



Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie  
des Universitätsklinikums Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Genexpressionsanalysen von CD34+  
hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen  
bei Patienten mit Polycythaemia vera**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Michael Schroeder

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg  
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>6</b>
<b>A. EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
<b>A.1. Polycythaemia vera.....</b>	<b>9</b>
A.1.1. Definition.....	9
A.1.2. Epidemiologie, Klinisches Bild und Diagnose.....	10
A.1.3. Therapie und Prognose.....	12
A.1.4. Ätiologie und Pathogenese.....	14
A.1.5. Ziele und Aufgabenstellung.....	20
<b>B. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
<b>B.1. Zellen.....</b>	<b>22</b>
<b>B.2. Dichtegradienten-Zentrifugation.....</b>	<b>22</b>
B.2.1. Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation.....	22
B.2.2. Dichtegradienten-Zentrifugation.....	22
<b>B.3. Immunmagnetische Zellisolation.....</b>	<b>25</b>
B.3.1. Prinzip der immunmagnetischen Zellisolation.....	25
B.3.2. „Magnetic Labeling“.....	26
B.3.3. Säulenchromatographie.....	27
<b>B.4. Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie (FACS).....</b>	<b>27</b>
<b>B.5. Genexpressionsanalysen mit Hilfe von cDNA-Arrays.....</b>	<b>28</b>
B.5.1. Prinzip der cDNA-Arrays.....	28
B.5.2. RNA-Extraktion.....	29
B.5.3. Reverse Transkription.....	30
B.5.4. Säulenchromatographie.....	31
B.5.5. Hybridisierung.....	31
B.5.6. Quantifizierung, Normalisierung und Statistische Analysen.....	33

<b>B.6. Quantitative “Real-Time” RT-PCR.....</b>	<b>34</b>
B.6.1. RNA-Extraktion.....	34
B.6.2. Reverse Transkription.....	35
B.6.3. Prinzip der “Real-Time” RT-PCR.....	36
B.6.4. Quantitative “Real-Time” RT-PCR mittels TaqMan <sup>®</sup> -Sonde.....	37
<b>B.7. Klonogener Wachstumstest (“Colony-forming assays”).....</b>	<b>38</b>
B.7.1. Prinzip der “Colony-forming assays”.....	38
B.7.2. “Colony-forming assays”.....	38
B.7.3. Auswertung der “Colony-forming assays”.....	40
B.7.4. Statistische Analysen.....	40
<b>C. ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
<b>C.1. Genexpressionsprofile von PV-CD34+ Zellen .....</b>	<b>41</b>
<b>C.2. Überexpression von RAR<math>\beta</math> und RXR<math>\beta</math> auf mRNA-Ebene.....</b>	<b>47</b>
<b>C.3. ATRA-induzierte Hemmung des Wachstums von PV-CD34+ Zellen.....</b>	<b>51</b>
<b>D. DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
<b>D.1. Untersuchung der Genexpression von CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit PV .....</b>	<b>54</b>
D.1.1. Differentielle Genexpression verschiedener funktioneller Genfamilien.....	54
D.1.2. Überexpression der beiden Retinsäurerezeptoren RAR $\beta$ und RXR $\beta$ in PV-CD34+ Zellen.....	61
<b>D.2. Hemmung des klonogenen Wachstums mononukleärer Zellen von Patienten mit PV durch ATRA.....</b>	<b>63</b>

<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>66</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>79</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>81</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AML	Akute myeloische Leukämie
ASH	American Society of Hematology
ATRA	All-trans Retinoic Acid
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region-Abelson
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copy-DNA
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte/monocyte
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRABP	Cellular retinoic acid binding protein
C <sub>T</sub>	Cycle of threshold
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EEC	Endogenous erythroid colony
EML	Erythroid myeloid lymphoid
ET	Essentielle Thrombozythämie
FACS	Fluorescence-associated cell sorting
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Hkt	Hämatokrit
IMF	Idiopathische Myelofibrose
IFN- $\alpha$	Interferon alpha
Ig	Immunglobulin
IL-3	Interleukin-3
JAK2	Januskinase 2
LOH	loss of heterozygosity
MACS	Magnetic-associated cell sorting
mRNA	messenger-RNA
$^{32}\text{P}$	$^{32}\text{Phosphor}$
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pdN <sub>6</sub>	Random-Hexamere
PML	Promyelozytenleukämie
PV	Polycythaemia vera
PVSG	Polycythemia Vera Study Group
RAR	Retinoic acid receptor
RARE	Retinoic acid responsive element
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotations per minute
RT	Reverse Transcription

RXR	Retinoic X receptor
SSC	Sodium saline citrate
STAT	Signal transducer and activator of transcription
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel



## **A. Einleitung**

### **A. 1. Polycythaemia vera**

#### **A. 1. 1. Definition**

Die Polycythaemia vera (PV) wurde 1892 von Vaquez zum ersten Mal beschrieben und gehört neben der chronischen myeloischen Leukämie (CML), der essentiellen Thrombozythämie (ET) und der idiopathischen Myelofibrose (IMF) zu den myeloproliferativen Erkrankungen<sup>1,2</sup>. Die Klassifikation dieser Erkrankungen durch Dameshek aus dem Jahr 1951 ist vor kurzem von der World Health Organisation (WHO) revidiert worden<sup>2,3</sup>. Gemäß dieser WHO-Klassifikation werden neben den vier oben genannten Erkrankungen auch die chronische Neutrophilen-Leukämie, die chronisch eosinophile Leukämie inklusive dem Hypereosinophilie-Syndrom, die systemische Mastozytose und die nicht klassifizierbare chronische myeloproliferative Erkrankung zu diesem Krankheitskomplex gezählt<sup>3</sup>. Die PV stellt dabei eine klonale Erkrankung einer multipotenten hämatopoietischen Progenitorzelle dar, in deren Folge es zu einer Hyperplasie der erythrozytären, granulozytären und megakaryozytären hämatopoetischen Zelllinien kommt, ohne dass ein dem Bedarf gemäßer physiologischer Stimulus existiert<sup>4,5</sup>. Neben einer Akkumulation von Erythrozyten, die der Erkrankung den Namen gab und eine entscheidende Rolle für das klinische Bild und die Diagnose spielt, kann auch die Konzentration reifer Granulozyten und Thrombozyten erhöht sein<sup>6,7</sup>. Dabei gilt es, die PV von anderen Formen einer Polyglobulie abzugrenzen, wie sie unter bestimmten physiologischen oder pathophysiologischen Zuständen als sekundäre Form anzutreffen ist<sup>8</sup>. So kommt es physiologischerweise zu einer Erythrozytose bei einem Aufenthalt in großer Höhe aufgrund des verminderten Sauerstoffpartialdrucks<sup>8</sup>. Pathophysiologisch spielen unter anderem chronisch obstruktive Lungenerkrankungen oder Erythropoietin-produzierende Tumore der Niere eine Rolle bei der Entstehung einer Erythrozytose<sup>8,9</sup>.

### **A. 1. 2.                    Epidemiologie, klinisches Bild und Diagnose**

Die PV tritt mit einer Inzidenz von 2,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr auf, wobei das mittlere Erkrankungsalter oberhalb des 60. Lebensjahres liegt<sup>6,10</sup>. Männer erkranken in einem Verhältnis von 3 zu 2 etwas häufiger als Frauen<sup>10-12</sup>.

Die klinische Symptomatik und die meisten Komplikationen der PV werden durch die Erythrozytose und die daraus resultierende gesteigerte Blutviskosität bestimmt<sup>13,14</sup>. Kennzeichnend für die PV ist eine absolut erhöhte Erythrozytenzahl, ein gesteigerter Hämatokrit und eine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration. Aufgrund der veränderten Fließeigenschaften stellen Thrombosen eine häufige Komplikation im Verlauf der Erkrankung dar: So werden zwischen 12-49% der Patienten mit einer PV aufgrund eines thrombembolischen Ereignisses entdeckt, und während des Krankheitsverlaufs entwickeln 40% der Patienten eine Thrombose<sup>14</sup>. Zwischen 20-40% der Patienten versterben aufgrund einer thrombembolischen Komplikation<sup>14</sup>. So zeigen Patienten mit PV eine signifikant erhöhte Rate an Schlaganfällen, Myokardinfarkten, Leberventhrombosen (Budd-Chiari-Syndrom) und peripher ischämischen Ereignissen<sup>14,15</sup>. Seltener als thrombembolische Ereignisse werden paradoxerweise hämorrhagische Diathesen mit Nasenbluten, Blutergüssen und gastrointestinalen Blutungen beobachtet, die eine Folge der Thrombozytose bzw. Thrombozytopathie und der vaskulären Stase sind<sup>14</sup>.

Charakteristisch für PV ist auch ein Juckreiz, der während des Duschens auftritt und vermutlich Folge eines erhöhten Histaminspiegels im Blut ist<sup>16</sup>. Häufiges Symptom ist auch eine Splenomegalie hervorgerufen durch extramedulläre Blutbildung<sup>13</sup>. Des Weiteren weist ein Teil der Patienten mit PV eine arterielle Hypertonie auf<sup>13</sup>. Daneben können auch Gichtanfälle oder Uratsteine infolge eines erhöhten zellulären Umsatzes und des daraus resultierenden Anstiegs des Serumspiegels von Harnsäure auftreten<sup>17</sup>.

Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium tritt bei manchen Patienten ein sogenanntes „Wasting Syndrome“ auf, das mit therapieresistentem Gewichtsverlust, extramedullärer Blutbildung und einer ausgeprägten Erhöhung der Leukozyten- und Thrombozytenzahl einhergeht<sup>14</sup>. Während des Krankheitsverlaufs können sich komplizierend eine Anämie, eine Fibrosierung des Knochenmarks und eine akute Leukämie entwickeln, die zunächst als genuiner

Krankheitsverlauf gewertet wurden, wie sich heute zeigt, jedoch weitaus häufiger als Folge einer Therapie durch ionisierende Strahlung, <sup>32</sup>Phosphor oder Chlorambucil auftraten<sup>14,18</sup>.

Die Diagnose der PV beruht schon seit der Erstbeschreibung der Erkrankung auf klar definierten Kriterien. Begonnen von Osler im Jahre 1903, systematisiert durch die Polycythemia Vera Study Group (PVSG) 1971 und durch Pearson et al. im Jahre 2001 berücksichtigt der aktuelle Katalog der American Society of Hematology (2005) neben den klassischen Kriterien auch neuere wissenschaftliche Erkenntnisse, die wir der Anwendung sensitiverer Labormethoden verdanken<sup>19-23</sup>. Sie unterscheidet vier sog. „A“- oder Hauptkriterien und vier sog. „B“- oder Nebenkriterien, die in der folgenden Tabelle dargestellt sind<sup>23</sup>.

---

#### **Diagnosekriterien für Polycythaemia vera ASH 2005**

---

- A1** Gesteigerte Erythrozytenmasse (mindestens 25% oberhalb des Durchschnittswertes, oder Hämatokrit Männer mindestens 60%, Frauen mindestens 56%)
  - A2** Ausschluß einer sekundären Erythrozytose (normale arterielle Sauerstoffsättigung und keine Erhöhung des Erythropoietin-Serumspiegels)
  - A3** Palpable Splenomegalie
  - A4** Nachweis der JAK2 V617F Mutation oder andere zytogenetischer Veränderungen (außschließlich BCR-ABL) in hämatopoietischen Zellen
  - B1** Thrombozytose über 400.000/ $\mu$ l
  - B2** absolute Neutrophilie (über 10.000/ $\mu$ l bei Nichtrauchern bzw. über 12.500/ $\mu$ l bei Rauchern)
  - B3** radiologisch nachgewiesene Splenomegalie
  - B4** Wachstum endogener erythrozytärer Kolonien (EEC) oder niedriger Erythropoietin-Serumspiegels
- 

Die Diagnose PV wird bei Vorliegen der Kriterien A1 und A2 und einem weiteren A- oder zwei weitere B-Kriterien gestellt.

Erstmals wird in dieser Einteilung auch der Nachweis der JAK2 V617F Mutation (s. unten) als Diagnosekriterium angewandt, die ähnlich wie das Philadelphia-Chromosom bei der CML als molekularer Marker etabliert worden ist<sup>23</sup>. Im weiteren möchte ich noch auf neuere Untersuchungen eingehen, die möglicherweise die Grundlage für zwei weitere „Diagnosemarker“ liefern könnten. Dabei handelt sich zum einen um das „Polycythemia Rubra Vera-1 (PRV-1)“<sup>24</sup>. Dieses ist ein Oberflächenrezeptor, der physiologisch im Knochenmark und in einem sehr geringen Maße in der fetalen Leber exprimiert wird und zur Familie der „uPAR/Ly6/CD59/snake toxin-receptors“ zählt<sup>24</sup>. Der PRV-1-Rezeptor wird auf Granulozyten von Patienten mit PV exprimiert, nicht jedoch auf Granulozyten von gesunden Personen oder von Patienten mit sekundärer Erythrozytose, so dass hier eine differentialdiagnostische Abgrenzung möglich ist<sup>24,25</sup>. Allerdings zeigen Granulozyten von manchen Patienten mit IMF und ET ebenfalls eine gesteigerte PRV-1-Expression, so dass die Differentialdiagnose zwischen den verschiedenen myeloproliferativen Erkrankungen nur unter Berücksichtigung anderer Befunden möglich ist<sup>24</sup>. Für die Diagnostik ist mittlerweile eine RT-PCR etabliert worden<sup>25</sup>. Bei dem anderen Kandidaten handelt es sich um den Thrombopoetin-Rezeptor „c-Mpl“, der auf den Blutplättchen von Patienten mit PV und IMF stark vermindert ist oder sogar fehlt<sup>26</sup>. Möglicherweise lassen sich über die verminderte „c-Mpl“-Expression die sog. Philadelphia-Chromosom-negativen myeloproliferativen Erkrankungen charakterisieren.

### **A. 1. 3. Therapie und Prognose**

Die Behandlung der PV verfolgt bis dato einen symptomatischen Therapieansatz und zielt auf die Vermeidung von Komplikationen wie z. B. Thrombosen, Myokardinfarkten oder cerebralen Insulten ab. Die zu diesem Zweck am häufigsten durchgeführte Therapie sind isovolämische Aderlässe, deren Ziel die Verminderung der Erythrozytenmasse und damit des Hämatokrits ist (Frauen: Hkt < 42%, Männer: Hkt < 45%)<sup>27</sup>. Synergistisch im Hinblick auf die Reduktion des kardiovaskulären Risikos wirken der Thrombozytenaggregationshemmers Acetylsalicylsäure (100mg/Tag) sowie die Behandlung anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie z. B. arterielle Hypertonie und Dyslipoproteinämie<sup>28,29</sup>.

Die Entstehung einer symptomatischen Splenomegalie als Ausdruck einer progressiven Krankheitsverlaufes, eine verminderte Toleranz des Patienten hinsichtlich der Aderlässe sowie das Auftreten einer Thrombozytose stellen eine Indikation für eine zytoreduktive Therapie dar<sup>23,29</sup>. Hierfür wird in den meisten Fällen Hydroxyurea (Litalir®) benutzt<sup>23,29</sup>. Als Alternative hierzu kann bei jüngeren Menschen (< 40 Jahre) oder bei Schwangeren Interferon alpha (INF- $\alpha$ ) zur Zytoreduktion eingesetzt werden<sup>23,29</sup>, da diese Substanz keinen gesicherten leukämie-induzierenden oder teratogenen Effekt aufweist. Zur Behandlung der Thrombozytose kommt auch Anagrelide (Agrylin®) infrage, welches hemmend auf die Thrombozytenaggregation und die Thrombozytenzahl durch Inhibition der Megakaryozytenausreifung direkt senkt<sup>23,29</sup>. Aufgrund der erhöhten Inzidenz von Leukämien und anderen Sekundärneoplasien als Folge der Therapie mit <sup>32</sup>P, Chlorambucil, Pipobroman, dem Alkylans Busulfan oder auch als Folge einer Bestrahlung werden diese Therapieformen nicht mehr angewandt<sup>30,31</sup>.

Da alle oben genannten Behandlungsmethoden nicht zu einem Verschwinden des malignen Zellklons führen, stellt die Transplantation allogener hämatopoietischer Stammzellen den einzigen kurativen Therapieansatz dar<sup>29</sup>. Angesichts der mit dieser Behandlung assoziierten Risiken wird sie allerdings nur bei wenigen, ausgewählten Patienten, wie zum Beispiel bei verhältnismäßig jungen Patienten oder bei Patienten mit weit fortgeschrittener Myelofibrose, in klinischen Studien durchgeführt<sup>29,32,33</sup>.

In aktuellen Untersuchungen konnte die Bildung von „erythroiden Burst-Forming Units“ (BFU-E) durch den Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Glivec®) bei einigen Patienten mit PV inhibiert werden<sup>34,35</sup>. Dennoch scheint es aufgrund klinischer Ergebnisse so, dass Imatinib für die Behandlung der PV wenn überhaupt nur eine geringe Bedeutung zukommt<sup>34,35</sup>. Die erst kürzlich gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Januskinase 2 (JAK2) legen nahe, dass die JAK 2 möglicher Angriffspunkt einer molekularen Therapie bei PV sein kann, zumal eine Hemmung der Bildung „endogener erythrozytärer Kolonien“ (EEC) durch einen pharmakologischen Inhibitor der JAK2 und eine gegen JAK2 gerichtete „short interfering“ RNA in vitro bereits gezeigt werden konnte<sup>36-38</sup>.

Prognostisch betrachtet ist die Lebenserwartung von Patienten mit PV signifikant verringert (15-Jahresüberlebensrate 65%), und die Mortalität ist mit ca. 3 pro 100 Patienten/Jahr um den Faktor 1,6 gegenüber der gesunden Bevölkerung erhöht<sup>39,40</sup>.

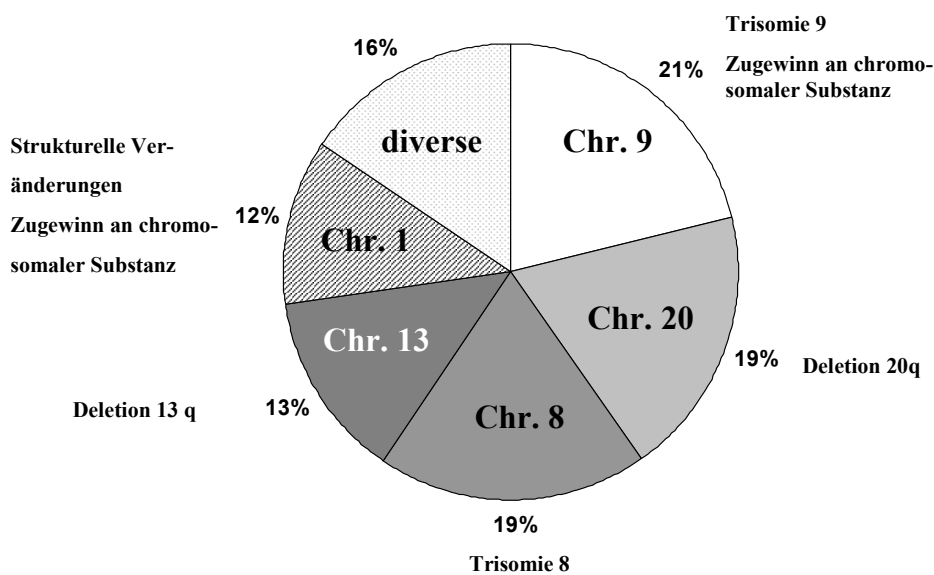
#### A. 1. 4. Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der Polycythaemia vera ist auch nach über einem Jahrhundert klinischer und experimenteller Forschung nicht vollständig bekannt. Aktuelle Untersuchungen haben entscheidende Einblicke in die molekularen Grundlagen dieser Erkrankung gebracht und ermöglichen ein neues pathophysiologisches Verständnis der PV. Im folgenden werde ich einen Abriß über die Pathogenese der PV geben.

Im Gegensatz zur CML oder z. B. der Promyelozytenleukämie (AML M3) lässt sich bei der PV keine einheitliche zytogenetische Veränderung nachweisen, so dass zytogenetische Untersuchungsmethoden für die Routine-Diagnostik der PV keine Rolle spielen<sup>41,42</sup>. Möglicherweise weist das Vorhandensein chromosomaler Abberationen zum Diagnosezeitpunkt ähnlich wie bei anderen Leukämieformen auf einen ungünstigen Verlauf hin.

Zum Diagnosezeitpunkt weisen lediglich 13%-29% der Patienten mit PV eine zytogenetische Aberration auf<sup>43</sup>. Nachfolgend sind die häufigsten chromosomalen Veränderungen bei PV aufgelistet:

**Abbildung 1: Zytogenetische Veränderungen bei PV**



Die strukturellen Veränderungen des Chromosoms 9 sind besonders häufig bei PV. Deshalb vermuteten schon Chen et al (1998) und Najfeld et al (2002), dass die Amplifikationen von Genen, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 lokalisiert sind, für die PV pathogenetisch eine Rolle spielen<sup>44,45</sup>. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Heterozygotie des kurzen Arms von Chromosom 9 (LOH9p) die häufigste strukturelle Aberration bei PV ist<sup>46</sup>. Etwa 30% der Patienten mit PV weisen diesen Chromosomendefekt auf<sup>46</sup>.

Fokussiert auf diese Chromosomen-Region wiesen fünf Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine Punktmutation (Guanin → Tyrosin) des Nukleotids 1849 im Exon 12 für die Januskinase 2 (JAK2) nach<sup>47</sup>. Diese Mutation, die durch einen Aminosäureaustausch (V617F) zu einer konstitutiven Aktivierung der JAK2 führt, ist eine somatische Mutation und tritt mit einer Inzidenz von 65%-97% bei Patienten mit PV auf<sup>47</sup>. Ihre pathogenetische Relevanz wird in einem eigenen Kapitel beschrieben.

Daneben zeigen Granulozyten und CD34+ Zellen von Patienten mit PV, die den oben genannten 9pLOH-Defekt besitzen, eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors NFI-B<sup>46</sup>. Dieser Transkriptionsfaktor vermittelt in vitro eine Resistenz gegenüber „Transforming Growth Factor  $\beta$ 1“ (TGF  $\beta$ 1)<sup>46</sup>. Da TGF  $\beta$ 1 ein bekannter Inhibitor der Hämatopoese ist, könnte die gesteigerte Expression von NFI-B für die übermäßige Bildung reifer Blutzellen bei der PV verantwortlich sein<sup>46</sup>.

Eine andere chromosomale Aberration, die Deletion des langen Arms von Chromosom 20, die sich als Verlust einer Region von 8 bis 9 Megabasen präsentiert und um die Bande 20q12 lokalisiert ist, führt möglicherweise zur Inaktivierung von Genen, die zur Entstehung der PV oder einem Progress der Krankheits führen kann<sup>48,49</sup>.

Im folgenden Abschnitt der Einleitung möchte ich auf die für die PV charakteristische Hypersensitivität der hämatopoietischen Progenitorzelle gegenüber Erythropoietin und gegenüber anderen hämatopoietischen Wachstumsfaktoren näher eingehen.

PV beruht auf der malignen Transformation einer multipotenten hämatopoietischen Vorläuferzelle, die zu einer Hyperplasie aller drei myeloischen Zellreihen, insbesondere jedoch der erythrozytären Zellreihe führt<sup>4,5</sup>. Charakteristisch für hämatopoietische Progenitorzellen bei der PV ist die Bildung sog. „endogener erythrozytärer Kolonien“ (EEC), d. h. sie können im Gegensatz zu hämatopoietischen Vorläuferzellen von Gesunden ohne von außen zugeführtes Erythropoietin in serumhaltigen Kulturmedien erythrozytäre

Zellkolonien, sog. „Burst Forming Units-Erythroid“ (BFU-E) bilden<sup>50</sup>. Dieses Wachstumsverhalten, das initial als „Erythropoietin-Unabhängigkeit“ bezeichnet wurde, wird mittlerweile als „Erythropoietin-Hypersensitivität“ interpretiert und richtete den Schwerpunkt vieler Untersuchungen auf den Erythropoietin-Rezeptor<sup>51,52</sup>.

Hierbei zeigte sich jedoch, dass der Erythropoietin-Rezeptor mit Ausnahme seltener familiärer Formen einer Erythrozytose bei PV strukturell und funktionell intakt ist<sup>52</sup>. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde vermutet, dass die „Erythropoietin-Hypersensitivität“ Folge von Veränderungen auf der Stufe der intrazellulären Signaltransduktion sein könnte. Diese Theorie wurde durch weitere Befunde bekräftigt. So zeichnen sich hämatopoietische Vorläuferzellen von Patienten mit PV durch eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit für weitere hämatopoietische Wachstumsfaktoren, wie z. B. Interleukin 3 (IL-3), „Stem Cell Factor“ (SCF), Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und Thrombopoietin (TPO) aus<sup>53-56</sup>. Bemerkenswert ist außerdem, dass sowohl die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade dieser Zytokine als auch diejenige des Erythropoietin-Rezeptors aus Januskinasen (JAK) und sog. „STAT-Proteinen“ („signal transducer and activator of transcription“) besteht<sup>36,57</sup>.

Auf der anderen Seite zeigen andere chronisch myeloproliferative Erkrankungen, allen voran die CML mit der bcr-abl-Tyrosinkinase, aber auch seltenere Formen wie die systemische Mastozytose mit der c-Kit-Tyrosinkinase konstitutionelle Kinaseaktivität als Ursache für die abnorme Proliferation<sup>58,59</sup>.

Durch die oben genannten Erkenntnisse auf mögliche Veränderungen intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse aufmerksam geworden, rückte die Januskinase 2 (JAK2) in den Mittelpunkt der neueren Untersuchungen. An dieser Stelle soll zum besseren Verständnis kurz das physiologische Wirkprinzip der Januskinasen erklärt werden. Diese phosphorylieren Tyrosinreste an den intrazellulären Domänen von Zytokin-Rezeptoren, sobald diese mit ihrem zugehörigen Liganden interagieren. An die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors binden anschließend sog. „STAT-Proteine“ (signal transducer and activator of transcription) und werden danach durch Phosphorylierung aktiviert. Nach der Aktivierung wandern diese Proteine in den Zellkern und modulieren als Transkriptionsfaktoren die Expression ihrer



Zielgene. Neben dem „STAT-Pathway“ werden durch die Phosphorylierung des Rezeptors weitere Signalkaskaden wie MAP-Kinase, und Phosphatidylinositol-3-Kinase aktiviert. Konsequenz der aktivierten Signaltransduktionskaskaden ist ein Überlebensvorteil, eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung der jeweiligen Zellen<sup>60</sup>.

Tatsächlich konnten 5 Arbeitsgruppen unabhängig voneinander dieselbe, erworbene Punktmutation (s. oben) im Genort für die JAK 2 bei 65- 97% der Patienten mit PV nachweisen<sup>47</sup>. Auf Proteomebene führt die Mutation zu einem Austausch der Aminosäure Valin gegen die Aminosäure Phenylalanin an Position 617 in der Aminosäurenkette von JAK2<sup>36,47</sup>. Mit Blick auf die Quartärstruktur der JAK2 führt dieser Aminosäureaustausch zu einer Konformitätsänderung im Bereich der sog. JH2-Domäne der JAK2<sup>47</sup>. Diese Untereinheit der JAK2 besitzt physiologisch keine Kinase-Aktivität, sondern übt eine inhibitorische und somit regulatorische Wirkung auf die eigentliche Kinase-Region des Moleküls, die JH1-Domäne, aus<sup>61,62</sup>. Durch diese Punktmutation, so die aktuelle Theorie, geht diese autoinhibitorische Funktion der JH2-Domäne verloren, und es resultiert eine konstitutive Aktivität der JAK2 mit Aktivierung untergeordneter Signalkaskaden<sup>36,47</sup>. Diese konstitutiv aktive Kinase ist verantwortlich für die gesteigerte Empfindlichkeit der erythrozytären Vorläuferzellen gegenüber verschiedenen hämatopoietischen Wachstumsfaktoren, insbesondere dem Erythropoietin, was eine gesteigerte Proliferation der erythrozytären Progenitorzellen zur Folge hat<sup>36,47</sup>.

Die Tatsache, dass 23-57% der Patienten mit ET und 35-57% der Patienten mit IMF ebenfalls diese Mutation aufweisen, zeigt die ätiologische Verwandtschaft der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen untereinander<sup>36,47</sup>. Neben den Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung stellte sich gleichzeitig die Frage, wie die JAK2-Mutation alleine zu den phänotypisch unterschiedlichen Krankheitsbildern PV, ET oder IMF führen kann. Möglicherweise wird die Aktivität der JAK2 durch bisher unbekannte Faktoren moduliert, so dass die drei unterschiedlichen Krankheitsbilder Folge einer unterschiedlichen enzymatischen Aktivität sind. Denkbar ist auch, dass die JAK2-Mutation in unterschiedlichen Subpopulationen der hämatopoietischen Progenitorzellen auftritt und somit zu den phänotypisch unterschiedlichen Entitäten führt<sup>36,47</sup>.

Außerdem könnten bisher unbekannte genetische Veränderungen zu den verschiedenen V617F-JAK2-Mutation assoziierten chronisch- myeloproliferativen Erkrankungen beitragen. In diesem Zusammenhang sind genetische Aberrationen zu nennen, die den „JAK/STAT-

Pathway“ beeinflussen, wie zum Beispiel Gene für Phosphatasen, sog. „SOCS“-Proteine („suppressor of cytokine signalling“) oder „CIS“-Proteine („cytokine-inducible SH2-protein“) <sup>36,47,63</sup>. Diese Proteine schwächen physiologisch das durch JAK2-initiierte Signal ab<sup>63</sup>.

In einem weiteren Kapitel werde ich nun die bisherigen Erkenntnisse über die Ätiologie und Pathophysiologie der PV darlegen, die anhand von Genexpressionsanalysen gewonnen wurden.

Die „cDNA-Microarray-Technik“ ermöglicht eine simultane Expressionsanalyse einer Vielzahl von Genen auf dem Niveau der RNA. Dadurch können neue Kandidatengene identifiziert werden, die zur Aufklärung der molekularen Ursachen der PV beitragen, und neue Ansätze für die Diagnose und Therapie der PV liefern.

Goerttler et al. konnten anhand eines Genexpressionsprofils von reifen Granulozyten Patienten mit PV eindeutig von Patienten mit sekundärer Erythrozytose unterscheiden<sup>64</sup>. Dafür haben sie 64 Gene identifiziert, die eine Trennung zwischen diesen beiden Patientengruppen ermöglicht. Verglichen mit gesunden Kontrollpersonen wiesen Patienten mit PV 644 Gene mit unterschiedlicher Expression ( $\geq 1,5$ fach) auf. Interessanterweise zeigen Patienten mit PV eine 2,3- bis 40fach erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors NF-E2 in reifen peripheren Granulozyten. Die Überexpression dieses Transkriptionsfaktors, die in fetalen Leberzellen zur Ausreifung Erythropoietin-unabhängiger erythrozytärer Kolonien führt und hämatopoietische Vorläuferzellen in Richtung erythroider Ausreifung bringt, könnte nach Goerttler et al. bei PV für die gesteigerte Produktion von Erythrozyten und in manchen Fällen für die Thrombozytose verantwortlich sein<sup>64,65</sup>.

Eine zweite Arbeitsgruppe um Andrea Pellagati untersuchte ebenfalls mit Hilfe von cDNA-Array-Technik das Genexpressionsprofil von reifen Granulozyten bei Patienten mit PV im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und 2 Patienten mit ET<sup>66</sup>. Sie fanden 147 Gene, deren Expression sich mindestens um den Faktor 2,5 zwischen den Patienten mit PV und den gesunden Kontrollen unterscheidet. Eine Vielzahl dieser Gene fördert antiapoptotische Prozesse und damit das Überleben der Zellen<sup>66</sup>.

Ziel beider Arbeitsgruppen ist einerseits eine neue diagnostische Methode der PV von zu etablieren, und andererseits neue pathogenetisch relevante Genveränderungen zu entdecken. Bei diesen Untersuchungen gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass eine klonale Alteration einer hämatopoietischen Vorläuferzelle der pathogenetische Ausgangspunkt der Erkrankung

ist, was sich nicht unbedingt mit einem veränderten Expressionsmuster in Granulozyten decken muss.

## A.2. Ziele und Aufgabenstellung

Trotz mehr als hundert Jahren klinischer und experimenteller Forschung sind die Ätiologie und Pathogenese der PV nicht vollständig aufgeklärt, auch wenn in den letzten Jahren mit der Entdeckung der JAK2-Mutation eine wichtige Erkenntnis über die molekularen Grundlagen dieser Erkrankung gewonnen wurde.

Der pathogenetischer Ausgangspunkt der PV liegt in klonalen Veränderungen einer hämatopoietischen Progenitorzelle.

Da „cDNA-Arrays“ eine zeitgleiche Expressionsanalyse einer Vielzahl von Genen ermöglichen, wählten wir zur Untersuchung CD34+ hämatopoietischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit PV zunächst diese Technik, um ein Genexpressionsprofil dieser Zellen zu erstellen und dieses mit dem Expressionsprofil von CD34+ Zellen von gesunden Knochenmarkspendern zu vergleichen.

Ziel dieser Untersuchung war die Identifikation neuer Kandidatengene, um einerseits weitere Erkenntnisse über die molekularen Ursachen der PV zu gewinnen, andererseits neue Ansätze für die Diagnose und Therapie der PV zu liefern.

Hierbei identifizierten wir mit dem Retinoic Acid Receptor (RAR $\beta$ ) und dem Retinoic X Receptor (RXR $\beta$ ) zwei Retinsäurerezeptoren, die mit Blick auf die Pathophysiologie und einen möglichen Therapieansatz der PV interessant sein könnten.

Deshalb sollte im nächsten Schritt die differentielle Expression der Gene des Retinsäure-Signalweges mit Hilfe einer anderen, etablierten Methode bestätigt werden. Hierfür wählten wir eine quantitative „Real-Time“ RT-PCR.

Das Ziel der nächsten Experimente war die Untersuchung, ob all-trans Retinsäure (ATRA) als physiologischer Ligand der Retinsäurerezeptoren das Wachstumsverhalten hämatopoietischer Progenitorzellen von PV-Patienten in vitro beeinflusst. Aus diesem Grund führten wir einen Methylcellulose-Assay durch und inkubierten die hämatopoietische Vorläuferzellen von PV-Patienten mit ATRA.

## **B Material und Methoden**

### **B. 1. Zellen**

Alle Patienten mit PV und alle gesunden Kontrollpersonen, von denen wir für die Laboruntersuchungen Zellen gewonnen haben, wurden über das Entnahmeverfahren und den wissenschaftlichen Zweck der Untersuchungen informiert und haben danach schriftlich ihr Einverständnis gegeben. Bei der Betrachtung der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass die Patienten, die für die Genexpressionsanalysen untersucht wurden, nicht die Patienten repräsentieren, die in den PCR-Analysen und den Colony-forming Assays eingesetzt wurden. Das liegt unter anderem daran, dass nach der Durchführung der cDNA-Microarrays nicht mehr ausreichend RNA für die Bestätigungsexperimente mittels RT-PCR zur Verfügung standen. Eine erneute Knochenmarkpunktion zur Gewinnung von CD34+ Zellen erfolgte einerseits aufgrund der fehlenden klinischen Indikation nicht, andererseits wurde sie aus logistischer Schwierigkeiten nicht durchgeführt, da diese Patienten lediglich für eine Zweitmeinung in unserer Klinik vorgestellt worden waren.

Die Diagnose der 14 Patienten mit PV, deren Zellen untersucht wurden, stützte sich auf die Diagnosekriterien der American Society of Hematology (ASH 2005)<sup>23</sup>. Eine Übersicht über die Patientencharakteristika gibt Tabelle 1.

#### **Array**

Zur Erstellung eines Genexpressionsprofils durch cDNA-Microarrays wurden CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von vier zu diesem Zeitpunkt noch unbehandelten Patienten mit PV und von zehn gesunden Kontrollpersonen gewonnen.

#### **Real Time RT-PCR**

Für die Untersuchung von mRNA-Expression bei Patienten mit PV, wurden CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von sechs PV-Patienten gewonnen und mit sechs gesunden Kontrollpersonen verglichen.

Die Therapie bei diesen Patienten erfolgte zum Entnahme-Zeitpunkt durch Aderlässe, Interferon alpha, Anagrelide oder eine Kombination.

### **Colony-forming assays**

Bei der funktionellen Untersuchung der hämatopoietischen Vorläuferzellen von PV-Patienten mittels Methylcellulose-Assays wurden mononukleäre Zellen aus Aderlässen von fünf PV-Patienten eingesetzt. Zwei dieser Patienten wurden allein mit Aderlässen behandelt, drei dieser Patienten erhielten zusätzlich zu den Aderlässen Interferon alpha und zwei weitere Anagrelide in Kombination mit der Aderlass-Therapie.

## **B. 2. Dichtegradienten-Zentrifugation**

Das bei einer Knochenmarkspunktion gewonnene Aspirat enthält neben Knochenbröckeln ein heterogenes Gemisch von Zelltypen aller Stadien der Hämatopoese. Um aus diesem Gemisch CD34+ Stamm- und Progenitorzellen zu gewinnen, führten wir als ersten Schritt eine Dichtegradienten-Zentrifugation durch.

### **B. 2. 1. Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation**

Bei einer Dichtegradienten-Zentrifugation werden die verschiedenen zellulären Bestandteile des Knochenmarkes dichteabhängig aufgetrennt. Dazu wird das verdünnte Knochenmark auf ein Phasentrennmittel, hier Lymphoprep<sup>®</sup>-Medium, aufgeschichtet und anschließend zentrifugiert. Die Erythrozyten durchwandern die Lymphoprep<sup>®</sup>-Phase und befinden sich am Boden. Getrennt durch die Lymphoprep<sup>®</sup>-Phase erscheint oberhalb der Erythrozyten der sogenannte Interphase-Ring, der von den mononukleären Zellen gebildet wird. Oberhalb des Interphase-Rings lagern sich die Thrombozyten in einer Plasma-Schicht ab.

### **B. 2. 2. Dichtegradienten-Zentrifugation**

Zuerst wurden 15-20 ml mit Heparin oder Citrat antikoaguliertes Knochenmark-Aspirat von einer Spritze in ein Falcon<sup>®</sup>-Tube (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) überführt, mit 35 ml PBS-Puffer (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verdünnt und durch 1-minütiges kräftiges Vortexen gemischt. Als nächstes wurden jeweils 20ml Lymphoprep<sup>®</sup>-Medium (Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen) in zwei neue Falcon<sup>®</sup>-Tubes vorgelegt.

**Tabelle 2a: Patientencharakteristika entsprechend der ASH-Diagnosekriterien (2005)**

Nr.	Alter	Geschlecht	Hb (g/dl)	Hkt (%)	Leukozyten (/µl)	Thrombozyten (/µl)	Neutrophile Granulozyten (/µl)
Genexpressionsanalysen:							
1	58	m	18,1	54,4	15.400	732.000	12.335
2	52	m	17,6	59	7.200	325.000	5.900
3	72	m	22,1	69,4	12.300	246.000	8.899
4	67	m	21,6	72,6	11.600	172.000	9.396
RT-PCR:							
5	61	w	16,2	58,4	6.000	202.000	4.110
6	66	w	17,4	62,5	9.300	355.000	4.801
7	65	m	19,1	61	11.200	543.000	5.022
8	67	w	12,7	36,9	10.500	1.087.000	7.634
9	56	m	18,2	57	16.300	377.000	14.490
10	56	m	12,1	39,7	5.900	832.000	n. u.
Colony-forming assays:							
11	61	w	15,6	47,4	9.000	846.000	5.200
12	68	m	17,4	50,2	11.200	476.000	8.064
13	68	m	21,2	64,1	9.100	290.000	7.271
14	65	m	17,8	51,1	8.900	138.000	8.222
15	entspricht Patient Nr. 4						

**Tabelle 2b: Patientencharakteristika entsprechend der ASH-Diagnosekriterien (2005)**

Nr.	V617F-JAK2	BCR-ABL	Zytogenetik	Serum-Erythropoetin	arterielle O2-Sättigung (%)	Erythrozytenmasse	Splenomegalie
Genexpressionsanalysen:							
1	n. u.	negativ	n. u.	niedrig-normal	91	erhöht	nein
2	n. u.	n. u.	n. u.	niedrig-normal	96,3	n. u.	radiologisch
3	n. u.	n. u.	n. u.	niedrig-normal	98	normal	nein
4	n. u.	negativ	n. u.	vermindert	92	n. u.	radiologisch
RT-PCR:							
5	n. u.	n. u.	n. u.	niedrig-normal	n.u.	n.u.	palpabel
6	n. u.	n. u.	n. u.	n.u.	93	n.u.	palpabel
7	n. u.	n. u.	n. u.	n.u.	94	n.u.	nein
8	n. u.	n. u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	nein
9	positiv	negativ	Trisomie 9	n.u.	n.u.	n.u.	radiologisch
10	n. u.	n. u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	nein
Colony-forming assays:							
11	n. u.	n. u.	normal	vermindert	97	n.u.	palpabel
12	n. u.	negativ	n. u.	n.u.	96	n.u.	palpabel
13	n. u.	negativ	Monosomie 7	vermindert	95	erhöht	radiologisch
14	n. u.	n. u.	normal	niedrig-normal	94	n.u.	nein
15	entspricht Patient Nr. 4						



Auf dieses Medium wurden dann jeweils 25ml des verdünnten Knochenmark-Aspirats mit Hilfe einer mechanischen Pipettierhilfe (Brand GmbH und Co KG, Wertheim, Deutschland) vorsichtig aufgeschichtet, so dass eine Durchmischung zwischen den beiden Flüssigkeiten vermieden wurde. Anschließend wurde dieser Gradient bei 1600 rpm und 20<sup>o</sup> C 30 Minuten zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugationsschritt kommt es zu der oben beschriebenen dichteabhängigen Verteilung der unterschiedlichen Zellpopulationen.

Der Interphase-Ring wurde nun mit einer mechanischen Pipettierhilfe in ein neues Falcon<sup>®</sup>-Tube überführt, mit 35ml PBS-Puffer aufgefüllt und 10 Minuten bei 1600 rpm und 20<sup>o</sup> C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Zellen erneut in PBS-Puffer aufgenommen und abzentrifugiert. Zuletzt wurde das Zell-Pellet in einem definierten Volumen resuspendiert, und die Anzahl der mononukleären Zellen durch einen Zellzähl-Automaten (Beckman-Coulter) bestimmt.

### **B. 3. Immunmagnetische Zellisolation**

Der Anteil der CD34+ Zellen an den mononukleären Zellen des Knochenmarks entspricht circa 0,5-3%<sup>67</sup>. Um die Fraktion der CD34+ Zellen spezifisch zu selektieren, führten wir eine immunmagnetische Zellisolation durch.

#### **B. 3. 1. Prinzip der immunmagnetischen Zellisolation**

Die immunmagnetische Zellisolation basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion und anschließender Säulenchromatographie und ermöglicht die selektive Separation einer Subpopulation von Zellen. Der Antikörper, der spezifisch gegen ein Epitop der Subpopulation gerichtet ist, ist an seinem Fc-Teil mit einem kolloidalen, magnetisierten „Microbead“ gekoppelt. Dieser magnetisch markierte Antikörper bindet spezifisch an das Epitop der Zielzelle. Um eine unspezifische Bindung beziehungsweise eine Bindung an den

Fc-Teil des Antikörpers zu verhindern, wird ein zweiter Antikörper (humaner IgG-Antikörper, FcR Blocking Reagent<sup>®</sup>) hinzugefügt. Bei der anschließenden Säulenchromatographie durchlaufen die Zellen ein magnetisches Feld, das die Antikörpermarkierten und somit magnetisierten Zellen in der Säule zurückhält. Die Zellen, die nicht durch den Antikörper magnetisch markiert wurden, durchlaufen hingegen die Säule. Nach Entfernen des magnetischen Feldes können anschließend die Antikörpermarkierten Zellen aus der Säule eluiert werden.

### **B. 3. 2. „Magnetic Labeling“**

Um die hämatopoietischen Stamm- und Progenitor-Zellen aus den mononukleären Zellen immunmagnetisch zu isolieren, wurden diese mit einem „Microbead“-gekoppelten Antikörper markiert, der spezifisch an das CD34-Epitop bindet, da das CD34-Antigen ein anerkannter Marker für hämatopoietische Stamm- und Progenitor-Zellen ist<sup>67</sup>.

Folgende Antikörper, die von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) geliefert wurden, wurden verwendet:

MACS CD34 MicroBeads	isotype: mouse IgG1, clone: QBEND/10
FcR Blocking Reagent	human IgG

Zunächst wurden die mononukleären Zellen kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen MACS-Puffer aufgenommen. (300µl MACS-Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen). Der MACS-Puffer wurde aus 450 ml PBS-Puffer, 50 ml Humanalbumin ( Humanalbin<sup>®</sup>, Aventis Behring GmbH, Marburg, Deutschland) und 372 mg EDTA ( entspricht 2 mM) hergestellt. Als nächster Schritt wurden FcR-Blocking Reagent (100µl pro  $1 \times 10^8$  Zellen) und CD34-Microbeads (100µl pro  $1 \times 10^8$  Zellen) entsprechend der Zellzahl hinzupipettiert und der Ansatz bei 4° C 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz mit 10 ml MACS-Puffer aufgefüllt, 5 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert und das Zell-Pellet nach Verwerfen des Überstandes mit 3 - 10 ml MACS-Puffer resuspendiert. Unmittelbar danach erfolgte die Säulenchromatographie.

### **B. 3. 3 Säulenchromatographie**

Zuerst wurden die Trennsäulen in den Magneten eingespannt. Trennsäulen und Magneten wurden von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) geliefert. Anschließend wurden die Säulen mit 3 ml MACS-Puffer angefeuchtet. Nach dem „Anfeuchten“ der Säule wurde die Zellsuspension auf die Trennsäule aufgetragen. Nachdem die Zellsuspension die Trennsäule durchlaufen hatte, wurde die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Als nächster Schritt wurde die Trennsäule aus dem Magneten herausgenommen und mit 3 ml MACS-Puffer in ein neues Falcon<sup>®</sup>-Tube eluiert.

Um die Spezifität dieses Anreicherungsverfahrens zu erhöhen, wurde die Säulenchromatographie anschließend mit einer neuen Trennsäule wiederholt.

Danach wurden die eluierten Zellen kurz abzentrifugiert, in einem definierten Volumen MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzähl-Automaten (Becton Dickinson) bestimmt.

Anschließend wurde die Zellsuspension kurz abzentrifugiert und nach Abkippen des Überstandes in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen RLT-Puffer (Qiagen, Hilden Deutschland) resuspendiert (600 µl pro  $1 \times 10^6$  Zellen). Der RLT-Puffer war zuvor mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (10 µl pro 1000 µl RLT-Puffer) versetzt worden. Nach Transfer in ein neues Eppendorf-Gefäß wurden die Zellen bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-20^\circ \text{C}$  eingefroren.

### **B. 4. Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie (FACS)**

Bei der immunmagnetischen Zellisolation kann es zu unspezifischen Bindungen der Microbead-gekoppelten Antikörper kommen, so dass auch Zellen isoliert werden, die nicht das spezifische Epitop, in diesem Fall das CD34-Antigen, auf ihrer Oberfläche besitzen. Um eine Aussage über die Spezifität des Anreicherungsverfahrens zu erhalten, wurden eine Immunfluoreszenzfärbung und eine Durchflusszytometrie durchgeführt.

Hierzu wurden als erstes  $1 \times 10^5$  immunmagnetisch-angereicherte Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 2 Minuten bei 2400 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zell-Pellet in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert und danach auf 2 FACS-Röhrchen verteilt (je 50 µl). Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten lang bei 4° C mit je 10 µl Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- konjugierten CD34 monoklonalen Antikörper (Clone 8G12, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) oder dem Isotyp-identischen Kontrollantikörper (mouse IgG<sub>1</sub> FITC-conjugated, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Proben mit je 1000 µl PBS aufgefüllt, 5 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 500 µl PBS resuspendiert.

Die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse wurde mit einem Becton Dickinson FACScan mit einem 2-W Argon-Laser durchgeführt. Zur Fluoreszenzmessung wurde für FITC ein 530/15 nm – Filter benutzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der CELL QUEST Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), nachdem auf lebendige Zellen „gated“ worden war. Die Reinheit der immunmagnetisch angereicherten CD34+ Zellen betrug zwischen 98 und 99,8 %.

## **B. 5. Genexpressionsanalysen mit Hilfe von cDNA-Arrays**

### **B. 5. 1. Prinzip der cDNA-Arrays**

Genexpressionsanalysen mit RT-PCR, Rnase Protection Assay und Northern Blot lassen nur die Untersuchung weniger Gene zum gleichen Zeitpunkt zu. Die „cDNA-Array-Technik“ hingegen ermöglicht die simultane Expressionsanalyse einer Vielzahl von Genen auf dem Niveau der RNA.

cDNA-Arrays bestehen aus Nylonmembranen, auf deren Oberfläche viele unterschiedliche cDNA-Sequenzen mit einer Länge von 200 bis 600 Basenpaaren „gespottet“ sind. Die Zusammenstellung der Gene kommerziell erwerbbarer cDNA-Arrays entspricht entweder einer Auswahl wichtiger funktioneller Gengruppen, wie zum Beispiel Zellzyklus-Genen, oder kann den Anforderungen des Untersuchers entsprechend entworfen werden.

Bei der Durchführung des Experimentes wird zunächst die mRNA aus den Zellen isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkription zu cDNA konvertiert. Als Substrat für die entstehende cDNA werden radioaktiv markierte Triphosphate verwendet, die in die wachsenden cDNA-Stränge eingebaut werden. Bei der anschließenden Hybridisierung binden die radioaktiv markierten cDNA-Moleküle nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die korrespondierenden Sequenzen auf den Array, so dass ein entsprechendes Hybridisierungsmuster auf dem Array entsteht, das aufgrund der emittierten Strahlung auf Röntgenfilmen darstellbar wird. Anschließend erfolgt mit Hilfe von spezifischen Software-Programmen eine quantitative Auswertung der Daten, die einen Vergleich zu einer Referenzgruppe ermöglicht.

Initial wurde die RNA der immunmagnetisch-isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen extrahiert und anschließend für die Array-Experimente eingesetzt.

Für die Array-Experimente wurde das Atlas™ Human Array Trial Kit der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg, Germany) verwendet.

### **B. 5. 2. RNA-Extraktion**

Nach der immunmagnetischen Zellisolation wurde die zelluläre RNA mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert.

Hierzu wurden initial  $1,5 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^6$  immunmagnetisch angereicherte Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und kurz abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 600 µl RLT-Puffer (im Kit enthalten) resuspendiert und durch 1-minütiges „Vortexen“ lysiert. Der RLT-Puffer war zuvor mit 10 µl/ml β- Mercaptoethanol versetzt worden. Als nächstes wurde dem Ansatz das gleiche Volumen Ethanol 70% hinzugefügt, der Ansatz gut durchmischt und dann auf eine RNeasy-Zentrifugationssäule aufgetragen. Anschließend wurde der Ansatz eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die RNeasy-Zentrifugationssäule in ein Collection Tube eingesetzt. Dann wurden 650 µl RW1 Waschpuffer auf die Säule gegeben und die Säule eine Minute lang bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 500 µl RPE Waschpuffer auf die Säule pipettiert und erneut eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die

Säule in ein neues Collection Tube überführt und nach nochmaliger Zugabe von 500 µl RPE Waschpuffer 2 Minuten lang bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule vorsichtig aus dem Collection Tube entnommen und die RNA mit 30 µl sterilem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm eluiert. Nachfolgend wurden RNA-Gehalt und –Reinheit des Eluats photometrisch bestimmt. Zuletzt wurde das Eluat kurz abzentrifugiert, und die RNA nach Verwerfen des Überstandes in 2 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Unmittelbar danach wurde die reverse Transkription durchgeführt.

### **B. 5. 3. Reverse Transkription**

Für die Konvertierung der mRNA zu radioaktiv markierter cDNA wurde der Gen-spezifische CDS-Primer-Mix der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg, Germany) verwendet, da dieser im Gegensatz zu zufällig ausgewählten Primern sicherstellt, dass nur cDNA-Moleküle solcher Gene synthetisiert werden, die sich auf dem jeweiligen Array befinden.

Als Substrat für das „Radioactive Labeling“ diente  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-Desoxyadenosintriphosphat (dATP), das von der Firma Amersham geliefert wurde.

Es wurden RNA-Mengen zwischen 1,2 µg und 4 µg revers transkribiert.

Zuerst wurde ein Mastermix hergestellt, der folgende Reagenzien enthielt: 3,5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (35µCi, 1,295 Bq), 2 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl 10X dNTP Mix und 0,5 µl DTT. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein Array-Experiment und wurden entsprechend der Anzahl der durchgeführten Array-Experimente angepasst. Der Mastermix wurde bei Raumtemperatur gelagert. Als nächstes wurden jeweils 1,5 µl RNA und 1,5µl CDS Primer Mix in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, kurz zentrifugiert und dann erst 4,5 Minuten lang bei 70° C und anschließend 3 Minuten lang bei 50° C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationsphase wurden jeweils 8 µl des Mastermixes, der zuvor mit je 1 µl/Reaktion MMLV Reverse Transcriptase versetzt worden war, zu jeder Probe hinzupipettiert und 25 Minuten bei 50° C im Wasserbad inkubiert. Nach 25 Minuten wurde jeder Probe 1µl des 10X Termination Mix hinzugefügt, um die reverse Transkription zu beenden. Anschließend erfolgte die Säulenchromatographie.

#### **B. 5. 4. Säulenchromatographie**

Zur Aufreinigung der radioaktiv markierten cDNA wurde als nächster Schritt eine Säulenchromatographie durchgeführt, um <sup>32</sup>P-markierte Nukleotide zu entfernen, die nicht in die cDNA-Stränge inkorporiert wurden.

Dazu wurden die cDNA-Proben initial mit jeweils 190 µl NT2-Puffer verdünnt und anschließend auf NucleoSpin Extraktionssäulen aufgetragen, die zuvor in 2 ml- Collection Tubes eingesetzt worden waren. Die Proben wurden 1 Minute lang bei 14000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Danach wurden die Extraktionssäulen jeweils in neue 2 ml- Collection Tubes transferiert und nach Auftragen von jeweils 400 µl NT3-Puffer auf jede Extraktionssäule 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde dieser Waschschrift zweimal wiederholt. Zur Elution der gereinigten cDNA wurden anschließend je 100 µl NE-Puffer auf die Extraktionssäulen aufgetragen, die zuvor in 1,5 ml- Microcentrifuge Tubes transferiert worden waren. Nach einer Einwirkzeit von 1 Minute wurden die Proben 60 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert und die Extraktionssäulen anschließend verworfen. Zuletzt wurde die Radioaktivität der cDNA-

Proben mit Hilfe eines Beckmann LS 9000 gemessen. Die erste Peak-Fraktion, die 0,5 – 10 x 10<sup>6</sup> cpm enthielt, wurde für die direkt anschließende Hybridisierung verwendet.

#### **B. 5. 5. Hybridisierung**

Als Hybridisierung wird ein Vorgang bezeichnet, bei dem ein Array der radioaktiv markierten cDNA exponiert wird. Die radioaktiv markierte cDNA kann gemäß dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die entsprechende cDNA auf dem Microarray binden.

Hierzu wurden die Microarrays zuerst mit 0,5 mg „Salmon Sperm DNA“ prähybridisiert, um das sogenannte „Background Binding“ zu verringern. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der Arrays mit der cDNA.

Zunächst wurde eine sogenannte Prähybridisierungslösung hergestellt. Dazu wurden 50 µl „Salmon Sperm DNA“ – Lösung (entsprechen 0,5 mg) 5 Minuten auf 95° C–100° C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach diesem Denaturierungsprozess wurde die

„Salmon Sperm DNA“ – Lösung (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany) mit 5 ml ExpressHyb™ Hybridization Solution, die zuvor auf 68° C erwärmt worden war, vermischt und bei 68° C aufbewahrt. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein Array-Experiment und wurden entsprechend der Anzahl der Versuche berechnet.

Als nächstes wurden die einzelnen Arrays mit je 10 ml destilliertem Wasser angefeuchtet und in Hybridisierungsflaschen eingelegt, so dass sie vollständig an der Innenwand anlagen und die DNA-Spots zum Flaschenlumen ausgerichtet waren. Im Anschluss daran wurden in jede Hybridisierungsflasche 5 ml der oben beschriebenen Prähybridisierungslösung hinzupipettiert.

Die so vorbereiteten Arrays wurden in einem Hybridisierungssofen (ThermoHybaid, Heidelberg, Deutschland) 30 Minuten bei 68° C unter kontinuierlicher Rotation (6 rpm) inkubiert.

Während dieser Prähybridisierung wurden die cDNA-Proben vorbereitet. Als erstes wurden je 100 µl der cDNA-Proben mit je 11 µl 10x „Denaturing Solution“ (0,1 M NaOH) in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und 20 Minuten bei 68° C inkubiert, um die cDNA-Proben zu denaturieren. Danach wurden je 115 µl 2X „Neutralizing Solution“ (0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und je 5 µl C0t-1 DNA (Qiagen, Hilden Deutschland) hinzugefügt und die Proben erneut 10 Minuten bei 68° C inkubiert. Insgesamt ergibt sich so ein Endvolumen von 231 µl für jede cDNA-Probe. Die hinzugefügte C0t-1 DNA vermindert unspezifische Bindungen der cDNA-Fragmente an die Arrays.

Nach Beendigung der Prähybridisierung wurden die Hybridisierungsflaschen und die darin befindlichen Microarrays aus dem Hybridisierungssofen entnommen und senkrecht aufgestellt. In jede Hybridisierungsflasche wurde dann das vollständige Volumen je einer cDNA-Probe pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken mit der in der Flasche befindlichen Prähybridisierungslösung vermischt. Anschließend wurden die Flaschen erneut in den Hybridisierungssofen gestellt und 20 Stunden bei 68° C und kontinuierlicher Rotation (6 rpm) inkubiert. Die kontinuierliche Rotation bewirkt einen konstanten, gleichmäßigen Kontakt der cDNA-Probe mit der Array-Membran.



Nach Beendigung der Hybridisierungsphase wurden mehrere Waschschriffe durchgeführt. Hierfür wurden zwei verschiedene Waschlösungen mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Waschlösung 1: 2X SSC, 1% SDS

Waschlösung 2: 0,1X SSC, 0,5% SDS

Zuerst wurden die Hybridisierungsflaschen aus dem Hybridisierungsöfen entnommen und die Hybridisierungslösung vorsichtig entfernt. Die Array-Membranen wurden an der Flaschenwand anliegend in den Hybridisierungsflaschen belassen. Anschließend wurden die Hybridisierungsflaschen mit 68° C warmer Waschlösung zu 4/5 des Flaschenvolumens gefüllt und 30 Minuten bei 68° C unter konstanter Rotation (12-15 rpm) im Hybridisierungsöfen inkubiert. Danach wurde die Waschlösung verworfen und dieser Waschschriff dreimal wiederholt.

Nach einem weiteren Waschschriff, der nach dem gleichen Schema mit Waschlösung 2 durchgeführt wurde, erfolgte abschließend ein Waschschriff mit 2X SSC-Lösung.

Hierzu wurden die Array-Membranen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette von den Hybridisierungsflaschen in ein Plastik-Gefäß überführt, das mit 2X SSC-Lösung gefüllt war.

In dieser Lösung wurden die Array-Membranen 10 Minuten lang bei Raumtemperatur unter Schütteln gewaschen. Unmittelbar danach wurden die Membranen in sterilen Plastikfolien eingeschweißt und PhosphorImager Filmen (FujiFilm, Düsseldorf, Deutschland) ausgesetzt.

#### **B. 5. 6. Quantifizierung, Normalisierung und Statistische Analysen**

Die Expositionszeit der Membranen ist abhängig von der Aktivität der jeweiligen Probe und betrug bei unseren Experimenten zwischen 24 bis 96 Stunden.

Nach dieser Expositionszeit wurden die PhosphorImager-Filme mit einem PhosphorImager (Fuji FLA-3000; FujiFilm) unter Benutzung der BAS-Reader 3.01 Software (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) „gescanned“. Die Intensität der Signale jedes „Gen-Spots“ auf den Arrays wurde mit Hilfe der TINA-Software 2.09 g (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) gemessen und anschließend durch die ArrayVision Software (Interfocus, Suffolk, Großbritannien) bestätigt.

Nach Subtraktion der Hintergrund-Signale erfolgte die Normalisierung der Messdaten, indem zuerst die mittlere Signal-Intensität aus den 20% am stärksten exprimierten Genen eines Experiments berechnet wurde. Diese mittlere Signal-Intensität wurde in Bezug zu jedem Einzelsignal gesetzt und als Ratio (Intensität des Einzelsignals/mittlere Signal-Intensität) für jedes Gen wiedergegeben. Um die Proben der vier PV-Patienten mit den Proben der zehn gesunden Kontrollpersonen zu vergleichen, wurde für jedes Gen der Mittelwert der PV-Patientengruppe und analog dazu für die Kontrollpersonengruppe berechnet. Anschließend wurde für jedes Gen der Mittelwert der PV-Patientengruppe durch den Mittelwert der Kontrollpersonengruppe dividiert und das Ergebnis als Ratio (PV-Patientengruppe/Kontrollpersonengruppe) dargestellt. Dabei bedeuten Werte größer 1 eine höhere Expression des Gens bei PV-Patienten, wohingegen Werte kleiner 1 eine höhere Expression des Gens in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen widerspiegeln. Um zu ermitteln, ob diese Unterschiede in der Genexpression statistisch signifikant sind, wurde der Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Es wurden nur p-Werte  $< 0,01$  als statistisch signifikant zugelassen.

## **B. 6. Quantitative “Real-Time” RT-PCR**

### **B. 6. 1. RNA-Extraktion**

Zur Evaluierung der Expression von RAR  $\beta$  und RXR  $\beta$  auf mRNA-Niveau führten wir eine quantitative „real-time“ RT-PCR durch. Hierzu wird in einem ersten Schritt die zelluläre RNA extrahiert und in cDNA revers transkribiert. Anschließend erfolgt die Durchführung der PCR.

Für diese Experimente wurde die zelluläre RNA der CD34<sup>+</sup> Zellen nach der immunmagnetischen Anreicherung mit Hilfe des „Absolutely RNA<sup>®</sup> Microprep Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) extrahiert. Vorteil dieses RNA-Extraktions-Kits im Gegensatz zu dem weiter oben erwähnten Kit ist eine integrierte DNase-Verdauung, die eine DNA-Kontamination vermeidet.

Als erstes wurden  $5 \times 10^5$  Zellen kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 100  $\mu$ l Lyse-Puffer (im Kit enthalten), der zuvor mit 0,7  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt

worden war, aufgenommen und durch 1-minütiges kräftiges „Vortexen“ lysiert. Danach wurden 100 µl Ethanol 70% hinzugefügt und gut gemischt. Dieses homogene Gemisch wurde anschließend auf eine Zentrifugationssäule aufgetragen, bei 13000 rpm 60 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um eine DNA - Kontamination der Probe zu vermeiden, wurde als nächster Schritt eine DNase –Verdauung durchgeführt. Dazu wurden 600 µl „Low Salt Wash“ Puffer auf die Zentrifugationssäule aufgetragen und bei 13000 rpm 60 Sekunden zentrifugiert. Nach Abkippen des Durchflusses wurde die Zentrifugationssäule erneut 120 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert, um sämtliche Flüssigkeitsrückstände aus der Zentrifugationssäule zu entfernen. Anschließend wurden 30 µl DNase –Lösung, die aus 5 µl RNase freier DNase I und 25 µl „DNase Digestion“ Puffer hergestellt wurde, auf die Zentrifugationssäule aufgetragen und bei 37° C 15 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 500 µl „High Salt Wash“ Puffer auf die Zentrifugationssäule pipettiert, 60 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In zwei weiteren Waschschrritten wurden 600 µl beziehungsweise 300 µl „Low Salt Wash“ Puffer auf die Zentrifugationssäule aufgetragen und jeweils 60 Sekunden bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen und die Zentrifugationssäule in ein Sammelröhrchen transferiert. Um die RNA aus der Zentrifugationssäule zu eluieren, wurde die Probe mit 30 µl „Elution“ Puffer 2 Minuten lang inkubiert und danach 60 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Verbesserung der Ausbeute bei der RNA-Extraktion wurde dieser Elutionsschritt anschließend mit 20 µl Elutions-Puffer wiederholt. Die Menge und Reinheit der so extrahierten RNA wurden photometrisch bestimmt und die reverse Transkription unmittelbar angeschlossen.

### **B. 6. 2. Reverse Transkription**

Um die RNA zu cDNA umzuschreiben, wurde zunächst der so genannte cDNA-Mix bestehend aus folgenden Komponenten hergestellt: 10,5 µl 5xGibco-M-MLV-Puffer, 0,53 µl Gibco-DTT (0,1M), 2,1 µl 4xdNTPs (je 25 mM), 1,1 µl pdN<sub>6</sub>-Lösung [539 µl H<sub>2</sub>O, 21 µl KCL (0,5 M) 50 U pdN<sub>6</sub>] und 10,3 µl RNase freies H<sub>2</sub>O. Aus diesem Mix mit einem Endvolumen von 24,53 µl wurden 19 µl entnommen und unmittelbar vor der reversen Transkription mit 1,33 µl M-MLV-RT (Gibco, 200 u/µl) und 0,67 µl RNasin (Gibco, 40 u/µl)

versetzt. Die Angaben beziehen sich auf eine Einzelprobe, für die Versuche wurde ein Mastermix entsprechend der Anzahl der Proben synthetisiert.

Anschließend wurden 19 µl RNA-Eluat mit 21 µl cDNA-Mix mit M-MLV-RT und RNasin gemischt und zuerst 2 Stunden bei 37<sup>o</sup> C und danach 10 Minuten bei 65<sup>o</sup> C inkubiert. Die reverse Transkription wurde auf dem „Mastercycler personal“ der Firma Eppendorf (Köln, Deutschland) durchgeführt.

### **B. 6. 3. Prinzip der “Real-Time” RT-PCR**

Um die Detektion und Quantifizierung der mRNA-Expressionsstärke von RAR β und RXR β zu ermöglichen, wurde eine RT-PCR mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System Instrument (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dieses Hybridisierungsformat wurde für die DNA-Detektion und –Quantifizierung entwickelt und erlaubt eine maximale Spezifikation der PCR-Produkte.

Grundprinzip dieses Verfahrens ist eine speziell für das erwünschte PCR-Produkt hergestellte TaqMan-Sonde. Diese TaqMan-Sonde (Taqman MGB probe) ist an ihrem 3' Ende mit einem „NonFluorescent Quencher“ und an ihrem 5' Ende mit einem „reporter dye“ (6-Carboxy-Fluoreszein) markiert. In diesem Zustand bewirkt der geringe Abstand zwischen „NonFluorescent Quencher“ und „reporter dye“ die Auslöschung des durch 6-Carboxy-Fluoreszein emittierten Lichts. Dieser Vorgang wird als „Förster-type energy transfer“ bezeichnet<sup>67</sup>. Die Sequenz der Sonde ist so gewählt, dass sie an die amplifizierten cDNA-Fragmente binden kann. In jeder „Annealing-Phase“ bindet die Sonde an die komplementäre Basensequenz der entstehenden PCR-Produkte. Bindet nun die Taqman-Sonde an das wachsende PCR-Produkt, spaltet die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase aufgrund ihrer 5' Exonuklease-Funktion den „reporter dye“ vom NonFluorescent Quencher während der Extensionsphase ab. Der „reporter dye“ emittiert daraufhin ein grünes Licht der Wellenlänge 530 nm, welches über den Messkanal des ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System Instrument gemessen wird. In jeder Annealing/Extension-Phase spaltet die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase den „reporter dye“ ab, wenn die Sonde an die neu entstandenen cDNA-Stränge hybridisiert hat. Dadurch vergrößert sich die Menge des emittierten Lichtes

proportional zur Menge an PCR-Produkten mit zunehmender Zykluszahl. Es wird der PCR-Zyklus bestimmt, an dem die Fluoreszenz ein zuvor festgelegtes Niveau erreicht. Dieser Zyklus wird „cycle of threshold“ ( $C_T$ ) genannt. Der  $C_T$ -Wert dient als Maß für die im Ausgangsmaterial enthaltene Menge an der gewünschten Zielsequenz der PCR. Um die Menge einer Zielsequenz in verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können, erfolgt eine Normalisierung über ein Referenzgen. Bei der quantitativen RT-PCR dienen Housekeeping-Gene wie zum Beispiel Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgene. Die Normalisierung erfolgt über die Differenz der  $C_T$ -Werte für Zielgen und Referenzgen ( $\Delta C_T$ ) für eine Probe.

### **B. VI. 3. Quantitative “Real-Time” RT-PCR mittels TaqMan<sup>®</sup>-Sonde**

Die RNA-Extraktion und die Reverse Transkription (RT) wurden wie unter B. 2. 1. und B. 2. 2. beschrieben durchgeführt.

„Assay-on-Demand Gene Expression Products“ sind kommerziell erwerbbar, von der Firma Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH (Darmstadt, Deutschland) etablierte und synthetisierte Primerpaare kombiniert mit der jeweilig passenden TaqMan<sup>®</sup>-Sonde.

Die Sequenz der Primer und die Länge des zu erwartenden PCR-Produkts werden von der Firma nicht bekanntgegeben.

Für die Durchführung der quantitativen “Real-Time” RT-PCR wurden folgende „Assay-on-Demand Gene Expression Products“ eingesetzt:

“Assay-on-Demand Gene Expression Products”:

Retinoic acid receptor beta (Hs00233407\_m1, Applied Biosystems)

Retinoic X receptor beta (Hs00232774\_1, Applied Biosystems)

GAPDH (Hs99999905\_m1, Applied Biosystems)

Es wurde das „TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG“ Kit (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Die PCR wurde in einer AbiPrism<sup>®</sup> 96-Well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 12,5 µl TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG(2x)<sup>2</sup> und 1,25 µl 20x Assay-on-Demand Gene Expression Product als Mastermix (13,75 µl pro Ansatz) angesetzt und einzeln mit jeweils 11,25 µl cDNA (20ng total RNA revers transkribiert zu cDNA) auf 25 µl aufgefüllt. Die 96-Well-Platte wurde mit einem „AbiPrism<sup>®</sup> Optical Adhesive Cover“ (Applied Biosystems) verschlossen und bei 1500 rpm 10 Sekunden zentrifugiert. Die quantitative „Real-Time“ RT-PCR wurde auf dem ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT „Sequence Detection System Instrument“ (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Nach einer Vor-Inkubationszeit von 10 Minuten bei 95° C folgten 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden Denaturierung und 1 Minute Primer-Annealing/Kettenverlängerung bei 60° C. Der Verlauf der Fluoreszenzstärke wurde von der AbiPrism<sup>®</sup>-Software (Applied Biosystems<sup>®</sup>) während der PCR-Zyklen kontinuierlich detektiert. Anhand der gemessenen Fluoreszenzstärke in den einzelnen Amplifikationszyklen ermittelt die Software die C<sub>T</sub>-Werte der Proben. Hierfür legten wir den sog. „FAM threshold“ auf 0,1 fest.

## **B.7. Klonogener Wachstumstest (“Colony-forming assays”)**

### **B. 7. 1. Prinzip der “Colony-forming assays”**

„Colony-forming assays“ stellen eine etablierte Methode zur funktionellen Untersuchung hämatopoietischer Progenitorzellen dar<sup>68</sup>. Sie ermöglichen eine Aussage über die erythroide und myelomonozytäre Differenzierungskapazität von Vorläuferzellen. In diesem Experiment benutzten wir ein methylcellulosehaltiges Medium, das aufgrund seiner Zytokin- und Wachstumsfaktor-Zusammensetzung selektiv das Wachstum von CD34+ hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen erlaubt.

### **B. 7. 2. „Colony-forming assays“**

Um mögliche Wirkungen von ATRA auf das Koloniebildungsverhalten von CD34+ Zellen von PV-Patienten zu untersuchen, führten wir einen „Colony-forming assay“ durch.

Dazu wurde folgender Ansatz gewählt:

- |                        |                              |
|------------------------|------------------------------|
| 1.) Kontrolle          | keine Zusätze                |
| 2.) Kontrolle mit DMSO | DMSO                         |
| 3.) ATRA               | $10^{-6}$ M Endkonzentration |
| 4.) ATRA               | $10^{-5}$ M Endkonzentration |

Zur Herstellung einer  $10^{-2}$  M ATRA-Stammlösung wurden 50  $\mu$ l ATRA in 16,64 ml DMSO gelöst. Diese Stammlösung wurde anschließend im Verhältnis 1:10 mit DMSO zu einer  $10^{-3}$  M Stammlösung verdünnt. Um mögliche Einflüsse des DMSO auf das Wachstum und die Differenzierungskapazität der hämatopoietischen Progenitorzellen zu untersuchen, wurde einer Kontrolle das entsprechende Volumen reines DMSO hinzugefügt.

In Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Zellmenge wurden die Versuche mit  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kulturschale durchgeführt. Jeder Versuch erfolgte als Doppelansatz.

Mononukleäre Zellen wurden aus Aderlässen von PV-Patienten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 2400 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in 2000  $\mu$ l RPMI 1640-Medium (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) resuspendiert. Zusätzlich enthielt das RPMI 1640-Medium 1% Penicillin, 1% Streptomycin, 1% L-Glutamin und 10% FCS. Als nächstes wurden je 2500  $\mu$ l eines semisoliden, Methylcellulose-haltigen Mediums in 4 Cryotubes vorgelegt. Als Medium diente MethoCult<sup>®</sup> SF H4436 (StemCell Technology, Vancouver, Canada) mit folgender Zusammensetzung: Methylcellulose in Iscove's MDM, Bovine Serum Albumin, rekombinantes humanes Insulin, humanes Transferrin (Eisen-gesättigt), 2-Mercaptoethanol, L-Glutamin, rh Stem Cell Factor, rh GM-CSF, rh IL-3, rh IL-6, rh G-CSF, rh Erythropoietin. In jedes der Cryotubes mit je 2500  $\mu$ l Medium wurden danach je 500  $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert, so dass ein Endvolumen von 3000  $\mu$ l in jedem Cryotube entstand. Durch 1-minütiges „kräftiges Vortexen“ wurden die Zellen homogen im Medium verteilt. Als nächstes wurde in jedes Cryotube entsprechend des oben beschriebenen Ansatzes das jeweilige Volumen der Stammlösung hinzupipettiert und durch „kräftiges Vortexen“ im Medium verteilt. Anschließend wurden aus jedem Cryotube zweimal je 1000  $\mu$ l Zellsuspension mit einer 1000  $\mu$ l Insulinspritze (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) entnommen und in

zwei kleine Petrischalen (Corning Inc., Corning, USA) überführt. Durch leichtes Schwenken wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf dem Boden der Petrischalen verteilt. Die beiden Petrischalen der vier Ansätze wurden jeweils in eine große Petrischale (Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) gestellt. Zuletzt wurde in jede große Petrischale eine weitere kleine Petrischale gestellt, die 1000µl steriles Wasser enthielt. Anschließend wurden die Zellkulturen bei 37<sup>0</sup> C und 4,7% CO<sub>2</sub> 14 Tage inkubiert.

### **B. 7. 3. Auswertung der „Colony-forming assays“**

Die Auswertung der Colony-forming assays erfolgte nach der 14-tägigen Inkubationszeit mit Hilfe eines Auflichtmikroskops (Leitz Diavert<sup>®</sup>) bei 100-facher Vergrößerung.

Es wurden Burst-forming-Units-Erythrocytes (BFU-E) und Colony-forming Units-Granulocyte/Monocyte (CFU-GM) anhand morphologischer Kriterien unterschieden.

### **B. 7. 4. Statistische Analysen**

Anhand der erhaltenen Koloniezahlen für BFU-E und CFU-GM in den einzelnen Ansätzen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet (Microsoft Excel<sup>XP</sup>). Es wurden jeweils Zellen von PV-Patienten mit Zellen von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Ein p-Wert < 0,05 ( Student-T-Test) wurde als statistisch signifikant gewertet.



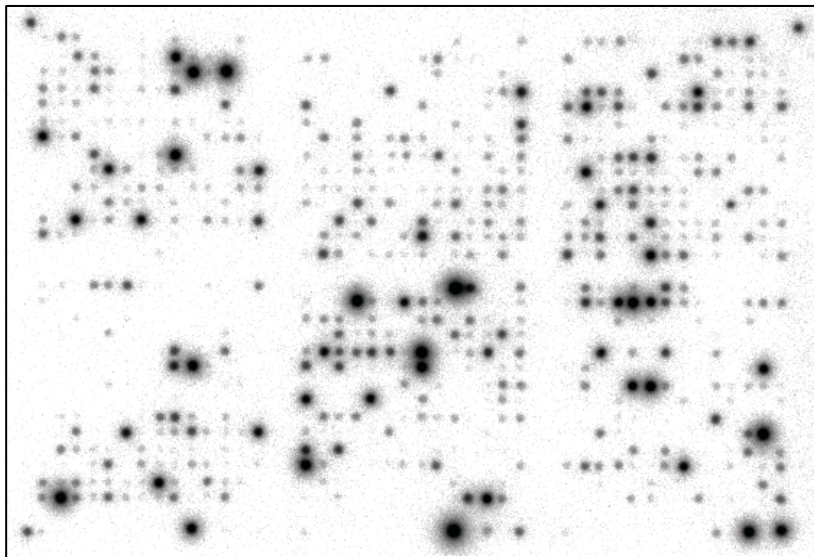
## C Ergebnisse

### C. 1. Genexpressionsprofile von PV-CD34+ Zellen

Um mögliche molekulare Ursachen für die gesteigerte Proliferation hämatopoietischer Progenitorzellen bei PV zu identifizieren, untersuchten wir die Genexpression von immunmagnetisch angereicherten CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von vier unbehandelten Patienten mit PV mittels der cDNA-Array-Technik. Als Vergleich diente die Genexpression in CD34+ Zellen von zehn gesunden Knochenmarkspendern.

Hierfür benutzten wir Clontech Atlas™ cDNA-Arrays, was eine Betrachtung der Genexpressionsprofile der einzelnen Patienten erlaubt, ohne dass ein „Pooling“ der einzelnen Patientenproben oder eine Amplifikation der mRNA aus den CD34+ Zellen mittels PCR-gestützter Techniken oder in-vitro-Transkription notwendig ist.

Auf den Clontech Atlas™ Human 1.2 I cDNA Arrays sind 1185 verschiedene Gene aufgetragen.



**Abbildung 2: Clontech Human 1.2 I cDNA Array.** Beispielhaft ist ein Array abgebildet, bei dem jeder dunkle Punkt eine Zielsequenz darstellt. An diese bindet die komplementäre DNS entsprechend der in der Probe enthaltenen Menge.

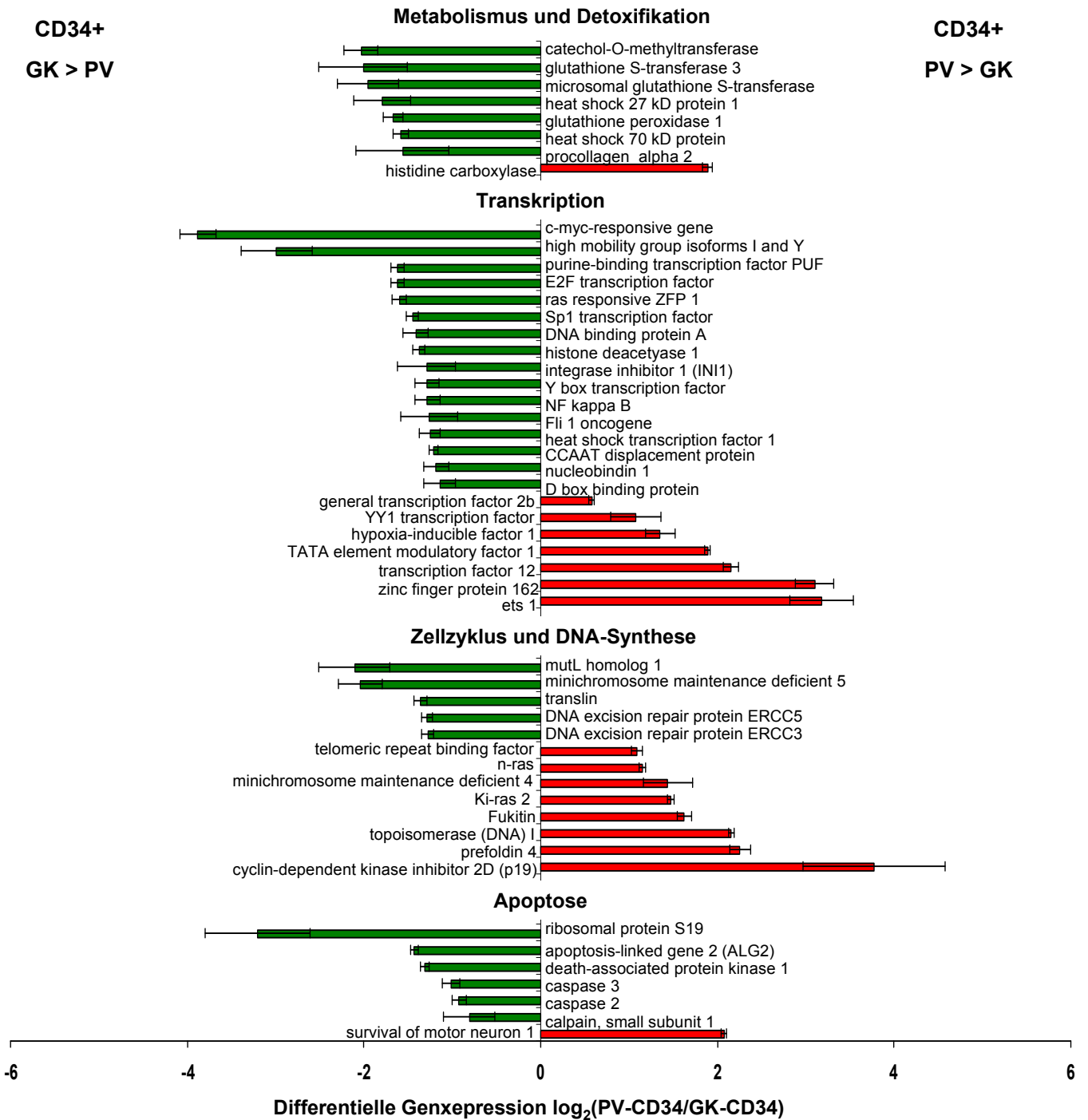
Beim Vergleich des Genexpressionsprofils der Patienten mit PV mit dem der gesunden Probanden fanden wir bei 107 Genen einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) der Expressionsstärke. Von diesen 107 differentiell exprimierten Genen waren 50 Gene in der Patientengruppe um den Faktor 1,9 bis 192 stärker exprimiert. Für die restlichen 57 Gene fanden wir bei den Patienten eine um den Faktor 1,75 bis 14,3 verminderte Expression. Die differentiell exprimierten Gene sowie  $\log_2$ - und  $p$ -Werte sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Im Folgenden werde ich die differentiell exprimierten Gene entsprechend funktioneller Gruppen darstellen:

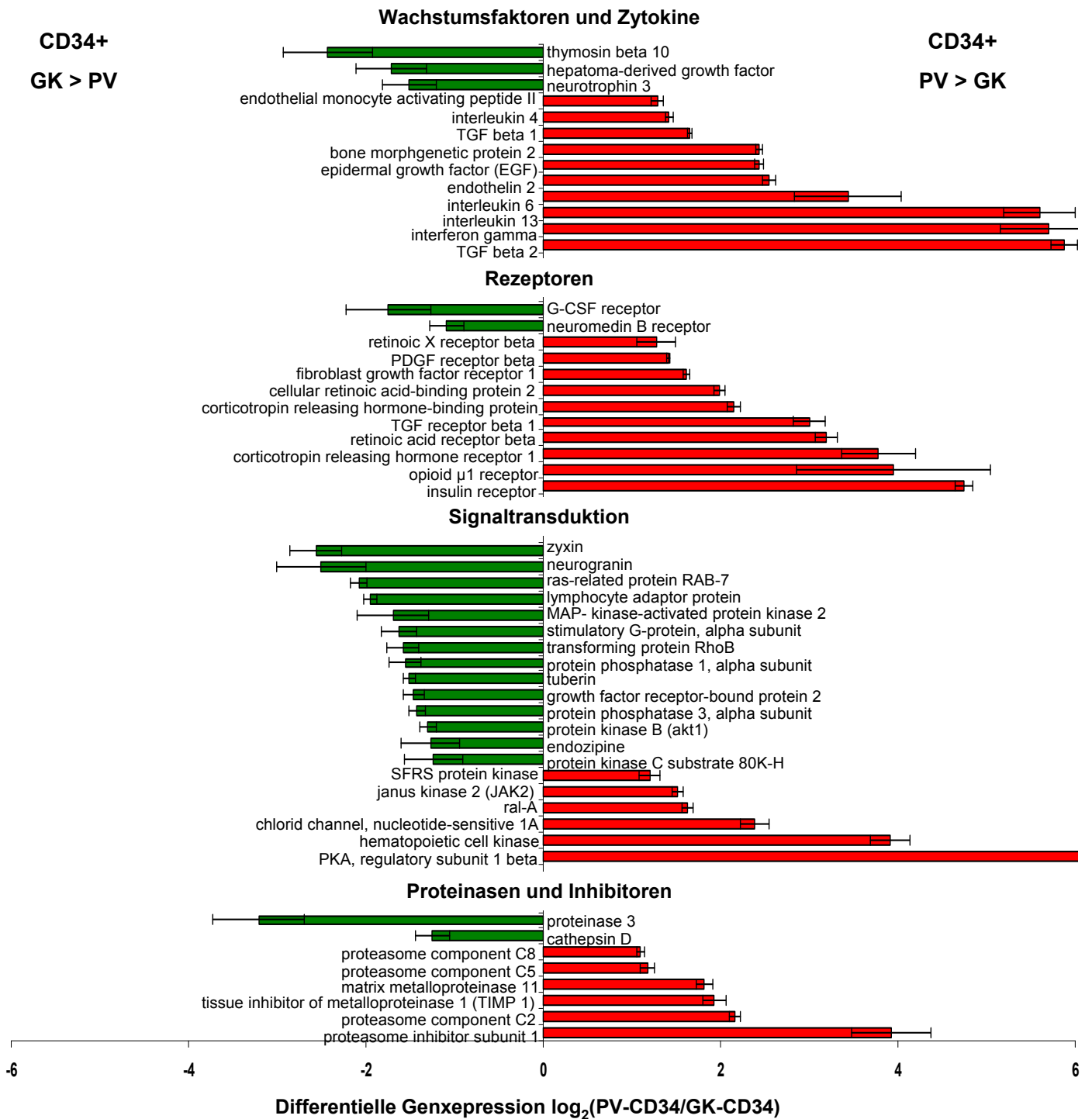
Zunächst wenden wir uns den Genen zu, die an der Regulation von Apoptose beteiligt sind. Hierbei fanden wir sechs proapoptotische Gene, Calpain, Caspase 2, Caspase 3, DAPK 1, Ribosomal Protein S 19 und ALG 2, die bei PV-CD34+ Zellen 2- bis 8-fach schwächer exprimiert sind, während eine 4-fach verstärkte Expression des antiapoptotischen Gens SMN 1 nachweisbar war. Insgesamt sprechen die Expressionsdaten für eine verminderte apoptotische Aktivität der PV-CD34+ Zellen.

Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe wiesen PV- CD34+ Zellen für 7 Transkriptionsfaktoren eine erhöhte Genexpression auf, wohingegen 17 andere Transkriptionsfaktoren in PV-CD34+ Zellen auf RNA-Niveau schwächer exprimiert waren. Dieses hinsichtlich der Transkriptionsfaktoren veränderte Expressionsmuster könnte einerseits die in Richtung Erythropoiese verschobene Zelldifferenzierung bei PV erklären, andererseits kann die differentielle Expression der Transkriptionsfaktoren als direkte oder indirekt-kompensatorische Folge der veränderten Signaltransduktion in PV-CD34+ Zellen interpretiert werden<sup>36,37,47</sup>.

Wir konnten für insgesamt 13 Gene eine differentielle Expression nachweisen, die den Zellzyklus und die DNA-Replikation beeinflussen. Acht dieser Gene waren stärker exprimiert, 5 Gene waren schwächer exprimiert. Insgesamt kann aus diesen Daten geschlussfolgert werden, dass weder die Stimulation oder Inhibition des Zellzyklus für die klonale Proliferation der hämatopoetischen Progenitorzellen bei PV verantwortlich sind. Diese Beobachtung könnte die Theorie bestärken, dass PV eher eine myeloakkumulative denn eine myeloproliferative Erkrankung ist.



**Abbildung 3a, b:** Differenzielle Genexpression in PV-CD34+ Zellen (PV) im Vergleich mit CD34+ Zellen von gesunden Probanden (GK). Die Gene sind in unterschiedlichen funktionellen Gruppen eingeteilt. Zur Darstellung der differentiellen Genexpression wurde eine logarithmische Darstellung ( $\log_2$ ) gewählt. Positive Werte (rote Balken) zeigen eine erhöhte Expression in PV-CD34+ Zellen, negative Werte (grüne Balken) zeigen eine verminderte Expression in PV-CD34+ Zellen. Standardabweichungen sind dargestellt. Es wurden nur Gene mit statistisch signifikanter, differentieller Expression ( $p < 0,01$ ) abgebildet.



**Abbildung 3b:** Differentielle Genexpression in PV-CD34+ Zellen (PV) im Vergleich mit CD34+ Zellen von gesunden Probanden (GK).

Mit Blick auf Gene, die eine Rolle im Zellmetabolismus und für sogenannte Detoxifikationsprozesse spielen, zeigten PV- CD34+ Zellen für diese Gene eine überwiegend verminderte Expression. Möglicherweise führt dies bei PV zu einer genetischen Instabilität der hämatopoietischen Progenitorzellen und fördert die Entstehung eines malignen Zellklons.

Bei den Proteinasen und Proteinaseinhibitoren fanden wir eine 2- bis 15fache Erhöhung der Genexpression folgender Gene unter den PV-Patienten: Matrix Metalloproteinase 11, TIMP 1, Proteasome Components C2, C5 und C8 sowie Proteasome Inhibitor Subunit 1. Letztere legen eine gesteigerte Proteasomaktivität bei Patienten mit PV nahe. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei Patienten mit PV eine Therapie mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib (PS 41, Velcade® Millenium, Cambridge, MA) erfolgreich sein könnte<sup>69-71</sup>.

Für insgesamt 20 Gene, die Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden sind, konnten wir in PV-CD34+ Zellen verglichen mit den CD34+ Zellen der gesunden Kontrollgruppe eine veränderte Genexpression nachweisen. Hierzu zählten unter anderem die Proteinkinase A regulatory subunit  $\beta$  und Hematopoietic Cell Kinase. Besonders erwähnenswert ist jedoch, dass die Janus Kinase 2 (JAK2), die durch eine Punktmutation bei bis zu 97% der PV-Patienten konstitutive Aktivität erlangt, in PV-CD34+ Zellen um den Faktor 2,87 auf mRNA-Niveau hochreguliert ist<sup>36,37,47</sup>. Zusammenfassend betrachtet könnten die Veränderungen verschiedener Signalkaskaden Ursache der trilineären Zellhyperplasie bei PV sein. Andererseits könnten diese Alterationen auch sekundär infolge der JAK2-Mutation im Sinne eines „Cross-Talks“ zwischen verschiedenen Signalkaskaden betrachtet werden.

Fokussiert auf Wachstumsfaktoren und Zytokine fanden sich mit Interferon gamma, Interleukin 4, Interleukin 6, Interleukin 13, Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1), Transforming Growth Factor  $\beta$ 2 (TGF  $\beta$ 2), Epidermal Growth Factor (EGF), Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP 2), Endothelin 12 und Endothelial Monocyte Activating Peptide II 10 Gene, die in CD34+ Zellen von PV-Patienten stärker exprimiert wurden. Ebenfalls eine erhöhte Expression in PV-CD34+ Zellen ließ sich für verschiedene Oberflächenrezeptoren, z. B. Insulinrezeptor, Opioidrezeptor  $\alpha$ 1, CRH 1-Rezeptor, TGF  $\beta$ 1-Rezeptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 1, Fibronectin  $\beta$ -Rezeptor und den PDGF  $\beta$ -Rezeptor nachweisen. Im Gegensatz dazu war die mRNA des G-CSF-Rezeptors bei PV-Patienten signifikant geringer exprimiert.

Die veränderte Expression von Signalmolekülen einerseits und Rezeptoren andererseits könnte für die Dysregulation der hämatopoietischen Differenzierungsentscheidungen bei

dieser chronisch myeloproliferativen Erkrankung verantwortlich sein. Alternativ könnte auch dieses alterierte Genexpressionsmuster der Oberflächenrezeptoren und Signalmoleküle eine Folge oder ein Kompensationsmechanismus der durch die JAK2-Mutation veränderten Signaltransduktion sein<sup>36,37,47</sup>.

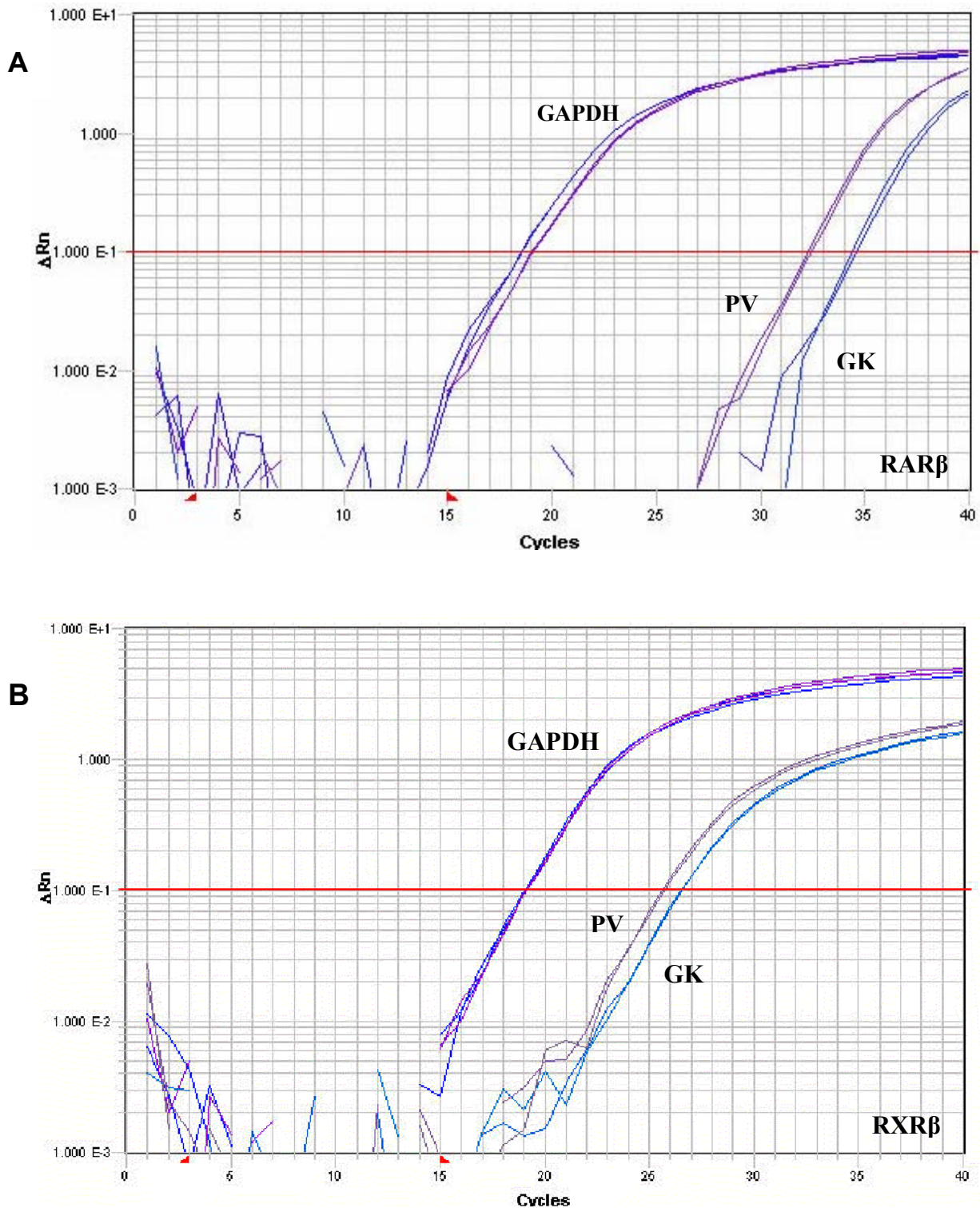
Interessanterweise waren bei den PV-Patienten drei Gene hochreguliert, die eine Rolle bei der Retinsäure-Signalkaskade spielen: Retinoic Acid Receptor beta (RAR  $\beta$ ) war 5,5fach (SA: 1,52), Retinoic X Receptor beta (RXR  $\beta$ ) 2,4fach (SA:0,26) und Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2 (CRABP2) 3,5fach (SA: 1,18) stärker exprimiert in CD34+ Zellen von PV-Patienten verglichen mit CD34+ Zellen von gesunden Kontrollpersonen.

## C.2. Überexpression von RAR $\beta$ und RXR $\beta$ auf mRNA-Ebene

Im nächsten Schritt überprüften wir die differentielle Expression der Gene des Retinsäure-Signalweges (RAR $\beta$ / RXR $\beta$ ) mit der quantitativen RT-PCR. Dafür entwickelten wir eine auf der TaqMan<sup>®</sup>-Technologie basierende, quantitative „Real-Time“ RT-PCR.

Hierbei bestimmten wir für jede Probe von 6 Patienten mit PV und 6 gesunden Kontrollpersonen die  $C_T$ -Werte für RAR  $\beta$  und RXR  $\beta$ . Jedes Experiment wurde als Doppelansatz durchgeführt. Die RAR  $\beta$ - beziehungsweise die RXR  $\beta$ -spezifischen PCR-Kurven sowie die PCR-Kurven des Referenzgens GAPDH der einzelnen CD34+ Zellproben von PV-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden miteinander verglichen.

Der „cycle of threshold“ ( $C_T$ ) der RAR  $\beta$ -spezifischen PCR-Kurven lag bei PV-CD34+ Zellen im Durchschnitt bei Zyklus 32,8 und im Vergleich dazu bei den gesunden Kontrollpersonen im Durchschnitt bei Zyklus 35,2. Bei Betrachtung der RXR  $\beta$ -spezifischen PCR-Kurven lag der „cycle of threshold“ ( $C_T$ ) bei den PV-CD34+ Zellen im Durchschnitt bei Zyklus 26,4, während dieser bei den gesunden Kontrollpersonen im Durchschnitt bei Zyklus 28,6 lag. Die „cycle of threshold“ ( $C_T$ ) –Werte für die GAPDH-spezifischen PCR-Kurven von PV-Patienten und gesunden Kontrollpersonen lagen im Durchschnitt bei Zyklus 20,3 (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Bestätigung der Überexpression von RAR $\beta$  und RXR $\beta$  in PV-CD34+ Zellen mit der quantitativen „Real Time“ RT-PCR. Repräsentativ für insgesamt 6 unabhängig voneinander untersuchten PV-CD34+ Proben und 6 CD34+ Zellsamples von gesunden Kontrollpersonen (GK) sind die PCR-Kurven der RAR $\beta$ - bzw. RXR $\beta$ - sowie der GAPDH-spezifischen PCR aus einem Experiment dargestellt. GAPDH fungierte als externe Kontrolle. Ein „Pooling“ der einzelnen Proben erfolgte nicht.

**A.** qRT-PCR von GAPDH und RAR $\beta$ . **B.** qRT-PCR von GAPDH und RXR $\beta$ .



Ergebnisse- Überexpression von RAR  $\beta$  und RXR  $\beta$  auf mRNA-Ebene

Entsprechend erfolgte die Berechnung von  $\Delta C_T(\text{RAR } \beta - \text{GAPDH})$  beziehungsweise des  $\Delta C_T(\text{RXR } \beta - \text{GAPDH})$  für PV- und Kontrollproben (Tabelle 3).  $\Delta C_T(\text{RAR } \beta - \text{GAPDH})$  lag bei den PV-Proben im Durchschnitt bei 12,5, bei den gesunden Kontrollproben hingegen bei 14,9. Parallel dazu betrug der  $\Delta C_T(\text{RXR } \beta - \text{GAPDH})$ -Wert bei den Proben von PV-Patienten durchschnittlich 6,1, bei den gesunden Kontrollproben bei 8,4.

Durch Subtraktion der  $\Delta C_T$ -Werte der PV-Proben von den  $\Delta C_T$  -Werten der gesunden Kontrollproben haben wir die sog.  $\Delta \Delta C_T$ -Werte für das jeweilige Gen berechnet. Durch Potenzierung der Zahl 2 mit dem jeweiligen  $\Delta \Delta C_T$ -Wert konnte für die beiden untersuchten Gene die Expression als Ratio PV/gesunde Kontrollen ermittelt werden. Hiernach war RAR  $\beta$  bei den Patienten mit PV 5,3fach höher exprimiert als bei den gesunden Kontrollpersonen. Die Expression des RXR  $\beta$  war bei den Patienten mit PV im Vergleich mit den gesunden Kontrollen um den Faktor 4,8 ebenfalls erhöht.

**Tabelle 3: Vergleich der Expressionsdaten aus den cDNA-Array-Experimenten und der quantitativen RT „real-time“ Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)**

	<u>RXR <math>\beta</math></u>	<u>RXR <math>\beta</math></u>
<u>cDNA array</u>		
<b>Expression PV/HD</b>	<b>5,5</b>	<b>2,4</b>
SA	1,52	0,26
p	0,001	0,005
<u>qRT-PCR</u>		
$\Delta C_T^A$ , gesunden Kontrollen	14,903	8,368
SA, gesunde Kontrollen	0,470	1,157
$\Delta C_T^B$ , PV-Patienten	12,496	6,103
SA, PV-Patienten	0,991	1,383
$\Delta \Delta C_T^C$	2,407	2,265
<b>Expression PV/HD<sup>D</sup></b>	<b>5,3</b>	<b>4,8</b>
p	0,0001	0,007

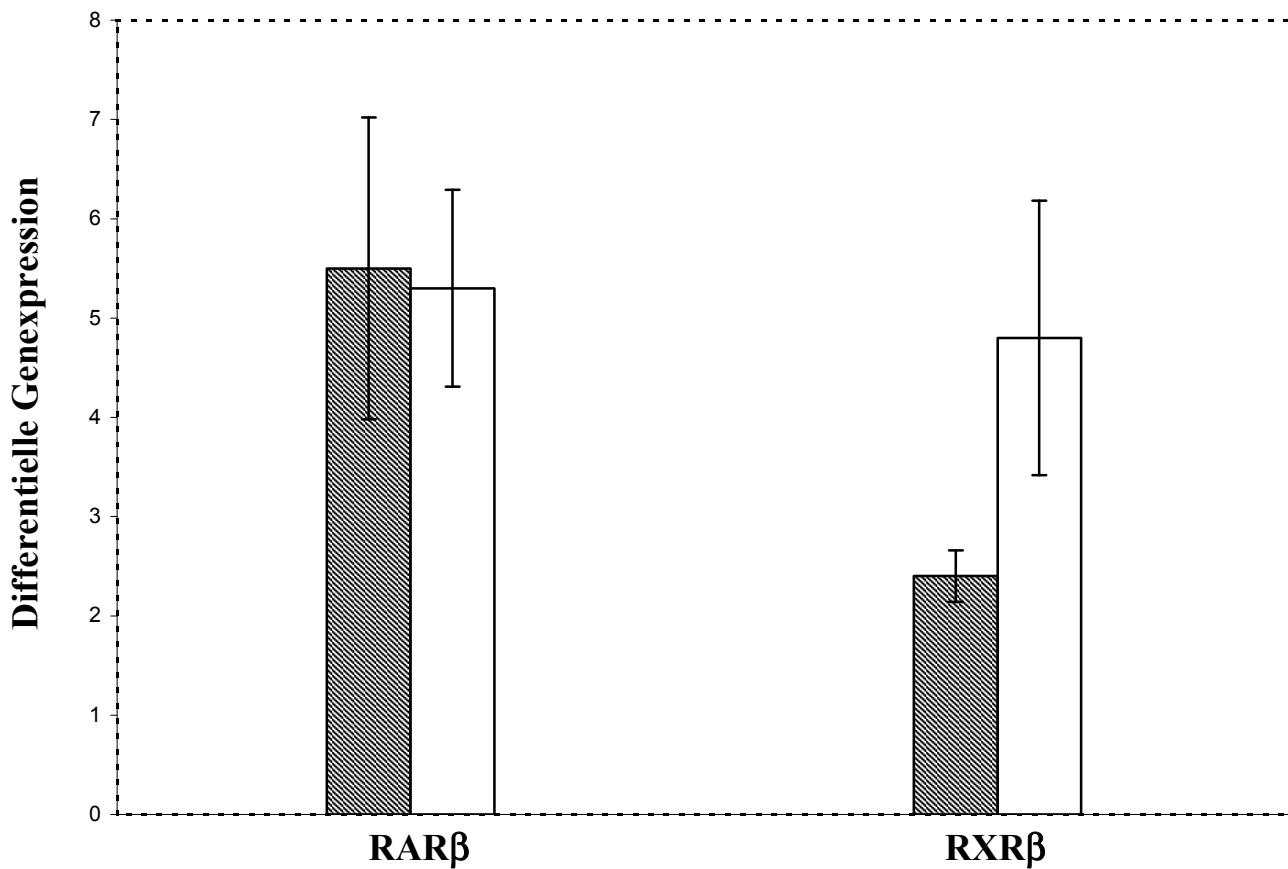
<sup>A</sup> Mittelwert der Differenz aus den CT-Werten für das spezifische Gen und GAPDH für individuelle Proben (n=6)

<sup>B</sup> Mittelwert der Differenz aus den CT-Werten für das spezifische Gen und GAPDH für individuelle Proben (n=8)

<sup>C</sup>  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  (gesunde Kontrollen) -  $\Delta C_T$  (PV-CD34+ Zellen)

<sup>D</sup> Expressionsratio PV/HD =  $2^{\Delta\Delta C_T}$

**Abbildung 5: Bestätigung der Genexpressionsdaten mit Hilfe der RT-PCR.** Dargestellt sind die Expressionsstärken des RAR $\beta$  und RXR $\beta$ , die mit Hilfe der cDNA-Array-Technik (graue Säulen, n=4) und der RT-PCR (helle Säulen, n=8) ermittelt wurden. Abgebildet sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung.



### **C.3. ATRA-induzierte Hemmung des Wachstums von PV-CD34+ Zellen**

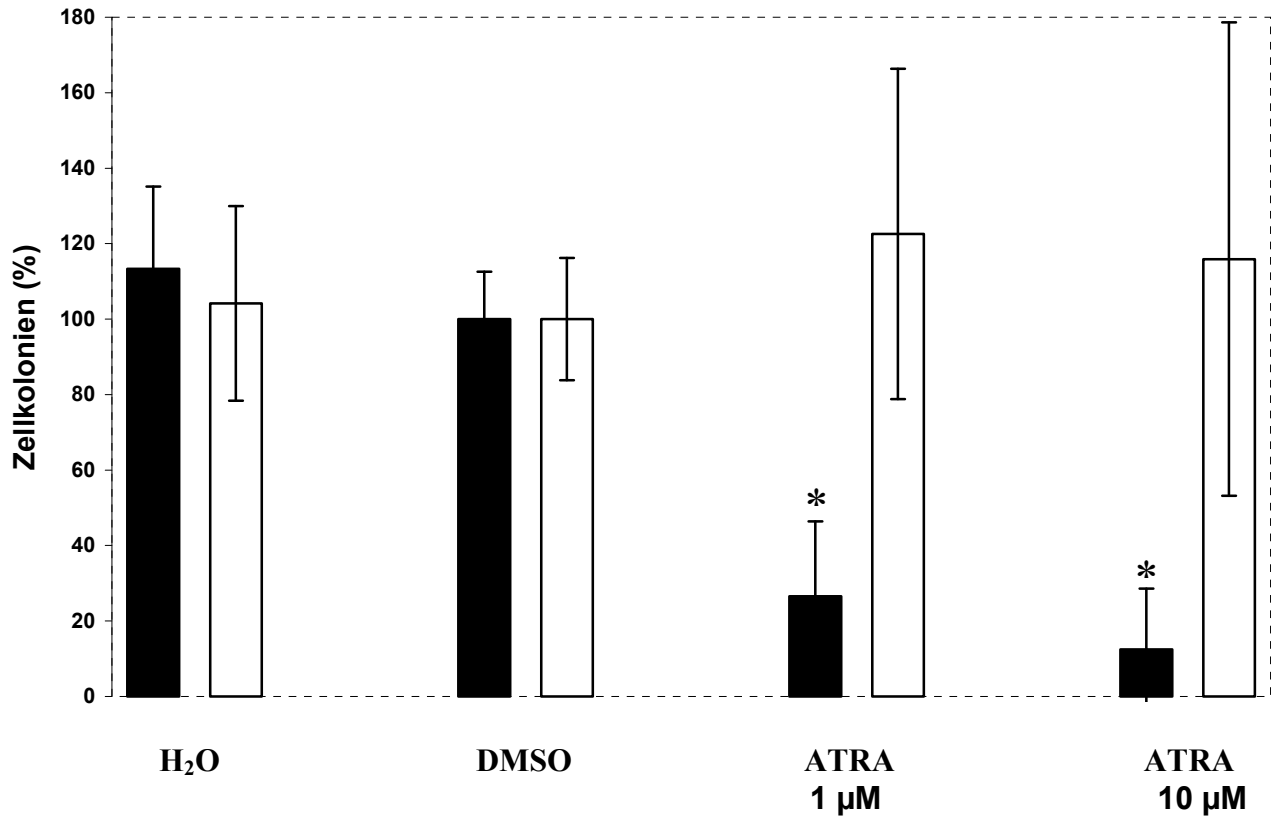
All-trans Retinsäure (ATRA) ist ein biologisch aktives Derivat des Vitamin A und fungiert als physiologischer Ligand des RAR  $\beta$ <sup>72,78</sup>. Um zu prüfen, ob eine Stimulation von RAR  $\beta$  durch ATRA das klonogene Wachstumsverhalten von CD34+ Zellen von PV-Patienten beeinflusst, führten wir Methylcellulose-Assays durch. Hierzu inkubierten wir CD34+ Zellen von 5 PV-Patienten 14 Tage mit ATRA in 2 verschiedenen Konzentrationen. Als Kontroll-Ansätze kultivierten wir CD34+ Zellen dieser Patienten mit H<sub>2</sub>O und mit DMSO. Nach vierzehntägiger Inkubationszeit erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung. Die Kolonien wurden anhand morphologischer Kriterien in „Burst-Forming Units Erythrocyte“ (BFU-E) und „Colony-Forming Units Granulocyte/Monocyte“ (CFU-GM) eingeteilt.

ATRA bewirkte eine signifikante, dosisabhängige Reduktion des Wachstums der BFU-E von PV-Patienten im Vergleich zu den Kontrollansätzen. (Abbildung 6 und 7)

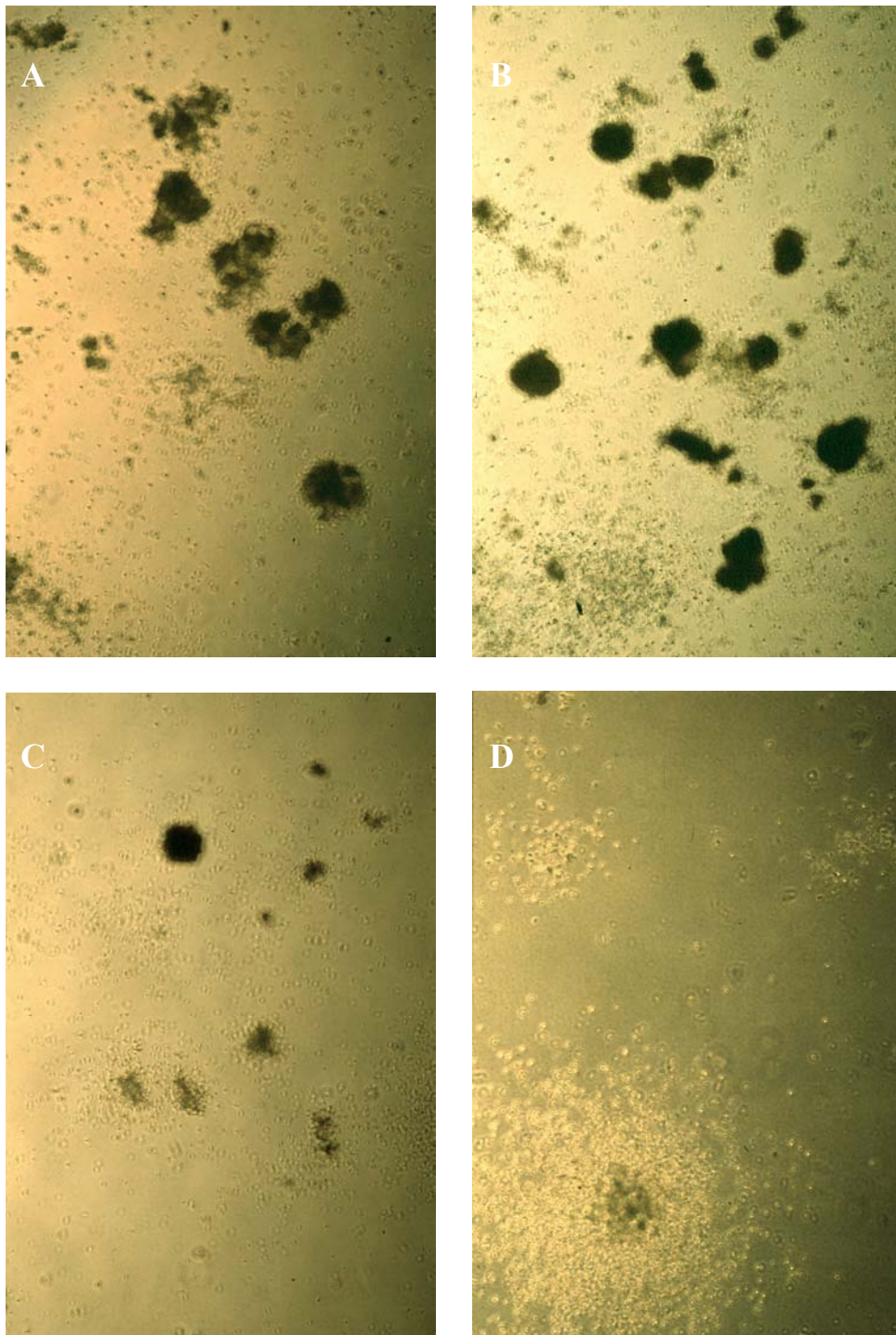
PV-CD34+ Zellen, die ATRA in einer Konzentration von 1  $\mu$ M ausgesetzt waren, zeigten eine Inhibition der BFU-E-Proliferation von 72% (SA 20%,  $p < 0,001$ ). PV-CD34+ Zellen, die bei einer 10 $\mu$ M ATRA-Konzentration kultiviert wurden, wiesen sogar eine Reduktion der BFU-E-Proliferation von 89% (SA 16%,  $p < 0,001$ ) auf.

Das Wachstum der Colony-Forming-Units Granulocyte/Monocyte (CFU-GM) wurde durch ATRA nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 6 und 7).

## ATRA-induzierte Hemmung des Wachstums von PV-CD34+ Zellen



**Abbildung 6: Dosisabhängige Hemmung des klonogenen Wachstums erythroider Kolonien bei hämatopoietischen Progenitorzellen von Patienten mit PV.** Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von fünf Patienten mit PV wurden in „Colony forming assays“ untersucht. BFU-E (dunkle Balken) und CFU-GM (weiße Balken) wurden nach 14 Tagen ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Eine statistisch signifikante Inhibition des klonogenen Wachstums ist durch \* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.



**Abbildung 7:** Hemmung der erythroiden Koloniebildung hämatopoietischer Progenitorzellen eines Patienten mit PV durch ATRA. Eines von fünf unabhängigen Experimenten ist repräsentativ abgebildet. A. H<sub>2</sub>O-Kontrolle. B. DMSO 0,1%. C. ATRA 1  $\mu$ M, DMSO 0,1%. D. ATRA 10  $\mu$ M, DMSO 0,1%.

## **D                    Diskussion**

### **D. 1.                Untersuchung der Genexpression von CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit PV**

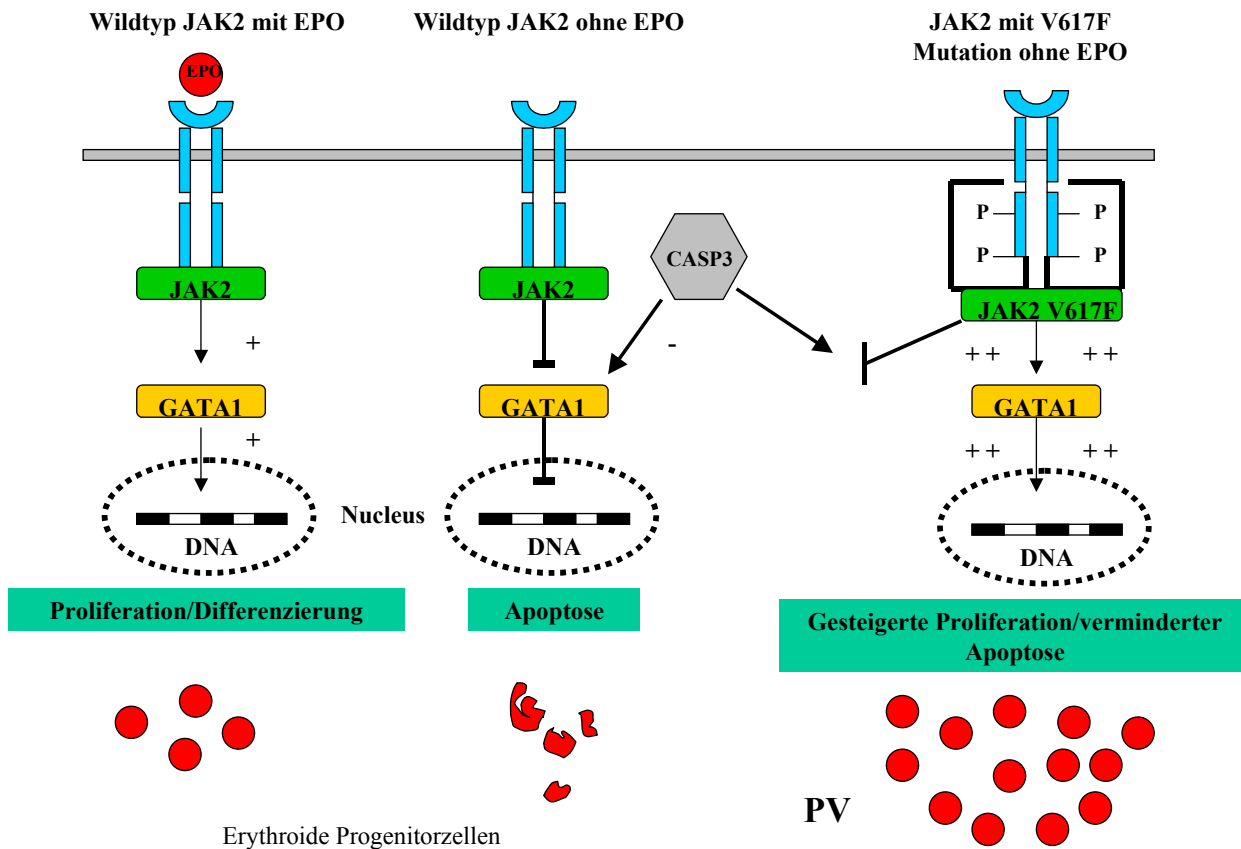
In dieser Arbeit verglichen wir mit Hilfe von cDNA-Arrays das Genexpressionsprofil von CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit PV mit dem Genexpressionsprofil von CD34+ Zellen aus dem Knochenmark von gesunden Personen. Um mögliche therapie-induzierte Veränderungen der Genexpression auszuschließen, wählten wir ausschließlich Patienten mit PV aus, deren Diagnose erst kurz zuvor gestellt worden war und die noch unbehandelt waren. Obwohl Granulozyten aus dem peripheren Blut einfacher zu gewinnen sind, untersuchten wir anders als zwei Arbeitsgruppen CD34+ Zellen aus dem Knochenmark, da die Ursachen der PV in Veränderungen einer hämatopoietischen Progenitorzelle zu vermuten sind<sup>4,64,66</sup>.

#### **D. 1. 1.            Differentielle Genexpression verschiedener funktioneller Genfamilien**

Hierbei fanden wir 107 Gene, die im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe in PV-CD34+ Zellen differentiell exprimiert werden. Dieses Genexpressionsprofil kann möglicherweise pathophysiologische Zusammenhänge bei Patienten mit PV auf molekularer Ebene aufdecken und erklären, andererseits vermag es neue Ansatzpunkte für eine kausale Therapie der PV zu liefern.

Bei der Betrachtung der verschiedenen funktionellen Gruppen konnten wir zeigen, dass die sechs proapoptotische Gene Calpain, Caspase 2, Caspase 3, DAPK 1, Ribosomal Protein S 19 und ALG 2, bei Patienten mit PV geringer exprimiert sind, während das antiapoptotische Gen SMN1 in PV-CD34+ Zellen stärker exprimiert wird. Insbesondere die verminderte Expression der Caspase 2 und Caspase 3 könnten für die Pathogenese der PV von Bedeutung

sein. Caspasen sind zytoplasmatische Proteasen, die autokatalytisch nach Stimulierung durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel über den CD 95 (Fas/Apo-1) Rezeptor, in einer Kaskade aktiviert werden und dann über weitere katalytische Schritte zum programmierten Zelltod führen<sup>79</sup>. Dabei existiert eine direkte Verbindung zwischen der Erythropoiese und der Caspase 3<sup>80,81</sup>. Proliferation und Differenzierung von erythroid-determinierten Progenitorzellen nach Stimulation mit Erythropoietin werden unter anderem durch die gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-1 vermittelt<sup>82</sup>. Eine verminderte Stimulation durch Erythropoietin resultiert hingegen in einer Aktivierung von Caspase 3 und weiteren Caspasen, was durch den Abbau von GATA-1 die Apoptose der erythroiden Vorläuferzellen<sup>80,81</sup> fördert. Zeuner et al konnten zeigen, dass in erythroiden Vorläuferzellen von Patienten mit PV, welche die JAK2-Mutation aufweisen, nach Aktivierung des CD 95 (Fas/Apo-1) Rezeptors eine verminderte Caspase-3-Aktivität und konsekutiv eine verminderte Proteolyse von GATA-1 vorliegen<sup>83</sup>. Die für PV charakteristische Hypersensivität gegenüber Erythropoietin und anderen Zytokinen infolge der konstitutiven Januskinase 2 mag zu einer Akkumulation von GATA-1 und somit zur gesteigerten Hämatopoiese beitragen. Diese Beobachtung korreliert mit der von uns in PV-CD34+ Zellen nachgewiesenen verminderten Expression der Caspase 3 und lässt vermuten, dass die Erythrozyten-Akkumulation bei PV zum Teil Folge einer verminderten Apoptoserate der Vorläuferzellen ist.



**Abbildung 8:** Verminderter Apoptose und gesteigerte Proliferation erythroider Progenitorzellen bei PV als Folge der JAK2 (V617F)-Mutation. Durch die Bindung von Erythropoietin an den Rezeptor wird der Transkriptionsfaktor GATA-1 hochreguliert. Dies vermittelt den erythroiden Vorläuferzellen einen Wachstumsvorteil. Durch die JAK2 (V617F)-Mutation wird einerseits die Expression von GATA-1 gesteigert, andererseits der Abbau von GATA-1 durch die Caspase-3 (CASP3) blockiert.

Diese Deutung steht im Einklang mit anderen bisher publizierten Daten, die eine erhöhte Expression von Bcl-X, einem Inhibitor der Apoptose, in erythroiden Vorläuferzellen bei PV belegen<sup>82,84-86</sup>. Silva et al. vermuten, dass die Hochregulation dieses Proteins in den erythroiden Progenitorzellen, die mit der Jak2-induzierten STAT5-Aktivierung assoziiert ist, für die Erythrozytose bei PV eine Rolle spielt<sup>84</sup>. Interessanterweise vermittelt Bcl-X als Bestandteil der intrazellulären Signalkaskade Erythropoietin-induzierte Wachstumsstimuli<sup>82,86</sup>.



Eine andere Arbeitsgruppe konnte bei Patienten mit PV anhand von Genexpressionsanalysen eine veränderte Expression von Genen zeigen, die eine ähnliche Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Abläufen in Richtung der antiapoptotischen Prozesse nahe legen<sup>66</sup>. Bei der Betrachtung deren Resultate muss berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen an Granulozyten durchgeführt wurden und deshalb nicht unmittelbar auf die molekularen Veränderungen in CD34+ Zellen übertragen werden können. Diese Ergebnisse könnten andererseits eine Erklärung für die bei PV häufig anzutreffende Vermehrung von Granulozyten sein. Die Veränderungen innerhalb der Erythropoiese vermögen sie aber nicht zu erklären.

Die Expression des Transkriptionsfaktors NF kappa B, einem weiteren Molekül mit Wirkung auf Apoptosevorgänge war in PV-CD34+-Zellen gegenüber den normalen Kontrollen um den Faktor 2,4 vermindert. Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt zu einer gesteigerten Expression von antiapoptotischen Genen und vermittelt hierdurch eine Hemmung der Apoptose<sup>87</sup>. Dieser Mechanismus spielt unter anderem bei der Pathophysiologie anderer Neoplasien, wie z. B. von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, Hodgkin-Lymphomen und der Philadelphia-Chromosom-positiven CML eine Rolle, indem es dem malignen Zellklon bei diesen Entitäten einen Proliferationsvorteil verschafft<sup>88</sup>. Im Lichte dieser Resultate könnte man erwarten, dass eine verminderte Expression von NF kappa B in PV-CD34+ Zellen eine die Proliferation dämpfende Wirkung hervorrufen könnte. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen hingegen legen nahe, dass eine gesteigerte Aktivität von NF kappa B Apoptose induziert und so der Entstehung von Tumoren entgegenwirkt<sup>89-92</sup>.

Ungeachtet dieser etwas unklaren Rolle von NF kappa B zeigen unsere Daten in der Gesamtschau, dass die in gesunden Zellen vorhandene Homoöstase zwischen Apoptose und Proliferation in PV-CD34+ Zellen zugunsten einer gesteigerten Proliferation verschoben ist.

Zwei im Langzeitverlauf der PV relativ häufig auftretende Komplikationen sind der Übergang in eine akute Leukämie und die Fibrosierung des blutbildenden Knochenmarks<sup>14,18</sup>.

Bei unseren Untersuchungen fanden wir in PV-CD34+ Zellen eine reduzierte Expression von Detoxifikationsenzymen wie z. B. Glutathione-Peroxidase und Glutathione S-Transferase 1 und 2. Veränderungen dieser Gene werden in Zusammenhang mit der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie und der myelodysplastischen Syndrome gebracht<sup>93</sup>. Diese Enzyme metabolisieren während der Phase II der Biotransformation physiologischerweise endogene

und exogene Karzinogene. Hierdurch verhindern sie die Interaktion der Karzinogene mit der DNA und somit eine potentielle DNA-Schädigung. Zusammen mit der verminderten Expression von den DNA-Reparatur-Proteinen „Excision Repair Cross Complementing“ (ERCC) 3 und 5 könnte dies in PV-CD34+ Zellen eine genetische Instabilität fördern, die im Zuge von somatischen Mutationen zur Leukämogenese beitragen könnte. Eine erhöhte genetische Instabilität könnte also erklären, warum während des Krankheitsverlaufes etwa 2-15% der Patienten mit PV eine akute myeloische Leukämie entwickeln<sup>14,18</sup>. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen von Kronenwett et al. an CD34+ Zellen von Patienten mit CML unterstützt<sup>94</sup>. So zeigten seine Expressionsanalysen 11 Detoxifikationsenzymen und DNA-Reparaturproteinen, die in den CML-CD34+ Zellen gegenüber normalen hämatopoietischen CD34+ Zellen signifikant vermindert waren<sup>94</sup>. Kronenwett schlussfolgerte, dass die gesteigerte genetische Instabilität zur Transformation von der chronischen Phase in die Blastenkrise bei CML beitragen könnte<sup>94</sup>.

Eine Myelofibrose tritt zwar nur bei etwa 9 % der Patienten mit PV auf, führt jedoch dann nicht selten zu einer Transfusionsbedürftigkeit und kompliziert damit den weiteren Krankheitsverlauf erheblich<sup>14,18</sup>. Die molekularen Mechanismen, die einer Fibrosierung des Knochenmarks zugrunde liegen, sind nur zum Teil geklärt. Bei unseren Untersuchungen fanden wir einige, hochregulierte Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie Rezeptoren, die einen fördernden Einfluss auf die Entstehung einer Myelofibrose haben könnten. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei dem „Basic Fibroblast Growth Factor“ (bFGF) und seinem korrespondierenden Rezeptor, dem „Fibroblast Growth Factor Receptor I“ (FGFR I) zu. „Basic Fibroblast Growth Factor“ wird von Knochenmarkstromazellen, Megakaryozyten und Thrombozyten produziert und vermittelt neben der wachstumsstimulierenden Wirkung auf Fibroblasten regulatorische Effekte auf hämatopoietische Zellen<sup>95-97</sup>. Le Bousse-Kerdilès et al. konnten in Ihren Arbeiten eine gesteigerte Expression von bFGF in CD34+ Zellen von Patienten mit IMF nachweisen<sup>98</sup>. bFGF stimuliert unter anderem in Synergismus mit Zytokinen wie IL-3, GM-SCF, Epo und SCF das Wachstum von CD34+ Zellen einschließlich der determinierten Progenitorzellen<sup>96,99,100</sup>. Sie schlussfolgerte hieraus, dass die gesteigerte Expression von bFGF und des FGFR 1 in CD34+ Zellen von Patienten mit IMF einerseits durch autokrine und parakrine Mechanismen die Proliferation von hämatopoietischen Progenitorzellen steigert, andererseits auch eine pathogenetische Rolle für die progressive

Myelofibrose spielt<sup>98,101</sup>. Damit steht auch im Einklang, dass der bFGF auch im Serum von Patienten mit PV erhöht ist<sup>102</sup>.

Neben dem FGFR1 fanden wir mit dem Platelet-derived Growth Factor Receptor beta (PDGFR beta), Bone morphogenetic protein 2 (BMP2), Epidermal Growth Factor (EGF), dem Transforming Growth Factor Receptor beta 1 (TGFR beta 1) sowie dem Transforming Growth Factor beta 1 und beta 2 (TGF1/2) solche Wachstumsfaktoren und zugehörige Rezeptoren, die in CD34+ Zellen von Patienten mit PV stärker exprimiert werden. Alle diese Wachstumsfaktoren stimulieren das Wachstum von Stromazellen, Fibroblasten und mesenchymalen Progenitorzellen, was auf molekularer Ebene die Entstehung der Myelofibrose erklären könnte<sup>102-106</sup>.

Hierbei ist der TGF beta 1 und sein korrespondierende Rezeptor TGFR beta 1 von besonderer Relevanz, da deren gesteigerte Expression einerseits durch Veränderungen im Knochenmarkstroma zur Myelofibrose beitragen kann, andererseits aber auch das Wachstumsverhalten des malignen CD34+ Zellklons bei PV beeinflussen kann<sup>107-109</sup>.

TGF beta 1 führt in vitro durch einen autokrinen Stimulationsmodus zu einem Zellzyklusarrest und hemmt dadurch das Wachstum von unreifen CD34+ Zellen<sup>110-112</sup>. Bei der IMF wird der TGFR beta 2 in CD34+ Zellen vermindert exprimiert. Le Bousse-Kerdilès et al. postulierten in zwei Arbeiten diese abgeschwächte Stimulation des TGF/TGFR-Pathways als eine Ursache der Myeloproliferation<sup>98,101</sup>. Im Gegensatz hierzu zeigten unsere Experimente eine gesteigerte Expression des TGFR beta 1 sowie des TGF1 und TGF2 in PV-CD34+ Zellen. Möglicherweise kann dies als ein Versuch des entarteten PV-CD34+ Zellklons fungieren, sein Wachstum endogen zu unterdrücken.

Interessanterweise konnte ein funktioneller Antagonismus zwischen TGF beta 1 und dem zuvor erwähnten bFGF nachgewiesen werden. Während bFGF die Proliferation von hämatopoietischen Progenitorzellen stimuliert, hemmt TGF beta 1 das Wachstum der Progenitorzellen<sup>97,113</sup>. Bei der PV kann dies bedeuten, dass das wachstumshemmende TGF beta 1-Signal in CD34+ Zellen durch bFGF überspielt wird. Zusammenfassend darf ein Ungleichgewicht zwischen wachstumsfördernden und inhibitorischen Stimuli zu Gunsten der Proliferation angenommen werden.

Neue Erkenntnisse über die Pathogenese der PV sind vor kurzem gewonnen worden. Fünf Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bei PV die Januskinase 2 (JAK2) durch eine Punktmutation konstitutiv aktiviert ist<sup>47</sup>. Dadurch ausgelöst, so die Befunde, werden bei PV verschiedene Signalkaskaden beeinflusst, die für die bei PV charakteristische Hypersensitivität gegenüber verschiedenen Wachstumsfaktoren führt<sup>47,50-57</sup>.

In den von uns durchgeführten Experimenten fanden wir ebenfalls mehrere hochregulierte Gene, die Bestandteil solcher Signaltransduktionskaskaden sind. Zunächst fanden wir eine 2,87fach erhöhte Expression der Januskinase 2 auf mRNA-Ebene. Diese Hochregulation der Expression des JAK2-Gens könnte im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus Folge der konstitutiv aktiven JAK2 in PV-CD34+ Zellen sein. Wir haben nur bei einem Patienten die Punktmutation der JAK2-Mutation untersucht, bei dem sich diese Mutation nicht nachweisen ließ. Da die CD34+-Zellen dieses Patienten mit Hilfe der cDNA-Technik analysiert wurden, bleibt also die oben genannten Theorie über einen möglichen Feedback-Mechanismus spekulativ.

Kronenwett et al. konnten in CD34+ Zellen bei CML ebenfalls eine gesteigerte mRNA-Expression von JAK2 zeigen<sup>94,114</sup>. Hierbei fand sich im Gegensatz zur PV keine V617F-Mutation innerhalb des Gens für die JAK2, weshalb Kronenwett schlussfolgerte, dass die Hochregulation der JAK2 in CML-Zellen entweder Folge der BCR-ABL-Mutation oder anderer, bisher nicht entdeckter Mutationen der JAK2 sein könnte<sup>114</sup>.

Neben der JAK2 wird auch die Hematopoetic Cell Kinase (HCK) in PV-CD34+ Zellen überexprimiert. Ebenso wie JAK2 ist die HCK als zytoplasmatische Tyrosinkinase Bestandteil verschiedener Signalkaskaden in hämatopoietischen Zellen<sup>115</sup>. So vermittelt sie unter anderem unabhängig von JAK2 Signale nach Aktivierung des IL3-Rezeptors und des Erythropoetin-Rezeptors<sup>115-120</sup>. Des weiteren zeigten Untersuchungen von Lionberger et al., dass HCK für die BCR-ABL-induzierte Zytokin-Unabhängigkeit von myeloischen Zellen bei CML eine große Rolle spielt<sup>121</sup>. Außerdem phosphoryliert HCK nach Aktivierung durch BCR-ABL den Transkriptionsfaktor STAT5 und trägt dadurch unabhängig vom klassischen JAK-vermittelten Aktivierungsmechanismus der STATs zur Pathogenese der CML bei<sup>122</sup>.

Diese Erkenntnisse sind möglicherweise auch für das Verständnis der Pathogenese der PV von Relevanz, da bei PV einer „Hypersensitivität“ gegenüber verschiedenen Wachstumsfaktoren inklusive IL3 und Erythropoietin vorliegt, die in bis zu 97% der Fälle auf einer Alteration der JAK/STAT-Kaskade beruht<sup>47,50-57</sup>. Da jedoch nicht alle Patienten mit PV die JAK2-Mutation haben, könnte die von uns nachgewiesene Hochregulation der HCK die gesteigerte Empfindlichkeit der Vorläuferzellen gegenüber diesen Zytokinen zumindest teilweise erklären. Gleichzeitig lassen unsere Beobachtungen vermuten, dass die Pathophysiologie der PV komplexer Natur ist und sich aus einer Vielzahl von dysregulierten Signaltransduktionsmechanismen ableiten lässt.

#### **D. 1. 2. Überexpression der beiden Retinsäurerezeptoren RAR $\beta$ und RXR $\beta$ in PV-CD34+ Zellen**

Unsere Untersuchungen zeigten auch, dass die beiden intrazellulären Retinsäurerezeptoren Retinoic Acid Receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ) und Retinoic X Receptor  $\beta$  (RXR $\beta$ ) in den CD34+ Zellen von Patienten mit PV signifikant hochreguliert sind.

Diese Befunde könnten aufgrund von drei Aspekten für das Verständnis der Pathophysiologie und für die Therapie der PV interessant sein.

Zum einen vermittelt Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ), ein anderer Isotyp aus der Familie der Retinsäurerezeptoren, Differenzierungsentscheidungen während der Myelopoese und ist als Bestandteil des Fusionsprotein PML/RAR $\alpha$  an der Pathogenese der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL, FAB M3) beteiligt<sup>74,75,123</sup>. Die durch das Fusionsprotein bei der APL induzierte Differenzierungsblockade kann durch Gabe von all-trans Retinsäure (ATRA, Vesanoid®), einem physiologischen Liganden der Retinsäurerezeptoren, aufgehoben werden, woraus eine Ausreifung der myeloischen Vorläuferzellen resultiert<sup>74,75</sup>. Auch bei der PV liegt ein gestörtes Gleichgewicht bei hämatopoietischen Differenzierungsentscheidungen vor, was schließlich zu einer Verschiebung in Richtung einer erythroider Differenzierung führt.

Zum anderen konnten mehrere Arbeitsgruppen einen wachstumsstimulierenden Effekt von Retinsäuren auf hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen nachweisen. Hiernach wirken Retinoide anti-apoptotisch auf CD34+ Zellen und können die Repopulationsaktivität von lin-/c-kit+/Sca1+ Zellen in vivo steigern. Retinoid-Antagonisten wirken hingegen pro-

apoptotisch auf CD34+ Zellen<sup>124-126</sup>. Möglicherweise gewinnt der maligne Zellklon durch die gesteigerte Expression von Bestandteilen der Retinsäurekaskaden einen Wachstumsvorteil gegenüber den gesunden CD34+ Zellen im Knochenmark von Patienten mit PV.

Außerdem konnten Untersuchungen an normalen hämatopoietischen Progenitorzellen einen inhibitorischen Effekt von ATRA auf die erythroide Differenzierung zeigen<sup>127,128</sup>, was möglicherweise ein Ansatzpunkt für eine kausale Therapie der PV ist.

RAR $\beta$  und RXR $\beta$  gehören wie die Glucocorticoid-Rezeptoren zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und haben eine unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Liganden<sup>72,129</sup>. Während der „Retinoic Acid Receptor“ (RAR) sowohl durch all-trans Retinsäure (ATRA) als auch durch 9-cis Retinsäure (9cRA) stimuliert werden kann, wird der „Retinoic X Receptor“ nur durch 9-cis Retinsäure aktiviert<sup>72,129</sup>. Nach Interaktion mit dem Liganden bindet der Komplex aus Retinsäurerezeptor und Ligand an eine spezifische DNS-Sequenz ihres Zielgens, nämlich das „Retinoic Acid Responsive Element“ (RARE), um so die Transkription dieses Gens modulieren<sup>72,129</sup>. Die Liganden bilden die Familie der Retinoide und lassen sich in physiologische Retinsäuren und synthetische Retinsäuren einteilen<sup>129</sup>. Zu den physiologischerweise vorkommenden Retinoiden zählen die all-trans Retinsäure und die 9-cis Retinsäure<sup>129</sup>. Sie spielen als Regulatoren für Proliferation, Differenzierungsprozesse und Apoptose eine Rolle für die pränatale Entstehung des Herzens, des Kreislaufsystems und des ZNS<sup>72,130</sup>. Postnatal beeinflussen sie die Differenzierung der Haut und besitzen als Bestandteil des Pigments Rhodopsin elementare Bedeutung für den Sehprozess<sup>72,130</sup>. Zu den synthetischen Retinoiden zählen unter anderem 13-cis Retinsäure (Isotretinoin), Tazarotene und Bexarotene (Tagretin®)<sup>129</sup>. Diese Substanzen werden bei der Therapie von kutanen T-Zell-Lymphomen, der Mycosis fungoides und des Sezary-Syndroms eingesetzt<sup>131</sup>.

Damit die Retinoide mit ihren Rezeptoren interagieren und einen zellulären Effekt induzieren können, werden sie nach Aufnahme ins Zytoplasma an „Cytoplasmatic Retinol Binding Proteins“ (CRBP) gebunden und enzymatisch aktiviert<sup>72,129</sup>. Anschließend interagieren die Retinoide mit „Cellular Retinoic Acid Binding Proteins“ (CRABP I und II) und werden von diesen in den Zellkern transferiert<sup>72,129</sup>. Wir fanden, dass auch das Cellular Retinoic Acid

Binding Protein 2 (CRABP2) in PV-CD34+ Zellen stärker exprimiert wird.

Dieser Befund lässt vermuten, dass die hochregulierten Proteine bei der PV als Bestandteile einer aktivierten Signalkaskade eine pathogenetische Rolle spielen.

Die anhand von klassischen zytogenetischen Untersuchungen ermittelte Beobachtung, dass Abberationen des Chromosoms 3p bzw. 6p, dem Genlokus des RAR $\beta$  bzw. RXR $\beta$ , bei PV sehr selten sind, lässt vermuten, dass transkriptionale Veränderungen und nicht Genamplifikationen für die Überexpression der Rezeptoren verantwortlich sind<sup>41-43</sup>.

## **D.2. Hemmung des klonogenen Wachstums mononukleärer Zellen von Patienten mit PV durch ATRA**

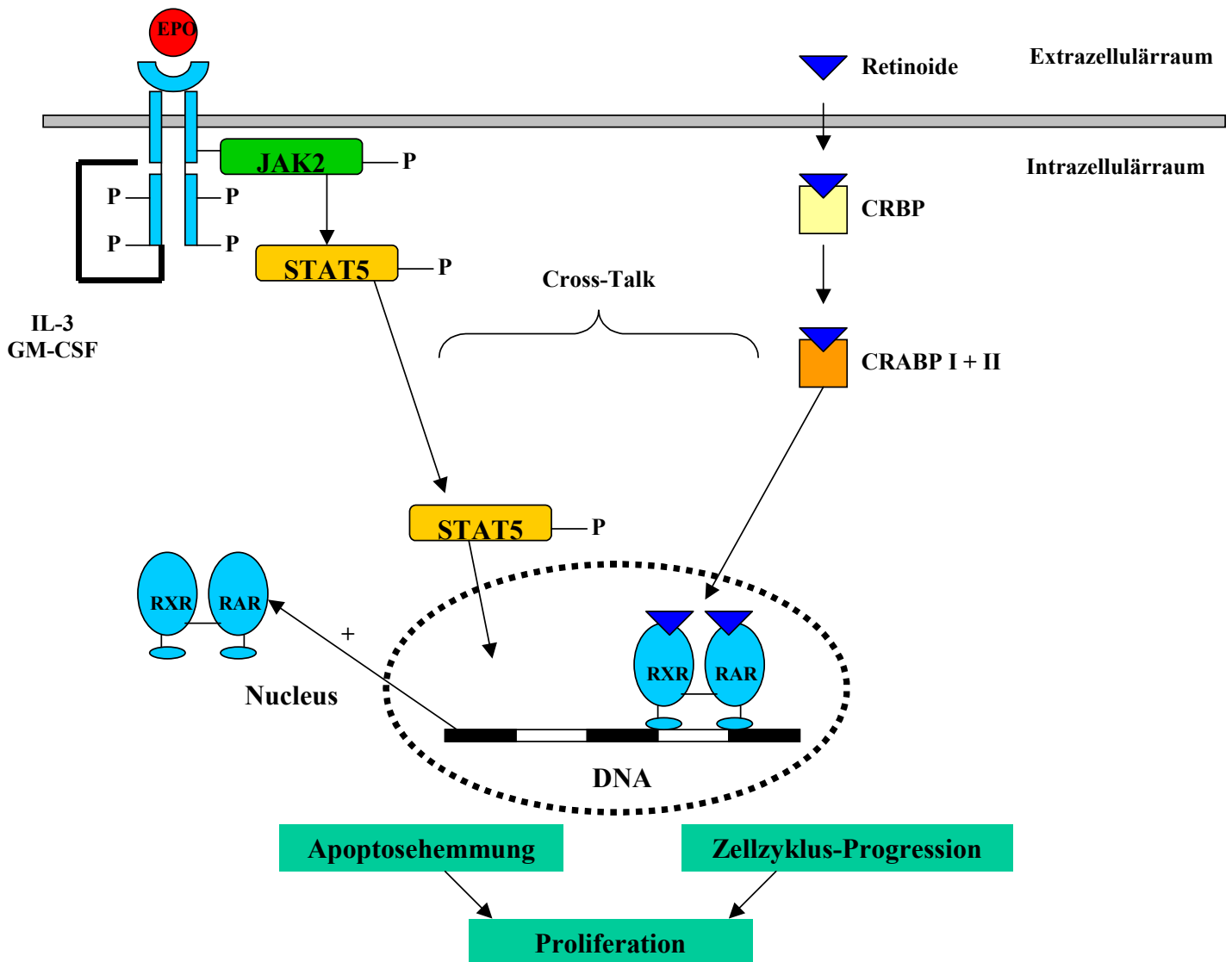
Mit Hilfe eines Methylcellulose-Assays untersuchten wir, ob ATRA das Wachstumsverhalten von hämatopoietischen Vorläuferzellen von Patienten mit PV in vitro beeinflusst. Dabei fanden wir, dass ATRA die Entstehung erythroider Zellkolonien dosisabhängig hemmt, während das myelomonozytäre Koloniewachstum nicht verändert wird. Diese Befunde stehen in Einklang mit Beobachtungen von zwei anderen Arbeitsgruppen an gesunden Vorläuferzellen. So konnten Labbaye et al. und Gratas et al. zeigen, dass ATRA die erythroide Differenzierung der hämatopoietischen Progenitorzellen hemmt und gleichzeitig die granulozytäre Differenzierung favorisiert<sup>127,128</sup>. Bei der Untersuchung von Labbaye et al. war die Gesamtzahl der Kolonien unverändert, was für einen direkten Einfluss von ATRA auf das Differenzierungsverhalten der Vorläuferzellen spricht<sup>127</sup>. In unseren Experimenten mit den Vorläuferzellen von Patienten mit PV führte ATRA dosisabhängig zu einer Abnahme der Gesamtzahl an Kolonien. Hierfür könnte es mehrere Erklärungen geben. Im Gegensatz zu Labbaye et al. haben wir statt angereicherter hämatopoietischer Progenitor- und Stammzellen mononukleäre Zellen kultiviert. Damit sind akzessorische Zellen in der Kultur enthalten, die entweder den ATRA-Metabolismus beeinflussen oder Wachstumsfaktoren freisetzen könnten. Bei den PV-CD34+ Zellen liegen außerdem neben den beobachteten Veränderungen der Retinsäurekaskade im Gegensatz zu gesunden Vorläuferzellen noch weitere Alterationen vor, die das Ergebnis unserer Experimente beeinflussen können. Außerdem haben wir ATRA nur einmal am Anfang der 14tägigen Inkubationszeit in die Kultur gegeben, während die Arbeitsgruppe um Labbaye die ATRA-Dosis mehrfach während der Inkubationsphase

applizierte<sup>127</sup>. Aus den Ergebnissen unserer ATRA-assoziierten Hemmung des erythroiden Koloniewachstums lässt sich ein möglicher therapeutischer Nutzen von ATRA für Patienten mit PV ableiten.

Die Einflüsse, die Retinsäuren auf die hämatopoietischen Differenzierungsentscheidungen ausüben, können nicht für sich betrachtet werden, sondern im Zusammenspiel mit einer Vielzahl anderer Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Diese Interaktionen zwischen Mitgliedern der Retinsäurekaskade und solchen der Zytokin-vermittelten Signalkaskaden werden „Cross-Talk“ genannt<sup>123</sup>. Die Vorstellung von einem „Cross-Talk“ wird durch die Ergebnisse von der Arbeitsgruppe um Steven J. Collins gestützt, die anhand von in vitro Modellen mögliche Interaktionen zwischen Zytokinen und Retinsäurerezeptoren untersuchten<sup>77</sup>. So fanden sie, dass Interleukin-3 und „Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor“ (GM-CSF) in der multipotenten SCF-abhängigen EML-Zelllinie die transkriptionelle Aktivität von Retinsäurerezeptoren verstärken. Diese Zytokinwirkung wird intrazellulär durch die JAK2-Kaskade vermittelt und belegt somit eine direkte Verknüpfung zwischen den beiden Signaltransduktionswegen. Auch auf molekularer Ebene konnten Collins et al. eine Verbindung zwischen beiden Kaskaden nachweisen, indem sie innerhalb des „Retinoic Acid Responsive Element“ (RARE) für den RAR $\beta$  überlappend eine Bindungssequenz für den Transkriptionsfaktor STAT 5, der durch die JAK2 aktiviert wird, nachweisen konnten<sup>77</sup>.

Möglicherweise ist also die von uns in den PV-CD34+ Zellen nachgewiesene Überexpression von RAR $\beta$  und RXR $\beta$  eine Folge der bei PV konstitutiv aktiven Januskinase 2. So könnte die infolge der konstitutiven JAK2-Aktivität gesteigerte Sensitivität gegenüber IL-3 und GM-CSF in einer erhöhten Expression der Retinsäurerezeptoren resultieren. Da sowohl die beiden Zytokine als auch die Retinsäurerezeptoren das Wachstum und die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen stimulieren, könnte dies die bei PV häufig ebenfalls vorliegende Granulozytose erklären<sup>50-57,74,75,123</sup>.





**Abbildung 9:** „Cross-Talk“ zwischen der Retinsäurekaskade und JAK2-gekoppelten Zytokinrezeptoren bei Polycythaemia vera. Beide Signalkaskaden und ihre Interaktionsmöglichkeiten sind dargestellt. Nach Stimulation durch einen Liganden bzw. Internalisierung der Retinoide im Zellkern wird die Expression der Zielgene durch „STAT-Transkriptionsfaktoren“ („signal transducer and activator of transcription“) bzw. Retinsäurerezeptoren moduliert.

## **Danksagung**

Besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rainer Haas für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seinen immerwährenden Antrieb, diese Arbeit fertig zu stellen.

Herrn PD Dr. med. Ralf Kronenwett und Herrn Dr. med. Ulrich Steidl danke ich für die hervorragende praktische Betreuung, die Einführung in die Prinzipien der molekularbiologischen und medizinischen Forschung, ihre ständige Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Beantwortung meiner vielen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Hämatologischen/Molekularbiologischen Forschungslabors der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und Geschwistern, ohne deren immerwährende Unterstützung mir die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Diese Arbeit wurde von der Leukämie Liga e. V., Düsseldorf finanziell gefördert.

## Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Vaquez H. Sur une Forme Speciale De Cyanose S'Accompagnant D' Hyperglobulie Excessive Et Peristante.  
C. R. Soc Biol (Paris) 1892 ;44:384-388
- <sup>2</sup> Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes.  
Blood 1951;6:372-375
- <sup>3</sup> Vardiman JW, Harris N, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm.  
Blood 2002;100:2292-302
- <sup>4</sup> Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem cell and probable clonal origin of the disease.  
N Engl J Med 1976;295:913-916
- <sup>5</sup> Adamson JW, Singer JW, Catalano P, Murphy S, Lin J, Steinmann L, Ernst C, Fialkow PJ. Polycythemia vera: further in vitro studies of hematopoietic regulation.  
J Clin Invest 1980;66:1363-1368
- <sup>6</sup> Bilgrami S, Greenberg BR. Polycythemia rubra vera.  
Sem Onc 1995;22:307-326
- <sup>7</sup> Ellis JT, Peterson P. The bone marrow in polycythemia vera.  
Pathol Annu 1979;14:383-403
- <sup>8</sup> Prchal JF, Prchal JT. Molecular basis for polycythemia.  
Curr Opin Hematol 1999;6:100-109
- <sup>9</sup> Da Silva JL, Lacombe C, Bruneval P, Casadevall N, Leporrier M, Camilleri JP, Bariety J, Tambourin P, Varet B. Tumor cells are the site of erythropoietin synthesis in human renal cancers associated with polycythemia.  
Blood 1990;75:577-582
- <sup>10</sup> Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, Melton LJ 3rd. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989.  
Am J Hematol 1994;47:89-93
- <sup>11</sup> McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K..  
Hematol Oncol 1997;15:173-189
- <sup>12</sup> Berglund S, Zettervall O. Incidence of polycythemia vera in a defined population.  
Eur J Haematol 1992;48:20-26

- <sup>13</sup> Prentice TC, Berlin NI, Lawrence JH. Effect of the therapy on blood volume, blood pressure and spleen size in polycythaemia vera.  
Arch Intern Med 1952;89:584-590
- <sup>14</sup> Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management.  
Blood 2002;100:4272-4290
- <sup>15</sup> Parker RG. Occlusion of the hepatic veins in man.  
Medicine 1959;38:369-402
- <sup>16</sup> Westin J, Granerus G, Weinfeld A, Wetterquist H. Histamine metabolism in polycythaemia vera.  
Scand J Haematol 1975;15:45-57
- <sup>17</sup> Spivak JL. The optimal management of polycythaemia vera.  
Br J Haematol 2002;116:243-254
- <sup>18</sup> Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, Marchetti M. Chronic myeloproliferative disorders.  
Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003;200-224
- <sup>19</sup> Osler W. Chronic cyanosis, with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity.  
Am J Med Sci 1903;126:176-201
- <sup>20</sup> Wassermann L. The management of polycythemia vera.  
Br J Haematol 1971;21:371-376
- <sup>21</sup> Pearson TC, Messinezy M, Westwood N, Green AR, Bench AJ, Huntly BJ, Navecha EP, Barbui T, Finazzi G. A Polycythemia Vera Updated: Diagnosis, Pathobiology, and Treatment.  
Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2000:51-68
- <sup>22</sup> Pearson TC. Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera.  
Semin Hematol 2001;38:21-24
- <sup>23</sup> Campbell PJ, Green AR. Management of polycythemia vera and essential thrombocythemia.  
Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005:201-208
- <sup>24</sup> Temerinac S, Klippel S, Strunck E, Röder S, Lübbert M, Lange W, Azemar M, Meinhardt G, Schaefer HE, Pahl HL. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera.  
Blood. 2000;95:2569-2576
- <sup>25</sup> Klippel S, Strunck E, Temerinac S, Bench AJ, Meinhardt G, Mohr U, Leichtle R, Green AR, Griesshammer M, Heimpel H, Pahl HL. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis.  
Blood. 2003;102:3569-3574

- <sup>26</sup> Moliterno AR, Hankinks WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338:572-580
- <sup>27</sup> Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet* 1978;2:1219-1219
- <sup>28</sup> Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T; European Collaboration on low-dose aspirin in polycythemia vera investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004;350:114-124.
- <sup>29</sup> Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R, Marchetti M. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:200-224
- <sup>30</sup> Berk PD, Goldberg JD, Silverstein MN, Weinfeld A, Donovan PB, Ellis JT, Landaw SA, Laszlo J, Najean Y, Pisciotto AV, Wasserman LR. Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *N Engl J Med* 1981;304:441-447
- <sup>31</sup> Modan B, Lilienfeld AM. Polycythemia vera and leukemia-the role of radiation treatment. *Medicine* 1965;44:305-339
- <sup>32</sup> Stobart K, Rogers PC. Allogeneic bone marrow transplantation for an adolescent with polycythemia vera. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:337-339
- <sup>33</sup> Jurado M, Deeg H, Gooley T, Anasetti C, Chauncey T, Flowers M, Myerson D, Storb R, Appelbaum F. Haemopoietic stem cell transplantation for advanced polycythaemia vera or essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2001;112:392-396
- <sup>34</sup> Silver RT. Imatinib mesylate (Gleevec(TM)) reduces phlebotomy requirements in polycythemia vera. *Leukemia*. 2003 ;17:1186-1187
- <sup>35</sup> Oehler L, Jaeger E, Eser A, Sillaber C, Gisslinger H, Geissler K. Imatinib mesylate inhibits autonomous erythropoiesis in patients with polycythemia vera in vitro. *Blood* 2003;102:2240-2242
- <sup>36</sup> Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;:533-537

- <sup>37</sup> Chloe J, Ugo, V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Beannaceur-Griscelli A, Villevak JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.  
Nature 2005;434:1144-1148
- <sup>38</sup> Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Labret F, Lecluse Y, Debili N, Vainchenker W, Casadevall N. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera.  
Exp. Hematol 2004;32:179-187
- <sup>39</sup> Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia.  
Am J Med 2004;117:755-761
- <sup>40</sup> Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, Marilus R, Villegas A, Tognoni G, Barbui T. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera  
J Clin Oncol 2005;23:2224-2232
- <sup>41</sup> Goldmann JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment.  
N Engl J Med 2003;349:1451-1464
- <sup>42</sup> Larson RA, Kondo K, Vardimann JW, Butler AE, Golomb HM, Rowley JD. Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia.  
Am J Med 1984;76:827-841
- <sup>43</sup> Pahl HL. Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera.  
Eur J Biochem 2000;267:3395-3401
- <sup>44</sup> Chen Z, Notohamiprodjom M, Guan XY, Paietta E, Blackwell S, Stout K, Richkin K, Trent JM, Lamb A, Sandberg AA. Gain of 9p in the pathogenesis of polycythemia vera.  
Genes, Chromosomes and Cancer 1998;22:321-324
- <sup>45</sup> Najfeld V, Montella L, Scalise A, Fruchtman S. Exploring polycythaemia vera with fluorescence in situ hybridisation: additional cryptic 9p is the most frequent abnormality detected.  
Br J Haematol 2002;119:558-566
- <sup>46</sup> Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera.  
Exp. Hematol 2002;30:229-236

- <sup>47</sup> Constantinescu SN, Vainchenker W. A unique activating mutation in JAK 2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases.  
Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005:195-200
- <sup>48</sup> Bench AJ, Aldred MA, Humphray SJ, Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Deloukas P, Gwilliam R, Bentley DR, Green AR. A detailed physical and transcriptional map of the region of the chromosome 20 that is deleted in myeloproliferative disorders and refinement of the common deleted region.  
Genomics 1998;49:351-362
- <sup>49</sup> Asimakopoulos FA, Gilbert JG, Aldred MA, Pearson TC, Green AR. Interstitial deletion constitutes the major mechanism for loss of heterozygosity on chromosome 20q in polycythemia vera.  
Blood 1996;88:2690-2698
- <sup>50</sup> Prchal JF, Axelrad AA. Bone-marrow responses in polycythemia vera.  
N Engl J Med 1974;290:1382
- <sup>51</sup> Zanjani ED, Lutton JD, Hoffmann R, Wassermann LR. Erythroid colony formation by polycythemia vera bone marrow in vitro. Dependence on erythropoietin.  
Clin Invest 1977;59:841-848
- <sup>52</sup> Mittelman M, Gardyn J, Carmel M, Malovani H, Barak Y, Nir U. Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes.  
Leuk Res 1996;20:459-466
- <sup>53</sup> Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means RT Jr, Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera, II: hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte- macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin- and granulocyte- macrophage colony-stimulating factor.  
Blood 1992;80:891-899
- <sup>54</sup> Dai CH, Krantz SB, Koury ST, Kollar K. Polycythaemia vera, IV: specific binding of stem cell factor to normal and polycythaemia vera highly purified erythroid progenitor cells.  
Br J Haematol 1994;88:497-505
- <sup>55</sup> Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium.  
Blood 1994;83:99-112
- <sup>56</sup> Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia.  
Blood 2000;96:3310-3321
- <sup>57</sup> Ihle JN. Cytokine receptor signalling.  
Nature 1995;377:591-594

- <sup>58</sup> Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. *Nature* 1985;315:758-761
- <sup>59</sup> Tefferi A, Pardanani A. Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease. *Curr Opin Hematol* 2004;11:58-64
- <sup>60</sup> Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 2002;296:1653-1655
- <sup>61</sup> Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak 2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:3387-3395
- <sup>62</sup> Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak 2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2003;14:1448-1459
- <sup>63</sup> Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *Biol Chem* 2004;279:821-824
- <sup>64</sup> Goerttler PS, Kreutz C, Donauer J, Faller D, Maiwald T, März E, Rumberger B, Sparna T, Schmitt-Gräf A, Wilpert J, Timmer J, Walz G, Pahl HL. Gene expression profiling in polycythaemia vera: overexpression of transcription factor NF-E2. *Br J Haematol* 2005;129:138-150
- <sup>65</sup> Sayer MS, Tilbrook PA, Spadaccini A, Ingley E, Sarna MK, Williams JH, Andrews NC, Klinken SP. Ectopic expression of transcription factor NF-E2 alters the phenotype of erythroid and monoblastoid cells. *J Biol Chem* 2000;275:25292-25298
- <sup>66</sup> Pellagatti A, Vetrie D, Langfor CF, Gama S, Eagleton H, Wainscoat JS, Boulwood J. Gene expression profiling in polycythemia vera using cDNA microarray technology. *Cancer Res* 2003;63:3940-3944
- <sup>67</sup> Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler M, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-165
- <sup>68</sup> Steidl U, Kronenwett R, Martin S, Haas R. Molecular biology of hematopoietic stem cells. *Vitam Horm.* 2003;66:1-28
- <sup>69</sup> Barlogie B, Shaughnessy JD, Tricot G, Jacobson J, Zangari M, Anaissie E, Walker R, Crowley J. Treatment of multiple myeloma. *Blood* 2004;103:20-32



- <sup>70</sup> Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003;101:2377-2380
- <sup>71</sup> Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliot PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001;61:3071-3076
- <sup>72</sup> Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:940-954
- <sup>73</sup> Simoni D, Tolomeo M. Retinoids, apoptosis and cancer. *Curr Pharm Des* 2001;7:1823-1837
- <sup>74</sup> Pitha-Rowe I, Petty WJ, Kitareewan S, Dmitrovsky E. Retinoid target genes in acute promyelocytic leukaemia. *Leukemia* 2003;17:1723-1730
- <sup>75</sup> Piazza F, Gurrieri C, Pandolfi PP. The theory of APL. *Oncogene* 2001;20:7216-7222
- <sup>76</sup> Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003;22:7305-7315
- <sup>77</sup> Si J, Collins SJ. IL3-induced enhancement of retinoic acid receptor activity is mediated through Stat5, which physically associates with the retinoic acid receptors in an IL3-dependent manner. *Blood* 2002;100:4401-4409
- <sup>78</sup> Dawson MI. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Design* 2000;6:311-325
- <sup>79</sup> Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16
- <sup>80</sup> De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999;401:489-493

- <sup>81</sup> Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation.  
Blood 2004;103:4310-4316
- <sup>82</sup> Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression.  
Blood 1999;94:87-96
- <sup>83</sup> Zeuner A, Pedini F, Signore M, Ruscio G, Messina C, Tafuri A, Girelli G, Peschle C, De Maria R. Increased death receptor resistance and FLIP<sub>short</sub> expression in polycythemia vera erythroid precursor cells.  
Blood 2006;107:3495-3502
- <sup>84</sup> Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera.  
N Engl J Med 1998;338:564-571
- <sup>85</sup> Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2.  
Blood 1996;88:1576-1582
- <sup>86</sup> Gregoli PA, Bondurant MC. The roles of Bcl-X(L) and apopain in control of erythropoiesis by erythropoietin.  
Blood 1997;90:630-640
- <sup>87</sup> Barkett M, Gilmore T. Control of apoptosis by Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors.  
Oncogene 1999;18:6910-6924
- <sup>88</sup> Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B.  
J Clin Invest 2001;107:241-246
- <sup>89</sup> von Hogerlinden M, Rozell B, Ahrlund-Richter L, Toftgard R. Squamous cell carcinoma and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/NF- $\kappa$ B signalling.  
Cancer Res 1999;59:3299-3303
- <sup>90</sup> Kasibhatla S, Genestier L, Green D. Regulation of Fas-ligand expression during activation-induced cell death of T lymphocytes via NF- $\kappa$ B.  
J Biol Chem 1999;274:987-992
- <sup>91</sup> Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green AR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1.  
Mol Cell 1998;1:543-551

- <sup>92</sup> Ryan K, Ernst M, Rice N, Vousden K. Role of NF- $\kappa$ B in p53-mediated programmed cell death.  
Nature 2000;404:892-897
- <sup>93</sup> Haase D, Binder C, Bunger J, Fonatsch C, Streubel B, Schnittger S, Griesinger F, Westphal G, Schoch C, Knopp A, Berkovicz D, Krieger O, Wormann B, Hilgers R, Hallier E, Schulz T. Increased risk for therapy-associated hematological malignancies of patients with carcinoma of the breast and combined homozygous gene deletions of glutathione transferases M1 and T1.  
Leuk Res 2002;26:249-254
- <sup>94</sup> Kronenwett R, Butterweck U, Steidl U, Kliszewski S, Neumann F, Bork S, Diaz-Blanco E, Roes N, Gräf T, Brors B, Eils R, Maercker C, Kobbe G, Gattermann N, Haas R. Distinct molecular phenotype of malignant CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia.  
Oncogene 2005;24:5313-5324
- <sup>95</sup> Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties.  
Prog Growth Factor Res 1989;1:207-235
- <sup>96</sup> Gabbianelli M, Sargiacomo M, Pelosi E, Testa U, Isacchi G, Peschle C. "Pure" human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor.  
Science 1990;249:1561-1564
- <sup>97</sup> Allouche M. Basic fibroblast growth factor and hematopoiesis.  
Leukemia 1995;9:937-942
- <sup>98</sup> Le Bousse-Kerdilès MC, Chevillard S, Charpentier A, Romquin N, Clay D, Smadja-Joffe F, Praloran V, Dupriez B, Demory JL, Jasmin C, Martyré MC. Differential expression of transforming growth factor- $\beta$ , basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia.  
Blood 1996;88:4534-4546
- <sup>99</sup> Gabrilove JL, White K, Rahman Z, Wilson EL. Stem cell factor and basic fibroblast growth factor are synergistic in augmenting committed myeloid progenitor cell growth.  
Blood 1994;83:907-910
- <sup>100</sup> Gallicchio VS, Hughes NK, Hulette BC, DellaPuca R, Noblitt L. Basic fibroblast growth factor (bFGF) induces early and late-stage hematopoietic progenitor cell colony formation (CFU-gm, CFU-meg, and BFUe) by synergizing with GM-CSF, Meg-CSF, and erythropoietin and is a radioprotective agent in vitro.  
Int J Cell Cloning 1991;9:220-232
- <sup>101</sup> Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC and Members of the French INSERM Research Network on Idiopathic Myelofibrosis. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis.  
Ann Hematol 1999;78:437-444

- <sup>102</sup> Musolino C, Calabro L, Bellomo G, Martello F, Loteta B, Pezzano C, Rizzo V, Alonci A. Soluble angiogenic factors: implications for chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hem* 2002;69:159-163
- <sup>103</sup> Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 1997;51:39-57
- <sup>104</sup> Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop* 1996;39-46
- <sup>105</sup> Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signalling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G845-G850
- <sup>106</sup> Nakamura H, Izumoto Y, Kambe H, Kuroda T, Mori T, Kawamura K, Yamamoto H, Kishimoto T. Molecular cloning of complementary DNA for a novel hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem* 1994;269:25143-25149
- <sup>107</sup> Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K. Cloning of a TGF- $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- $\beta$  type II receptor. *Cell* 1993;75:681
- <sup>108</sup> Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF- $\beta$  type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992;68:775
- <sup>109</sup> Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$ 1 receptor. *Nature* 1994;370:341
- <sup>110</sup> Hatzfeld J, Li M, Brown EL, Sookdeo H, Levesque JP, O'Toole T, Gurney C, Clark SC, Hatzfeld A. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor- $\beta$  or Rb oligonucleotides. *J Exp Med* 1991;174:925
- <sup>111</sup> Lardon F, Snoeck HW, Nijs G, Lenjou M, Peetermans ME, Rodrigus I, Berneman ZN, van Bockstaele DR. Transforming growth factor- $\beta$  regulates the cell cycle status of interleukin-3 (IL-3) plus IL-1, stem cell factor, or IL-6 stimulated CD34 + human hematopoietic progenitor cells through different cell kinetic mechanisms depending on the applied stimulus. *Exp Hematol* 1994;22:903

- <sup>112</sup> Cashman JD, Eaves AC, Raines EW, Ross R, Eaves CJ. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF- $\beta$ . *Blood* 1990;75:96
- <sup>113</sup> Gabilove JL, Wong G, Bollenbacher E, White K, Kojima S, Wilson EL. Basic fibroblast growth factor counteracts the suppressive effect of transforming growth factor- $\beta$  on human myeloid progenitor cells. *Blood* 1993;81:909
- <sup>114</sup> Kronenwett R, Gräf T, Neumann F, Pechtel S, Steidl U, Diaz-Blanco E, Haas R. Absence of the JAK2 mutation in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from patients with BCR-ABL-positive CML in chronic phase and blast crisis. *Leuk Res* 2006;30:1323-1324
- <sup>115</sup> Corey SJ, Anderson SM. Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood* 1999;83:1-14
- <sup>116</sup> Chaturvedi P, Reddy MV, Reddy EP. Src-kinases and not JAKs activate STATs during IL-3 induced myeloid cell proliferation. *Oncogene* 1998;16:1749-1758
- <sup>117</sup> Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O. Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* 1998;91:3734-3745
- <sup>118</sup> Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1999;274:17209-17218
- <sup>119</sup> Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* 2000;19:2532-2547
- <sup>120</sup> Okutani Y, Kitanaka A, Tanaka T, Kamano H, Ohnishi H, Kubota Y, Ishida T, Takahara J. Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signalling pathway. *Oncogene* 2001;20:6643-6650
- <sup>121</sup> Lionberger JM, Wilson MB, Smithgall TE. Transformation of myeloid leukaemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck. *J Biol Chem* 2000;275:18581-18585
- <sup>122</sup> Klejman A, Schreiner SJ, Nieborowska-Skorska M, Smithgall TE, Skorski T. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukaemia cells. *EMBO J* 2002;21:5766-5774

- <sup>123</sup> Evans T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling.  
Exp Hematol 2005;33:1055-1061
- <sup>124</sup> Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells.  
Blood 2000;95:470-477
- <sup>125</sup> Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All-trans retinoic acid delays the differentiation of primitive hematopoietic precursors (lin-/c-kit+/Sca1+) while enhancing the terminal maturation of committed granulocyte/monocyte progenitors.  
Blood 1999;94:483-495
- <sup>126</sup> Herculat O, Domenech J, Georget MT, Clement N, Colombat P, Binet C. All-trans retinoic acid prevents apoptosis of human marrow CD34+ cells deprived of hematopoietic growth factors.  
Br J Haematol 2002;118:289-295
- <sup>127</sup> Labbaye C, Valtieri M, Testa U, Giampaolo A, Meccia E, Sterpetti P, Parolini I, Pelosi E, Bulgarini D, Cayre YE, Peschle C. Retinoic acid downmodulates erythroid differentiation and GATA1 expression in purified adult-progenitor culture.  
Blood 1994;83:651-656
- <sup>128</sup> Gratas C, Menot ML, Dresch C, Chomienne C. Retinoic acid supports granulocytic but not erythroid differentiation of myeloid progenitors in normal bone marrow cells.  
Leukemia 1993;7:1156-1162
- <sup>129</sup> Nagpal S, Chandraratna RAS. Recent developments in receptor-selective retinoids.  
Curr Pharm D 2000;6:919-931
- <sup>130</sup> Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, de Luca LM. Retinoids in embryonal development.  
Physiological Reviews 2000;80:1021-1054
- <sup>131</sup> Zhang C, Hazarika P, Ni X, Weidner DA, Duvic M. Induction of apoptosis by Bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action  
Clin C Res 2002;8:1234-1240

## Curriculum vitae

### Zur Person

**Name:** Thomas Michael Schroeder

**Adresse:** Benzenbergstr. 21  
40219 Düsseldorf

**Geburtstag:** 27.01.1980

**Geburtsort:** Essen

**Familienstand:** ledig

**Konfession:** römisch-katholisch

**Eltern:** Dr. med. Michael Bernhard Schroeder, Arzt  
Gudrun Schroeder, geb. Ilg, Musikpädagogin

### Schulbildung

**1986 – 1990** Gemeinschaftsgrundschule  
Tonstraße, Duisburg

**1990 – 1999** Städtisches Landfermann-Gymnasium  
Duisburg

## **Universitätsausbildung**

- Oktober 1999** Beginn des Medizinstudiums an der  
Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf
- September 2001** Ärztliche Vorprüfung
- Februar 2002** Beginn der Doktorarbeit im Hämatologischen  
Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie  
und klinische Immunologie (Prof. Dr. med. R. Haas)
- August 2003** 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- März 2005** 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- April 2005** Beginn des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum  
Düsseldorf
- Mai 2006** 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **Beruflicher Werdegang**

- Mai 2006** Approbation als Arzt
- seit Juli 2006** Assistenzarzt an der Klinik für Hämatologie, Onkologie  
und Klinische Immunologie (Direktor: Prof. Dr. med.  
Rainer Haas) des Universitätsklinikums Düsseldorf



## Zusammenfassung

Polycythaemia vera ist eine chronische myeloproliferative Erkrankung, die Ausdruck einer klonalen Proliferation einer hämatopoietischen Stamm- bzw. Vorläuferzelle ist. Trotz neuerer Erkenntnisse ist die molekulare Pathogenese der PV nur teilweise geklärt.

In meiner Arbeit haben wir mit Hilfe der cDNA-Array-Technik erstmals die Genexpression von CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit PV untersucht. Dabei fanden wir, dass sich die Genexpression in CD34+ Zellen von vier Patienten mit PV gegenüber von zehn gesunden Probanden in 107 Genen signifikant voneinander unterscheidet.

Diese differentiell exprimierten Gene gehören unterschiedlichen funktionellen Gruppen an. So fanden wir bei PV Veränderungen der Expression von Genen für Mitglieder innerhalb von Signalkaskaden, von Genen, die an Vorgängen der Apoptose beteiligt sind sowie Gene für Oberflächenrezeptoren und Wachstumsfaktoren. In ihrer Gesamtheit liefern sie – wie eine hierarchische Clusteranalyse zeigte - eine für die PV charakteristische molekulare Signatur, welche Grundlage für eine molekulare Diagnostik werden könnte.

Aus therapeutischer Sicht besonders interessant ist die Beobachtung, dass die beiden Retinsäurerezeptoren RAR $\beta$  und RXR $\beta$  in PV-CD34+ Zellen stärker exprimiert sind als in gesunden CD34+ Zellen. Zur Bestätigung der durch cDNA-Array-Technik ermittelten Daten verglichen wir mittels quantitativer RT-PCR die Genexpression von RAR $\beta$  und RXR $\beta$  bei Patienten mit PV mit der von gesunden Kontrollpersonen und konnten damit die Array-Daten bestätigen. Angestoßen durch die neuen Erkenntnisse über die Pathogenese der PV und im Wissen um die Funktionen der Retinsäurerezeptoren bei der Hämatopoiese untersuchten wir, ob über diese beiden Rezeptoren ein Effekt auf das klonogene Wachstum vermittelt wird. Mit Hilfe von Methylcellulose-Assays fanden wir, dass ATRA, ein physiologischer Ligand der beiden Rezeptoren, die Bildung erythroider Kolonien dosisabhängig unterdrückt.

Wenn man davon ausgeht, dass die Hochregulation der Retinsäurerezeptoren zur Dysregulation der hämatopoietischen Differenzierung bei Patienten mit PV beiträgt, böte sich damit durch die Gabe von ATRA die Möglichkeit, auf die gesteigerte Erythropoiese dämpfend einzuwirken und damit eine Normalisierung der peripheren Hämoglobinkonzentration zu erreichen.