität des gesamten S5RE-bindenden Komplexes (Abb 19, A). Diese Intensitätsabschwächung legte nahe, daß die verwendete α -CrkL-Antikörpermenge in der Bindereaktion noch nicht im Sättigungsbereich lag. So wurden in einem weiteren Experiment steigende Antikörpermengen zu den Bindereaktionen gegeben (siehe Abb 19, B). Dabei zeigte sich, daß höhere Antikörpermengen zu einer weiteren Intensitätsabschwächung der S5RE-*Shift*-Bande führten und der *Supershift* in seiner Intensität deutlich zunahm. Die Kombination von α -CrkL- und α -Stat5b-, aber nicht von α -CrkL- mit α -Stat5a-Antikörpern in einer Bindereaktion führte zu der Entstehung einer noch langsamer als der *Supershift* wandernden *Super-Supershift*-Bande (siehe Abb 19, A). Dies zeigt, daß CrkL im wesentlichen mit Stat5b, aber nicht (oder schwächer) mit Stat5a in stimulierten Plättchen wechselwirkt. Dies wurde dadurch bestätigt, daß die durch den α -Stat5b-Antikörper entstandene *Supershift*-Bande durch Zugabe von steigenden Mengen an α -CrkL-Antikörper vollständig retardiert wurde (siehe Abb 19, B). Die neu gebildete *Super-Supershift*-Bande enthält neben Stat5b und CrkL die beiden entsprechenden Antikörper.

Die Kombination beider α -Stat5-Antikörper in einer Bindereaktion führte nicht zur kompletten Retardierung des gesamten S5RE-*Shift*-Bande zum *Supershift* (siehe Abb. 19, A). Die Intensität dieses sehr schnell wandernden Sub-Komplexes konnte aber durch steigende Mengen an α -CrkL-Antikörper deutlich reduziert werden. Diese

Ergebnisse zeigen, daß ein weiterer Stat5-artiger Faktor in Assoziation mit CrkL an das S5RE bindet, der aber weder Stat5a noch Stat5b ist.

Es konnte gezeigt werden, daß sich im Rahmen der c-Mpl-Signaltransduktion in TPO-stimulierten Thrombozyten Homodimere von Stat5a und Stat5b bilden sowie ein Heterodimer Stat5a/Stat5b. Das Adaptorprotein CrkL bindet bevorzugt an aktiviertes Stat5b und liegt in stimulierten Thrombozyten im Komplex mit DNA vor.

Aus den hier gezeigten EMSA- und den Western Blot-Daten ergibt sich, daß der TPO-Rezeptor c-Mpl auf Thrombozyten nach Stimulation mit TPO zur Aktivierung der Januskinase Jak2 führt. Diese phosphoryliert Stat1 α , Stat3, Stat5a und Stat5b. Die Phosphorylierung der verschiedenen Stat-Moleküle führt zu einer spezifischen Bildung von Stat-Dimeren. Es bilden sich Homodimere von Stat1, Stat3, Stat5a und Stat5b sowie Heterodimere von Stat1 α /Stat3 und Stat5a/Stat5b. Das Adaptorprotein CrkL liegt in den Komplexen an Stat5b assoziiert vor. Die Dimere zeigen in Abhängigkeit von der TPO-Stimulationsdauer unterschiedliche DNA-Bindungskinetiken, was eine TPO-spezifische Aktivierung von Genen erklären kann.

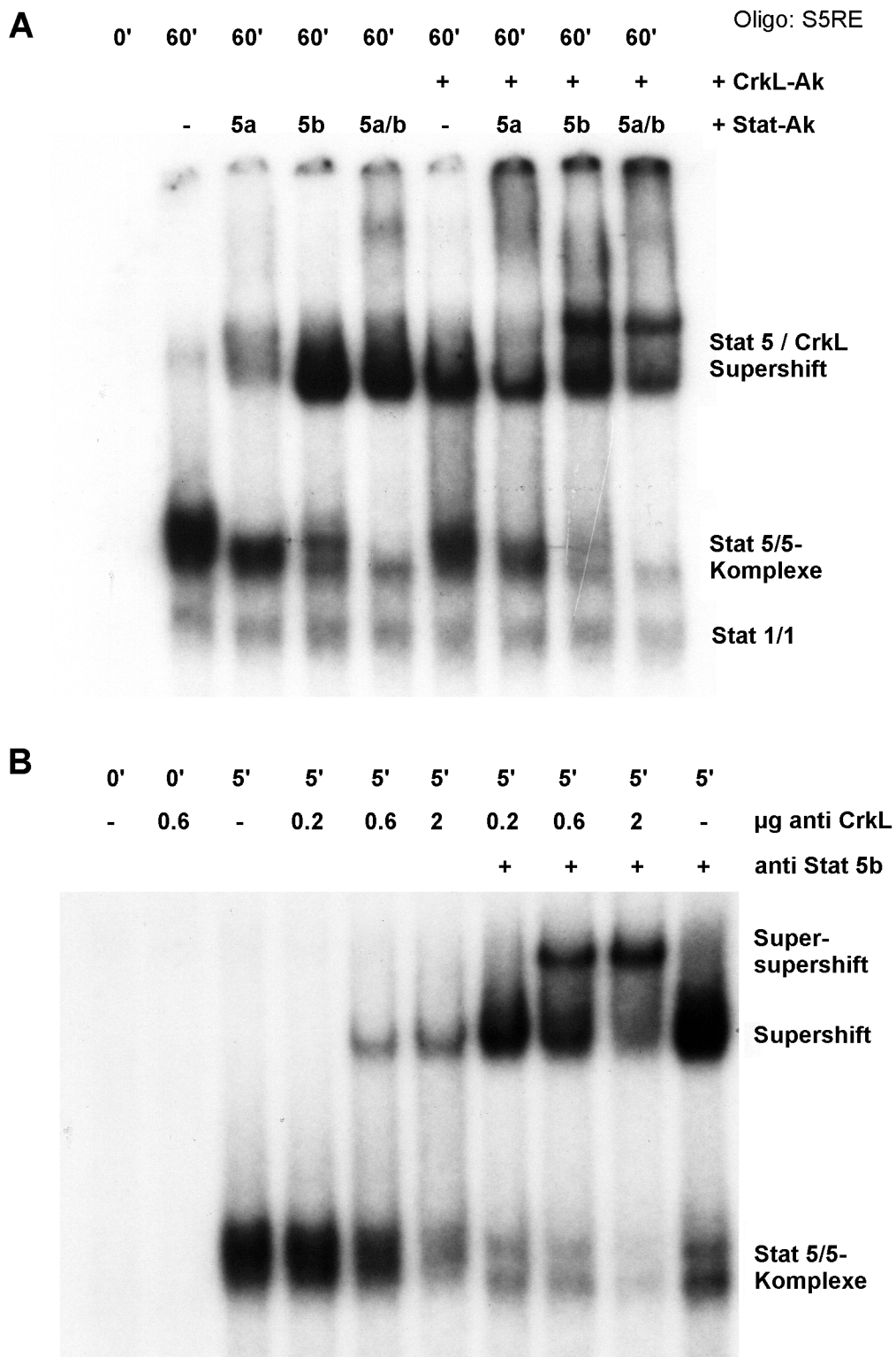


Abb 19: Die S5RE-bindenden Komplexe in TPO-stimulierten Thrombozyten bestehen aus Stat5a, Stat5b und CrkL. Zur Untersuchung der Zusammensetzung der S5RE-bindenden Proteine wurden Kombinationen der Antikörper α -Stat5a, α -Stat5b und α -CrkL zu den Bindereaktionen mit Lysaten TPO-stimulierter Thrombozyten und dem ^{32}P -markierten S5RE-Konsensus-Oligonukleotid gegeben. (A) Die Zugabe von α -Stat5a bzw. α -Stat5b-Antikörper zur Bindereaktion zeigt, daß beide Stat5b-Moleküle im Komplex vorliegen. Der *Super-Supershift* bei Zugabe beider Antikörper weist ein Stat5a/Stat5b-

Heterodimer nach. Auch die Zugabe von α -CrkL-Antikörper führt zum *Supershift* und weist die Präsenz von CrkL im S5RE-bindenden Komplex nach. (B) Der Einsatz steigender Konzentrationen an α -CrkL-Antikörper zeigt, daß alle Komplexe in der Bande CrkL enthalten. Die durch den α -Stat5b-Antikörper erhaltene *Supershift*-Bande kann durch α -CrkL-Antikörper nochmals *geshiftet* werden.

3.3. PROTEINBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN BLUTPLÄTTCHEN VON PATIENTEN

3.3.1. THROMBOZYTEN VON PATIENTEN MIT CAMT ZEIGEN KEINE TYROSIN-PHOSPHORYLIERBAREN PROTEINE NACH STIMULATION MIT TPO

Amegakaryozytäre Thrombozytopenien (AMT) sind Erkrankungen der Hämatopoese, bei denen ein Thrombozytenmangel aufgrund einer Bildungsstörung der Vorläuferzellen im Knochenmark, der Megakaryozyten vorliegt. Neben den erworbenen Formen (z.B. medikamentenbedingt) unterscheidet man innerhalb der angeborenen AMT u.a. die isolierte kongenitale AMT (CAMT) und das TAR-Syndrom, bei dem die AMT mit zusätzlichen Veränderungen des Skeletts (bilaterale Radiusaplasie, *thrombocytopenia with absent radii*) einhergeht. In die folgenden Untersuchungen sind ausschließlich Patienten einbezogen, die an CAMT oder an dem TAR-Syndrom erkrankt sind.

Frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß Patienten mit CAMT hohe TPO-Serumspiegel aufwiesen (CREMER *et al.* 1999). Die Thrombozyten dieser Patienten zeigten hingegen durchflußzytometrisch keine *in vitro*-Reaktivität auf TPO. Im folgenden sollte untersucht werden, ob Thrombozyten von CAMT-Patienten eine mangelnde Reaktivität auf TPO innerhalb der Signaltransduktionskaskade zeigen. Dabei erforderten zwei Dinge die Optimierung aller Methoden auf kleinste Materialmengen: zum einen liegt bei den CAMT-Patienten eine sehr schwere Thrombozytopenie mit Plättchenzahlen oft unter 40.000/ μ l vor und zum anderen handelt es sich um Kinder, bei denen keine größeren Mengen Blut abgenommen werden konnten.

Die ersten Untersuchungen ergaben oftmals ein Grundphosphorylierungsmuster unstimulierter Thrombozyten von CAMT-Patienten, das deutlich von dem der Gesunder abwich. Die Unterschiede waren auf das bei Patienten zugunsten des Plasmas verschobene Verhältnis von Thrombozyten zu den Plasmabestandteilen

zurückzuführen. Dies wurde dadurch bestätigt, daß bereits in der Ponceaufärbung der Plättchenproteine von Patienten nach Elektrophorese und Western Blot sehr intensive Banden bei 66 kDa (Albumin) detektiert wurden, was auf eine Kontamination der Plättchenproteine mit Serumproteinen verweist. Auf diese Weise entstand ein verändertes Bandenmuster konstitutiv tyrosinphosphorylierter Proteine unstimulierter Thrombozyten. Bei der Untersuchung von Thrombozyten eines CAMT-Patienten (EK) konnte schließlich ein mit dem Gesundspender (ME) vergleichbares Muster von konstitutiv phosphorylierten Proteinen gefunden werden (siehe Abb. 20). Während die Thrombozyten dieses Gesundspenders auf TPO reagierten, indem hauptsächlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 95 kDa phosphoryliert wurde, konnte bei dem CAMT-Patienten keine Induktion von tyrosinphosphorylierten Proteinen nach TPO-Stimulation detektiert werden. Statt dessen war hier in dem entsprechenden Molekulargewichtsbereich bei 95 kDa sowohl in den unstimulierten wie in den TPO-stimulierten Proben ein schwaches unspezifisches Signal zu erkennen, aber es waren keine distinkten Banden nachweisbar.

Im Gegensatz zu Thrombozyten von Gesundspendern, die auf TPO-Stimulation durch Tyrosinphosphorylierung von Proteinen reagierten, waren bei stimulierten Thrombozyten von CAMT-Patienten keine zusätzlichen phosphorylierten Proteine nachweisbar. Dies bestätigte die fehlende *in vitro*-Reaktivität der Thrombozyten der Patienten auf TPO.

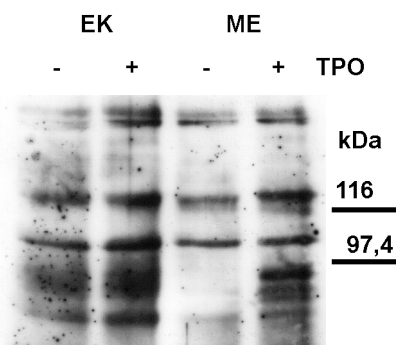


Abb. 20: Thrombozyten von CAMT-Patienten reagieren nicht auf TPO. Thrombozyten eines Gesundspenders (ME) und eines Patienten mit CAMT (EK) wurden gewaschen und auf gleiche Zellzahl eingestellt, bevor sie für 5 Minuten mit TPO stimuliert wurden. Anschließend wurden die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western Blot gegen Tyrosinphosphat detektiert. Die bei dem Gesundspender festgestellte Induktion von Proteinbanden bei 95 kDa durch TPO-Stimulation konnte bei dem Patienten nicht nachgewiesen werden. Die Thrombozyten zeigten keinerlei Reaktivität auf TPO.

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob diese veränderte Reaktivität der Thrombozyten auf TPO vererbt wird und sich folglich auch bei den Eltern eines CAMT-Patienten nachweisen läßt. Dazu wurden Thrombozyten des Patienten LM, des Vaters (VM), der Mutter (MM) sowie eines Gesundspenders (ME) gewaschen, auf gleiche Zellzahl eingestellt und anschließend unstimuliert bzw. nach TPO-Stimulation lysiert. Danach wurden die Proteinlysate in der Elektrophorese aufgetrennt und nach Western Blot mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper inkubiert. Auch hier konnte bei allen unstimulierten Proben ein nahezu identisches Muster konstitutiv tyrosinphosphorylierter Proteine nachgewiesen werden (siehe Abb. 21). Dies zeigt, daß der Patient verglichen mit seinen Eltern und einem Gesundspender in den unstimulierten Thrombozyten die (annähernd) gleiche Protein-Tyrosinphosphorylierung aufwies.

Nach Stimulation der Thrombozyten mit TPO zeigte der Patient wiederum in dem relevanten Molekulargewichtsbereich bei 95 kDa keine Induktion von Banden. Hingegen konnte sowohl in den Proben des Vaters als auch in denen der Mutter eine dem Gesundspender vergleichbare Induktion von Banden bei den TPO-stimulierten Thrombozyten gefunden werden. Die normale Reaktivität der Plättchen der Eltern des CAMT-Patienten auf TPO zeigt, daß die fehlende *in vitro*-Reaktivität der Thrombozyten des Patienten nicht vererbt wird, sondern bei dem Patienten "neu" entstanden ist.

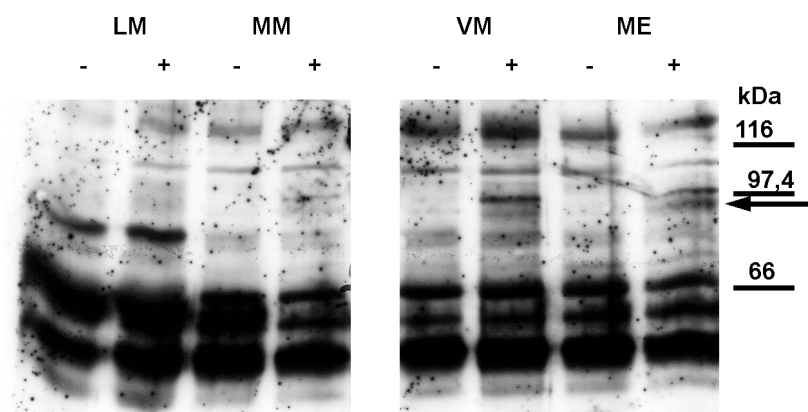


Abb 21: Die TPO-Reaktivität von Thrombozyten der Eltern eines CAMT-Patienten sind mit denen des Gesundspenders vergleichbar. Thrombozyten des Patienten (LM), beider Elternteile (VM, MM) und eines Gesundspenders (ME) wurden gewaschen und auf gleiche Zellzahl eingestellt, bevor sie mit TPO stimuliert wurden. Nach der Lyse wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western Blot mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper inkubiert. Dabei zeigten beide Elternteile eine mit dem Gesundspender vergleichbare Reaktivität der Plättchen auf TPO, während die des Patienten keinerlei Reaktivität auf TPO zeigte.

3.3.2. PLÄTTCHEN VON TAR-PATIENTEN ZEIGEN KEINE REAKTIVITÄT AUF TPO

Auch Patienten mit TAR-Syndrom zeigen eine schwere Thrombozytopenie, obwohl die durchschnittlichen Plättchenzahlen mit 40 - 80.000/ μ l höher liegen als bei den Patienten mit CAMT. Die Thrombozytopenie wird durch eine Bildungsstörung innerhalb der Megakaryopoese hervorgerufen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte durchflußzytometrisch gezeigt werden, daß Blutplättchen dieser Patienten normal auf die Plättchenaktivatoren ADP und TRAP reagieren, daß es aber nicht zu einem Synergismus von TPO mit ADP oder TRAP kommt (SCHULZE 1996; BALLMAIER *et al.* 1997). Um auszuschließen, daß die fehlende Reaktivität auf TPO an dem Fehlen des Rezeptors c-Mpl liegt, wurde die Expression von c-Mpl auf der Oberfläche von Thrombozyten im FACScan untersucht. Hier konnte kein Unterschied zu der c-Mpl-Expression von Gesundspendern gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

In dieser Untersuchung sollte überprüft werden, ob bei TAR-Patienten der Defekt in der Reaktivität von Thrombozyten auf TPO in der Signaltransduktion von c-Mpl liegt. Dazu wurden gewaschene Blutplättchen der TAR-Patienten und der Gesundspender auf die gleiche Zellzahl eingestellt und anschließend für 5 Minuten mit TPO stimuliert, bevor sie lysiert wurden. Die Proteinlysate wurden in der Elektrophorese aufgetrennt und nach Western Blot mit einem Antikörper α -Tyrosinphosphat inkubiert.

Unstimulierte Thrombozyten wiesen bei dem TAR-Patient SE und dem Gesundspender (MB) das gleiche Muster an konstitutiv tyrosinphosphorylierten Proteinbanden auf (siehe Abb. 22). Unterschiede zwischen Normalspender und Patient zeigten sich erst bei dem Vergleich des Bandenmusters stimulierter Thrombozyten. Die Plättchen des Gesundspenders reagierten auf TPO mit Induktion von Tyrosinphosphorylierungen von Proteinen mit Molekulargewichten von 95-100 kDa sowie >120 kDa. Demgegenüber wurden in Thrombozyten des Patienten auch bei Stimulation mit sehr hohen Dosen von TPO keine zusätzlichen Tyrosinphosphorylierungen induziert. Es wurde das gleiche Muster an tyrosinphosphorylierten Proteinbanden detektiert wie in unstimulierten Thrombozyten des Patienten.

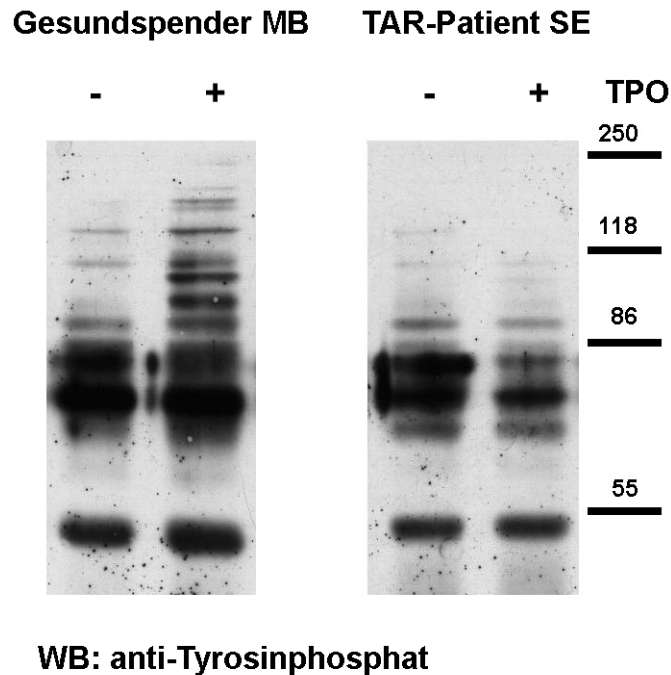


Abb. 22: Thrombozyten von TAR-Patienten zeigen keine induzierbaren Tyrosinphosphorylierungen als Folge der TPO-Stimulation. Blutplättchen eines TAR-Patienten (SE) und eines Gesundspenders (MB) wurden gewaschen und auf gleiche Plättchenzahl eingestellt. Die Lysatproteine der unstimulierten und TPO-stimulierten Plättchen wurden in der Elektrophorese aufgetrennt und nach Western Blot mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper inkubiert. Die Thrombozyten des TAR-Patienten zeigten im Vergleich zum Normalspender keinerlei Reaktivität auf TPO.

Folglich ist der Defekt in der Reaktivität der Thrombozyten auf TPO, wie er von unserer Arbeitsgruppe zuvor beschrieben wurde, in der Signaltransduktion von c-Mpl begründet. Trotz Bildung von biologisch aktivem TPO und der gesunden Thrombozyten vergleichbaren Expression des Rezeptors konnte keine intrazytoplasmatische Induktion von Tyrosinphosphorylierungen im Rahmen der Signaltransduktion von c-Mpl gefunden werden. Um die Bindung von TPO an c-Mpl nachzuweisen, wurden Thrombozyten mit TPO inkubiert, das zuvor kovalent mit dem Fluorophor FITC markiert worden war (siehe Abschnitt 2.8.). Diese Thrombozyten konnten anschließend im FACS auf die Bindung des FITC-TPO an c-Mpl hin untersucht werden. Leider reichte die Sensitivität der Messung für einen eindeutigen Nachweis der Bindung von TPO an c-Mpl auf Thrombozyten beim Gesundspender nicht aus. Ursache dafür war vermutlich eine Kombination aus der mit ca. 30 Rezeptoren pro Plättchen (BROUDY *et al.* 1997) geringen c-Mpl-Expression auf

Thrombozyten und einer unzureichenden FITC-Markierung von TPO, von dem nur eine begrenzte Menge für die Untersuchungen zur Verfügung stand.

Da überhaupt keine TPO-abhängigen Tyrosinphosphorylierungen von Plättchenproteinen nachweisbar waren, liegt beim TAR-Syndrom ein Defekt in der Bindung von TPO an c-Mpl oder sehr früh innerhalb der Signaltransduktion vor.

3.3.3. IN PLÄTTCHEN VON TAR-PATIENTEN WIRD JAK2 NACH TPO-STIMULATION NICHT PHOSPHORYLIERT

Die fehlende Induktion von Tyrosinphosphorylierungen in TPO-stimulierten Blutplättchen von TAR-Patienten legte den Verdacht nahe, daß bereits eine der ersten Kinasen in der Signaltransduktion von c-Mpl bei den Patienten nicht aktiviert wird. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich in den Thrombozyten der Patienten die Januskinase Jak2 nachweisen läßt und ob diese Kinase bei den Blutplättchen der Patienten nach Stimulation mit TPO tyrosinphosphoryliert wird. Dazu wurden Thrombozyten des Patienten RZ sowie beider Eltern (MZ, VZ) und eines Gesundspenders (MB) gewaschen und auf gleiche Zellzahl eingestellt. Nach Inkubation der Thrombozyten mit TPO für 5 Minuten wurde die Stimulation durch Zugabe von Lysepuffer beendet. Anschließend folgten eine IP gegen Jak2, eine Auftrennung der Präzipitate in der SDS-PAGE und, nach dem Transfer, Dabei zeigte sich, daß in den TPO-stimulierten Proben sowohl der Eltern als auch des Gesundspenders ein tyrosinphosphoryliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa nachweisbar war. In dem Lysat TPO-stimulierter Plättchen des Patienten hingegen fehlte eine vergleichbare Proteinbande bei 120 kDa.

Nach dem Strippen der Membran sollte geprüft werden, ob in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen waren. Dazu wurde der Blot mit einem Antikörper α -Jak2 inkubiert. Eine Bande für Jak2 (bei ca.120 kDa) konnte in allen Spuren, unabhängig von der TPO-Phosphorylierung nachgewiesen werden, auch in den Proben des Patienten. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Kinase Jak2 in diesem Patienten mit TAR-Syndrom zwar vorhanden ist, daß sie aber nach Stimulation der Thrombozyten mit TPO nicht aktiviert wird. Da der Defekt bei keinem der Eltern auftrat, kann eine dominante Vererbung der fehlenden Aktivierung von Jak2 bei dem Patienten ausgeschlossen werden. Weiterhin zeigt sich anhand dieser Ergebnisse,

daß die Signaltransduktion von c-Mpl in den Thrombozyten dieser Patienten tatsächlich in einem der ersten Schritte gestört ist, da Jak2 unmittelbar nach TPO-Stimulation tyrosinphosphoryliert wird (siehe 3.2.4.).

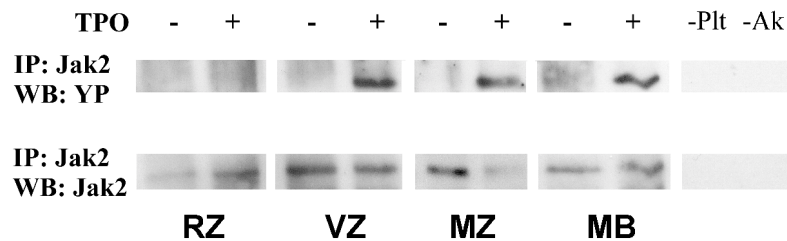


Abb 23: In Thrombozyten von TAR-Patienten ist die Kinase Jak2 vorhanden, sie wird aber nicht durch TPO-Stimulation tyrosinphosphoryliert. Gleiche Zellzahlen von gewaschenen Thrombozyten des Patienten RZ, seiner Eltern (VZ, MZ) und eines Gesundspenders (MB) wurden mit TPO stimuliert und anschließend lysiert. Die Präzipitate nach einer IP α -Jak2 wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine nach dem Western Blot mit einem Antikörper α -Tyrosinphosphat detektiert. Dabei konnte keine Bande bei 120 kDa in der Probe von RZ gefunden werden. Die anschließende Detektion α -Jak2 zeigte, daß in allen Spuren (abgesehen von den Kontrollen) Jak2 vorhanden war.

Die Reaktivität von Thrombozyten auf TPO (hier gezeigt an der Phosphorylierung zytoplasmatischer Proteine) kann als ein Modell der Signaltransduktion von c-Mpl in Megakaryozyten und deren Vorläufern verstanden werden. Insofern kann die Thrombozytopenie der TAR-Patienten durch eine fehlende oder unzureichende Signaltransduktion von c-Mpl in Vorläuferzellen innerhalb der megakaryozytären Zellreihe erklärt werden.

3.4. UNTERSUCHUNGEN DER ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNE VON C-MPL BEI EINEM PATIENTEN MIT SCHWERER THROMBOZYTOPENIE UND DOWN-SYNDROM

Alle bisher beschriebenen Patienten zeichneten sich durch eine Thrombozytopenie aus, die von einer Bildungsstörung der Vorläuferzellen ausging. Das Knochenmark dieser Patienten zeigte wenige oder nahezu keine Megakaryozyten. Das Fehlen der Thrombozyten in der Peripherie beruht auf diesem Mangel an Vorläuferzellen im Knochenmark.

Der hier untersuchte Patient mit Down-Syndrom zeigte eine schwere Thrombozytopenie mit Thrombozytenzahlen, die sogar kleiner als die der CAMT-

Patienten waren ($<10.000/\mu\text{l}$). Knochenmarkstanzen zeigten jedoch im Gegensatz zu denen der zuvor beschriebenen thrombozytopenischen Patienten viele Megakaryozyten. Das Fehlen der Thrombozyten in der Peripherie war entsprechend in diesem Fall nicht auf einen Mangel an Vorläuferzellen im Knochenmark zurückzuführen. CFU-Assays mit mononukleären Knochenmarkzellen (KM-MNC) dieses Patienten ergaben ungewöhnlich viele megakaryozytäre Kolonien (60 und 113, verglichen zu 8-12 bei Gesundspendern). Die Kolonien zeigten eine veränderte Morphologie: Sie waren durch eine erhöhte Zahl deutlich kleinerer Zellen gekennzeichnet. Im Serum des Patienten wurde ein niedriger TPO-Spiegel gemessen, im Gegensatz zu allen anderen hier untersuchten Patienten mit niedrigen Plättchenzahlen, die deutlich erhöhte TPO-Spiegel aufwiesen.

Um die Reaktivität der KM-MNC auf TPO zu testen, wurden jeweils $1 \cdot 10^7$ Zellen des Patienten und eines Gesundspenders in RPMI-1640 + 10% FKS resuspendiert. Einziger Wachstumsfaktor war TPO (10 ng/ml). Während die Zellen des Gesundspenders nach 4-6 Tagen apoptotisch wurden, konnten die aufgereinigten Zellen des Patienten fast 3 Monate mit TPO als einzigem Wachstumsfaktor in Kultur gehalten werden.

Diese Experimente zeigten, daß die Thrombozytopenie bei diesem Patienten nicht an einer Bildungsstörung megakaryozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark liegt. Vielmehr liegt eine gestörte Differenzierung von Vorläufern vor, was zum einen zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen führt und zum anderen die Freisetzung von Thrombozyten aus den reifen Megakaryozyten ins periphere Blut verhindert.

Da nach bisherigem Kenntnisstand unterschiedliche Bereiche der zytoplasmatischen Domäne des humanen TPO-Rezeptors c-Mpl für die Transduktion von Proliferations- und Differenzierungssignalen verantwortlich sind (MORITA *et al.* 1996; TAKATOKU *et al.* 1997), sollte im folgenden untersucht werden, ob bei dem beschriebenen Patienten Mutationen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors für das gestörte Verhältnis zwischen Proliferation und Differenzierung verantwortlich sind.

Da die Expression von c-Mpl mRNA auf Zellen der Megakaryopoese und auf Plättchen beschränkt ist und weder ausreichende Mengen von Plättchen noch von Megakaryozyten zur Verfügung standen, konnte keine RT-PCR mit anschließender Sequenzierung durchgeführt werden. Da diese Thrombozytopenie aber kongenital ist,

konnte von einer Mutation in der Keimbahn oder einer frühen somatischen Mutation ausgegangen werden, so daß als Ausgangsmaterial für die Sequenzierung DNA aus peripheren Leukozyten eingesetzt wurde. Die Sequenzierung von 15 Klonen ergab keine Mutation innerhalb der Exons 11 und 12 sowie des dazwischenliegenden Introns 11. Diese Exons codieren für die gesamte zytoplasmatische Domäne mit den konservierten Bereichen *Box1* und *Box2*, mit Ausnahme der ersten 9 membranproximalen Aminosäuren (514-522), die noch von Exon 10 codiert werden. In diesen ersten 9 Aminosäuren liegt auch ein Tyrosinrest (Y 521). Da die Bereiche der zytoplasmatischen Domäne von c-Mpl, die für Proliferations- und Differenzierungssignale verantwortlich sind, im C-terminalen Bereich des Rezeptors liegen (ab *Box1*), kann eine Mutation in diesem Bereich von c-Mpl als Ursache der Differenzierungsstörung bei dem Patienten ausgeschlossen werden. Die Sequenzierung des gesamten Rezeptors soll erfolgen, wenn weitere DNA des Patienten zur Verfügung steht.

4. DISKUSSION

4.1. TPO-INDUZIERTE TYROSINPHOSPHORYLIERUNGEN VON PROTEINEN IN THROMBOZYTEN

Thrombopoietin spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der Megakaryozyten und Thrombozyten. Wie andere hämatopoetische Wachstumsfaktoren (G-CSF, EPO) wirkt TPO durch Bindung an spezifisch-exprimierte Rezeptoren nur auf eine kleine Subpopulation von Vorläuferzellen im Knochenmark. Diese sind für Untersuchungen der Wirkung von TPO auf Primärzellen nur durch sehr aufwendige Isolationsverfahren zugänglich. Da aber die in das periphere Blut freigesetzten Thrombozyten den Rezeptor c-Mpl noch auf der Oberfläche tragen, sollten Methoden zur Untersuchung der Signaltransduktion von c-Mpl an Thrombozyten von Gesundspendern etabliert werden. So sollten einerseits grundlegende Mechanismen der Signaltransduktion von TPO an primären, humanen Zellen aufgeklärt werden und auf dieser Grundlage andererseits Verfahren für die Untersuchung von Störungen der TPO-Reaktivität bei Patienten-Thrombozyten entwickelt werden.

Der Rezeptor c-Mpl gehört zu der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie. Ihre Mitglieder weisen keine intrinsische Kinaseaktivität auf, statt dessen führt ihre Aktivierung durch den jeweiligen Liganden mittels zytoplasmatisch assoziierter Kinasen zu einer Kaskade von Tyrosinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit (SCHULZE 1996) konnte mit Hilfe von Plättchenstimulationen mit TPO, ADP und TRAP und anschließenden FACS-Messungen gezeigt werden, daß c-Mpl auch auf Thrombozyten funktional ist: TPO ist in der Lage, die Wirkung der Plättchenaktivatoren ADP und TRAP, die zu Exozytose der α -Granula und Neoexpression von CD62 führen, zu verstärken. Dies zeigte, daß TPO an c-Mpl auf Plättchen bindet und eine Signaltransduktion des Rezeptors aktiviert. Damit eigneten sich Plättchen zur Untersuchung der Signaltransduktion von c-Mpl.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Thrombozyten von Patienten mit angeborener Thrombozytopenie und einer bilateralen Radius-aplasie (TAR-Syndrom) zwar normal auf ADP und TRAP reagierten, aber keinen

Synergismus mit TPO zeigten (SCHULZE *et al.* 1996). Dieses Ergebnis einer fehlenden Reaktivität des Rezeptors c-Mpl und der nachgeschalteten Signaltransduktion war Ausgangspunkt, die Signalwege von TPO in Thrombozyten anhand von Proteintyrosinphosphorylierungen aufzuklären und in diesem Zusammenhang eine weitergehende Erklärung für die Thrombozytopenie bei Patienten mit angeborenen Bildungsstörungen der Megakaryopoese zu finden.

Anhand der Molekulargewichte der tyrosinphosphorylierten Proteine, die nach TPO-Stimulation in Thrombozyten detektiert worden waren, wurde die Expression der Signalmoleküle Vav, Shc und ERK2 in Thrombozyten untersucht und nachgewiesen. Dadurch sind Rückschlüsse auf TPO-abhängige Signalwege in Thrombozyten möglich. **Shc** ist ein Adapterprotein, das verschiedene aktivierte Proteine über SH2-Domänen binden kann und in der Signaltransduktion anderer Zytokinrezeptoren am Beginn des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs steht (BONFINI *et al.* 1996).

p42 **ERK2** ist ein Mitglied der MAP-Kinase-Familie und steht am Ende des Ras-Raf-MAPK-Signalwegs. Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle nach Stimulation von Zellen mit Mitogenen. Die Aktivierung von ERK2 konnte nach TPO-Stimulation in FD-TPO-Zellen von NAGATA *et al.* und in UT-7/TPO-Zellen von YAMADA *et al.* und in dieser Untersuchung erstmals auch in Thrombozyten gezeigt werden konnte (NAGATA & TODOKORO 1995; YAMADA *et al.* 1995). Die Präsenz und Aktivierung von ERK2 in Thrombozyten wurde bisher nur nach Stimulation der Plättchen mit Thrombin, *platelet activating factor* (PAF) oder Vasopressin nachgewiesen (AHARONOVITZ & GRANOT 1996). Whalen konnte an K562-Zellen zeigen, daß die Aktivierung von ERK2 auch unabhängig von TPO eine Rolle in der megakaryozytären Differenzierung spielt (WHALEN *et al.* 1997). ERK2 wird somit im Rahmen der Signaltransduktion verschiedener Rezeptoren aktiviert, die für die Ausreifung von Megakaryozyten von Bedeutung sind und sich auch noch in Thrombozyten aktivieren lassen.

Die TPO-abhängige Phosphorylierung von p95 **Vav** in Thrombozyten konnte inzwischen auch von anderen Gruppen bestätigt werden (MIYAKAWA *et al.* 1997). Vav ist ein GDP-Austauschfaktor, dessen Substrate neben Ras hauptsächlich die GTPasen Rac und Rho sind, die wiederum beim Rearrangement des Zytoskeletts auch nach Plättchenstimulation aktiviert werden. Dies zeigt, daß die TPO-abhängige

Signaltransduktion in Thrombozyten verschiedene Signalwege aktiviert. Nach bisherigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, daß diese Signaltransduktionswege auch in der megakaryozytären Differenzierung von Bedeutung sind.

Die Tyrosinphosphorylierung verschiedener Signalmoleküle in Plättchen erfolgt nach Phosphorylierung und Aktivierung von c-Mpl durch zytoplasmatisch mit dem Rezeptor assoziierte Kinasen.

Neben dem Nachweis der Expression auf der Plättchenoberfläche im FACS konnte **c-Mpl** in dieser Untersuchung nach der Etablierung der Immunpräzipitation an Zelllinien auch mittels IP aus Plättchen nachgewiesen werden. Darüberhinaus war es möglich, die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors auf Thrombozyten nach TPO-Stimulation zu zeigen, daß heißt: der Rezeptor wird aktiviert.

Der Rezeptor besitzt in der zytoplasmatischen Domäne neben den konservierten Motiven *Box1* und *Box2* auch 5 Tyrosinreste. Im murinen System konnte gezeigt werden, daß bei Aktivierung von c-Mpl nur die beiden C-terminalen Tyrosinreste phosphoryliert werden (DRACHMAN & KAUSHANSKY 1997). Diese bieten dann Bindungsstellen für die SH2-Domänen von Shc oder *Shc-associated p145* (SHIP), Adaptermoleküle des Ras-Raf- und des Lipidsignalwegs. Auch Moleküle des Jak-Stat-Signalwegs, der nach Stimulation von Zytokinrezeptoren hauptsächlich aktiviert wird, können an das aktivierte c-Mpl binden. So kann Stat3 an die Konsensus-Bindungssequenz YXXQ von dem aktivierten Rezeptor binden. Die Phosphorylierung des Rezeptors wie auch der anderen Signalmoleküle wird bei der Familie der Zytokinrezeptoren durch Mitglieder der Januskinasen (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2) vermittelt. Für die Signaltransduktion von c-Mpl wurde übereinstimmend in Zelllinien und Plättchen die Aktivierung von Jak2 beschrieben (SATTLER *et al.* 1995; NAGATA & TODOKORO 1995; EZUMI *et al.* 1995; MU *et al.* 1995; MIYAKAWA *et al.* 1995). Darüberhinaus wurde auch die Aktivierung von Tyk2 nachgewiesen (ODA *et al.* 1996a; MORITA *et al.* 1996; SATTLER *et al.* 1995; EZUMI *et al.* 1995).

4.2. DIE AKTIVIERUNG VON STAT1 UND STAT3 IN TPO-STIMULIERTEN THROMBOZYTEN

Stat-Moleküle (*Signal transducer and activator of transcription*) werden durch Vermittlung der Januskinasen aktiviert und bilden nach der Phosphorylierung eines C-terminal gelegenen Tyrosinrests Homo- oder Heterodimere, die dann im normalen zellulären System in den Nucleus translozieren (IHLE 1996) und anschließend als Transkriptionsfaktoren an die Promotoren ihrer Zielgene binden.

In dieser Untersuchung konnte die Expression von Stat3 in verschiedenen megakaryozytären Zelllinien und in Plättchen gezeigt werden, ebenso seine Tyrosinphosphorylierung, die zeitlich nach der Jak2-Phosphorylierung erfolgt. Die Phosphorylierung von Stat3 nach TPO-Stimulation ist inzwischen von einigen Gruppen in Zelllinien und Plättchen oder murinen Megakaryozyten gezeigt worden (SATTLER *et al.* 1995; MIYAKAWA *et al.* 1996; MATSUMURA *et al.* 1997; MIURA *et al.* 1998; QUENTMEIER *et al.* 1998; EZUMI *et al.* 1995; DRACHMAN *et al.* 1995).

Die Daten in der Literatur über die TPO-abhängige Aktivierung von Stat1 sind hingegen deutlich spärlicher und uneinheitlich: Einige Gruppen konnten die Aktivierung von Stat1 nach TPO-Stimulation in Zelllinien wie M-07e oder UT7 zeigen (NAGATA & TODOKORO 1995; SATTLER *et al.* 1995; MIURA *et al.* 1998), während QUENTMEIER *et al.* in M-07e-Zellen keine Stat1-Phosphorylierung nachweisen konnte (QUENTMEIER *et al.* 1998). In Plättchen konnte bisher übereinstimmend keine Aktivierung von Stat1 nachgewiesen werden (EZUMI *et al.* 1995; MIYAKAWA *et al.* 1996). Eine konstitutive Tyrosinphosphorylierung in CMK-Zellen wurde hingegen von MATSUMURA *et al.* beschrieben (MATSUMURA *et al.* 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tyrosinphosphorylierung von Stat1 nach einer Stimulationskinetik mit TPO an Thrombozyten untersucht. In Übereinstimmung mit der Literatur war es nicht möglich, in TPO-stimulierten Thrombozyten tyrosinphosphoryliertes Stat1 direkt nachzuweisen. Ein indirekter Beweis konnte jedoch durch Einsatz des *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) erbracht werden.

Der Gelretardationsassay (EMSA) ist eine Methode zur Charakterisierung von DNA-bindenden Proteinen. Dabei werden in der Regel radioaktiv-markierte Oligonukleotide einer Bindereaktion mit Kernextrakten oder Zelllysaten der zu untersuchenden Zellen zugegeben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß sich

Zelllysate von TPO-stimulierten Thrombozyten eignen, um mittels EMSAs DNA-bindende Proteine nach Aktivierung der c-Mpl-Signaltransduktion zu charakterisieren. Als DNA-Konsensus-Sequenz zur Untersuchung der Aktivierung von Stat1 und Stat3 in stimulierten Thrombozyten wurde ein Abschnitt des c-fos-Promotors gewählt (hSIE: human c-Sis-inducible element), der durch eine Mutation (m67) höher affin für die Bindung von Stat1- und Stat3-Dimeren ist (WAGNER *et al.* 1990).

Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in TPO-stimulierten Thrombozyten hauptsächlich drei Komplexe mit unterschiedlicher Kinetik an m67 binden. Durch Vergleich dieser Daten mit der Literatur wurde vermutet, daß die für m67 beschriebenen Komplexe SIF-A (Stat3/Stat3), SIF-B (Stat1/3) und SIF-C (Stat1/1) auch denen in Thrombozyten entsprechen. Diese Zuordnung konnte durch das Hinzufügen der Supershiftantikörper α -Stat1 und α -Stat3 zu den Bindereaktionen bestätigt werden, d.h. es gibt eine TPO-abhängige Aktivierung von Stat1 und Stat3 in Thrombozyten. Obwohl mit dem α -Stat1-Antikörper zwar die entsprechenden *Shift*-Banden zum Verschwinden gebracht werden konnten, entstanden aber keine gel retardierten Supershift-Banden. Demnach ist das Verschwinden der *Shift*-Banden durch den α -Stat1-Antikörper als indirekter Nachweis für die Beteiligung von Stat1 an diesen Komplexen zu bewerten.

Der in diesen Experimenten verwendete α -Stat1-Antikörper ist gegen ein Epitop gerichtet, das innerhalb der SH2-Domäne liegt und somit an der Protein-Protein-Wechselwirkung mit den Tyrosinphosphaten anderer Stat-Moleküle beteiligt ist. Da die Antikörper in der Bindereaktion vor dem Oligonukleotid hinzugefügt werden, kann als Erklärung für das Fehlen der Stat1-*Supershift*-Bande davon ausgegangen werden, daß der Komplex aus Stat1 und Antikörper eine anschließende Bindung an die DNA verhindert. Da die Detektion DNA-bindender Proteine aber über das radioaktiv-markierte Oligonukleotid erfolgt, verschwindet nach Zugabe des Antikörpers die *Shift*-Bande des Komplexes aus Stat1 und Oligo, ohne daß es zu einem *Supershift*-Komplex aus DNA, Stat1 und Antikörper kommt.

Zur weiteren Absicherung der These, daß Stat1 durch TPO-Stimulation in Thrombozyten aktiviert wird, wurden zwei weitere Antikörper in der EMSA-Bindereaktion eingesetzt: zum einen ein α -Stat1 α -Antikörper, der den C-Terminus

von Stat1 α erkennt, der in der verkürzten Spleißvariante Stat1 β nicht mehr vorhanden ist, und zum anderen ein Antikörper α -Stat1-Tyrosin-701-phosphat, der gegen den phosphorylierten Tyrosinrest 701 von Stat1 α und β gerichtet ist. Der α -Stat1 α -Antikörper erzeugte den für Stat1 erwarteten Supershift, was die Präsenz von aktiviertem Stat1 in TPO-stimulierten Thrombozyten in DNA-bindenden Komplexen bestätigte. Durch das vollständige Shiften des SIF-C-Komplexes (Stat1/Stat1) wurde geschlossen, daß hier Stat1 α /Stat1 α - oder Stat1 α /Stat1 β -Komplexe vorlagen, aber keine Homodimere von Stat1 β . Stat1 β fehlen als verkürzter Spleißvariante im Vergleich zu Stat1 α C-terminal 38 Aminosäuren. Folglich kann Stat1 β zwar noch am Tyrosinrest 701 phosphoryliert werden und DNA binden, aber keine Gentranskription mehr aktivieren. Es handelt sich somit um einen natürlich vorkommenden Repressor (IHLE 1996). Bei der weiteren Untersuchung zur Aktivierung von Stat1 in TPO-stimulierten Plättchen wurde eine gelretardierte und daher wahrscheinlich phosphorylierte Form von Stat1 nachgewiesen. Diese These wird durch die Tatsache bestätigt, daß die gefundene Aktivierungskinetik der gelretadierten Bande der im EMSA gefundenen Kinetik der Stat1-Aktivierung nach TPO-Stimulation entspricht.

Weiterhin konnte die Expression von Stat1 β (p83) in Thrombozyten nachgewiesen werden. Eine Stat1 α -analoge Aktivierung durch TPO-Stimulation, die infolge der Phosphorylierung zur Gelretardierung im SDS-Gel führte, fand jedoch bei Stat1 β nicht statt. Diese Daten sprechen dafür, daß im wesentlichen Stat1 α nach TPO-Stimulation in Thrombozyten aktiviert wird. Einschränkend muß erwähnt werden, daß diese Phosphorylierung an Tyrosin 701 von Stat1 α bzw. Stat1 β nicht direkt nachgewiesen werden konnte, weder bei der IP mit anschließender Detektion mit einem α -Tyrosinphosphat-Antikörper noch in Totallysaten mit einem Antikörper, der speziell gegen das Tyrosin 701-phosphorylierte Epitop von Stat1 gerichtet ist. Die Aminosäureumgebung des Tyrosinrests 701 in Stat1 kann für die Bindung eines Antikörpers, der gegen eine Konsensusumgebung von Tyrosinphosphat gerichtet ist, unzureichend sein. Der α -Stat1-Tyrosin 701-phosphat-Antikörper hat hingegen in Positivkontrollen in einem stimulierten Kontrolllysat von A431-Zellen eine Bande bei 91 kDa erkannt. Hier gab es aber weitere, unspezifische Banden, so daß die Sensitivität dieses Antikörpers in Frage gestellt sein muß. Bei Stat3 konnte gezeigt werden, daß ausschließlich die Serin 727-phosphorylierung, nicht aber die Tyrosin

705-phosphorylierung zu einer Gelretardierung im SDS-Gel führt (CHUNG *et al.* 1997). Wenn dies analog auch bei Stat1 zutrifft, so erklärte dies die fehlende Retardierung von Stat1 β , denn hier liegt der Serinrest 727 nicht mehr vor. Andererseits ist das PXSP-Motiv in Stat1 ein schlechtes Substrat für die MAP-Kinasen (*ebd.*). Für die gefundene DNA-Bindung von Stat1 ist aber eine Tyrosinphosphorylierung Voraussetzung. In dieser Untersuchung konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, daß Stat1 in Thrombozyten nach TPO-Stimulation aktiviert wird, wahrscheinlich durch Phosphorylierung des Tyrosinrests 701, der nur in Stat1 α vorkommt. Weiterhin konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß in stimulierten Thrombozyten aktive Stat-Dimere gebildet werden, die an DNA binden können.

Stat3-Homodimere (SIF-A) banden mit einer schnelleren Kinetik als Stat1-Homodimere an das verwendete Oligo m67, Signale jener Komplexe waren schon ab einer Minute TPO-Stimulation von Thrombozyten detektierbar. Die Aktivierung des Heterodimers Stat1/Stat3 (SIF-B) erfolgte erwartungsgemäß nicht so schnell wie die der Stat3-Homodimere (SIF-A), aber schneller als die der Stat1-Homodimere (SIF-C).

Neben der Phosphorylierung eines konservierten Tyrosinrests in Stat-Molekülen, der einer Dimerisierung vorausgeht, kann bei einigen Stat-Mitgliedern die Funktionalität noch über die Phosphorylierung von Serinresten moduliert werden (IHLE 1996). Stat1, Stat3, Stat4 und Stat5a/b haben einen Serinrest, der in einem sogenannten PXSP-Motiv liegt, das als Substrat z.B. von den MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 erkannt wird (WEN *et al.* 1995; ZHU *et al.* 1997; CHUNG *et al.* 1997; ZHANG *et al.* 1995). Die genaue Bedeutung dieser Serinphosphorylierungen ist noch nicht geklärt. WEN *et al.* zeigten zunächst, daß die volle Funktion von Stat1 und Stat3 erst bei Phosphorylierung sowohl des Tyrosin- als auch des Serinrests gewährleistet ist (WEN *et al.* 1995). Später wiesen WEN *et al.* nach, daß die Serinphosphorylierung nur Einfluß auf die Transaktivierung, nicht aber auf die DNA-Bindung von Stat-Dimeren hat (WEN & DARNELL JR. 1997). In dieser Untersuchung war es trotz unterschiedlicher methodischer Herangehensweisen und Verwendung eines spezifisch gegen Stat3-Serin 727-phosphat gerichteten Antikörpers nicht möglich, die Serinphosphorylierung von Stat1 oder Stat3 nach TPO-Stimulation in Thrombozyten zu zeigen. Unscharfe Signale im detektierten Western Blot zeigten zudem keine TPO-abhängigen

Intensitätsunterschiede. Insbesondere der Serinrest 727 in Stat3 ist im Gegensatz zu dem Serinrest 727 in Stat1 als ein gutes Substrat von ERK2 beschrieben worden (CHUNG *et al.* 1997). Im Gegensatz zu EZUMI *et al.* (1998) konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 in Plättchen nach TPO-Stimulation gezeigt werden. Deutliche Signale konnten detektiert werden, wenn die Stimulation mindestens 5 bis 10 Minuten dauerte. Für die megakaryozytäre Zelllinie UT7-TPO sind sogar ERK2-Aktivierungszeiten von 60 Minuten beschrieben worden (ROUYEZ *et al.* 1997). Widersprüchliche Daten zur Aktivierung von ERK2 in Thrombozyten sind somit möglicherweise durch unzureichende Dauer der TPO-Stimulation zu erklären.

Trotz zum Teil widersprüchlicher Daten konnte anhand der in dieser Untersuchung durchgeführten Experimente eindeutig gezeigt werden, daß Stat1 in Thrombozyten nach TPO-Stimulation aktiviert wird und als Homodimer oder als Heterodimer mit Stat3 an DNA binden kann. Der nachgewiesene *Shift* im SDS-Gel legt eine Tyrosinphosphorylierung von Stat1 α , aber nicht von Stat1 β nahe, da die gefundenen Retardationskinetiken von Stat1 α in beiden methodischen Systemen übereinstimmen. Ein Einfluß von TPO auf die Serinphosphorylierung von Stat1 und Stat3 konnte nicht nachgewiesen werden.

Dies heißt für die Signaltransduktion von c-Mpl in Thrombozyten, daß es neben der Aktivierung von Stat3 auch zu der Aktivierung von Stat1 kommt. Diese bilden Komplexe, die an die entsprechende DNA binden können. Weiterhin kann durch die Phosphorylierung von ERK2 zum einen die Aktivierung einer MAP-Kinase in Thrombozyten nach TPO-Stimulation nachgewiesen werden, zum anderen ist dadurch eine gegensätzliche Regulation der Stat-Aktivierung denkbar. Auch wenn im Rahmen dieser Untersuchung eine Serinphosphorylierung nicht nachgewiesen werden konnte, so kann aktives ERK2 modulierend auf die Tyrosinphosphorylierung einwirken. Diese Daten können auch unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Thrombozyten keinen Zellkern haben, ein Modell für die TPO-induzierten Signale in Megakaryozyten sein.

4.3. DIE AKTIVIERUNG VON STAT5A UND STAT5B IN TPO-STIMULIERTEN THROMBOZYTEN

Die Aktivierung von Stat5 nach TPO-Stimulation ist inzwischen von einigen Gruppen in humanen Zelllinien und Blutplättchen gezeigt worden (BACON *et al.* 1995; SATTLER *et al.* 1995; EZUMI *et al.* 1995; MIYAKAWA *et al.* 1996; ODA *et al.* 1996b; MATSUMURA *et al.* 1997; MIURA *et al.* 1998; QUENTMEIER *et al.* 1998). Dabei wurde zwischen den beiden unterschiedlichen Genprodukten Stat5a und Stat5b bislang nur bei der Untersuchung von murinen Megakaryozyten unterschieden (DRACHMAN & KAUSHANSKY 1997). Obwohl beide Proteine 95% Homologie in der Aminosäuresequenz zeigen und in den meisten Geweben co-exprimiert werden, sind in letzter Zeit Unterschiede in einigen biochemischen Eigenschaften wie DNA-Bindung beschrieben worden (TEGLUND *et al.* 1998; VERDIER *et al.* 1998).

Im Rahmen dieser Untersuchungen kann zum ersten Mal gezeigt werden, daß sowohl Stat5a als auch Stat5b in Plättchen exprimiert und nach TPO-Stimulation tyrosinphosphoryliert werden. Diese Aktivierung erfolgt unmittelbar nach Beginn der TPO-Stimulation anscheinend vollständig, da während der nächsten 2 Stunden Stimulation keine Zunahme der Intensität erfolgte. In TPO-stimulierten Thrombozyten bilden sich im Rahmen der Signaltransduktion Stat5a- und Stat5b-Homodimere und in geringerem Ausmaß Stat5a/Stat5b-Heterodimere.

1998 konnte von anderen Gruppen gezeigt werden, daß CrkL - ein 39 kDa großes Adapterprotein, das nur aus SH2- und SH3-Domänen besteht - mit Stat5 wechselwirken kann (ODA *et al.* 1998; OTA *et al.* 1998; FISH *et al.* 1999). CrkL wird auch in Thrombozyten exprimiert und nach TPO-Stimulation tyrosinphosphoryliert (OZAKI *et al.* 1998). Hier konnte gezeigt werden, daß CrkL in Komplexen mit Stat5b, aber nicht mit Stat5a vorliegt. Diese Daten legen nahe, daß CrkL in Thrombozyten im wesentlichen mit Stat5b wechselwirkt und auch nach DNA-Bindung der Stat-Dimere mit im Komplex vorliegt. Über die Funktionen von CrkL ist noch nicht viel bekannt. Wie andere Adapterproteine kann es mit weiteren Signalmolekülen wechselwirken: Für seine SH2-Domäne sind Interaktionen mit c-Cbl, CAS, HEF-1 und Paxillin beschrieben worden, die N-terminale SH3-Domäne kann mit PI3-Kinase, C3G und Sos wechselwirken (SATTLER & SALGIA 1998). Da zumindest einige der möglichen

CrkL-Partner in Thrombozyten exprimiert werden (c-Cbl, Paxillin, PI3-Kinase), wären damit u.a. Verbindungen zwischen der Aktivierung und Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Zellkern und Veränderungen des Zytoskeletts hergestellt, deren physiologische oder biochemische Funktion aber noch unklar sind. Kürzlich wurde eine Regulatorfunktion von CrkL oberhalb des JNK-Signalweges (*Jun-N-terminal kinase*, eine andere MAP-Kinase) beschrieben (LING *et al.* 1999). Dabei ist eine Interaktion mit HPK1, einer *hematopoietic progenitor kinase* postuliert worden. Da TPO JNK1 und JNK2 in FD-TPO-Zellen phosphorylieren kann (NAGATA *et al.* 1997) und auch ein früher hämatopoetischer Wachstumsfaktor ist (SOLAR *et al.* 1998), könnte CrkL durch den hier gezeigten Zusammenhang zwischen TPO und CrkL-Aktivierung auch eine Bedeutung in den c-Mpl-Signalwegen früher Vorläuferzellen haben.

Interessanterweise konnte in dieser Untersuchung auch die Bindung von Stat1 α -Homodimeren an S5RE nachgewiesen werden. Hingegen konnten keine Heterodimere aus Stat3 oder Stat1 und Stat5 detektiert werden, weder an S5RE noch an m67. Für die Oligosequenz m67 ist die Bindung von Stat3/Stat5-Heterodimeren nach Stimulation verschiedener Zelllinien mit CSF-1 oder PDGF beschrieben worden (NOVAK *et al.* 1996). Eine unterschiedliche Kombination von Homo- und Heterodimerisierungen aus aktivierten Stat-Molekülen kann die jeweilige Spezifität der Signaltransduktion von verschiedenen Zytokinrezeptoren, die Signale über den Jak-Stat-Signalweg transduzieren, erklären. Der alleinige Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von verschiedenen Stat-Molekülen sagt somit nichts über die Zusammensetzung der gebildeten Dimere aus. Die Bildung von unterschiedlichen Komplexen kann dabei durch die unterschiedliche Kinetik, mit der die verschiedenen Stat-Moleküle phosphoryliert werden, reguliert werden. Obwohl man davon ausgeht, daß alle Stat-Moleküle in Thrombozyten durch Jak2 aktiviert werden, erfolgt die DNA-Bindung von Stat5a und Stat5b unmittelbar nach Beginn der TPO-Stimulation, während die DNA-Bindung von Stat3- und Stat1-Komplexen im Vergleich zu Stat5 zeitverzögert auftritt und anscheinend eine längere TPO-Stimulation voraussetzt.

Diese Unterschiede in der Kinetik können in der spezifischen Bindung der Stat-Moleküle an den phosphorylierten Rezeptor begründet liegen. Eine linienspezifische

Gen-Aktivierung durch verschiedene Zytokine kann somit auch bei gleicher Aktivierung des Jak-Stat-Signalwegs in der Expression der verschiedenen Jak- und Stat-Moleküle und deren unterschiedlichen Aktivierungskinetiken begründet liegen.

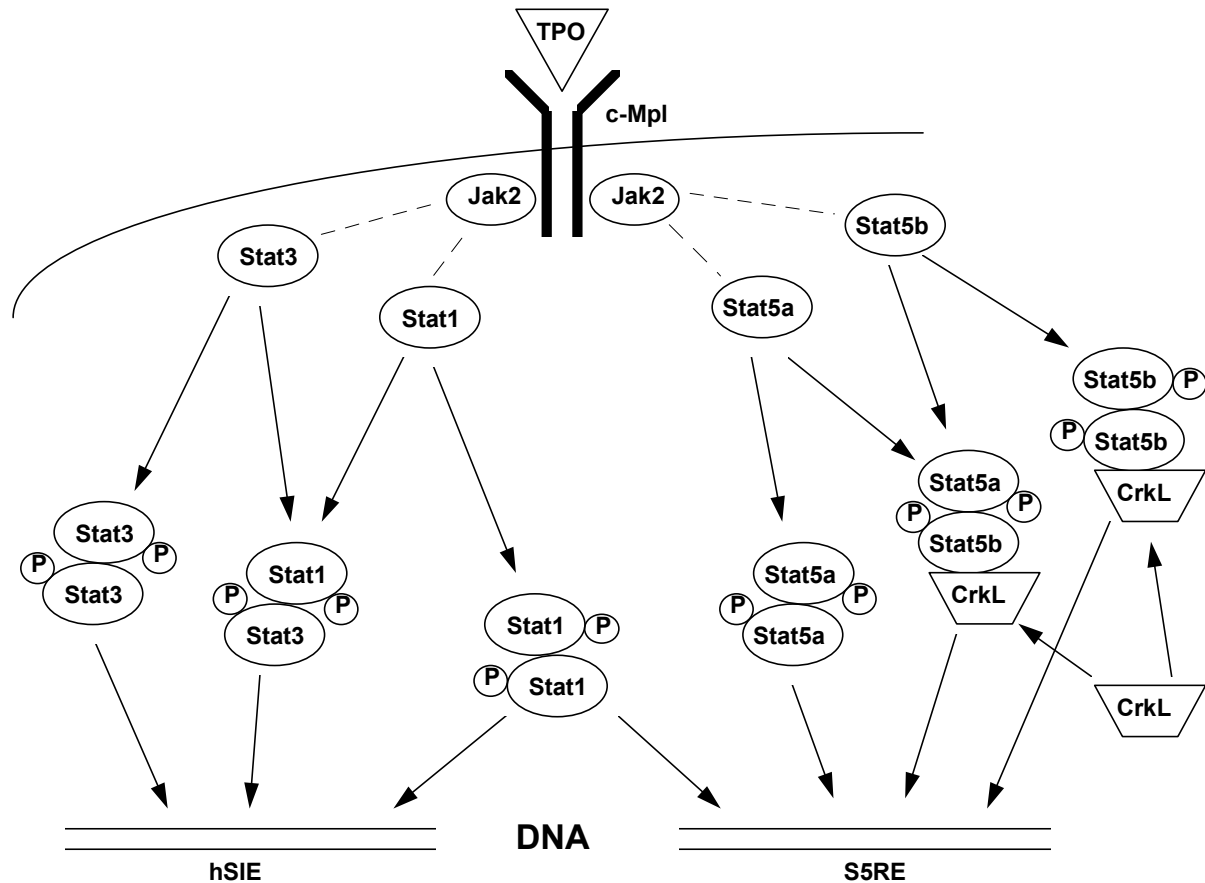


Abb. 24: Aktivierte Jak-Stat-Signalwege nach TPO-Stimulation in humanen Thrombozyten. TPO aktiviert zunächst Jak2. Diese Kinase phosphoryliert Stat1, Stat3, Stat5a und Stat5b. Daraufhin bilden sich Homodimere von Stat1, Stat3, Stat5a und Stat5b sowie Heterodimere von Stat1 α /Stat3 und Stat5a/Stat5b. Die Dimere zeigen unterschiedliche DNA-Bindungseigenschaften, wie hier durch die verantwortlichen Elemente m67 und S5RE gezeigt.

Überraschenderweise konnte auch nach 2 Stunden TPO-Stimulation keine Abnahme der Tyrosinphosphorylierung bzw. Aktivität der untersuchten Stat-Moleküle festgestellt werden. Die Aktivierung und Bindung von Stat1 und Stat3 an m67 konnte auch bei G-CSF-stimulierten neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Dr. GERMESHAUSEN, pers. Mitteilung), jedoch zeigten Stat1 und Stat3 in diesen Zellen nach einstündiger Inkubation mit G-CSF einen Rückgang ihrer Aktivierung, nach zwei Stunden *in vitro*-Stimulationsdauer ist keine oder eine nur sehr schwache Aktivierung beider Stat-Moleküle vorhanden. Hingegen konnte bei TPO-stimulierten

Thrombozyten keinerlei Abschaltung der Stimulationssignale gefunden werden, weder bei Stat1 und Stat3 an m67 noch bei Stat1 und Stat5 an S5RE. Da eine fehlende Abschaltung des TPO-Signals in Megakaryozyten sehr unwahrscheinlich ist, könnte die andauernde Aktivierung der Stat-Moleküle nach TPO-Stimulation in Thrombozyten durch das Fehlen eines Zellkerns begründet sein.

Die negative Regulation von Zytokin-aktivierten Signalwegen geschieht zumindest teilweise durch zytokin-aktivierte Induktion von *immediate-early*-Genprodukten, die dann wiederum rückwirkend die Zytokinwirkung inhibieren. CIS (*Cytokine-induced SH2-containing protein*) wurde zunächst als frühes Genprodukt nach IL-2-, IL-3- und EPO-Stimulation gefunden (YOSHIMURA *et al.* 1995), das nach seiner Induktion mit seiner SH2-Domäne an den EPO-Rezeptor oder an die β -Kette des IL-3-Rezeptors binden kann. Inzwischen sind sieben Mitglieder dieser Gruppe von negativen Regulatoren identifiziert worden (AMAN & LEONARD 1997). Auch Thrombopoietin induziert mit CIS, SOCS-2 und SOCS-3 Gene dieser Familie in Knochenmarkzellen (STARR *et al.* 1997). CIS interagiert vermutlich mittels seiner SH2-Domäne mit tyrosinphosphorylierten Proteinen und blockiert so die Transduktion von Signalen durch die Entkoppelung von aktivierten Proteinkomplexen. Da die Induktion von Genen in Thrombozyten aufgrund des fehlenden Zellkerns nicht mehr möglich ist, kann somit eine verlängerte Signaldauer erklärt werden. Auch die fehlende Translokation der Stat-Dimere in den Zellkern kann eine Rolle für die fehlende Abschaltung der Aktivierung spielen, ebenso eine unterschiedliche Aktivierung der Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2, die für die Dephosphorylierung aktivierter Adapterproteine und Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind .

In diesem Zusammenhang wären Untersuchungen an megakaryozytären Vorläuferzellen (z.B. CD41⁺-Zellen aus dem Knochenmark oder *in vitro* produzierte Megakaryozyten) ein geeignetes Untersuchungsmaterial, um die transkriptionelle Reaktion der Zellen auf TPO untersuchen zu können.

4.4. UNTERSUCHUNGEN AN THROMBOZYTEN VON PATIENTEN

Die hier untersuchten Patienten haben eine Thrombozytopenie aufgrund einer Bildungsstörung in der Megakaryopoese. Von den verschiedenen kongenitalen Erkrankungen wurden hier die CAMT (kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie) und das TAR (*thrombocytopenia with absent radii*)-Syndrom, bei dem die Thrombozytopenie mit einer bilateralen Radiusaplasie einhergeht, herausgegriffen. Bei beiden Patientengruppen wurde die *in vitro*-Reaktivität der Thrombozyten auf TPO untersucht. Bei keinem der Patienten konnte ein bei gesunden Plättchen nachweisbarer Synergismus von TPO mit den Plättchenaktivatoren ADP und TRAP in der CD62P-Expression gefunden werden. Diese fehlende *in vitro*-Reaktivität von Thrombozyten könnte einem Zustand fehlender oder unzureichender Reaktivität früher megakaryozytärer Vorläuferzellen auf TPO im Knochenmark entsprechen und so durch die Bildungsstörung der Megakaryozyten im Knochenmark die Thrombozytopenie im peripheren Blut erklären können. Patienten mit CAMT und TAR-Syndrom wiesen hohe TPO-Serumspiegel auf (CREMER *et al.* 1999), die mit den niedrigen Thrombozytenzahlen korrelierten.

Bei der Untersuchung der Signaltransduktion von TPO in Plättchen dieser Patienten ergaben sich eine Reihe von methodischen Problemen, die zum einen mit der niedrigen Thrombozytenzahl der Patienten und zum anderen mit der begrenzten Menge Untersuchungsmaterial (Blut, Knochenmark), das pädiatrischen Patienten abgenommen werden kann, zusammenhängen. Zusätzlich zu dem größeren Blutvolumen, das bei einem Kind mit Thrombozytopenie abgenommen werden muß, um auf eine für proteinchemische Untersuchungen geeignete Plättchenzahl zu kommen, scheint angesichts der ausgeprägten Thrombozytopenie dieser Patienten das stark verschobene Verhältnis von Thrombozyten zu umgebendem Plasma die Aufreinigung der Thrombozyten zu erschweren. Hier ist vor allem die hohe Konzentration an Albumin aus dem Plasma für die Aufreinigung der Thrombozyten kritisch, das als Trägerprotein weiterer Proteine zu einer Kontamination der Plättchenproteine mit Plasmaproteinen beitragen kann. In anschließenden Untersuchungen führt das dann zu einem veränderten Muster konstitutiv tyrosinphosphorylierter Proteine unstimulierter Thrombozyten.

4.4.1. PATIENTEN MIT ANGEBORENER AMEGAKARYOZYTÄRER THROMBOZYTOPENIE (CAMT)

In den Thrombozyten der hier untersuchten CAMT-Patienten findet keine, den gesunden Plättchen vergleichbare Induktion von tyrosinphosphorylierten Proteinen nach TPO-Stimulation statt. Diese fehlende Reaktivität in der Signaltransduktion von c-Mpl auf Stimulation mit TPO spiegelt sicher auch den Zustand in den Vorläuferzellen wider. Dabei stellte sich die Frage, ob bei diesen Patienten der Rezeptor für TPO fehlt oder defekt ist. In unserer Arbeitsgruppe konnte anhand von FACS-Untersuchungen auf Plättchen der Patienten ein vermindertes Signal für c-Mpl detektiert werden im Vergleich zu Thrombozyten von Normalspendern. MURAOKA *et al.* beschrieben 1997 einen Patienten mit CAMT, dessen Thrombozytopenie sie auf eine unzureichende Expression von c-mpl mRNA in Knochenmarkzellen zurückführten (MURAOKA *et al.* 1997). Jedoch wurde dort die semi-quantitative PCR von c-mpl auf c-kit als Standard bezogen, anstatt einen mit c-mpl co-exprimierten Marker der Megakaryopoese wie gpIIb/IIIa (CD41/CD61) oder gp Ib α (CD42b) zu wählen. So kann nicht ausgeschlossen werden, daß das beobachtete Phänomen der verminderten c-mpl mRNA-Expression nur ein Epiphänomen eines anderen Defekts ist. Liegt nämlich eine amegakaryozytäre Thrombozytopenie vor, so ist auch die Anzahl c-mpl positiver Zellen (megakaryozytäre Vorläufer) im Knochenmark geringer und man würde zwangsläufig eine im Vergleich zum gesunden Knochenmark geringere Expression von c-mpl mRNA im Knochenmark des Patienten erwarten. Durch die Wahl eines megakaryozytenspezifischen Markers wäre eine veränderte c-mpl-Expression auf die megakaryozytären Zellen und nicht auf das gesamte Knochenmark bezogen.

In diesem Jahr wurden die Ergebnisse der Sequenzierung des gesamten c-mpl-Gens von diesem Patienten publiziert (IHARA *et al.* 1999). Dabei wurden zwei unterschiedliche allelische Mutationen gefunden, die jeweils auf einen der beiden Elternteile zurückgeführt werden konnten. Dabei führt eine C nach T-Transition an Nukleotidposition 556 zu einem Stopcodon in Exon 4 bzw. eine T-Deletion an Position 1499 in Exon 10 zu einer Verschiebung im Leseraster. Beide Mutationen ergeben bei Translation eine verkürzte oder nicht mehr exprimierte zytoplasmatische Domäne des Rezeptors. Sofern Mutationen im c-mpl-Gen die molekulare Ursache für CAMT ist,

erklärte dies die in dieser Untersuchung festgestellte fehlende Induktion von tyrosinphosphorylierten Proteinbanden nach TPO-Stimulation von Plättchen dieser Patienten.

Eine trotz Ausschaltung der c-Mpl-Signaltransduktion vorhandene Produktion einer basalen Menge (<15%) an Thrombozyten konnte sowohl bei TPO^{-/-}- wie bei c-mpl^{-/-}-knock-out-Mäusen gezeigt werden. (ALEXANDER *et al.* 1996). Man findet bei den CAMT-Patienten ebenso wie bei den c-mpl^{-/-}-knock-out-Mäusen hohe TPO-Serumspiegel und eine geringe Menge an Megakaryozyten und Thrombozyten. Diese unterschieden sich morphologisch nicht von denen bei Gesundspendern. Die Thrombozyten der c-mpl^{-/-}-knock-out-Mäuse zeigen aber im Gegensatz zu den TPO^{-/-}-knock-out-Mäusen mit normaler c-Mpl-Expression aufgrund ihres fehlenden Rezeptors keine *in vitro*-Reaktivität auf TPO mehr.

Zusammenfassend kann man unter Einbezug der in dieser Untersuchung gefundenen fehlenden Induktion TPO-reaktiver Proteine in Plättchen von CAMT-Patienten und der in der Literatur beschriebenen Mutationen im c-mpl-Gen eines CAMT-Patienten von einer molekularen Ursache der CAMT ausgehen, die zu der isolierten angeborenen Thrombozytopenie führt. In unserer Arbeitsgruppe sind jetzt Sequenzierung von c-mpl bei weiteren Patienten mit CAMT geplant, um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen.

4.4.2. UNTERSUCHUNGEN AN THROMBOZYTEN VON TAR-PATIENTEN

Die Gruppe von Patienten mit *thrombocytopenia with absent radii* (TAR) stellt neben den Patienten mit CAMT eine weitere Untergruppe der Patienten mit angeborenen Störungen der Megakaryopoese dar. In meiner Diplomarbeit (SCHULZE 1996) konnte gezeigt werden, daß Thrombozyten dieser Patienten wie die der CAMT-Patienten keinen *in vitro*-Synergismus von TPO mit den Plättchenaktivatoren ADP und TRAP bei der CD62P-Expression zeigten. Die Expression des Rezeptors c-Mpl auf der Oberfläche der Plättchen konnte durchflußzytometrisch gezeigt werden. Aufgrund der Western Blot-Daten konnten größere zytoplasmatische Trunkationen des TPO-Rezeptors ausgeschlossen werden. Andere Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe zeigten bei diesen Patienten erhöhte Serumspiegel von TPO, dessen biologische Funktionalität in einem Bioassay nachgewiesen werden konnte, sowie ein

vermindertes Wachstum megakaryozytärer Kolonien in Kolonie-Assays aus mononukleären Knochenmarkzellen (BALLMAIER *et al.* 1997).

Im Verlauf dieser Arbeit konnte bei weiteren TAR-Patienten gezeigt werden, daß keine Tyrosinphosphorylierungen in Thrombozyten nach TPO-Stimulation induziert werden. Bei einem Patienten mit TAR-Syndrom konnte zusätzlich gezeigt werden, daß es nicht zu einer TPO-abhängigen Tyrosinphosphorylierung von Jak2 kommt. Da Jak2 auch bei anderen Plättchenaktivatoren wie Thrombin, U46619, Collagen oder PMA aktiviert wird (MIYAKAWA *et al.* 1997), könnte auf diese Weise somit der fehlende *in vitro*-Synergismus zwischen TPO und TRAP im FACS erklärt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom an einem Defekt der c-Mpl-Signaltransduktion liegt. Dabei könnte der Defekt an der Bindung von TPO an den Rezeptor oder früh in der Signalkaskade liegen. An Thrombozyten von Gesundspendern wurde die Bindung von TPO an c-Mpl durch Verwendung von FITC-markiertem TPO im FACS untersucht. Dabei reichte die Sensitivität des hier angewandten Verfahrens für den eindeutigen Nachweis einer Bindung, vermutlich aufgrund der mit 30 c-Mpl-Molekülen pro Plättchen extrem niedrigen Expression des Rezeptors (BROUDY *et al.* 1997) oder aufgrund einer ungenügenden FITC-Markierung, nicht aus.

Von zwei Patienten mit TAR-Syndrom wurde in Kooperation mit Dr. KAUSHANSKY (Seattle, USA) das gesamte c-mpl-Gen durch Sequenzierung genomischer DNA aus mononukleären Blutzellen untersucht, um einen Defekt in der extrazytoplasmatischen Domäne mit Einfluß auf die Ligandenbindung oder in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors auszuschließen. Dabei konnte keine Mutation detektiert werden. Da die Thrombozytopenie bei den TAR-Patienten kongenital ist und zwei Patienten keine Mutation im c-mpl-Gen aufwiesen, kann von einem Defekt des c-Mpl-Proteins als Ursache der Thrombozytopenie beim TAR-Syndrom nicht ausgegangen werden. Die hier gezeigten Daten mit fehlender Jak2-Aktivierung nach TPO-Stimulation von Thrombozyten sprechen eher für einen Defekt in der frühen Signaltransduktion von c-Mpl.

Zusammenfassend konnte bei den pädiatrischen Patienten mit TAR-Syndrom eine fehlende oder unzureichende *in vitro*-Reaktivität der Thrombozyten auf TPO gefunden

werden, deren Ursache weder am Fehlen oder der Funktion des Liganden TPO noch an einer Mutation im Rezeptor c-Mpl (wie bei einem CAMT-Patienten) liegt, sondern wahrscheinlich an einem Defekt in der frühen Signaltransduktion von c-Mpl. Somit bieten diese Krankheiten gute Modelle für ein allgemeines Verständnis der Bedeutung von TPO und seinem Rezeptor in der Thrombozytopenie.

4.4.3. UNTERSUCHUNGEN EINES PATIENTEN MIT THROMBOZYTOPENIE UND DOWN-SYNDROM

Im Gegensatz zu den Patienten mit einer Bildungsstörung der Megakaryopoese (CAMT, TAR-Syndrom) zeigte das Knochenmark eines Patienten mit Down-Syndrom und schwerer Thrombozytopenie viele Megakaryozyten im Knochenmark. Mononukleäre Zellen des Knochenmarks zeigten in Kolonie-Assays viele megakaryozytäre Kolonien, die mehr, aber kleinere Zellen als beim Gesundspender enthielten. Diese Zellen konnten mit TPO als einzigem Wachstumsfaktor für fast drei Monate *in vitro* kultiviert werden. Hier scheint folglich eher ein (wahrscheinlich TPO-unabhängiger) Defekt bei der Thrombozytenbildung aus Megakaryozyten vorzuliegen. Verschiedene Gruppen konnten innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von c-Mpl verschiedene Bereiche lokalisieren, die jeweils eher Proliferations- oder Differenzierungssignale vermitteln (GURNEY *et al.* 1995; PORTEU *et al.* 1997; DRACHMAN & KAUSHANSKY 1997; TAKATOKU *et al.* 1997). Dabei konnten beim murinen c-Mpl auch anti-proliferative Domänen charakterisiert werden, die erst durch gezielte Aminosäuremutationen zu einer verstärkten Proliferation der transfizierten Zellen führten. Dabei wurde die Expression megakaryozytärer Differenzierungsmarker verringert. Durch diese Versuche wurden insbesondere die bei Zytokinrezeptoren homologen Motive *Box1* und *Box2* für das Aufrechterhalten des proliferativen Signals von TPO charakterisiert. Von dem oben beschriebenen Patienten wurde deshalb die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors c-mpl sequenziert, um eventuelle Mutationen zu identifizieren. Dabei konnte in den dafür codierenden Exons 11 und 12 keine Mutationen gefunden werden. Einschränkend muß erwähnt werden, daß auch das Exon 10, das im wesentlichen für den Transmembranbereich des Rezeptors codiert, zytoplasmatisch noch neun membran-proximale Aminosäuren von c-Mpl

inclusive einem Tyrosinrest codiert. Dieser Bereich konnte aufgrund von fehlender DNA des Patienten noch nicht untersucht werden.

Durch Untersuchungen an verschiedenen knock-out-Mäusen konnten die Transkriptionsfaktoren NF-E2 und GATA-1 auch als megakaryozytäre Reifungsfaktoren identifiziert werden. Der Phänotyp der NF-E2^{-/-}-knock-out-Maus ist durch eine absolute Thrombozytopenie und niedrige TPO-Serumspiegel (SHIVDASANI *et al.* 1995) und der der GATA-1^{-/-}- knock-out-Maus durch eine ausgeprägte Thrombozytopenie (SHIVDASANI *et al.* 1997) charakterisiert. In beiden Fällen ist das Knochenmark der Mäuse sehr reich an Megakaryozyten. Bisherige Untersuchungen an mononukleären Zellen aus Knochenmark des Patienten mit Down-Syndrom zeigten die Expression beider Transkriptionsfaktoren auf RNA-Ebene.

Der Vergleich der gefundenen Defekte dieses Patienten mit denen der zuvor beschriebenen CAMT- oder TAR-Patienten zeigt, daß ein funktionaler TPO-Rezeptor zur Produktion einer ausreichenden Anzahl an Thrombozyten erforderlich ist, daß aber weitere Faktoren an der finalen Differenzierung von Megakaryozyten zur Plättchenfreisetzung in die Peripherie beteiligt sind. Diese regulieren vermutlich das Verhältnis von Proliferation und Differenzierung und sind so neben Thrombopoietin an der Homöostase der Thrombozytenzahl im peripheren Blut beteiligt.

4.5. AUSBLICK

Mit der Klonierung von TPO liegt neben den gentechnisch hergestellten anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF und Erythropoietin ein weiterer wichtiger Faktor der Hämatopoese als rekombinantes Protein vor. Die anfängliche Hoffnung, rekombinant hergestelltes TPO als Medikament verabreichen zu können, z.B. nach chemotherapie-induzierten Thrombozytopenien, hat sich bisher nicht erfüllen können. Die zunächst *in vitro* und dann in Tierexperimenten erhaltenen Ergebnisse konnten in den ersten klinischen Studien mit Polyethylenglykol-konjugiertem rekombinantem humanem TPO nur zum Teil bestätigt werden (FANUCCHI *et al.* 1997). Neben der Anwendung von TPO bei Therapie-bedingten Thrombozytopenien könnte es aber auch bei einigen angeborenen Thrombozytopenien Anwendung finden, vergleichbar mit der G-CSF-Therapie bei schweren kongenitalen Neutropenien. So wird bei Patienten mit Kostmann-Syndrom trotz

fehlender oder eingeschränkter *in vitro*-Reaktivität der Granulozyten auf G-CSF durch hohe Dosen an G-CSF die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut erhöht (WELTE *et al.* 1990; BONILLA *et al.* 1994).

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, bis TPO vielleicht bei einigen der angeborenen Thrombozytopenien einen Einsatz als Medikament finden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Thrombopoietin (TPO) ist innerhalb der Blutbildung das entscheidende Zytokin für die Megakaryopoese und Thrombozytopoese. Der TPO-Rezeptor c-Mpl wird nur auf megakaryozytären Vorläufern im Knochenmark und auf Plättchen, die durch Abschnürung von Megakaryozyten entstehen, exprimiert.

An Thrombozyten von Gesundspendern wurden die durch TPO-Stimulation aktivierten Signalwege untersucht. Dabei konnte durch Detektion phosphorylierter Proteine neben der Aktivierung des Jak-Stat-Signalwegs auch die des Raf-MAPK-Signalwegs nach TPO-Stimulation gezeigt werden. Es wird gezeigt, daß die Januskinase Jak2 unmittelbar nach Stimulation der Thrombozyten mit TPO aktiviert wird. Außerdem konnten die Tyrosinphosphorylierungen des Rezeptors c-Mpl und der Transkriptionsfaktoren Stat3, Stat5a und Stat5b detektiert werden. Die Aktivierung von Stat1 α konnte erstmalig durch Gelretardation im SDS-Gel und elektrophoretische Shift-Assays (EMSA) in TPO-stimulierten Thrombozyten nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die durch TPO induzierte Bildung der Homodimere von Stat1 α , Stat3, Stat5a und Stat5b wie der Heterodimere Stat1/Stat3 und Stat5a/Stat5b in Plättchen gezeigt werden. Die Bildung der verschiedenen Dimere und deren Bindung an DNA erfolgte nicht zeitgleich, sondern mit unterschiedlichen Kinetiken, wobei Stat5 nach 1 Minute und Stat3 nach 5 Minuten TPO-Stimulation aktiviert wurde. Die Aktivierung von Stat1 war erst nach 20-30 Minuten deutlich nachweisbar.

Es konnte die Protein-Expression der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 in Thrombozyten gezeigt werden. Nach TPO-Stimulation wurde im wesentlichen ERK2 phosphoryliert. Die Aktivierung von ERK2 konnte nach 5 Minuten TPO-Stimulation nachgewiesen werden und erreichte ihr Maximum nach 30 Minuten. Diese Aktivierungskinetik entsprach der von Stat1. Obwohl Stat1 und Stat3 einen Serinrest in einem MAPK-Substratmotiv aufweisen, konnte keine TPO-abhängige Veränderung der Serinphosphorylierungen von Stat1 und Stat3 nachgewiesen werden.

Bei Charakterisierungen der nach TPO-Stimulation in Thrombozyten gebildeten Stat5-Komplexe konnte das Adapterprotein CrkL in allen Stat5-DNA-Komplexen identifiziert werden. Dabei zeigte sich, daß CrkL im wesentlichen mit Stat5b, aber nicht mit Stat5a assoziiert ist.

Die am Gesundspender etablierten Methoden wurden zur Charakterisierung möglicher Defekte in der Thrombozytopoese bei Patienten mit kongenitaler amegakaryozytärer Thrombozytopenie (CAMT) und bei der Thrombozytopenie mit bilateraler Radiusaplasie (TAR-Syndrom) angewandt. Bei CAMT- und bei TAR-Patienten wurde ein Defekt der Signaltransduktion in Thrombozyten nach TPO-Stimulation nachgewiesen: Die fehlende Induktion tyrosinphosphorylierter Proteine in den Plättchen kann einer fehlenden Reaktivität der megakaryozytären Vorläufer auf TPO in diesen Thrombozytopenien entsprechen.

Da zwei TAR-Patienten im c-mpl-Gen keine Mutation aufwiesen, kann ein mutierter c-Mpl-Rezeptor als Ursache der Thrombozytopenie im TAR-Syndrom ausgeschlossen werden.

Bei einem TAR-Patienten konnte zusätzlich gezeigt werden, daß Jak2 in Thrombozyten nach TPO-Stimulation nicht phosphoryliert wird. Daher kann die Thrombozytopenie im TAR-Syndrom auf einen Defekt in der frühen Signaltransduktion von c-Mpl lokalisiert werden.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methodik kann die Signaltransduktion von TPO und seinem Rezeptor c-Mpl an primären Zellen untersucht werden, die das Geschehen im Megakaryozyten gut widerspiegeln. Dadurch ist es auch möglich, die molekularen Ursachen, die zu einer angeborenen Thrombozytopenie führen, genauer zu charakterisieren.

LITERATUR

1. Aharonovitz, O., & Granot, Y. (1996). Stimulation of mitogen-activated protein kinase and Na⁺/H⁺ exchanger in human platelets. Differential effect of phorbol ester and vasopressin. *J Biol Chem*, *271*, 16494-16499.
2. Alexander, W.S., Roberts, A.W., Nicola, N.A., Li, R., & Metcalf, D. (1996). Deficiencies in Progenitor Cells of Multiple Hematopoietic Lineages and Defective Megakaryocytopoiesis in Mice Lacking the Thrombopoietin Receptor c-Mpl. *Blood*, *87*, 2162-2170.
3. Aman, M.J., & Leonard, W.J. (1997). Cytokine signaling: Cytokine-inducible signaling inhibitors. *Current Biology*, *7*, R784-R788.
4. Bacon, C.M., Tortolani, P., Shimosaka, A., Rees, R.C., Longo, D.L., & O'Shea, J.J. (1995). Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. *FEBS Lett*, *370*, 63-68.
5. Ballmaier, M., Schulze, H., Strauss, G., Cherkaoui, K., Wittner, N., Lynen, S., Wolters, S., Bogenberger, J., & Welte, K. (1997). Thrombopoietin in Patients with Congenital Thrombocytopenia and Ansent Radii: Elevated Serum Levels, Normal Receptor Expression, But Defective Reactivity to Thrombopoietin. *Blood*, *90*, 612-619.
6. Baumann, H., Gearing, D., & Ziegler, S.F. (1994). Signaling by the cytoplasmic domain of hematopoietin receptors involves two distinguishable mechanisms in hepatic cells. *J Biol Chem*, *269*, 16297-16304.
7. Bazan, J.F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *PNAS*, *87*, 6934-6938.
8. Begemann, H., & Rastetter, J. (1993). Hämorrhagische Diathesen. In *Klinische Hämatologie*. (pp. 898-915). Stuttgart, New York:
9. Birnboim, H.C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res*, *7*, 1513-1523.
10. Bonfini, L., Migliaccio, E., Pelicci, G., Lanfrancone, L., & Pelicci, P. (1996). Not all Shc's roads lead to Ras. *TIBS*, *21*, 257-261.
11. Bonilla, M.A., Dale, D., Zeidler, C., Last, L., Reiter, A., Rugeiro, M., Davis, M., Koci, M., Hammond, W., Gillia, A., & Welte, K. (1994). Long term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (r-metHuG-CSF) in patients with severe congenital neutropenia. *Brit J Hematol*, *87*, 723-730.
12. Brizzi, M., Dentelli, P., Lanfrancone, L., Rosso, A., Pelicci, P., & Pegoraro, L. (1996). Discrete protein interactions with the Grb2/c-Cbl complex in SCF- and TPO-mediated myeloid cell proliferation. *Oncogene*, *13*, 2067-2076.
13. Broudy, V.C., Lin, N.L., Sabath, D.F., Papayannopoulou, T., & Kaushansky, K. (1997). Human Platelets Display High-Affinity Receptors for Thrombopoietin. *Blood*, *89*, 1896-1904.
14. Bunting, S., Widmer, R., Lipari, T., Rangell, L., Steinmetz, H., Carver-Moore, K., Moore, M.W., Keller, G., & deSauvage, F.J. (1997). Normal Platelets and Megakaryocytes Are Produced In Vivo in the Absence of Thrombopoietin. *Blood*, *90*, 3423-3429.

15. Chen, J., Herceg-Harjacek, L., Gropman, J., & Grabarek, J. (1995). Regulation of platelet activation in vitro by the c-Mpl ligand, thrombopoietin. *Blood*, *86*, 4054-4062.
16. Chesterman, C.N., & Penington, D.G. (1993). Platelet production and turnover: thrombocytopenia and thrombocytosis. In R.M. Hardisty & D.J. Weatherall (Eds.), *Blood and its disorders*. (pp. 971-1030). Oxford: Blackwell:
17. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, *162*, 156-159.
18. Chung, J., Uchida, E., Grammer, T., & Blenis, J. (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, *17*, 6508-6516.
19. Cremer, M., Schulze, H., Linthorst, G., Folman, C., Wehnert, S., Strauss, G., von dem Borne, A.E.G.K., Welte, K., & Ballmaier, M. (1999). Serum levels of thrombopoietin, IL-11 and IL-6 in pediatric thrombocytopenia. *Anal Hematol*, *in press*,
20. Debili, N., Wendling, F., Cosman, D., Titeux, M., Florindo, C., Dusanter-Fourt, I., Schooley, K., Methia, N., Charon, M., & Nador, R. (1995). The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood*, *85*, 391-401.
21. deSavage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., Kuang, W., Oles, K.J., Hultgren, B., Solberg Jr., L.A., Goeddel, D.V., & Eaton, D.L. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*, *369*, 533-538.
22. Dorsch, M., Fan, P., Danial, N., Rothman, P., & Goff, S. (1997). The thrombopoietin receptor can mediate proliferation without activation of the Jak-STAT pathway. *J Exp Med*, *186*, 1947-1955.
23. Drachman, J.G., & Kaushansky, K. (1997). Dissecting the thrombopoietin receptor: Functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *PNAS*, *94*, 2350-2355.
24. Drachman, J., Griffin, J., & Kaushansky, K. (1995). The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem*, *270*, 4979-4982.
25. Ezumi, Y., Takayama, H., & Okuma, M. (1995). Thrombopoietin, c-Mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonist-induced aggregation in platelets in vitro. *FEBS Lett*, *374*, 48-52.
26. Ezumi, Y., Uchiyama, T., & Takayama, H. (1998). Thrombopoietin potentiates the protein-kinase-C-mediated activation of mitogen-activated protein kinase/ERK kinases and extracellular signal-regulated kinases in human platelets. *Eur J Biochem*, *258*, 976-985.
27. Fanucchi, M., Glaspy, J., Crawford, J., Garst, J., Figlin, R., Sheridan, W., Menchaca, D., Tomita, D., Ozer, H., & Harker, L. (1997). Effects of polyethylene glycol-conjugated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on platelet counts after chemotherapy for lung cancer. *New England J Medicine*, *336*, 404-409.
28. Farese, A.M., Hunt, P., Boone, T., & MacVittie, T.J. (1995). Recombinant human megakaryocyte growth and development factor stimulates thrombocytopoiesis in normal nonhuman primates. *Blood*, *86*, 54-59.

29. Fish, E., Uddin, S., Korkmaz, M., Majchrzak, B., Druker, B., & Platanias, L. (1999). Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons. *J Biol Chem*, 274, 571-573.
30. Foster, D.C. (1995). *Characterization of molecular forms of TPO and its Receptor*. Gardiner-Caldwell.
31. Greenwald, H.M., & Sherman, I. (1929). Congenital essential thrombocytopenia. *Am J Dis Child*, 38, 1245-1251.
32. Gurney, A.L., Wong, S.C., Henzel, W.J., & deSavage, F.J. (1995). Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation. *PNAS*, 92, 5292-5296.
33. Hagiwara, S., Iki, S., Urabe, S., Saeki, K., Miwa, A., Togawa, A., Ozawa, K., Takaku, F., & Yuo, A. (1998). Tyrosine phosphorylation of proteins in primary human myeloid leukemia cells stimulated by cytokines: analysis of the frequency of phosphorylation, and partial identification and semi-quantification of signaling molecules. *Int J Hematol*, 68, 387-401.
34. Hall, J.G., Levin, J., & Kuhn, J.P. (1969). Thrombocytopenia with absent radius. *Medicine*, 18, 411-439.
35. Harbarth, P., & Vosberg, H.P. (1988). Enzymatic amplification of myosin heavy-chain mRNA sequences in vitro. *DNA*, 7, 297-306.
36. Herbst, A. (1998). Molekularbiologische Untersuchungen zur Signaltransduktion des G-CSF-Rezeptors. *Dissertation*, Universität Hannover
37. Ihara, K., Ishii, E., Eguchi, M., Takada, H., Suminoe, A., Good, R.A., & Hara, T. (1999). Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *PNAS*, 96, 3132-3136.
38. Ihle, J.N. (1996). STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell*, 84, 331-334.
39. Ihle, J., & Kerr, I. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*, 11, 69-74.
40. Inoue, H., Nojima, H., & Okyama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
41. Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, 86, 419-431.
42. Kiladjian, J.J., Heret, G., Briere, J., Grandchamp, B., & Gardin, C. (1995). New mRNA isoforms of the c-Mpl receptor in human platelets. *Blood*, 86, 366a (abstract)
43. Kimura, T., Kaburaki, H., Tsujino, T., Watanabe, Y., & Kato, H. (1998). Signal transduction by the peptide which mimics the activity of thrombopoietin. *Biochem Mol Biol Int*, 44, 1203-1209.
44. Kishimoto, T., Taga, T., & Akira, S. (1994). Cytokine Signal Transduction. *Cell*, 76, 253

45. Komatsu, N., Kunitama, M., Yamada, M., Hagiwara, T., Kato, T., Miyazaki, H., Eguchi, M., Yamamoto, M., & Miura, Y. (1996). Establishment and characterization of the thrombopoietin-dependent megakaryocytic cell line UT-7/TPO. *Blood*, *87*, 4552-4560.
46. Kuter, D.J., Beeler, D.L., & Rosenberg, R.D. (1994). The purification of megapoietin: A physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *PNAS*, *91*, 11104-11108.
47. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680
48. Ling, P., Yao, Z., Meyer, C., Wang, X., Oehrl, W., Feller, S., & Tan, T. (1999). Interaction of hematopoietic progenitor kinase 1 with adaptor proteins Crk and CrkL leads to synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol*, *19*, 1359-1368.
49. Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., Kramer, J.M., Bell, L.A., Sprecher, C.A., Blumberg, H., Johnson, R., Prunkard, D., Ching, A.F.T., Mathewes, S.L., Bailey, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Osborn, S.G., Evans, S.J., Sheppard, P.O., Presnell, S.R., O'Hara, P.J., Hagen, F.S., Roth, G.J., & Foster, D.C. (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature*, *369*, 565-568.
50. Löffler, & Petrides. (1997). *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer.
51. Matsumura, I., Ishikawa, J., Nakajima, K., Oritani, K., Tomiyama, Y., Miyagawa, J., Kato, T., Miyazaki, H., Matsuzawa, Y., & Kanakura, Y. (1997). Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcription activation of p21 WAF1/Cip1 by Stat5. *Mol Cell Biol*, *17*, 2933-2943.
52. Methia, N., Louache, F., Vainchenker, W., & Wendling, F. (1993). Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood*, *82*, 1395-1401.
53. Miura, Y., Kirito, K., & Komatsu, N. (1998). Regulation of both erythroid and megakaryocytic differentiation of a human leukemia cell line, UT-7. *Acta Haematol*, *99*, 180-184.
54. Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B., Kato, T., Miyazaki, H., Handa, M., & Ikeda, Y. (1995). Recombinant thrombopoietin induces rapid protein tyrosine phosphorylation of Janus kinase 2 and Shc in human blood platelets. *Blood*, *86*, 23-27.
55. Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B., Miyazaki, H., Handa, M., Ohashi, H., & Ikeda, Y. (1996). Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood*, *87*, 439-446.
56. Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B., Ozaki, K., Handa, M., Ohashi, H., & Ikeda, Y. (1997). Thrombopoietin and thrombin induce tyrosine phosphorylation of Vav in human blood platelets. *Blood*, *89*, 2789-2798.
57. Morita, H., Tahara, T., Matsumoto, A., Kato, T., Miyazaki, H., & Ohashi, H. (1996). Functional analysis of the cytoplasmic domain of the human Mpl receptor for tyrosine-phosphorylation of the signaling molecules, proliferation and differentiation. *FEBS Lett*, *395*, 228-234.

58. Mu, S.X., Xia, M., Elliott, G., Bogenberger, J., Swift, S., Bennett, L., Lappinga, D.L., Hecht, R., Lee, R., & Saris, C.J. (1995). Megakaryocyte growth and development factor and interleukin-3 induce patterns of protein-tyrosine phosphorylation that correlate with dominant differentiation over proliferation of mpl-transfected 32D cells. *Blood*, *86*, 4532-4543.
59. Muraoka, K., Ishii, E., Tsuji, K., Yamamoto, S., Yamaguchi, H., Hara, T., Koga, H., Nakahata, T., & Miyazaki, S. (1997). Defective response to thrombopoietin and impaired expression of c-mpl mRNA of bone marrow cells in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Brit J Hematol*, *96*, 287-292.
60. Myers, T.W., & Gelfand, D.H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, *30*, 7661
61. Nagata, Y., Nishida, E., & Todokoro, K. (1997). Activation of JNK signaling pathways by erythropoietin, thrombopoietin and interleukin-3. *Blood*, *89*, 2664-2669.
62. Nagata, Y., & Todokoro, K. (1995). Thrombopoietin induces activation of at least two distinct signaling pathways. *FEBS Lett*, *377*, 497-501.
63. Novak, U., Mui, A., Miyajima, A., & Paradiso, L. (1996). Formation of STAT5-containing DNA binding complexes in response to colony-stimulating factor-1 and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, *271*, 18350-18354.
64. Oda, A., Miyakawa, Y., Druker, B., Ishida, A., Ozaki, K., Ohashi, H., Wakui, M., Handa, M., Watanabe, K., Okamoto, S., & Ikeda, Y. (1996a). Crkl is constitutively tyrosine phosphorylated in platelets from chronic myelogenous leukemia patients and inducibly phosphorylated in normal platelets stimulated by thrombopoietin. *Blood*, *88*, 4304-4313.
65. Oda, A., Ozaki, K., Druker, B., Miyakawa, Y., Miyazaki, H., Handa, M., Morita, H., Ohashi, H., & Ikeda, Y. (1996b). p120c-cbl is present in human blood platelets and is differentially involved in signaling by thrombopoietin and thrombin. *Blood*, *88*, 1330-1338.
66. Oda, A., Sawada, K., Druker, B., Ozaki, K., Takano, H., Koizumi, K., Fukada, Y., Handa, M., Koike, T., & Ikeda, Y. (1998). Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of Jak2, STAT5A, and STAT5B in primary cultured human erythroid precursors. *Blood*, *92*, 443-451.
67. Ohashi, H., Morita, H., Misasizu, T., Tsunakawa, H., Tahara, T., Tsumara, H., Miyazaki, H., & Kato, T. (1995). Receptor activation mechanisms and signal transduction pathways of truncated or chimeric c-Mpl. *Blood*, *86*, 905a(abstract)
68. Ooi, J., Tojo, A., Asano, S., Sato, Y., & Oka, Y. (1998). Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of a common beta subunit of GM-CSF receptor and its association with Stat5 in TF-1/TPO cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *246*, 132-136.
69. Ota, J., Kimura, F., Sato, K., Wakimoto, N., Nakamura, Y., Nagata, N., Suzu, S., Yamada, M., Shimamura, S., & Motoyoshi, K. (1998). Association of CrkL with STAT5 in hematopoietic cells stimulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or erythropoietin. *Biochem Biophys Res Commun*, *252*, 779-786.
70. Ozaki, K., Oda, A., Wakao, H., Rhodes, J., Druker, B., Ishida, A., Wakui, M., Okamoto, S., Morita, K., Handa, M., Komatsu, N., Ohashi, H., Miyajima, A., & Ikeda, Y. (1998). Thrombopoietin induces association of CrkL with STAT5 but not STAT3 in human platelets. *Blood*, *92*, 4652-4662.

71. Pallard, C., Gouilleux, F., Benit, L., Cocault, L., Souyri, M., Levy, D., Groner, B., Gisselbrecht, S., & Dusanter-Fourt, I. (1995). Thrombopoietin induces a STAT5-like factor in hematopoietic cells. *EMBO J*, *14*, 2847-2856.
72. Porter-Pharr, P., & Ogawa, M. (1985). Pluripotent stem cells. In F. Takaku (Ed.), *Hematopoietic stem cells*. New York: Marcel Dekker Inc.
73. Porteu, F., Rouyez, M., Cocault, L., Benit, L., Charon, M., Picard, F., Gisselbrecht, S., Souyri, M., & Dusanter-Fourt, I. (1997). Functional regions of the mouse thrombopoietin receptor cytoplasmic domain: Evidence for a critical region which is involved in differentiation and can be complemented by erythropoietin. *Mol Cell Biol*, *16*, 2473-2482.
74. Quentmeier, H., Zaborski, M., & Drexler, H. (1998). Effects of thrombopoietin, interleukin-3 and the kinase inhibitor K-252a on growth and polyploidization of the megakaryocytic cell line M-07e. *Leukemia*, *12*, 1603-1611.
75. Rauprich, P., Kasper, B., Tidow, N., & Welte, K. (1995). The protein tyrosine kinase JAK2 is activated in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia. *Blood*, *86*, 4500-4505.
76. Rouyez, M., Boucheron, C., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I., & Porteu, F. (1997). Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*, *17*, 4991-5000.
77. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, *230*, 1350-1354.
78. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*, *74*, 5463-5467.
79. Sasaki, K., Odai, H., Hanazono, Y., Ueno, H., Ogawa, S., Langdon, W., Tanaka, T., Miyagawa, K., Mitani, K., & Yazaki, Y. (1995). TPO/c-mpl ligand induces tyrosine phosphorylation of multiple cellular proteins including proto-oncogene products, Vav and c-Cbl, and Ras signaling molecules. *Biochem Biophys Res Commun*, *216*, 338-347.
80. Sattler, M., Durstin, M., Frank, D., Okuda, K., Kaushansky, K., Salgia, R., & Griffin, J. (1995). The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp Hematol*, *23*, 1040-1048.
81. Sattler, M., & Salgia, R. (1998). Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. *Leukemia*, *12*, 637-644.
82. Sattler, M., Salgia, R., Durstin, M., Prasad, K., & Griffin, J. (1997). Thrombopoietin induces activation of phosphatidylinositol-3' kinase pathway and formation of a complex containing p85PI3K and the protooncprotein p120CBL. *J Cell Physiol*, *171*, 28-33.
83. Schulze, H. (1996). Thrombopoietin als Regulator der Blutplättchenaktivierung: Untersuchungen zur Signaltransduktion am TPO-Rezeptor c-Mpl. *Diplomarbeit*, Universität Hannover;
84. Schulze, H., Ballmaier, M., Strauss, G., Wittner, N., Cherkaoui, K., & Welte, K. (1996). Patients with Thrombocytopenia and absent radii (TAR) demonstrate elevated thrombopoietin (TPO)-levels, normal TPO receptor expression, but defective reactivity to TPO. *Exp Hematol*, *24*, 1069 (abstract)

85. Shivdasani, R.A., Rosenblatt, M.F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C.W., Hunt, P., Saris, C.J.M., & Orkin, S.H. (1995). Transcription Factor NF-E2 Is Required for Platelet Formation Independent of the Actions of Thrombopoietin/MGDF in Megakaryocyte Development. *Cell*, *81*, 695-704.
86. Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., & Orkin, S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*, *16*, 3965-3973.
87. Solar, G.P., Kerr, W.G., Zeigler, F.C., Hess, D., Donahue, C., deSauvage, F.J., & Eaton, D.L. (1998). Role of c-mpl in Early Hematopoiesis. *Blood*, *92*, 4-10.
88. Souyri, M., Vigon, I., Penciolelli, J., Heard, J., Tambourin, P., & Wendling, F. (1990). A Putative Truncated Cytokine Receptor Gene Transduced by the Myeloproliferative Leukemia Virus Immortalizes Hematopoietic Progenitors. *Cell*, *63*, 1137-1147.
89. Starr, R., Wilson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J.L., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., & Hilton, D.J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, *387*, 917-921.
90. Takatoku, M., Kametaka, M., Shimizu, R., Miura, Y., & Komatsu, N. (1997). Identification of Functional Domains of the Human Thrombopoietin Receptor Required for growth and differentiation of megakaryocytic cells. *J Biol Chem*, *272*, 7259-7263.
91. Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., & Ihle, J. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, *93*, 841-850.
92. Tortolani, P., Johnston, J., Bacon, C., McVicar, D., Shimosaka, A., Linnekin, D., Longo, D., & O'Shea, J. (1995). Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of the Janus kinase, JAK2. *Blood*, *85*, 3444-3451.
93. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins of polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, *76*, 4350
94. Ulich, T.R., Del Castillo, J., Yin, S., Swift, S., Padilla, D., Senaldi, G., Bennett, L., Shutter, J., Bogenberger, J., Sun, D., Samal, B., Shimamoto, G., Lee, R., Steinbrink, R., Boone, T., Sheridan, W.T., & Hunt, P. (1995). Megakaryocyte growth and development factor ameliorates carboplatin-induced thrombocytopenia in mice. *Blood*, *86*, 971-976.
95. Verdier, F., Rabionet, R., Gouilleux, F., Beisenherz-Huss, C., Varlet, P., Muller, O., Mayeux, P., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., & Chretien, S. (1998). A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol*, *18*, 5852-5860.
96. Vigon, I., Mornon, J., Cocault, L., Mitjavila, M., Tambourin, P., Gisselbrecht, S., & Souyri, M. (1992). Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: Identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *PNAS*, *89*, 5640-5644.

97. Wagner, B.J., Hayes, T.E., Hoban, C.J., & Cochran, B.H. (1990). The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promotor. *EMBO J*, 9, 4477
98. Welte, K., Zeidler, C., Reiter, A., Müller, W., Odenwald, E., Souza, L., & Riehm, H. (1990). Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in children with severe congenital neutropenia. *Blood*, 75, 1056-1063.
99. Wen, Z., & Darnell Jr., J.E. (1997). Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucl Acid Res*, 25, 2062-2067.
100. Wen, Z., Zhong, Z., & Darnell, J.J. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82, 241-250.
101. Wendling, F., & Vainchenker, W. (1998). Thrombopoietin and its receptor. *Eur Cytokine Netw*, 9, 221-231.
102. Whalen, A.M., Galasinski, S.C., Shapiro, P.S., Stines Nahreini, T., & Ahn, N.G. (1997). Megakaryocytic Differentiation Induced by Constitutive Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Mol Cell Biol*, 17, 1947-1958.
103. Yamada, M., Komatsu, N., Okada, K., Kato, T., Miyazaki, H., & Miura, Y. (1995). Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in a human thrombopoietin-dependent cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 217, 230-237.
104. Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Hara, T., & Miyajima, A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J*, 14, 2816-2826.
105. Zeidler, C., Kanz, L., Hurkuck, F., Rittmann, K.L., Wildfang, I., Kadoya, T., Mikayama, T., Souza, L., & Welte, K. (1992). In vivo effects of interleukin-6 on thrombopoiesis in healthy and irradiated primates. *Blood*, 80, 2740-2745.
106. Zeigler, F.C., deSavauge, F.J., Widmer, H.R., Keller, G.A., Donahue, C., Schreiber, R.D., Malloy, B., Hass, P., Eaton, D.L., & Matthews, W. (1994). In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood*, 84, 4045-4052.
107. Zhang, X., Blenis, J., Li, H., Schindler, C., & Chen-Kiang, S. (1995). Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promotor complexes. *Science*, 267, 1990-1994.
108. Zhu, X., Wen, Z., Xu, L., & Darnell, J.J. (1997). Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol Cell Biol*, 17, 6618-6623.

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen, die an der Entstehung dieser Arbeit Anteil genommen haben, aber besonders

Herrn Prof. Dr. K. Welte für die freundliche Aufnahme in sein Institut, die Formulierung des Themas, die Bereitstellung vielfältiger Arbeitsmöglichkeiten und das ständige Interesse an meiner Arbeit sowie die Übernahme des Korreferates,

Herrn Prof. Dr. J. Alves, meinem Doktorvater, für die Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit und die Übernahme des Hauptreferates,

Herrn Dr. Shimosaka für die freundliche Überlassung von rekombinantem TPO und α -c-Mpl-Antiserum,

Herrn Dr. M. Ballmaier für die Betreuung meiner Arbeit, das Wecken meines Interesses für TPO und die Hämatopoese, die vielen Ideen, Tips und Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben,

Frau Dr. M. Germeshausen für die Unterstützung in den molekularbiologischen Fragen, für die vielen biochemischen und hämatologischen Diskussionen, für die sprachliche Überarbeitung meines Manuskripts und die organisatorische Hilfe in den letzten Tagen und Nächten vor der Abgabe der Arbeit,

Herrn Dr. A. Herbst für die Diskussionen und Hilfestellungen im Labor und dann per e-mail,

Herrn Priv.-Doz. Dr. M. R. Hadam für Anmerkungen bei der Durchflußzytometrie und die Unterstützung bei der Bearbeitung der Bilder,

Frau Dr. G. Strauß für die Zusammenarbeit bei der Organisation von Material von Patienten und die Diskussionen über thrombozytopenische Erkrankungen,

Frau Rita Janz für die Versorgung mit PBS und Zellkulturmedien im Verlauf der Doktorarbeit sowie allen Mitarbeitern im Labor der "Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie für ihre Hilfsbereitschaft,

Herrn Dr. Torsten Crass und meinen Freunden, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und mir zur Seite gestanden haben,

sowie meinem Bruder für all die praktische Hilfe während der Zeit der Doktorarbeit, meiner Schwester für die Anteilnahme an meiner Arbeit und meiner Mutter für all die Unterstützung, die sie mir in den Jahren hat zukommen lassen.

Die Arbeit ist dem Andenken meines Vaters gewidmet.

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, im Mai 1999

Harald Schulze

LEBENS LAUF

Name: Harald Schulze
geb. am: 21.11.1969
in: Alfeld / Leine
Eltern: Helmut Schulze
Helma Schulze, geb. Kasten
Konfession: evangelisch-lutherisch

Schulbildung: 1976 - 1980 Grundschole Alfeld
1980 - 1982 Orientierungsstufe Alfeld
1982 - 1989 Gymnasium Alfeld, Abitur

Zivildienst: 1989 - 1990 im Kirchenkreis Alfeld

Hochschule: 1990 - 1996 Studium der Biochemie in Hannover
10/1992 Diplomvorprüfung
06/1995 Diplomhauptprüfung
06/1995 -
01/1996 Diplomarbeit in der Abt. Päd. Hämatologie
und Onkologie in der Med. Hochschule
Hannover
ab 02/1996 Anfertigung der Doktorarbeit in der o.a. Abt.