Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker **Stefan Knoth**

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2006

Titel der Arbeit:

Regulation der Genexpression bei der Erythroiden Differenzierung

Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Wölfl, Universität Heidelberg
Prof. Dr. Katharina Pachmann, Universität Jena
Prof. Dr. Jürgen Reichling
Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt

Zusammenfassung

Viele Erkrankungen des blutbildenden Systems, insbesondere Leukämien, haben ihre Ursache in einer Störung der Differenzierungvorgänge, die ausgehend von undifferenzierten Stammzellen des Knochenmarks zu allen Arten von hochspezialisierten Blutzellen führen. Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) im Stadium der Blastenkrise kommt es zu einer unkontrollierten Vermehrung unreifer Blasten. Alle Chronischen Myeloischen Leukämien exprimieren dass Fusionsprotein BCR-ABL welches aus der Translokation t(9;22)(q34;q11) resultiert. BCR-ABL ist eine konstitutiv aktive Proteinkinase und stimuliert die Zellen zu unkontrolliertem Wachstum. Es ist bekannt, dass sich bei transformierten Zellen mit verschiedenen Substanzen wie AraC oder Butyrat die Proliferation unterdrücken und eine weitere Differenzierung induzieren lässt. Daher werden diese Substanzen oder ihre Derivate als Therapeutika eingesetzt bzw. als solche erprobt. Bei CML-Zellen geht man davon aus, dass durch die genannten Chemikalien die Differenzierung in Richtung der erythroiden Reihe stimuliert wird, da verstärkt Hämoglobine synthetisiert werden. Wegen ihrer einfachen Handhabung in Kultur wurden diese Zellsysteme in der Vergangenheit häufig als Modelle zur Untersuchung der erythroiden Differenzierung verwendet. Die therapeutikastimulierte erythroide Differenzierung von CML-Zellen ist also in zweierlei Hinsicht interessant, einerseits aus medizinischer Sicht zur Bewertung der Vorgänge im behandelten Patienten und andererseits hinsichtlich der Eignung dieser Systeme als Modelle zur Erforschung der Erythropoese. Bisher ist nämlich noch wenig darüber bekannt, wie sich die Differenzierung im Detail vollzieht und in wie fern sie mit der gesunden Erythropoese vergleichbar ist. Die gesunde Erythropoese selbst ist auf molekularer Ebene bisher ebenso unvollständig charakterisiert.

Der Differenzierungszustand einer Zelle wird durch die Gesamtheit der in ihr enthaltenen Moleküle bestimmt, wobei die Proteine die wichtigste Komponente darstellen. Die Gesamtheit der Proteine einer Zelle (Proteom) lässt sich aber im Gegensatz zur Gesamtheit aller RNA-Spezies (Transkriptom) zurzeit nur mit sehr hohem technischen Aufwand erfassen. Im biochemischen Informationsfluss besteht jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen mRNA und durch sie kodiertem Protein. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Veränderungen des Transkriptoms als Maß für Differenzierungsprozesse herangezogen.

Die Entwicklung von Erythrozyten aus Vorläuferzellen wurde in vier Zellkultursystemen untersucht, die als Modelle für diesen Differenzierungsweg allgemein anerkannt sind. Als Modell für die normale Erythropoese dienten CD34-positive hämatopoetische Vorläufer-

zellen, die mit Erythropoietin stimuliert wurden. Die drei anderen Modelle basieren auf der CML-Zelllinie K562, wobei die Zellen mit AraC, Natriumbutyrat oder Hämin behandelt wurden. Bei allen Modellen wurden Zellproben in Form von Zeitreihen entnommen. Mit Hilfe der aus den Zellen präparierten total-RNA wurden Hybridisierungsproben hergestellt und auf AFFYMETRIX-U133A-Microarrays hybridisiert. Die Daten aller Arrays wurden vor der Auswertung einem für solche Zwecke optimiertem Normalisierungsverfahren, der Rangmittel-Normalisierung, unterzogen, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass Datensätze, die als Duplikate vorliegen, gut übereinstimmen, wodurch die generelle Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt wurde.

Die therapeutikainduzierte Differenzierung der K562-Zellen verläuft schneller als die EPO-induzierte Differenzierung der CD34+-Zellen, deshalb unterscheiden sich die untersuchten Messzeitpunkte der CD34+-Datensätze von denen der K562-Datensätze. Um die Vergleichbarkeit wieder herzustellen, wurde versucht, sowohl in den CD34+- als auch in den K562-Datensätzen allen untersuchten Zeitpunkten definierten Stadien der Erythropoese zuzuordnen. Dazu wurden FACS-Daten bekannter Oberflächenmarker, morphologische Kriterien sowie Array-Daten einer Vielzahl weiterer erythrozytenspezifischer Gene benutzt. Die Einordnung gelang im CD34+-Experiment sehr gut. Die überwiegende Mehrheit der Zellen erreichte die letzten kernhaltigen Stadien Proerythroblast, Erythroblast und Normoblast, vollendete aber die erythroide Differenzierung nicht. Bei den K562-Zellen war eine Einordnung anhand ausgewählter Marker wegen widersprüchlicher Ergebnisse nicht möglich. Der Vergleich der kompletten Datensätze mittels hierarchischen Clusterns ermöglichte schlussendlich aber doch eine Zuordnung.

Anschließend wurden die Datensätze nach differentiell exprimierten Genen durchsucht. Dazu wurden bestimmte Selektionskriterien festgelegt, die mathematisch ausgedrückt als Datenfilter zur Anwendung kamen. Im Ergebnis wurden bei den EPO-stimulierten CD34+-Zellen 2363 Gene (2980 Probesets), bei den AraC-stimulierten K562 1987 Gene (2343 Probesets), bei den Butyrat-stimulierten K562 1941 Gene (2355 Probesets) und bei den Hämin-stimulierten K562 850 Gene (1048 Probesets) als differentiell exprimiert eingestuft. Um festzustellen, welche Gene in allen oder zumindest mehreren Modellen reguliert werden, wurden die Schnittmengen berechnet. Überraschenderweise waren nur 66 Gene (69 Probesets) in allen Modellen reguliert, wobei anhand der Schnittmengen noch keine Aussage über die Richtung der Veränderung getroffen werden kann. Von den 66 Genen wurden 5 Gene in allen 4 Modellen hoch- und 11 Gene herunterreguliert. Wegen der geringen Übereinstimmung der Modelle und unter der Annahme, dass das CD34+-Modell die i*n-vivo*-

Bedingungen am besten repräsentiert, wurde festgestellt, dass die therapeutikastimulierten K562 als Modelle der Erythropoese ungeeignet sind. Daher wurde im Weiteren nur das CD34+-Modell untersucht. Mittels *k-means-clustering* wurden regulierte Gene mit ähnlichen Expressionsverläufen innerhalb einer Zeitreihe zu Gruppen (Cluster) geordnet. Dadurch konnte besser zwischen früher (später) Aktivierung (Deaktivierung) unterschieden, und die Ergebnisse auch anschaulich dargestellt werden. Unter der Annahme, dass gleichen Expressionsverläufen häufig auch gleichartige Mechanismen der Expressionsregulation zugrunde liegen, wurde innerhalb der Cluster nach Genen gesucht, deren Produkte an der biochemischen Signaltransduktion beteiligt sind und in einer funktionellen Beziehung zueinander stehen. Die Bedeutung dieser Veränderungen für die regulatorischen und metabolischen Reaktionswege in der Zelle wurde erörtert. Insbesondere wurden regulatorische Proteine identifiziert, denen eine zentrale Funktion bei der Umsetzung der extrazellulären Stimuli in die Zellantwort zukommen dürfte. Ein weiterer Fokus lag auf der Identifizierung differentiell exprimierter Transkriptionsfaktoren sowie deren Aktivierungsmuster. Diese Daten wurden an kooperierende Bioinformatiker weitergegeben, die unter Verwendung weiterer Informationen aus Interaktionsdatenbanken transkriptionelle Netzwerke modellierten.

Die therapeutikainduzierte Differenzierung von K562 ist zwar kein ideales Modell der Erythropoese, ist aber von großem Wert bei der Beschreibung der biologischen Vorgänge, die bei einer Chemotherapie im Patienten stattfinden. In diesem Zusammenhang wurde konkret nach regulatorischen Proteinen gesucht, deren Expressionsmuster sich in den K562-Modellen deutlich vom CD34+-Modell unterscheiden und die daher neben BCR-ABL für die Ausprägung des CML-Phänotyps wichtig sein könnten. Es wurde eine Auswahl von 18 Genen vorgestellt und für 14 von ihnen wurden die Array-Daten durch quantitative RT-PCR bestätigt.

Mit Hilfe eines noch in Entwicklung befindlichen Microarrays mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern war am Modell der CD34+-Zellen die Signalkaskade ausgehend von der Stimulierung mit Erythropoietin (EPO) zu verfolgen. Es wurde gezeigt, dass durch EPO die Phosphorylierung von AKT und p70S6-Kinase ausgelöst wird. Diese Ergebnisse konnten durch Immunoblots bestätigt werden.

Abstract

Many diseases of the hematopoietic system, especially leukemias, originate from a dysfunction of differentiation processes. During these differentiation processes primitive hematopoietic stem cells develop into mature blood cells of all lineages. The chronic myeloic leukemia (CML) in blast crisis is characterized by uncontrolled growth of immature blast cells. All CMLs express the constitutively active protein kinase BCR-ABL, which results from the fusion of BCR and ABL as a consequence of the translocation t(9;22)(q34;q11). Moreover it is known that cytostatic substances as cytosine arabinoside or butyrate induce in blast cells a resuming of the aborted differentiation beyond their antiproliferativ action. Therefore these substances and their derivatives are used or rather tested as therapeutics. In CML the mentioned chemicals are believed to trigger differentiation into the erythroid lineage because of the raised synthesis of hemoglobins. Therefore in the past CML cell lines have been widely used as models for red blood cell differentiation. So the chemical induced erythroid differentiation of CML cells is interesting for two reasons. First the action of the drugs on malign cells within a treated patient is simulated. Second the applicability of these systems as models for the differentiation of erythrocytes still has to be confirmed. Up to now little is known about the details of chemical induced red blood cell differentiation and its comparability with normal erythropoiesis. Moreover the molecular basics of normal erythropoiesis are characterized incompletely as well.

The differentiation status of cells is defined by the sum of all its molecules whereas the proteins play the most important rule. The totality of proteins is difficult to analyze for technical reasons. In contrast methods to analyze the totality of RNAs are available. Because of the connection between a particular mRNA and encoded protein changes in mRNA content were used as metric for differentiation processes.

The development of erythrocytes from progenitor cells was examined in four cell culture systems which are generally accepted as models of red blood cell differentiation. CD34+ hematopoietic progenitors stimulated with erythropoietin have been used as model for the normal, healthy erythropoiesis. Three other models base upon the CML cell line K562 which was stimulated with cytosine arabinoside, sodium butyrate or hemin. In all four models cell probes were taken as time courses. The total RNA was prepared and hybridization probes were synthesized and hybridized upon AFFYMETRIX U133A microarrays. The data of all arrays were first normalized by a method optimized for this purpose. This method is called rank mean normalization and ensures best comparability of the different arrays. A subset of

data was created as duplicates. Duplicated data match very well what generally proofs the good reproducibility of the method.

The chemical induced differentiation of K562 proceeds faster than the differentiation of CD34+-cells upon application of erythropoietin. For that reason the points in time when probes where taken differ between the K562-experiments and the CD34+-model. In order to resume the comparability of the models the examined points in time were assigned to defined stadiums of erythropoiesis. For this purpose the expression of erythroid markers was analyzed by cytometry and retrieved from the microarray data. Additionally morphological data and hierarchic clustering were used. The assignment of stadiums of differentiation to the investigated points in time succeeded very well in the experiment with erythropoietin-stimulated CD34+-cells. The majority of cells reached the last nucleated stadiums proerythroblast, erythroblast and normoblast but did not complete the differentiation. In case of all three K562-experiments the assignment to defined stadiums of erythropoiesis by erythroid markers was impossible. The comparison of the complete data sets of all K562 with the datasets of the CD34+-experiment by hierarchic clustering enabled finally an assignment.

After that the data sets of all experiments were searched for differential expressed genes. For this purpose selection criteria were mathematically defined and applied with computational aid. In the CD34+-experiment 2363 genes (2980 probe sets) were identified as differentially expressed. In K562 stimulated by cytosine arabinoside 1987 genes (2343 probesets) were discovered, in butyrat-stimulated K562 1941 genes (2355 probesets) and in hemin-stimulated K562 850 genes (1048 probesets). All possible intersections of the differential expressed genes of all experiments were calculated to identify those genes which were differentially expressed in more than one model. Surprisingly only 66 genes (69 probesets) were regulated in all models. However the affiliation of an intersection does not give information about the direction of regulation. Out of the 66 genes differentially expressed in all models only 5 were up-regulated in all models and 11 were down-regulated in all models. Because of the low accordance of the models and because of the assumption that the CD34+-model mimics the in-vivo conditions best the K562-models were assessed to be improper models of red blood cell differentiation. Therefore the further work was focused on erythropoietin-stimulated CD34+-cells.

Genes with similar expression profiles were clustered by k-means-clustering. So it became easier to distinguish between patterns of expression. Within the clusters rather then in similarly shaped clusters was searched for genes whose products are involved in functional related biological processes. This search based on the assumption that similar expression

profiles are caused by similar regulatory mechanisms. The meaning of these changes for the regulatory and metabolic pathways of the cells was discussed. Genes were identified whose products probably play a central role for the conversion of the extracellular stimuli into the cell response. A focus lays on the identification of differentially expressed transcription factors and their patterns of activation because cooperating scientists planned to model transcriptional networks with this information.

Besides the bad applicability of the chemical induced differentiation of K562 as models for erythropoiesis these systems are useful to investigate the biological processes in patients treated with these drugs. Therefore it was searched for genes of regulatory proteins whose expression profiles were well distinguishable in K562- and CD34+-experiments. Besides of BCR-ABL such proteins could be important for the establishment and maintenance of the phenotype CML. A selection of 18 genes was presented whereas for 14 of them the array data were confirmed by quantitative RT-PCR.

Changes of the phosphorylation of meaningful signaling proteins in erythropoietin stimulated CD34+-cells were analyzed by the use of a novel protein microarray. This array has phosphorylation-specific antibodies as probe molecules. It is shown that erythropoietin triggers the phosphorylation of AKT and p70S6K. These results were confirmed by immunoblots.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Die normale Hämatopoese 1
1.2. Die normale Erythropoese 3
1.2.1. Die Erythroide Differenzierung CD34-positiver Zellen im Zellkulturmodell 6
1.3. maligne Hämatopoese 7
1.4. Die Chronische Myeloische Leukämie (CML) 7
1.4.1. Therapie der CML 11
1.4.2. Die künstliche Stimulierung der erythroiden Reifung von K562 13
1.5. Transkriptom und Proteom 15
1.6. Microarrays 16
1.6.1. Entwicklung eines Phosphoprotein-Microarrays im Array-Tube-Format 17
1.7. Clustern 17
1.7.1. Hierarchisches Clustern 18
1.7.2. *k-means*-Clustern 19

2. Ergebnisse 20

2.1. Microarray-Experimente 20
2.1.1. Reproduzierbarkeit der Array-Daten 22
2.1.2. Charakterisierung der Differenzierungsstadien anhand der Expression typischer Marker 24
2.1.2.1. CD34+-Experiment 25
2.1.2.2. K562 –Modelle 32
2.1.3. Charakterisierung der Differenzierungsstadien durch Hierarchisches Clustern 36
2.1.4. Schnittmengen 39
2.1.5. Die transkriptionelle Basis der Differenzierungsstufen: k-means-Clustering 43
2.1.5.1. Cluster mit steilem Anstieg bis Tag 1 45
2.1.5.2. Cluster mit steilem Anstieg zwischen Tag 1 und 6 46
2.1.5.3. Cluster mit steilem Anstieg zwischen Tag 3 und Tag 9 47
2.1.5.4. Cluster mit steilem Anstieg zwischen 6 und 12 Tagen 48
2.1.5.5. Cluster mit schwachem Anstieg bzw. moderatem Anstieg über längerem Zeitraum 49
2.1.5.6. Cluster mit lokalem Maximum 50
2.1.5.7. Cluster mit lokalen Minima und Maxima 53
2.1.5.8. Cluster mit lokalem Minimum 55
2.1.5.9. Cluster mit insgesamt herunterregulierter Genexpression und lokalem Minimum 57
2.1.5.10. Cluster mit stark abfallender Expression zwischen Tag 0 und Tag1 59
2.1.5.11. Cluster mit stark abfallender Expression zwischen Tag 0 und Tag 3 60
2.1.5.12. Cluster, deren Gene über einen längeren Zeitraum herunterreguliert werden 61
2.1.6. Regulatorische Proteine mit besonderer Bedeutung in der Erythroiden Differenzierung oder CML 63
2.1.6.1. Gruppe 1: Gene, die in CD34+-Modell induziert sind 66
2.1.6.2. Gruppe 2: Gene, die in CD34+-Zellen stark exprimiert sind und in unbehandelten K562 nicht 75
2.1.6.3. Gruppe 3: Gene, die in CD34+-Zellen und K562 stark exprimiert sind und durch EPO bzw. AraC oder Butyrat später abgeschaltet werden 78

2.1.6.4. Gruppe 4: Gene, die in K562 exprimiert und im CD34-Modell nicht oder schwach exprimiert werden 82
2.2. Anwendung eines neuartigen phosphorylierungsspezifischen Antikörper-Arrays zur Detektion von Veränderungen der Phosphorylierung wichtiger Signalproteine während der erythroiden Differenzierung EPO-stimulierter CD34+-Zellen 87
2.2.1.Auswertung der Array-Daten mit Scatterplots 87
2.2.2. Bestätigung der Ergebnisse durch Immunoblots 88

3. Diskussion 91

3.1 Transkriptomanalyse 91
3.2 Analyse des Phosphoproteoms mit einem Protein-Microarray 97

4. Material und Methoden 101

4.1. Material 101
4.1.1. Chemikalien 101
4.1.2. Enzyme 102
4.1.3. Kits 102
4.1.4. Verbrauchsmaterial 102
4.1.5. Oligonukleotide (Primer) 103
4.1.6. Geräte 103
4.1.7. Zellkultur 103
4.1.8. Zellen 104
4.1.9. Antikörper 104
4.2. Methoden 105
4.2.1. Zellkultur 105
4.2.1.1. CD34-positive hämatopoetische Stammzellen 105
4.2.1.2. K562 106
4.2.2. Durchflusszytometrie 106
4.2.3. RNA-Präparation 106
4.2.4. AFFYMETRIX-Arrays 107
4.2.4.1. Synthese der Hybridisierungsproben für AFFYMETRIX-Arrays 107
4.2.4.2. Normalisierung der Daten 110
4.2.4.3. Identifizierung differentiell exprimierter Gene 111
4.2.4.4. Erstellung von *Heatplots* 112
4.2.5. c-DNA-Synthese 113
4.2.6. Quantitative RT-PCR 113
4.2.7. Phosphorylierungsspezifisches Antikörper-Array (Array-Tube) 114
4.2.7.1. Proteinextraktion, Biotinylierung und Inkubation des Arrays 114
4.2.7.2. Datenakquisition und Auswertung 116
4.2.7.3. Normalisierung der Protein-Array-Daten 117
4.2.8. SDS-PAGE und Immunoblotting 118

5. Literatur 120

Anhang 126

Abkürzungen und Fachbegriffe 126
Danksagung 127
Lebenslauf 128
Selbständigkeitserklärung 129
Erklärung zur Bewerbung 130

1. Einleitung

In vielzelligen Organismen leiten sich alle Zellen mit ihrer Vielfalt in Funktion und Struktur von Stammzellen ab. Ausgehend von der befruchteten Eizelle kommt es nach den ersten Zellteilungen bereits zu ersten Spezialisierungen von Zellen. Diese Spezialisierung in der Funktion, nachfolgend als Differenzierung bezeichnet, vollzieht sich generell in mehreren Stufen. Aus einer omnipotenten Stammzelle, die in jede Zellform differenzieren könnte, entstehen durch Zellteilung pluripotente Stammzellen, die in ihren Möglichkeiten beschränkt sind. Pluripotente Stammzellen sind für die ständige Erneuerung spezialisierter Zellen verantwortlich, da diese im allgemeinem eine geringere Lebensdauer als der ganze Organismus haben. Bei der Mitose pluripotenter Stammzellen entstehen auch wieder neue pluripotente Stammzellen, denn die Populationen dieser Zellen müssen während der ganzen Lebensdauer erhalten bleiben.

1.1. Die normale Hämatopoese

Die pluripotenten Stammzellen des blutbildenden Systems (hämatopoetische Stammzellen, HSC) befinden sich im Knochenmark. Hämatopoetische Stammzellen sind durchaus in der Lage, auch nichthämatopoetische Zelltypen hervorzubringen wie zum Beispiel neuronale Zellen, Hepatozyten und viele andere [Graf 2002]. Die Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp ist nicht nur mit dem Anschalten zelltypspezifischer Gene verbunden, sondern vor allem auch mit dem Abschalten von Genen, die für andere Zelltypen spezifisch sind [Hu et al. 1997; Akashi et al. 2003]. Diese Autoren zeigten mit Microarray-Analysen, dass in hämatopoetischen Progenitoren verschiedener Entwicklungsstufen immer Gene aller Differenzierungsrichtungen transkribiert werden, die diesen Progenitoren noch offen stehen. Erst bei der endgültigen Festlegung auf eine Linie wird die Transkription der zu den anderen Differenzierungslinien gehörenden Gene abgeschaltet. Bei der Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellpopulation spielen HOX-Gene [Rich 1998] und die Notch-Rezeptor-Familie vermutlich eine wichtige Rolle. Die Differenzierungsrichtung der Stammzell-Nachkommen wird durch Zytokine beeinflusst [Kondo et al. 2000] und ist nicht zufällig [Metcalf 1998]. Stammzellen sezernieren selbst Zytokine und tragen so zur Modulation des lokalen Mikromilieus bei [Majka et al. 2001]. Die Definition der hämatopoetischen Stammzellen gestaltet sich zurzeit noch sehr schwierig, da sie schlecht von den ersten nachfolgenden Differenzierungsstufen zu unterscheiden sind.

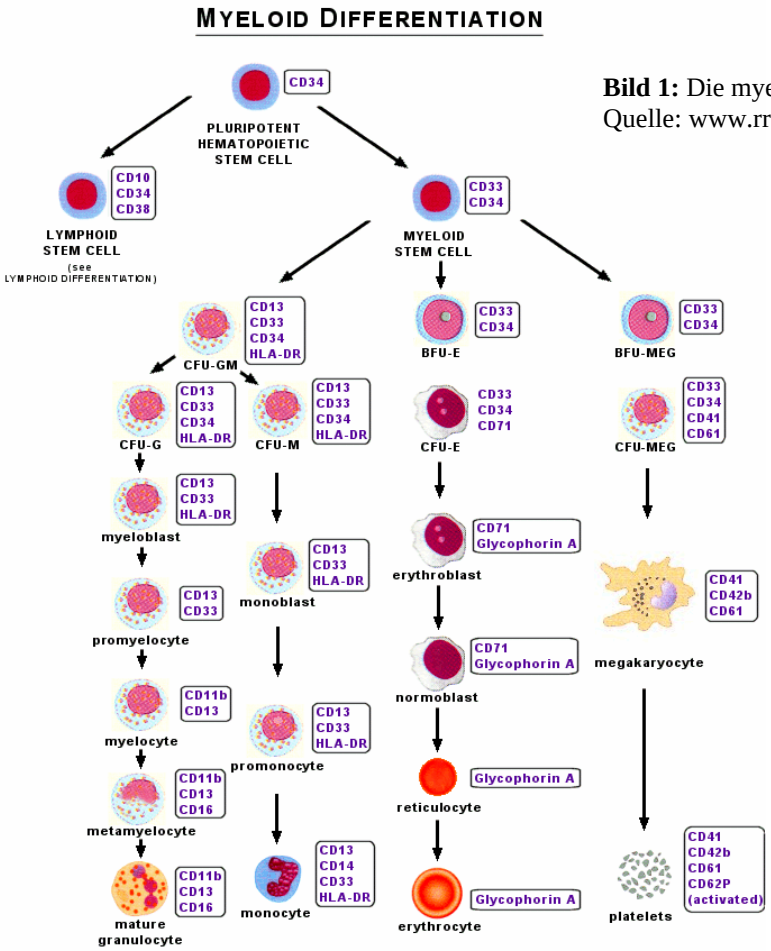


Bild 1: Die myeloide Differenzierungsreihe
Quelle: www.rrk-berlin.de/imarklab/immpheno.htm

CD34, ein Oberflächenprotein das wahrscheinlich die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks oder auch direkt an die Stromazellen vermittelt [genecards], wird als ein typischer Marker der hämatopoetischen Stammzellen angesehen. Jedenfalls exprimieren die meisten hämatopoetischen Stammzellen [Bhatia et al. 1997] aber auch die nachfolgenden frühen Differenzierungsstufen CD34. Es gibt allerdings im Tiermodell eine besonders gut reproduzierende CD34-negative Stammzellfraktion, so dass CD34 vielleicht auch schon ein Aktivierungsmarker ist [Bhatia et al. 1998]. Die Firma SEROTEC gibt auf ihrer Webseite (www.serotec.com/CDcatalogue/Cells/cellsindex.htm) CD34 nicht als Stammzellmarker an, sondern bezüglich der myeloischen Differenzierungsreihe als Marker für die folgenden frühen Differenzierungsstufen CFU-GEMM (*colony forming unit granulocyte-erythrocyte-monocyte-macrophage*), BFU-E (*boost forming unit erythroid*) und CFU-GM (*colony forming unit granulocyte- macrophage*) . Als weitere Merkmale des Stammzellphänotyps werden die Expression von THY-1 und MDR1 angesehen, die Expression von CD45RA und CD71 befindet sich auf niedrigem Niveau und CD38 ist nicht exprimiert.

CD34 positive Zellen (CD34+-Zellen) stellen eine Mischpopulation dar und sind in ihrer Fähigkeit, in verschiedene Blutzelltypen zu differenzieren, teilweise schon weiter

eingeschränkt als die hämatopoetischen Stammzellen allein. Bei der Blutzelldifferenzierung unterscheidet man grundsätzlich 2 Entwicklungslinien, nämlich die lymphatische und die myeloische. CD34+-Zellen, die bereits für die lymphatische Reihe festgelegt sind, differenzieren zu B- oder T-Lymphozyten. CD34+-Zellen der myeloischen Reihe differenzieren zu Granulozyten und Monozyten, zu Megakaryozyten oder Erythrozyten (Bild 1). Die weitere Unterteilung in diese Differenzierungswege erfolgt direkt nach dem Stadium dieser myeloiden Stammzelle. CD34+-Zellen proliferieren nur langsam und die Entwicklungsstadien mit hoher mitotischer Aktivität zur Erzeugung der benötigten Zellmengen folgen später. Im Falle der Erythrozytendifferenzierung sind dies die Stadien BFU-E (*boost forming unit - erythroid*) und CFU-E (*colony forming unit - erythroid*).

1.2. Die normale Erythropoese

Differenzierungsvorgänge werden durch Veränderungen in der Expression von Genen erreicht. Bis auf Ausnahmen haben alle Zellen eines Organismus dieselbe genetische Ausstattung. Um zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren, muss die Expression der Gene reguliert werden, d.h. in Abhängigkeit vom bereits erreichten Status und dem Ziel der Differenzierung wird die Expression stimuliert oder abgeschaltet. Die Differenzierung entspricht also der Abarbeitung eines genetisch vorgegebenen Programms. Um eine Differenzierung auszulösen, bedarf es eines extrazellulären Signals. Im Fall der Differenzierung von Erythrozyten aus myeloiden Stammzellen ist dies hauptsächlich das Zytokin Erythropoietin (EPO) [Quesenberry 1986]. Da die Expression des Erythropoietin-Rezeptors (EPOR) erst mit Erreichen des BFU-E -Stadiums beginnt [Tepperman et al. 1974], müssen noch weitere Faktoren an der Initiation der erythroiden Differenzierung beteiligt sein. Dies sind vor allem Interleukin 3 (IL3), der Stammzellfaktor (SCF oder KIT-Ligand) [Dai et al. 1991] und IL6 [Ikebuchi et al. 1987]. SCF ist unentbehrlich für das Überleben und die Proliferation der Zellen und verzögert die Maturation. IL6 scheint vor allem für die rasche Proliferation in den frühen Entwicklungsstadien wichtig zu sein.

Aus der myeloiden Stammzelle mit geringer Zellteilungsaktivität entstehen zunächst Zellen mit hoher mitotischer Aktivität, nämlich BFU-E und CFU-E. Diese entwickeln sich in ca. 14 Tagen zu Proerythroblasten und Erythroblasten und nach weiteren 2 Tagen zu Normoblasten, die wiederum nach 2 Tagen und Ausstoßung des Kerns zu Retikulozyten und schließlich zu Erythrozyten reifen [Bonanou-Tzedaki 1990]. Die Proliferation und Reifung der Erythroblasten findet in so genannten *erythroblastic islands* statt, welche aus Erythroblasten in

verschiedenen Reifungsstadien bestehen, die einem zentral gelegenen Makrophagen in konzentrischen Kreisen umlagern. Dabei stehen die Erythroblasten im direkten Zellkontakt mit dem Makrophagen bzw. dessen Filopodien [Bessis 1973]. Die Makrophagen phagozytieren und degradieren die ausgestoßenen Zellkerne der entstehenden Erythrozyten, spielen aber keine Rolle bei der eigentlichen Kernextrusion [Simpson und Kling 1967]. Weiterhin beseitigen sie defekte Erythroblasten sowie alte Erythrozyten [Ghadially 1979].

Tabelle 1: Zeittafel der Erythrozytendifferenzierung in vivo (Quelle Bonanou-Tzedaki 1990])

	Stadium	**Zeit (Tage)**	**zelluläre Veränderungen**	**Molekulare Veränderungen**
	hämatopoetische Stammzelle (HSC)			
			Liniendetermination	
liniendeterminierte erythropoetische Progenitor-Zellen	CFU-GEMM			
	BFU-E	14	zunehmende Sensitivität für Erythropoietin	Expression des EPOR
	CFU-E			
morphologisch identifizierbare Zellen	Proerythroblast	2-3	Verringerung der Zellgrösse	Induktion der Hämoglobingen-Transkription, Synthese von Spektrinen, Transferrin-Rezeptor, Glycophorinen
	Erythroblast		Zunahme des Hämoglobins	maximale Transkription der Hämoglobin-Gene, maximale Synthese von Häm, Transferrin-Rezeptor, Spektrinen und Glycophorinen
	Normoblast		starke Zunahme des Hämoglobins, Chromatin-Kondensation	maximale Hämoglobin-Synthese, nachlassende RNA- und DNA-Synthese
			Kernextrusion	
	Reticulozyt	2-3		Verlust verschiedener Oberflächen-Rezeptoren (z.B. EPOR) maximale Synthese von Catalase, Superoxid-Dismutase, Karboanhydrase und Lipoxygenase nachlassende Proteinsynthese
			Verlust der Zellorganellen	keine Proteinsynthese
	Erythrozyt			maximaler Hämoglobin-Gehalt

Es wird diskutiert, dass der zentrale Makrophage außerdem die Versorgung der Erythroblasten mit Eisen und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Der Ausstoßung des Kerns geht eine extreme Verdichtung des Chromatins voraus. Der kompakte und deutlich verkleinerte Kern wird dann an die Zellmembran transportiert und in einer pseudopodienähnlichen Ausstülpung der Zellmembran abgeschnürt [Skutelsky und Danon 1967]. Die Abschnürung und der Transport werden von Aktin-Filamenten bewerkstelligt. In Tabelle 1 ist eine Zeittafel der Erythrozytendifferenzierung *in vivo* dargestellt (nach Bonanou-Tzedaki 1990).

EPO stimuliert intensiv die DNA-, RNA- und Proteinsynthese, welche ihr Maximum im Erythroblasten erreicht. Bereits im Proerythroblasten beginnt die Synthese des Transferrin-Rezeptors, von Spektrin, Glycophorinen und Karboanhydrase. Die maximale Rate der Häm-Synthese, Transferrin-Bindung und Eisenaufnahme geht der maximalen Hämoglobin-Synthese ca. 10-20 h voraus. Am Ende des Erythroblastenstadiums fällt die DNA- und RNA-Synthese steil ab. Es werden fast nur noch Hämoglobin-Transkripte translatiert, die jetzt die überwältigende Mehrheit der vorhandenen mRNA darstellen, deren Synthese und Translation aber schon im CFU-E-Stadium beginnt. Ab dem späten Erythroblastenstadium verschwindet auch der EPO-Rezeptor d.h. für die weitere Entwicklung ist EPO nicht mehr nötig [Koury und Bondurant 1988].

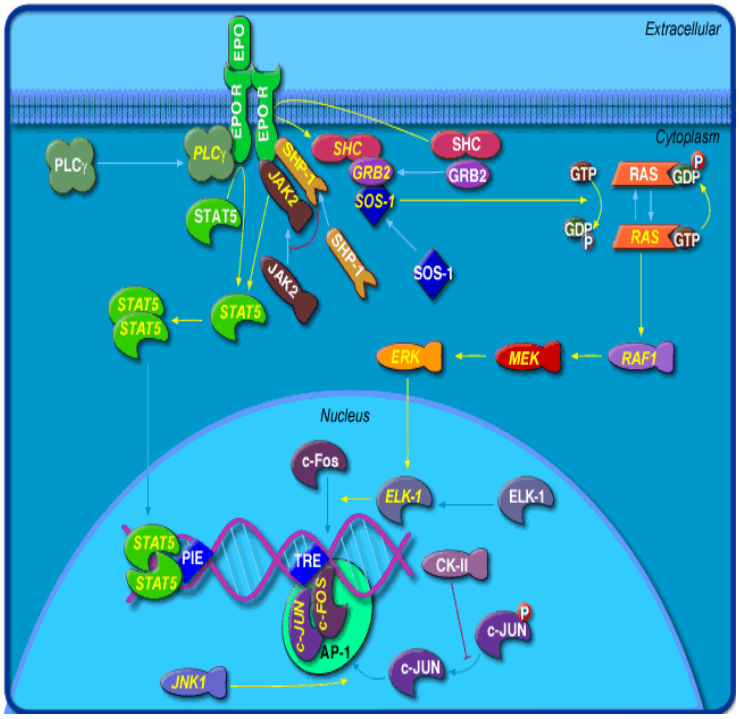


Bild 2: Signalübertragung am EPO-Rezeptor: Nach der Aktivierung des Rezeptors durch EPO erfolgt die Signalübertragung über den JAK-STAT-Weg und außerdem, vermittelt durch den Guanylat-Austauschfaktor SOS1, über eine Aktivierung des MAP-Kinase-Weges sowie über Phospholipase C. Im Bild nicht dargestellt ist die Aktivierung der PI3-Kinase. Alle Signalwege regulieren letztendlich die Transkription spezifischer Gene.
Quelle: www.biocarta.com

Mit Beginn der Reifung zum Reticulozyten wird die Synthese einer speziellen Lipoxygenase angeschaltet. Dieses Enzym spielt eine wesentliche Rolle beim Abbau subzellulärer Organellen [Rapoport und Schewe 1986]. Wichtige Transkriptionsfaktoren der erythroiden Differenzierung sind TAL1, LMO2, GATA2, später NFE2, EKLF [Koury et al. 2002].

Die Bindung von EPO an seinen membranständigen Rezeptor löst in der Zelle eine Signalkaskade aus, an deren Ende die Transkription von Genen stimuliert wird, deren Genprodukte entweder für die weitere Differenzierung wichtig bzw. für die eigentliche Funktion des Erythrozyten von Bedeutung sind. Nach Bindung seines Liganden bildet der EPO-Rezeptor ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten. An jedem Rezeptormonomer ist je ein JAK2-Molekül assoziiert. Nach der Dimerisierung der Rezeptoren werden die JAK2-

Moleküle so positioniert, dass sie sich gegenseitig phosphorylieren können. Diese Phosphorylierung befähigt JAK2 den EPO-Rezeptor an verschiedenen Tyrosinen seines zytoplasmatischen Teils zu phosphorylieren. Durch diese Phosphorylierung werden Bindungsstellen für weitere Signalproteine, zum Beispiel die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase, geschaffen. Über den PI3-Kinase-/AKT-Weg wird der Eintritt der Zellen in die Apoptose blockiert. Weiterhin bietet phosphoryliertes JAK2 eine Bindestelle für SHC2, welches wiederum eine Platform für einen Komplex aus den Adaptorproteinen GRB2, SOS und RAS bildet, woraufhin der MAP-Kinase-Weg aktiviert und die Proliferation der Zellen stimuliert wird. Aktiviertes JAK2 phosphoryliert außerdem STAT5, das daraufhin dimerisiert, als aktivierter Transkriptionsfaktor in den Zellkern einwandert und dort die Transkription erythrozytenspezifischer Gene bewirkt. Die Signalübertragung am EPO-Rezeptor ist in Bild 2 dargestellt.

1.2.1. Die Erythroide Differenzierung CD34-positiver Zellen im Zellkulturmodell

Die Methoden zur Isolierung CD34-positiver hämatopoetischer Zellen wurden ursprünglich entwickelt um Transplantate für Leukämiepatienten zu gewinnen. CD34-positive Zellen können erstens aus Nabelschnurblut oder zweitens direkt aus Knochenmark aufgereinigt werden. Drittens können durch Verabreichung von G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) CD34+-Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert werden. Durch Leukapherese mit anschließender immunomagnetischer Sortierung können CD34+- Zellen zu einer Reinheit von ca. 90% angereichert werden.

Obwohl die eigentliche hämatopoetische Stammzelle CD34-negativ ist, kann durch die Transplantation CD34-positiver Zellen, die die frühesten Differenzierungsstufen darstellen, wieder ein vollständiges blutbildendes System rekonstituiert werden. Das bedeutet entweder, dass durch die Stimulierung mit G-CSF ursprünglich CD34-negative Zellen CD34 exprimieren oder dass ein Teil der CD34+-Zellen wieder zu CD34-negativen dedifferenzieren kann. Nach SEROTEC exprimieren auch verschiedene frühe Differenzierungsstufen CD34, nämlich CFU-GEMM und BFU-E, weiterhin CFU-GM (*colony forming unit granulocyte-macrophage*) sowie die frühesten Formen der lymphatischen Differenzierungslinie. Daher ist das gewonnene Zellmaterial ein Gemisch dieser Zellen. Dazu kommt noch die bereits erwähnte, mögliche Ausdehnung der CD34-Expression durch G-CSF auf die ursprünglich CD34-negativen hämatopoetischen Stammzellen.

Das CD34-positive Zellmaterial kann in Kultur durch Zugabe von EPO zur Differenzierung in die erythroide Linie stimuliert werden. Neben EPO werden SCF, IL3 oder IL6 sowie weitere Wachstumsfaktoren und Zytokine in Form von fötalem Kälberserum (FCS) zugegeben. Während EPO die Liniendetermination bewirkt, sichern die anderen Faktoren vor allem in den frühen Entwicklungsstadien das Überleben und die Proliferation der Zellen.

1.3. maligne Hämatopoese

Differenzierungsvorgänge sind komplexe Prozesse, die einer stetigen Überwachung bedürfen, insbesondere dann, wenn sie noch mit vielen Mitosezyklen verbunden sind wie bei der Reifung von Erythrozyten. Kommt es während dieser Mitosen zu Mutationen in Genen, die für regulatorische Proteine kodieren, kann eine Transformation dieser Zellen die Folge sein, d.h. die Zellen wachsen unkontrolliert, ohne dass es zu einer weiteren Reifung und zum Erreichen der eigentlichen Funktionalität kommt. Eine Leukämie ist die Folge. Über den generellen Verlauf der Entstehung einer Leukämie, der Leukämogenese, gibt es zurzeit keine einheitliche Vorstellung. Ein etabliertes Modell der Leukämogenese sieht den leukämischen Phänotyp als eine Reflexion der Ebene innerhalb der hämatopoetischen Hierarchie, auf der der leukämogene genetische Schaden eintritt. Ein neueres Modell hingegen besagt, dass der leukämogene genetische Defekt in der Regel auf der Ebene der unreifen hämatopoetischen Stammzellen stattfindet. In welchen Zellreihen sich der Defekt dann durchsetzen kann, hängt wahrscheinlich davon ab, ob er mit dem Überleben der differenzierteren Zellen vereinbar ist oder ob der Defekt mit einem bestimmten Differenzierungsprogramm assoziiert ist [Haase 2003].

1.4. Die Chronische Myeloische Leukämie (CML)

Die CML ist durch eine Chromosomentranslokation t(9;22)(q34;q11), dem so genannten Philadelphia-Chromosom gekennzeichnet (Bild3). Diese Translokation führt zur Fusion von Teilen der Gene für BCR (Chromosom 22) und ABL (Chromosom 9), wobei es bezüglich der konkreten Fusionsstelle verschiedene Varianten gibt. BCR ist ein GTPase aktivierendes Protein und stimuliert die GTPase-Aktivität von RAC1 und CDC42. BCR besitzt außerdem eine Serin/Threoninkinase-Aktivität [genecards]. ABL (*v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*) ist eine Tyrosinkinase, die als Wildtyp nur im Kern lokalisiert ist [McWhirter und Wang 1991].

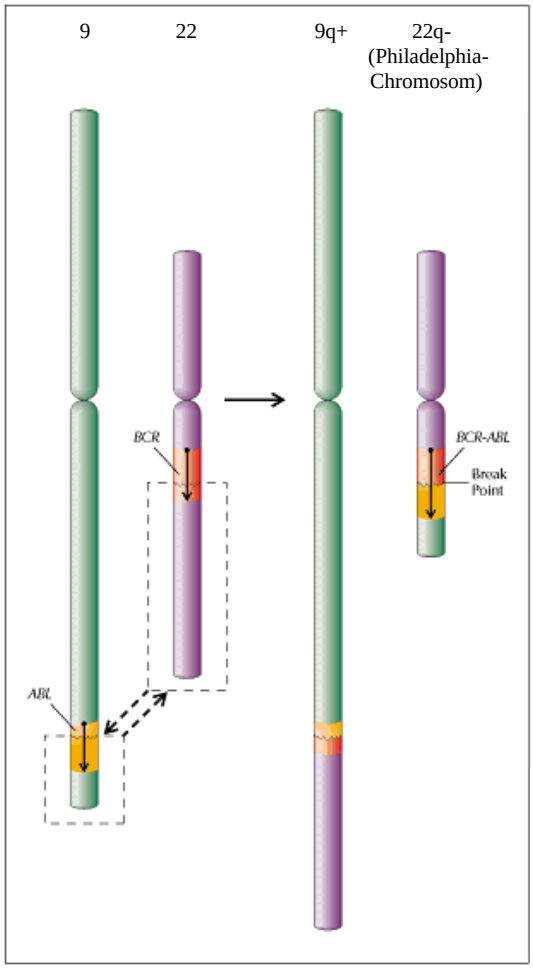


Bild 3: Das Philadelphia-Chromosom mit der BCR-ABL-Translokation entsteht durch einen reziproken Strangaustausch zwischen den Chromosomen 9 und 22 wobei es verschiedene Varianten (Fusionsstellen) gibt. Es entsteht ein Fusionsprotein aus BCR und ABL, das immer die katalytische Domäne der ABL-Kinase enthält, die nun konstitutiv aktiv ist.
Quelle: http://gslc.genetics.utah.edu/units/disorders/karyotype/reciprocal.cfm

ABL ist an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt nämlich an der Zellzykluskontrolle [Kipreos und Wang 1990], an der Zellantwort auf genotoxischen Stress [Yuan et al. 1999] und an der Weiterleitung von Informationen aus der zellulären Umgebung über den Integrin-Weg [Lewis und Schwartz 1998]. Die Aktivität von ABL wird durch das Retinoblastomprotein und p53 reguliert [Welch und Wang 1993; Wen et al. 1996]. Durch die Fusion entsteht eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, wodurch die Zellen immer wieder in den Mitosezyklus eintreten [Ben-Neriah et al. 1986]. Die Weiterleitung des Signals der BCR-ABL-Kinase wird durch GRB2 und RAS vermittelt [Sawyers et al. 1995; Gishizky et al. 1995]. Die typische Philadelphia-Translokation wird bei etwa 90% aller als CML diagnostizierten Patienten gefunden. Bei den verbleibenden 10% der Patienten kann durch konventionelle Zytogenetik kein Philadelphia-Chromosom nachgewiesen werden. Bei etwa einem Drittel der Fälle dieser Gruppe ist es möglich, mittels molekularbiologischer Methoden (FISH, PCR) die BCR-ABL-Fusion zu erkennen. Etwa 7% der klinisch als CML diagnostizierten Patienten sind BCR-ABL-negativ [Bennett et al. 1994]. Die Philadelphia-Translokation ist ausschließlich auf das hämatopoetische System beschränkt [Hagemeijer 1987].

Die BCR-ABL-Fusion hat nur dann eine CML zur Folge, wenn sie in einer hämatopoetischen

Zelle einer bestimmten Differenzierungsstufe auftritt. Dabei scheint es sich um eine pluripotente Stammzelle auf einer sehr frühen Stufe der Hämatopoese zu handeln. Dies zeigt sich daran, dass aus dieser Zelle myeloische, erythroide, megakaryozytische und lymphatische Vorläuferzellen entstehen können [Hochhaus 2001]. Ein Teil der Zellen verbleibt in der G_0-Phase [Holyoake et al. 1999]. Der Verlauf der CML untergliedert sich in drei Phasen nämlich in die chronische Phase, die Akzelerationsphase und die Blastenphase. In der chronischen Phase behalten die Vorstufen ihre Fähigkeit zur Differenzierung, wobei jedoch die myelopoetischen, megakaryopoetischen und erythropoetischen Reihen bevorzugt werden. Der maligne Klon ist also nicht auf einer bestimmten Differenzierungsstufe arretiert sondern unterhält einen sich regenerierenden Pool BCR-ABL-positiver pluripotenter Stammzellen, die den totipotenten Stammzellen der Hämatopoese sehr nahe stehen und aus denen differenziertere Zellen entstehen können. Die BCR-ABL-Stammzellen sind nur zytogenetisch und nicht durch ihren Immunphänotyp sicher von den gesunden Stammzellen zu unterscheiden [Hochhaus 2001]. Die chronische Phase ist durch eine Leukozytose gekennzeichnet (>30000/µl), da es bereits zu einer Ausschwemmung maligner Zellen aus dem Knochenmark kommt. Die chronische Phase ist therapeutisch gut zu beeinflussen und dauert im Median vier bis fünf Jahre. Die Erkrankung tritt in die Akzelerationsphase über, wenn sich Resistenzen gegen die Initialtherapie entwickelt haben und sich daher die Leukozytose verschlimmert. Im Verlauf der Akzelerationsphase entstehen häufig weitere Chromosomenabberationen wie zum Beispiel Trisomie 8 oder andere Mutationen zum Beispiel in den Genen von p53, pRb, p16, RAS oder MYC. Dabei wird eine allgemeine genomische Instabilität beobachtet [Thijsen et al. 1999], die zum Auftreten von immer neuen Phänotypen mit Selektionsvorteil, d.h. vor allem kürzerem Zellzyklus, und damit in die Blastenphase führt. Man vermutet, dass diese genomische Instabilität ursächlich mit BCR-ABL verbunden ist, da BCR-ABL die Proteolyse des DNA-Reparaturproteins DNA-PKcs stimuliert [Deutsch et al. 2001]. Die Blastenphase oder Blastenkrise wird erreicht, wenn es zu einer massiven Zunahme blastärer Phänotypen (myeloisch, megakaryoblastär, monoblastär, erythroblastär, basophil, eosinophil, B- oder T-lymphoblastisch, immunphänotypische Mischformen) kommt, weil die Differenzierung jetzt in diesem Stadium arretiert ist [Hochhaus 2001].

Obwohl die BCR-ABL-Translokation als Ursache der CML bekannt ist, versteht man die zugrunde liegenden Mechanismen nur unvollständig. Die Schwierigkeiten der Fassbarkeit der CML-Zellbiologie liegen tatsächlich gerade darin begründet, dass die Unterschiede zur normalen Hämatopoese oft nur gering erscheinen [Thijsen et al. 1999]. Die Dowding-Hypothese besagt, dass die Tendenz der CML-Stammzellen zur Ausdifferenzierung geringer

ist als bei gesunden Stammzellen. Dies führt zunächst zu deren Anreicherung und über diesen Umweg schlussendlich doch zu einer Expansion differenzierterer BCR-ABL-positiver Zellen [Dowding et al. 1986]. Die Hypothese der diskordanten Reifung besagt, dass die CML-Stammzellen relativ zu gesunden hämatopoetischen Stammzellen eine geringfügig gesteigerte Proliferationsrate haben, wofür auch eine beschleunigte Telomerverkürzung der BCR-ABL-positiven Zellen spricht [Brummendorf et al. 2000]. Die eigentliche Expansion vermutet man in den späteren Entwicklungsstadien, wo es zu zusätzlichen Zellteilungen bei verzögerter Reifung kommt [Clarkson et al. 1997; Gordon und Goldman 1996; Verfaillie 1998]. Genauer gesagt, interpretiert man die Beobachtungen so, dass das Zytoplasma schneller reift als der Kern. Das heißt, während das Zytoplasma schon Eigenschaften späterer Stadien hat, verhalten sich die Kerne zunächst noch so wie in den früheren, stark proliferierenden Entwicklungsstufen, um dann später aber doch noch auszureifen. Damit erklärt man auch den Übertritt in die Blastenkrise. Da sich unreife Differenzierungsstufen schneller vermehren als reifere, nehmen die unreiferen immer mehr zu, so dass schließlich die Blasten als unreifste Form dominieren [Gordon und Goldman 1996].

Die späteren Stadien, die hinsichtlich ihrer Differenzierung eindeutig festgelegt sind, sind vermutlich weniger empfänglich für wachstumsregulierende Signale [Clarkson et al. 1997] und das je nach Differenzierungslinie in unterschiedlichem Ausmaß. Deswegen sind die verschiedenen hämatopoetischen Entwicklungslinien bei den BCR-ABL-positiven Zellen unterschiedlich stark vertreten. Unklar ist dabei besonders das Schicksal der erythropoetischen Entwicklungslinie. Da es im Krankheitsverlauf nicht zu einer Anreicherung reifer Erythrozyten kommt, schlussfolgern manche Autoren, dass aus den CML-Vorläufern keine reifen Erythrozyten gebildet werden, weil der Reifeprozess auf einem früheren Stadium arretiert wird [Clarkson et al. 1997]. Andere führen dieses Phänomen darauf zurück, dass es bei den erythrozytären Vorstufen zu einer verfrühten Kernextrusion kommt und daher die weitere Proliferation und Reifung unterbunden ist [Verfaillie 1998]. Die Kernextrusion wird ja durch filamentäre Strukturen des Zytoplasmas bewirkt, welches gemäß der Hypothese der diskordanten Reifung schneller reift als die Kerne, die eigentlich noch mitotisch aktiv wären.

Ferner wurde beobachtet, dass manche BCR-ABL-positiven Zelllinien *in vitro* eine erhöhte Apoptoseresistenz bei Wachstumsfaktorentzug haben. Diesem Befund wird jedoch wenig Bedeutung für die Pathogenese der CML zugesprochen, da der totale Entzug von Wachstumsfaktoren prinzipiell unphysiologisch ist [Clarkson et al. 1997; Gordon und Goldman 1996]. CML-Zellen weisen ein verändertes Expressionsmuster verschiedener Zytokine auf, was eine autokrine Stimulation ihres Wachstums nahe legt [Ferrajoli et al. 1996]. So wurde zum

Beispiel eine erhöhte Produktion des hämatopoetischen Wachstumsfaktors IL1beta in CML-Progenitoren nachgewiesen. In der Blastenkrise, nicht aber in der chronischen Phase, kommt es zu einer abnormalen konstitutiven Expression von IL1beta, IL6, GM-CSF und LIF durch Stromazellen und dadurch zu einer autokrinen Stimulation der CML-Zellen [Ferrajoli et al. 1996]. Die Ausschwemmung unreifer Stadien ins periphere Blut geht mit einer gestörten Adhäsion der BCR-ABL-positiven Zellen an die extrazelluläre Matrix des Knochenmarksstromas einher. Möglicherweise ist eine Phosphorylierung von beta-1-Integrinen durch BCR-ABL für diesen Effekt verantwortlich, denn das Adhäsionsverhalten kann bei Applikation von STI571 normalisiert werden. Andererseits wurde gezeigt, dass BCR-ABL die Adhäsion hämatopoetischer Zellen an Fibronektin *in vitro* verstärkt und diese Adhäsion die Proliferation fördert [Kramer et al. 1999]. Der scheinbare Adhäsionsdefekt und die Ausschwemmung rühren nach Meinung dieser Autoren dann eher von einer begrenzten Verfügbarkeit von Adhäsionsstellen im Knochenmark her. Entscheidend dabei ist jedenfalls die Fähigkeit der malignen Zellen, sich auch bei Verlust der Stromabindung im Knochenmark weiter zu vermehren [Kramer et al. 2001; Bazzoni et al. 1996].

1.4.1. Therapie der CML

Obwohl mit Chemotherapeutika komplette hämatologische und zytogenetische Remissionen erreicht werden können, bleibt BCR-ABL immer noch durch PCR nachweisbar. Die residuellen BCR-ABL-positiven Zellen haben die Kapazität, ein Rezidiv auszulösen [Reiter et al. 1998]. Eine vollständige Heilung der CML ist nur durch allogene Knochenmarktransplantation möglich [Fefer et al. 1979]. Wichtige Therapeutika sind Hydroxyurea, ein spezifischer Inhibitor der Ribonukleotidreduktase, Interferon alpha (INFalpha), Cytosinarabinosid (AraC) und STI571, wobei insbesondere INFalpha [Allan et al. 1995] und STI571 die erwähnten Remissionen induzieren können. Der genaue Wirkungsmechanismus von INFalpha ist unbekannt. Es können sowohl direkt antiproliferative Mechanismen als auch indirekte Wirkungen, welche die Wachstumsregulation durch Stromazellen beeinflussen, unterschieden werden. Darüber hinaus scheint die Aktivierung des Immunsystems eine Rolle zu spielen [Hochhaus 2001]. Es wurde festgestellt, dass die Expression von Myeloblastin in allen Leukozyten, inklusive der BCR-ABL-positiven, angeschaltet wird. Mit INFalpha behandelte Patienten entwickeln regelmäßig Myeloblastin-spezifische zytotoxische T-Zellen, was auf eine Eliminierung der CML-Zellen durch eine zelluläre Immunantwort hindeutet.

STI571 (Glivec, Imatinib) ist ein Inhibitor der Tyrosinkinase-Aktivität von BCR-ABL. Es ist eines der ersten Medikamente, die zielgerichtet für eine bestimmte molekulare Funktion entwickelt wurden. Druker und Mitarbeiter [Druker et al. 1996] zeigten, dass STI571 das Wachstum von CML-Zelllinien und BCR-ABL-positiven Kolonien selektiv unterdrückt. Trotzdem hemmt STI571 auch noch weitere Tyrosinkinasen, nämlich ABL, PDGFR, ARG, KIT sowie zwei weitere Fusionsproteine, nämlich TEL-ABL und TEL-PDGFR [Buchdunger et al. 2000; Druker und Lydon 2000]. STI571 eliminiert die CML-Zellen offensichtlich durch direkte Wachstumsinhibition und nicht durch T-Zell-Aktivierung wie INFalpha, weil STI571 im Gegensatz zu INFalpha keine Proliferation Myeloblastin-spezifischer T-Zellen induziert [Burchert et al. 2003].

AraC ist bei CML in der Regel Bestandteil einer Kombinationstherapie und wird auch zur Behandlung anderer Leukämien, insbesondere des myelodysplastischen Syndroms (MDS) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) eingesetzt. AraC bewirkt einen Zellzyklusarrest und letztendlich den Eintritt der leukämischen Zellen in die Apoptose. Vorher werden jedoch Differenzierungsvorgänge induziert.

Antisensetherapie gegen BCR-ABL wurde versucht in Maus [Szczylik et al. 1991] und Mensch [Clark et al. 1999], doch bisher ohne zufrieden stellende Ergebnisse. Allerdings konnten die Studien bisher nur an Patienten vorgenommen werden, die bereits die Akzelerationsphase bzw. Blastenkrise erreicht hatten, wo die Therapieaussichten ohnehin schlecht sind. Weiterhin wurde versucht, die Expression von Genen, die im Signalfluss BCR-ABL nachgeschaltet sind, zu unterdrücken. Ein Beispiel ist MYB [Gewirtz 1999], das unter anderem die Expression von KIT und CD34 zu regulieren scheint. Auf die verminderte MYB-Expression reagieren BCR-ABL positive Zellen stärker als normale hämatopoetische Stammzellen.

Die stabile genomische Integration und Expression eines DNA-Fragments, das für ein BCR-ABL-Antisense-Transkript kodiert, brachte in Zellkultur eine 5-10 fache Reduktion der BCR-ABL-mRNA und eine um 3 bis 4 Größenordnungen geringere Tumorigenität *in vivo*.

Viele Malignome können mit bestimmten Chemikalien zum Austreten aus dem Mitosezyklus und zur Fortführung der unterbrochenen Differenzierung gezwungen werden. Auf diesem Prinzip beruht die Wirksamkeit vieler Krebstherapeutika. Neben der zytostatischen Wirkung bewirken manche dieser Stoffe, dass die Tumorzellen ihr unterbrochenes Differenzierungsprogramm wieder aufnehmen und fortsetzen. Eine ganze Reihe solcher Substanzen werden daher auch in der künstlichen Differenzierung leukämischer Zellen zu Forschungszwecken eingesetzt. Zum Beispiel ist allgemein anerkannt, dass Doxorubicin, AraC, 6-Thioguanin,

Mitomycin, 5-Azacytidin, Hämin, DMSO, HMBA (Hexamethylbisacetamid), CSF, ATRA (all-trans-Retinsäure), IFNgamma und Natriumbutyrat die erythroide Differenzierung von CML- und AML-Zellen stimulieren.

1.4.2. Die künstliche Stimulierung der erythroiden Reifung von K562

K562 ist eine Zelllinie die aus einer CML in Blastenkrise etabliert wurde und die BCR-ABL-Translokation trägt [Lozzio und Lozzio 1975]. K562 hat Eigenschaften einer pluripotenten hämatopoetischen Progenitorzelle und exprimiert Marker der erythroiden, granulozytischen, monozytischen und megakaryozytischen Differenzierungsreihen [Leary et al. 1987]. K562 kann mit AraC , [Luisi-DeLuca et al. 1984], Butyrat oder Hämin aber nicht mit EPO zur Differenzierung in der erythroiden Reihe stimuliert werden, da der Rezeptor nicht exprimiert wird [Rutherford et al. 1979].

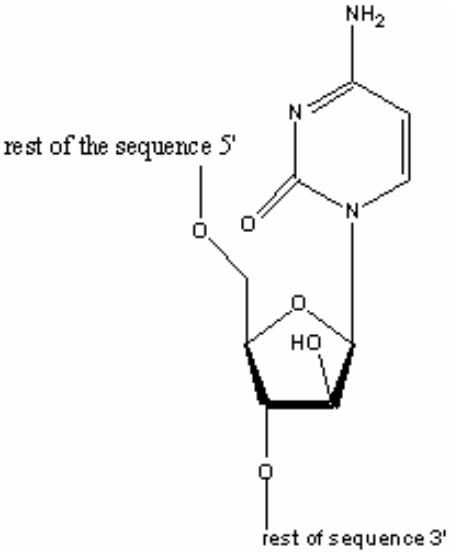


Bild 4: AraC ist ein Nukleosidanalogon des Cytosins, wobei die Desoxyribose durch Arabinose ersetzt ist. AraC wird in der Zelle zum Nukleosid-Triphosphat umgesetzt und in die DNA eingebaut. Dort destabilisiert es die Okazaki-Fragmente und bewirkt einen Zellzyklusarrest in der S-Phase.
Quelle: http://www.mcrc.com

Mit TPA (Phorbolester) hingegen kann in K562 die Differenzierung in der Megakaryozyten-Reihe ausgelöst werden [Tetteroo et al. 1984].

Das Zytostatikum AraC (Bild 4) ist ein Nukleosidanalogon des Cytosins, bei dem die Ribose durch Arabinose ersetzt ist. AraC wird in der Zelle zum Triphosphat phosphoryliert und in die DNA eingebaut. AraC destabilisiert die Okazaki-Fragmente und arretiert die Zellen in der S-Phase [Gmeiner et al. 1998]. Es wurde gezeigt, dass nicht nur der zytostatische Effekt allein die Differenzierung bewirkt, sondern dass die durch DNA-Schädigung stimulierten Proteinkinasen ATM/ATR essentiell für die Hämoglobinsynthese sind [Takagaki et al. 2005]. Die Induktion der Differenzierung durch AraC ist irreversibel und die Zellen verlieren dabei die

Fähigkeit zur Selbsterneuerung [Luisi-DeLuca et al. 1984]. AraC stimuliert sowohl die Häm-Synthese als auch die Expression der Hämoglobine alpha, gamma, epsilon und zeta sowie die Produktion von Glycophorinen [Watanabe et al. 1985].

Butyrat wirkt bei Konzentrationen im Millimolar-Bereich als Inhibitor der Histondeacetylasen [Kruh 1982]. Durch die resultierende Hyperacetylierung der Histonproteine ist eine effektive Verpackung des Chromatins zu Metaphase-Chromosomen unmöglich und das Chromatin bleibt dekondensiert. Der Zellzyklus wird beim Übertritt von der S-Phase in die G2-Phase arretiert. Butyrat induziert die Zelldifferenzierung in vielen Tumorzelllinien und die Vermutung liegt nahe, dass dem ein bisher unbekannter allgemeiner Wirkungsmechanismus zugrunde liegt [Witt et al. 2000]. Witt et al. zeigten außerdem, dass der RAS/ERK-Signalweg involviert ist. ERK und JNK waren nach Butyrat-Behandlung weniger stark phosphoryliert, p38 hingegen stärker [Witt et al. 2000]. K562 produzieren bei Butyrat-Behandlung hauptsächlich Hämoglobin Gower, das aus 2 Zeta- und zwei Epsilon-Ketten besteht sowie Hämoglobin Portland aus 2 Gamma- und 2 Zeta-Ketten [Cioe et al. 1981].

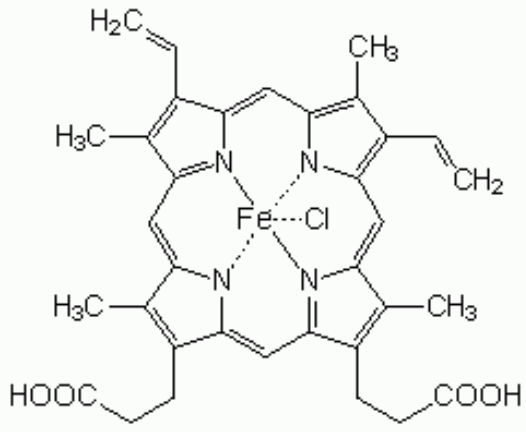


Bild 5: Hämin ist ein Derivat des Häms mit $Fe3^+$ statt $Fe2^+$ im Zentrum. Hämin bewirkt eine Erhöhung der Hämoglobin-Synthese in CML-Zellen.
Quelle: www.emdbiosciences.com/product/3741

Hämin ist ein oxidiertes Häm mit $Fe3^+$ statt $Fe2^+$ im Zentrum (Bild 5). Es fördert die Differenzierung von Erythroleukämien [Ross und Sautner 1976; Mager und Bernstein 1979; Bonanou-Tzedaki et al. 1981] aber auch von Zellen nichthämatopoetischer Herkunft wie zum Beispiel Präadipozyten, was auf einen generellen Effekt hindeutet. Hämin bewirkt eine 3- bis 5-fache Erhöhung des Gehalts an Globin-mRNAs durch verstärkte Transkription [Charnay und Maniatis 1983], wobei hauptsächlich Hämoglobin X aus 2 Epsilon- und 2 Gamma-Ketten und ein Hämoglobin aus 4 Gamma-Ketten gebildet werden [Cioe et al. 1981]. In den Enhancer-Regionen der humanen Hämoglobin-Gene befinden sich regulatorische Elemente, die aktiviert durch Hämin die Transkription anschalten [Ney et al. 1990]. Dabei spielt die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-E2 in dieser DNA-Region eine wichtige Rolle [Ney et

al. 1993]. Die Synthese von BCR-ABL wird unter dem Einfluss von Hämin verringert, was einen verringerten Phosphorylierungsstatus der BCR-ABL-Substratproteine zur Folge hat [Richardson et al. 1987]. Hämin bewirkt also keinen generellen Zellzyklusarrest, sondern nur eine Akkumulation von Hämoglobin [Lowenhaupt und Lingrel 1979] wie in einer murinen AML-Zelllinie gezeigt wurde. Die Zellteilung wird nicht beeinflusst, Zellteilung und Hämoglobinsynthese sind hier unabhängig regulierte Vorgänge. Der Effekt von Hämin auf K562 ist im Gegensatz zu AraC reversibel [Luisi-DeLuca et al. 1984].

1.5. Transkriptom und Proteom

Die Eigenschaften einer Zelle werden durch die Gesamtheit der in ihr vorhandenen Proteine (Proteom) bzw. deren Aktivität bestimmt, weil fast alle biochemischen Reaktionen durch Proteine katalysiert werden und die strukturbildenden Elemente der Zelle überwiegend aus Proteinen bestehen. Folglich sind Differenzierungsvorgänge ebenso wie pathologische Vorgänge mit Veränderungen des Proteoms verbunden. Diese Veränderungen können auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Die Regulation auf Transkriptionsebene ist von zentraler Bedeutung, weil dies für die Zelle am ökonomischsten ist. Weiterhin kann die Stabilität einer mRNA und ihre Translatierbarkeit reguliert werden. Auch auf das fertige Protein wirken regulierende Mechanismen. Wie bei der mRNA kann auch die Halbwertszeit der Proteine variiert werden. Proteine können in ihrer Aktivität modifiziert werden, indem sie zum Beispiel durch Inhibitoren oder sterische Veränderungen inaktiv gehalten werden. Die Übertragung funktioneller Gruppen wie Methyl-, Acetyl- oder Phosphatresten auf die Seitenketten bestimmter Aminosäuren ist ebenfalls ein wichtiger Mechanismus zur Steuerung der Aktivität der betroffenen Proteine.

Die Übertragung von Phosphatresten auf die Seitenketten von bestimmten Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten ist eine der bedeutendsten posttranslationalen Modifikationen bei Proteinen. Diese Phosphorylierungen spielen in der Signaltransduktion eine besondere Rolle. Durch Phosphorylierung werden Enzyme aktiviert oder deaktiviert sowie Bindestellen für andere Proteine geschaffen und so der Aufbau von Signalkomplexen ermöglicht. Alle grundlegenden Lebensäußerungen einer Zelle, einschließlich Differenzierung und pathologischer Prozesse, sind mit Änderungen des Phosphorylierungs-Status bestimmter Proteine verbunden. Die Protein-Phosphorylierung ist daher Gegenstand intensiver Forschung.

1.6. Microarrays

Um Veränderungen des Transkriptoms oder des Proteoms in ihrer Gesamtheit zu erfassen, benötigt man eine Methode, welche die parallele Quantifizierung vieler mRNAs bzw. Proteine einer biologischen Probe ermöglicht. Die wichtigste Methode in dieser Arbeit ist deshalb die Anwendung von Microarrays. Die Grundidee dieser Technologie besteht darin, dass auf einer festen Unterlage an definierten Orten Sonden-Moleküle abgelegt sind, die eine bestimmte Art Molekül, welches nachgewiesen werden soll (Target), spezifisch binden. Diese Bindung kann zum Beispiel auf der Doppelstrangbildung revers komplementärer Nukleinsäuren beruhen oder auf Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen. Weitere Möglichkeiten sind die Bindung von Proteinen an niedermolekularen Substanzen oder Nukleinsäuren. Dazu muss das Array mit der biologischen Probe unter geeigneten physikochemischen Bedingungen inkubiert werden, so dass die spezifische Bindung zwischen Sonden-Molekül und Target zustande kommt, unspezifische Bindungen aber möglichst ausgeschlossen werden. Um das gebundene Target nachweisen zu können, muss es entweder direkt markiert sein oder die Möglichkeit bieten, dass nach der eigentlichen Inkubation in einem zweiten Schritt ausschließlich die gebundenen Target-Moleküle markiert werden. Häufig benutzte Marker sind radioaktive Isotope, Fluoreszenzfarbstoffe und Enzyme. Während die Isotope direkt in die Target-Moleküle eingebaut werden können, müssen die Fluoreszenzfarbstoffe und Enzyme an die Target-Moleküle angehängt werden. Für eine solche Kopplung eignet sich zum Beispiel das Streptavidin-Biotin-System. Dabei wird das Target zuerst mit dem kleinen und wenig störenden Biotin-Molekül verbunden, Fluoreszenzfarbstoff oder Enzym werden chemisch an Streptavidin gebunden. Wegen der extrem hohen Affinität des Streptavidins zum Biotin wird schließlich das Marker-Molekül spezifisch an das Target gebunden.

Nach der Art der Sonden-Moleküle unterscheidet man grundsätzlich DNA- und Protein-Arrays. Diese unterteilen sich dann noch in weitere Untergruppen. Bei den DNA-Microarrays gibt es cDNA- und Oligo-Arrays. Auf cDNA-Arrays werden cDNAs, die vorher in bakteriellen Klonen amplifiziert wurden, aufgebracht. Bei Oligoarrays können fertige synthetische Oligonukleotide aufgebracht werden, die Oligonukleotide können aber auch *in-situ* synthetisiert werden. Letztere Vorgehensweise benutzt AFFYMETRIX zur Herstellung seiner Arrays wie des hier verwendeten HG-U133A.

Da das gesamte Proteom und dessen Veränderungen bei zellulären Prozessen sehr komplex sind, versucht man auch hier neue Technologien zu entwickeln, die die parallele

Untersuchung vieler Proteine bzw. ihrer posttranslationalen Modifikationen ermöglicht. Protein-Arrays basieren allgemein auf der spezifischen Bindung zwischen verschiedenen Proteinen bzw. zwischen Proteinen und anderen Molekülen wie Nukleinsäuren, Metaboliten, Pharmaka und anderen. Besonders die hochspezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung wird häufig zur Konstruktion von Microarrays ausgenutzt. Mit Antikörpern speziell gegen posttranslationale Modifikationen in bestimmten Proteinen können die Proteinmoleküle, die diese Modifikationen tragen, von den nicht modifizierten unterschieden werden. Die Phosphorylierung als besonders wichtige Protein-Modifikation hat eine große Bedeutung in der zellulären Signalverarbeitung. Neben der Massenspektrometrie sind Microarrays mit gespotteten phosphorylierungsspezifischen Antikörpern eine viel versprechende Methode zur Untersuchung des Phosphoproteoms. Der Vorteil der Microarrays gegenüber der Massenspektrometrie liegt dabei vor allem im geringeren apparativen Aufwand und der einfacheren Datenauswertung.

1.6.1. Entwicklung eines Phosphoprotein-Microarrays im Array-Tube-Format

In Zusammenarbeit mit der Firma CLONDIAG chip technologies GmbH wurde in unserer Gruppe ein Microarray im *Array-Tube*-Format (AT) entwickelt. Dabei stellte CLONDIAG die AT-Plattform und die *Spotting*-Technik zur Verfügung. Als Sonden trägt das Array überwiegend phosphorylierungsspezifische Antikörper gegen wichtige Signalproteine. Diese Antikörper sind gegen eine bestimmte Phosphorylierungsstelle ihres Zielproteins gerichtet und erkennen diese nur wenn sie einen Phosphat-Rest trägt. Die zu spottenden Antikörper und Kontrollen wurden von uns festgelegt. Im Vordergrund stand die Idee, alle wichtigen Signalwege durch wenigstens ein beteiligtes Protein zu repräsentieren.
Es wurden bevorzugt monoklonale Antikörper verwendet, um die größtmögliche Spezifität zu sichern.

1.7. Clustern

Um die oft sehr großen Datenmengen zu bewältigen, die bei Microarray-Experimenten entstehen, werden häufig Cluster-Algorithmen angewendet. Das Clustern dient dazu, Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen zu Gruppen zu ordnen. Es gibt verschiedene Cluster-Algorithmen, deren Ergebnisse sich auch deutlich unterscheiden können. Welchen Cluster-algorithmus man auswählt, hängt von der konkreten Fragestellung ab. Hier wurden das

hierarchische Clustern und das *k-means*-Clustern angewendet.

1.7.1. Hierarchisches Clustern

Das Prinzip des hierarchischen Clusterns beruht auf folgendem Schema:

(1) Berechnung des Abstands zwischen allen Expressionskurven und Konstruktion einer Abstandsmatrix
Jede Expressionskurve befindet sich jetzt in einem separaten Cluster.
(2) Identifizierung von je zwei Clustern r und s mit minimalem Abstand zueinander
(3) Vereinigung der Cluster r und s und Ersetzung von r durch das vereinigte Cluster; Cluster s wird gelöscht und die Abstände aller resultierenden Cluster neu berechnet.
(4) Wiederholung der Schritte 2 und 3 bis die Gesamtzahl der Cluster auf 1 reduziert ist

In einem ersten Schritt werden aus allen vorhandenen Probesets immer die zwei Probesets zu Paaren geordnet, die in ihren Expressionsverläufen maximale Ähnlichkeit aufweisen. Um die Ähnlichkeit zwischen zwei Expressionsverläufen zu berechnen, muss ein mathematisch definiertes Abstandsmaß verwendet werden. Die Expressionskurven bestehen ja aus einzelnen Messpunkten, die den Verlauf bestimmen. Häufig verwendete Abstandsmaße sind zum Beispiel der pearsonsche Korrelationskoeffizient und der euklidische Abstand. Für alle weiteren Vereinigungsschritte wird eine mathematische Vereinigungsregel (*linkage rule*) benötigt. Diese Vereinigungsregel bestimmt, wie der Abstand zwischen zwei bereits bestehenden Paaren definiert wird. Wichtige Vereinigungsregeln sind „*average distance*“, „*single linkage*“ und „*complete linkage*“. Bei „*average distance*“ wird aus den zwei vereinigten Expressionskurven eine gemittelte Expressionskurve berechnet, indem aus jedem Messpunkt-Paar der Mittelwert berechnet wird. Jetzt können erneut aus allen resultierenden Expressionskurven Paare gebildet werden, indem die jeweils ähnlichsten Expressionskurven vereinigt werden usw. Bei „*single linkage*“ wird keine resultierende Expressionskurve berechnet sondern die Ähnlichkeit zwischen zwei Paaren wird durch die zwei ursprünglichen Expressionskurven aus Paar 1 und Paar 2 bestimmt, die sich am ähnlichsten sind (*nearest neighbours*). Vereinigt werden also immer die Paare, deren *nearest neighbours* sich bezüglich des verwendeten Abstandsmaßes am ähnlichsten sind. Analog werden mit „*complete linkage*“ die Paare vereinigt, bei denen die Abstände der unähnlichsten Expressionskurven (*furthest neighbours*) minimal sind. Auch in allen folgenden Schritten werden immer wieder die

ursprünglichen Expressionskurven als *nearest neighbours* bzw. *furthest neighbours* verwendet.

1.7.2. *k-means*-Clustern

Schema des *k-means*-Clusterns:

(0) Die Anzahl der Cluster muss zunächst willkürlich bestimmt werden. Die Expressionskurven werden mathematisch als Vektoren beschrieben. Der Abstand dieser Vektoren wird mit einer so genannten Kostenfunktion berechnet.
(1) Jeder Vektor wird einem dieser Cluster zugeordnet.
(2) Für jedes Cluster wird aus allen Vektoren ein gemittelter Vektor berechnet.
(3) Für jeden einzelnen Vektor wird der Abstand zu jedem der gemittelten Vektoren der verschiedenen Cluster berechnet.
(4) Jeder Vektor wird dem Cluster zugeordnet, zu dessen gemitteltem Vector er den kürzesten Abstand hat.
(5) Alle gemittelten Vektoren werden neu berechnet.
(6) Die Schritte (3) bis (5) werden solange wiederholt, bis es nicht mehr zu Umordnungen einzelner Vektoren mehr kommt.

Ein wichtiger Vorteil des k-means-Clusterns gegenüber dem hierarchischen Clustern liegt in seinen geringeren Hardware-Anforderungen. Dadurch können auch sehr große Datensätze prozessiert werden. Ein Nachteil besteht darin, dass die Anzahl der Cluster festgelegt werden muss. Bei biologischen Proben ist die Anzahl der Cluster nicht bekannt. Man clustert daher mehrmals in verschieden viele Cluster bis man zufrieden stellende Ergebnisse erhält. Die Anzahl der gewählten Cluster stellt also immer einen Kompromiss zwischen der Einheitlichkeit innerhalb eines Clusters und der Übersichtlichkeit des gesamten Projekts dar.

2. Ergebnisse

2.1. Microarray-Experimente

CD34-positive pluripotente hämatopoetische Progenitor-Zellen eines gesunden Spenders wurden mit G-CSF aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert und zusammen mit den Blutleukozyten durch Leukapherese gewonnen. Anschließend wurden die CD34-positiven Zellen immunomagnetisch angereichert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für einen Tag in IMDM-Medium mit 30% FCS, 10ng/ml SCF und 100U/ml Interleukin 6 kultiviert. Nach diesem ersten Tag wurde eine erste Probe entnommen, die im weiterem als Ausgangsmaterial oder Tag 0 bezeichnet wird. Anschließend wurde Erythropoietin zu 7 U/ml zugegeben und weitere Zellproben nach 1, 3, 6, 9, 12 und 14 Tagen entnommen und sofort die RNA präpariert. In einer zweiten Serie wurde mit dem Material eines anderen Spenders genauso verfahren aber nur an den Tagen 0, 1, 3 und 6 Proben genommen.

K562-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS kultiviert. In zwei verschiedenen Experimenten wurde mit 1 µM AraC bzw. mit 2 mM Natriumbutyrat stimuliert. Vor Beginn der Behandlung wurde jeweils eine Probe entnommen, die unter der Bezeichnung Ausgangsmaterial oder 0 Stunden geführt wird. Weitere Proben wurden nach 6, 12, 24 und 48 Stunden genommen, beim Butyrat-Experiment auch nach 96 Stunden.

Sofort nach der Probennahme wurden die total-RNAs präpariert. Aus den präparierten RNAs wurden fluoreszenzmarkierte cRNA-Proben synthetisiert und auf Microarrays vom Typ U133A der Firma AFFYMETRIX hybridisiert. Bei den Butyrat-stimulierten K562 wurden nur zu den Zeitpunkte 0, 12 und 48h Array-Daten erzeugt, von den anderen Experimenten wurden alle Proben zur Hybridisierung verwendet. Aus den nach der Hybridisierung gewonnenen Rohdaten wurde nach mehreren Prozessierungsschritten die Datentabelle erzeugt, die als Datei „CD34_AraC_But_Hemin.xls“ auf der beiliegenden CD abgelegt ist und als Ausgangsbasis für alle weiteren Schritte diente. Diese Datentabelle enthält auch Daten eines weiteren Experiments, nämlich K562, die mit 50 µM Hämin im Medium stimuliert wurden. Dieses Experiment wurde nicht von mir, sondern von einer Gruppe an der *Thomas Jefferson University* in Philadelphia durchgeführt und publiziert [Addya et al. 2004]. Die zugehörigen Array-Daten wurden von den Urhebern in der frei zugänglichen Datenbank ENTREZ/GEO_DataSets (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) unter der Zugangsnummer GSE1036 veröffentlicht und von mir unabhängig ausgewertet. Bei diesem Experiment liegen für alle

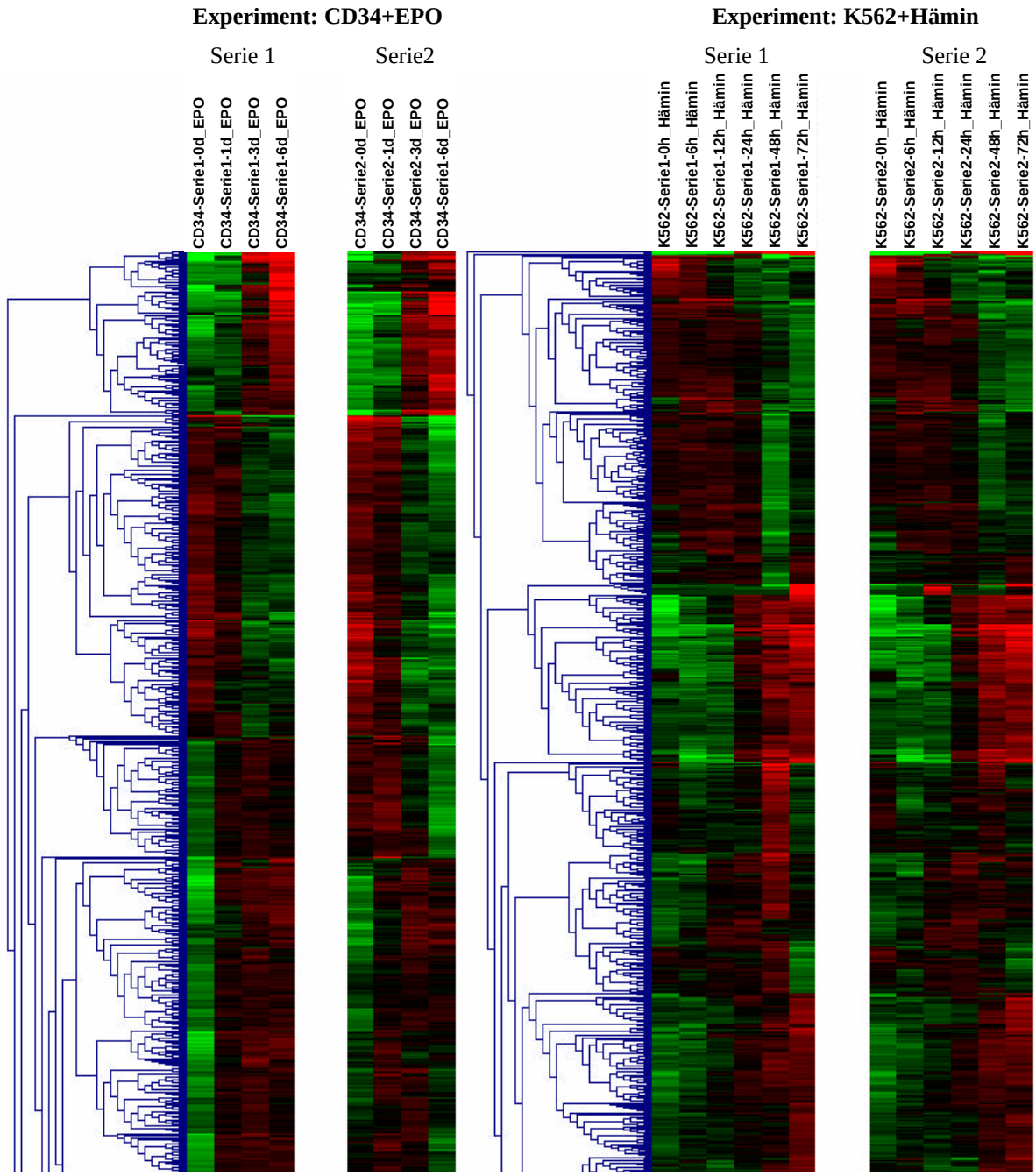
Messpunkte Duplikate vor, d.h. es wurden immer 2 Arrays hybridisiert.

Im folgendem werden die Daten, die von einem physischen Array stammen, also nur aus Zellen, die in einem Experiment zu einem bestimmten Zeitpunkt entnommen wurden, als Datensatz bezeichnet. Ein Datensatz enthält nach Abzug der verschiedener Kontrollen und Standards noch die Signale von 22238 Probesets. Ein Experiment bedeutet die Stimulierung eines Zelltyps mit einem bestimmten Agens, d.h. es gibt 4 Experimente nämlich a) die Stimulierung der CD34+-Zellen mit EPO sowie die Behandlung von K562 mit b) AraC oder c) mit Butyrat oder d) mit Hämin. Bei den CD34- und Hämin-Experimenten gibt es je 2 unabhängige Serien, d.h. diese Experimente wurden ganz oder teilweise als Duplikate angefertigt.

Die Auswertung der Array-Rohdaten erfolgte mit dem Programm MAS 5.1. Anschließend wurden die Daten einer Rangmittel-Normalisierung (*rank-mean-normalization*) unterzogen. Siehe Näheres dazu in Abschnitt 4.2.4.2. (Material und Methoden) sowie bei Kroll und Wölfl [Kroll und Wolfl 2002] und Bolstad et al. [Bolstad et al. 2003]. Im Ergebnis dieser Normalisierung beträgt der Median der Signalstärken aller in dieser Arbeit behandelten Datensätze 100 und der Mittelwert 485. Die jeweils zu einem Experiment gehörenden Datensätze wurden mit Hilfe eines dazu programmierten Datenfiltrers nach differentiell exprimierten Genen durchsucht. Weiterhin wurde nach Genen gesucht, deren Expression sich in unbehandelten K562 und unbehandelten CD34 deutlich unterscheidet (Kriterien siehe unter Material und Methoden). Im Falle der Experimente CD34+EPO und K562+Hämin, für die ganz oder teilweise Duplikate vorliegen, wurde jeweils nur eine Serie zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene herangezogen. Im Falle von CD34+EPO ist das die erste Serie (Spender 1) mit 7 Datensätzen, bei den Hämin-stimulierten K562 wurde ebenfalls die Serie 1 ausgewählt. Bei beiden Experimenten wurde die zweite Serie zu einer grafischen Darstellung der Reproduzierbarkeit der Array-Daten herangezogen (Bild 6). Im Falle duplizierter Datensätze wurden für alle Gene, die im weiterem besprochen werden, die Expressionsdaten der ersten Serie mit denen der zweiten Serie verglichen und bestätigt. Die Sortierung ergab für **CD34+EPO 2980**, für **K562+AraC 2343**, **K562+Butyrat 2355**, und für **K562+Hämin 1048** regulierte Probesets. Diese werden im folgendem alternativ auch als „differentiell exprimiert“ bezeichnet. Da manche Gene auf dem Array durch mehrere Probesets repräsentiert sind, ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene kleiner der Zahl der regulierten Probesets.

2.1.1. Reproduzierbarkeit der Array-Daten

Bild 6: Die Experimente CD34+EPO und K562+Hämin liegen teilweise (die ersten 4 Zeitpunkte bei CD34+EPO) oder ganz als Duplikate vor. Um die Reproduzierbarkeit der Array-Daten zu bestätigen, wurden die als differentiell exprimiert eingestuften Probesets hierarchisch geclustert. Dabei ordnet der Cluster-Algorithmus Probesets mit ähnlichen Expressionsverläufen waagerecht übereinander. Die Ergebnisse sind als *Heatplots* dargestellt. Der Farbcode markiert niedrige Signalstärken mit grün und starke Signale mit rot. Auf diese Weise entstehen Bereiche gleicher Farben, die sich in den beiden Serien eines Experiments wiederholen sollten.



Um einen Gesamteindruck von der Reproduzierbarkeit der Array-Daten zu bekommen, wurden die Duplikate verglichen. Nur ein Teil der Experimente liegt als Duplikat vor. Dies betrifft in beiden CD34+EPO-Serien die Zeitpunkte 0d EPO (unbehandelt), 1d, 3d und 6d EPO. Die K562+Hämin-Datensätze wurden komplett als Duplikate erzeugt.

Verglichen wurden nur differentiell exprimierte Gene. Gefiltert wurden diese immer nur in der Serie 1. Im Falle der CD34+EPO-Serien wurden nur die Probesets verwendet, die innerhalb der ersten vier untersuchten Zeitpunkte, für die Duplikate vorliegen, differentiell exprimiert sind. Dabei handelte es sich um 2014 statt 2980 Gene, die separat extrahiert wurden. Zunächst wurden alle Signale zur Basis 2 logarithmiert. Die logarithmierten Signale **eines** Probesets in **einer** Serie wurden dann um den Mittelwert aus allen logarithmierten Signalen **dieses** Probesets in **dieser** Serie zentriert. Dadurch entstanden positive und negative Werte. (Der Zweck dieser mathematischen Umformungen wird in Abschnitt 2.1.5 noch ausführlich erklärt.) Die transformierten Signalwerte der Serie 1 und 2 wurden hintereinander in ihrer zeitlichen Reihenfolge angeordnet. (Diese Struktur findet sich auch in den in Bild 6 dargestellten *Heatplots* wieder.) Anschließend wurden die Daten hierarchisch geclustert. Dadurch wurden Gene mit ähnlichem Expressionsverlauf innerhalb des gesamten Experiments zusammengeordnet. Als Abstandsmaß wurde der euklidische Abstand benutzt und „*average distance*“ als Vereinigungsregel.

Die kompletten Ergebnisse sind in der Datei „CD34+Hemin-HierClust.png“ auf der beiliegenden CD zu finden. Aus Platzgründen werden im Bild 6 nur Ausschnitte präsentiert. Der linke Teil eines *Heatplots* stellt die erste Serie dar, der rechte die zweite Serie. Die Farbe Rot bedeutet hohe Signalstärken, die nach der beschriebenen Datentransformation positiv sind. Grün steht für schwache Signale mit negativem Vorzeichen. Die Intensität der Farben beschreibt die Intensität der dargestellten Signale. Es geht darum, dass Probesets mit ähnlichen Verläufen zusammengeordnet werden, so dass ganze Felder gleicher oder zumindest ähnlicher Farbe entstehen. Wiederholen sich diese Farbfeld-Strukturen in der zweiten Serie in ähnlicher Weise, so sind auch die Expressionsverläufe der darin enthaltenen Gene vergleichbar. Diese simple Methode ist einer Berechnung der Abstände mit gebräuchlichen Abstandsmaßen und deren statistischer Auswertung wegen ihrer Anschaulichkeit überlegen. Außerdem fallen Ausreißer weniger ins Gewicht. Der wichtigste Vorteil ist jedoch, dass Trends auch dann eher als gleich erkannt werden, wenn die Änderungen zwar in die gleiche Richtung weisen aber mit zeitlicher Verschiebung eintreten.

Im Falle des Experiments „K562+Hämin“ zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Serien. Beim Experiment CD34+EPO stimmt die Mehrzahl der Probesets ebenfalls

überein, es gibt aber mehr Unterschiede als bei K562+Hämin. Man muss in diesem Zusammenhang berücksichtigen, dass das CD34-System wesentlich komplexer ist. Der wichtigste Grund für die Uneinheitlichkeit wird in der biologischen Variabilität der Spender vermutet. Weiterhin können geringfügige Unterschiede bei der Durchführung aller Arbeitsschritte, sowie in der Qualität der benutzten Medien, Seren, Wachstumsfaktoren etc. dazu beigetragen haben. Die beiden CD34-Serien wurden im Gegensatz zu den K562+Hämin-Serien nicht zeitgleich erstellt.

2.1.2. Charakterisierung der Differenzierungsstadien anhand der Expression typischer Marker

In der Hämatologie ist es generell üblich, Zellen bzw. Differenzierungsstadien anhand bestimmter Markerproteine, insbesondere Proteine der Zytoplasmamembran mit extrazellulären Domänen, zu beschreiben. Diese Oberflächenmarker werden von bestimmten Entwicklungsstadien innerhalb der hämatopoetischen Hierarchie exprimiert und erlauben daher eine Zuordnung der Zellen zu diesen Entwicklungsstadien, auch wenn über die eigentliche Funktion dieser Proteine oft nur wenig bekannt ist. Die Benennung der Oberflächenmarker erfolgt mit Hilfe einer speziellen Nomenklatur als *cluster of differentiation* (abgekürzt mit CD). Der Begriff *cluster of differentiation* bezeichnet Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. Als Oberflächenproteine sind die CD-Moleküle an den lebenden Zellen für Antikörper leicht zugänglich. Gegen die verschiedensten CD-Moleküle sind Antikörper erhältlich, die zum Beispiel mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und in der Durchflusszytometrie und Routinediagnostik Anwendung finden.
Im folgendem wurde versucht, anhand der Expressionsdaten relevanter Markerproteine die Entwicklung der Zellen zu dokumentieren, und den zu den Zeitpunkten der Probennahme erreichten Entwicklungsstand bestimmten Stadien zuzuordnen. Die Auswahl der CD-Moleküle wurde anhand der Publikationen der Firma SEROTEC getroffen, die auf ihrer Internet-Seite (www.serotec.com/CDcatalogue/Cells/cellsindex.htm) stadienspezifische Marker ausweist. Neben den CD-Molekülen wurden auch noch andere erythrozytentypische Proteine mit einbezogen. Im Falle der CD34+-Differenzierungsreihe liegen außerdem zytometrische Daten für CD34, Glycophorin A, EPOR und KIT vor.

2.1.2.1. CD34+-Experiment

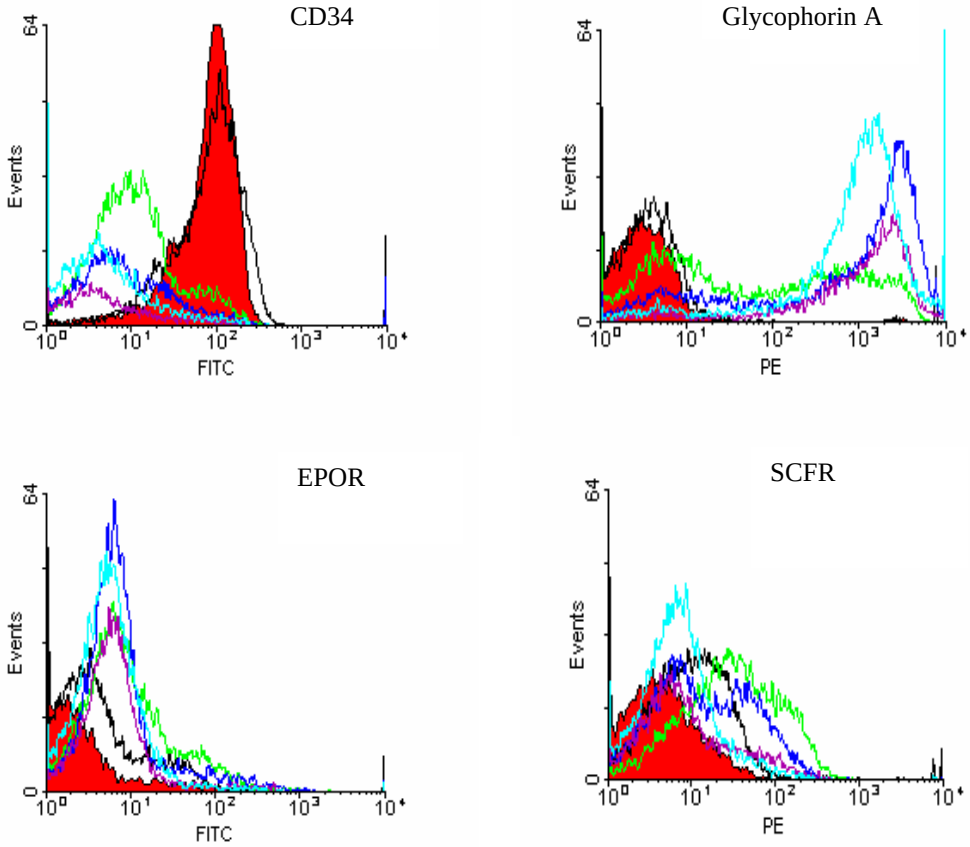
Durch Verabreichung von G-CSF wurden in zwei gesunden Spendern CD34+-Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert, die monoklonalen Zellen apheretisiert und die CD34-positiven Zellen immunomagnetisch isoliert. Das gewonnene Zellmaterial wurde im Durchflusszytometer auf die Expression von CD34, Glycophorin A, EPOR und SCF-Rezeptor (KIT) untersucht. Die Tabelle 2 zeigt die wichtigsten Ergebnisse der Messungen für Spender 1: Die zytometrische Analyse des Erythrozytenmarkers Glycophorin A bestätigt, dass nach 14 Tagen, dem Zeitpunkt der letzten Probennahme, die erythroiden Zellen eine Reinheit von mindestens 88% erreichten. Nicht mitgezählt sind Zellen der erythroiden Reihe, die noch kein Glycophorin A exprimieren, d.h. die das Stadium des Proerythroblasten noch nicht erreicht haben. Die Expression von CD34, ursprünglich in 89,4% der Zellen nachweisbar, nahm zwischen Tag 0 und Tag 5 um ca. 90% ab, d.h. in diesem Zeitraum erreichen die meisten Zellen mindestens das CD34-negative CFU-E-Stadium.

Tag	CD34-pos.	CD34-pos./ GlyA-pos.	GlyA-pos./ CD34-neg.
Tag 0	89,40%	0,90%	0,40%
Tag 1	85,70%	2%	0,65%
Tag 5	8,70%	0	47,40%
Tag 9	2,30%	0	73,90%
Tag 12	0	0,4	82,80%
Tag 14	0	0	88%

Tabelle 2: Die wichtigsten Zytometrie-Daten des aterials von Spender 1 sind zusammenfassend numerisch dargestellt. Der Stammzellmarker CD34 geht zwischen Tag 1 und Tag 5 auf ca. ein Zehntel seiner ursprünglichen Präsenz zurück verschwindet bis zum Tag 12 ganz. Demgegenüber ist Glycophorin A als Erythrozytenmarker anfangs praktisch nicht exprimiert. Bereits am Tag 5 beträgt der Anteil an Glycophorin-A-positiven Zellen fast 50% und erreicht 88% bis zum Tag 14.

In Bild 7 sind die Ergebnisse der zytometrischen Untersuchungen detailliert in Form von Histogrammen dargestellt. Die Histogramme der verschiedenen Zeitpunkte sind jeweils zusammengefasst. Außerdem wurden die Microarray-Daten der zytometrisch untersuchten Proteine im unteren Teil der Abbildung als Tabelle dargestellt. Die Signalstärken sind farbig unterlegt. Diese Farbkodierung der Signalstärken ordnet niedrigen Werten dunklere und höheren Werten hellere Farben zu, um die Lesbarkeit zu erleichtern. Zusätzlich zu den Signalstärken sind die *detection calls* angegeben, wobei „P“ für die sichere Detektion eines Transkripts relativ zum unspezifischen Hintergrund steht, während „A“ bedeutet, dass das Signal nicht signifikant erhöht ist. Der Vergleich von Zytometrie und Microarray-Daten ergibt eine hohe Übereinstimmung in mRNA-Synthese und Proteinexpression. Die Einbeziehung von EPOR und SCF-Rezeptor (KIT) ermöglicht noch eine genauere Beschreibung der früheren Zeitpunkte. Erythroide Zellen beginnen mit der Bildung von EPOR im CFU-E-

Bild 7 zeigt die Zytometrie-Daten der CD34+-Differenzierungsreihe als Histogramme. Die Farbkodierung der Graphen steht für rot=0 Tage, schwarz = 1 Tag, grün = 5 Tage, blau = 9 Tage, violett = 12 Tage, türkis = 14 Tage. Die Zytometrie-Daten korrelieren sehr gut mit den Microarray-Daten in der Tabelle im unteren Teil der Abbildung. Die Signalstärken der aufgeführten Gene auf den Microarrays sind als numerische Werte dargestellt. Schwache Signale sind zusätzlich mit dunklen Farben und starke Signale mit hellen Farben unterlegt, um Trends besser sichtbar zu machen. Außerdem ist der *detection call* angegeben (zu *detection call* siehe Material und Methoden; „P“ steht für sichere Detektion des Transkripts, „A“ bedeutet keine sichere Detektion möglich). Demnach wird die Expression von CD34 zwischen Tag 2 und Tag 6 merklich herunterreguliert, was den Übertritt der Zellen vom BFU-E zum CFU-E-Stadium kennzeichnet. Die Expression von Glycophorin A beginnt am Tag 6 und erreicht bereits am 9. Tag maximale Werte. Der Übergang von BFU-E zum Erythroblastenstadium erfolgt daher bei den meisten Zellen zwischen dem 6. und dem 9. Tag. Erythroide Zellen beginnen mit der Bildung von EPOR im CFU-E-Stadium, welches von vielen Zellen schon am Tag 2 erreicht wird. Die Synthese des SCF-Rezeptors (KIT) erreicht ihr Maximum zwischen dem 2. und 6. Tag und schwächt sich dann wieder ab. Die Expression von KIT ist typisch für hämatopoetische Stammzellen und GEMM-CFU, aber auch spätere Stadien scheinen den Rezeptor noch in geringeren Mengen zu tragen.



Gen-Symbol	unbehandelt_Signal	unbehandelt_Detektion	1d Epo_Signal	1d Epo_Detection	3d Epo_Signal	3d Epo_Detection	6d Epo_Signal	6d Epo_Detection	9d Epo_Signal	9d Epo_1Detection	12d Epo_Signal	12d Epo_Detection	14d Epo_Signal	14d Epo_Detection
CD34	1015	P	1355	P	424	P	381	P	382	P	312	P	358	P
GYPA	160	A	72	A	423	P	4632	P	9266	P	12407	P	15850	P
EPOR	237	P	276	P	691	P	1004	P	1492	P	2258	P	1754	P
KIT	1637	P	1894	P	2170	P	1184	P	1032	P	1106	P	1020	P

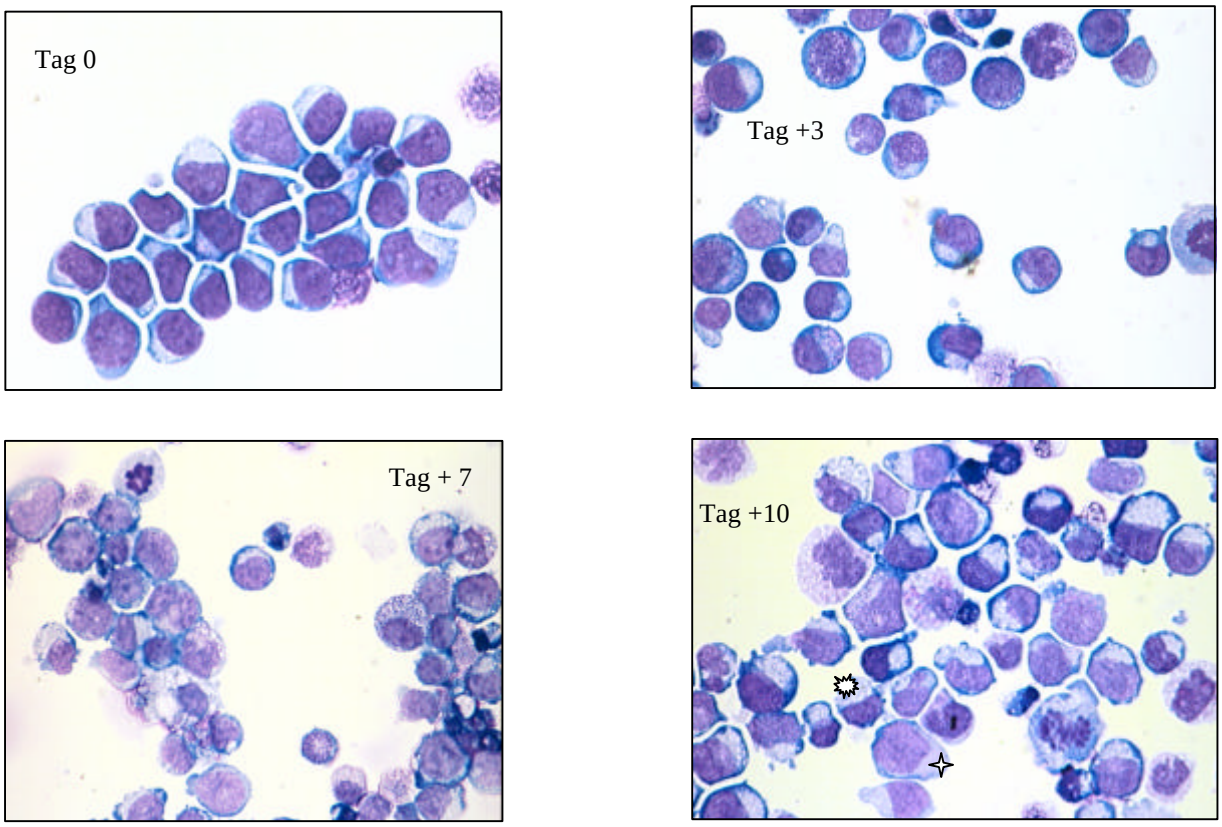


Bild 8 zeigt die Cytospins, die bei der CD34+-Differenzierungsserie am Tag 0, Tag 3, Tag 7, Tag 10 und Tag 14 erstellt wurden. Tag 0 heißt, dass es sich um das Ausgangsmaterial an peripheren CD34+ hämatopoetischen Stammzellen unmittelbar vor der Zugabe von EPO handelt. Die Zellen vom Tag 0 bis zum Tag 7 können morphologisch nicht sicher klassifiziert werden. Am Tag 7 erkennt man viele zerfallende Zellen, die mit den für die erythroide Differenzierung eingesetzten Wachstumsfaktoren nicht überleben können. Am Tag 10 überwiegen Proerythroblasten (✧) und Erythroblasten (✵) und am Tag 14 erscheinen neben den (Pro-) Erythroblasten auch Normoblasten (☆) kurz vor der Kernextrusion und kernlose Reticulozyten (im diesem Bildausschnitt nicht zu sehen).

Stadium [Tepperman et al. 1974], welches von vielen Zellen schon am Tag 2 erreicht wird. Das Maximum wird am Tag 9 erreicht. Dass es bis zum Tag 14 nur eine leichte Abschwächung gibt, spricht dafür, dass sich nur wenige Zellen bis zum EPOR-freien Reticulozyten entwickeln. Die Synthese des SCF-Rezeptors erreicht ihr Maximum zwischen dem 2. und 6. Tag und schwächt sich dann wieder ab. In diesem Fall korrelieren die Zytometrie-Daten schlecht mit den Microarray-Daten. Obwohl auch diese ein Maximum in diesem Zeitraum ausweisen, bleibt die Transkription auch danach noch auf relativ hohem Niveau erhalten.

Die Expression von KIT ist typisch für hämatopoetische Stammzellen und CFU-GEMM (SEROTEC), aber auch spätere Stadien scheinen den Rezeptor noch in geringeren Mengen zu tragen.
Zur morphologischen Charakterisierung der differenzierenden Zellen wurden am Tag 0, Tag 3, Tag 7, Tag 10 und Tag 14 Cytospins hergestellt(Bild 8). Vom Tag 0 bis zum Tag 7 können die Zellen keinem Zelltyp sicher zugeordnet werden. Am Tag 7 erkennt man viele zerfallende Zellen, die unter den gegebenen Bedingungen nicht überleben konnten. Die Mehrzahl der Zellen erreicht um den Tag 10 das Proerythroblasten- oder frühe bis mittlere Erythroblasten-stadium. Normoblasten, das letzte Stadium vor der Kernextrusion, entstehen erst nach dem 10.Tag und stellen am 14. Tag etwa 50% der Zellen dar.

Eine größere Anzahl weiterer Marker, für die allerdings nur Microarray-Daten vorlagen, wurde ebenfalls mit einbezogen. Das diente dem später folgenden Versuch, die K562-Zellen sowie deren durch Chemikalien differenzierte Formen den Stufen der Erythropoese zuzuordnen, mit denen sie die größte Ähnlichkeit haben. Die Tabelle 3 zeigt die Expressions-daten der ausgewählten Gene. Eine Farbkodierung der Signalstärken ordnet niedrigen Werten dunklere Farben und höheren Werten hellere Farben zu. Diese Daten sind für alle untersuchten Modelle in einer Excel-Tabelle (Datei:Differenzierungsmarker.xls auf der beiliegenden CD) zusammengefasst. Aus Platzgründen werden die Daten hier für jedes Modell separat dargestellt.
Für alle Differenzierungsstufen konnte festgestellt werden, dass sich nicht alle untersuchten Marker wie erwartet verhielten. In den Fällen, wo die gemessenen Signale niedrig und nicht sicher vom Hintergrund zu unterscheiden sind (Probeset erhält „*absent-call*“ durch MAS 5.1), kann das auch daran liegen, dass die Probesets, die von AFFYMETRIX ausgewählt wurden, zur Detektion dieser mRNAs schlecht geeignet ist. Es ist gelegentlich zu beobachten, dass bei Genen, die durch mehrere Probesets auf dem Array repräsentiert sind, nur ein Teil dieser Probesets richtig funktioniert.
5 typische Marker der hämatopoetischen Stammzellen wurden untersucht, von denen 3 sowohl in Serie 1 als auch Serie 2 sicher detektiert werden konnten, nämlich KIT, FLT3 und ABCB1. MPL wurde nur in Serie 1 im Ausgangsmaterial detektiert. Der Expressionsverlauf von KIT wurde schon weiter oben diskutiert. FLT3 und ABCB1 zeigen maximale Werte im Ausgangsmaterial bzw. am Tag 1, aber dann nehmen die Werte schnell ab und am Tag 6 gibt es keine sichere Detektion mehr.
Das Stadium CFU-GEMM ist durch 7 Marker repräsentiert, von denen 4 ein verwertbares

Tabelle 3: CD34+EPO: Die Zwischenstufen bei der erythroiden Differenzierung sind meist durch Oberflächenmarker zu unterscheiden. Außerdem gibt es weitere Proteine, deren Expression bestimmten Stadien zuzuordnen ist. Hier wurden die Array-Daten dieser Proteine den Entwicklungsstufen zugeordnet. Eine Farbkodierung der Signale, bei der hellere Farben für starke und dunklere Farben für schwache Signale stehen, soll die Übersichtlichkeit verbessern. Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen bilden Bereiche gleicher oder ähnlicher Farben. Außerdem wurden die *detection calls* angegeben. Die Tabellen 3, 5 und 6 sollen eine Aussage ermöglichen, welchen Entwicklungsstand die Mehrzahl der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkte erreicht hat. Die K562-Experimente sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt (siehe nächste Seiten). Eine Tabelle, die 3, 5 und 6 zusammenfasst, ist aus Platzgründen nur auf der beiliegenden CD (Differenzierungsmarker.xls) abgelegt.

			CD34+ Epo Serie 1								CD34+ Epo Serie 2													
		Gen-Symbol	unbehandelt_Signal	unbehandelt_Detektion	1d Epo_Signal	1d Epo_Detection	3d Epo_Signal	3d Epo_Detection	6d Epo_Signal	6d Epo_Detection	unbehandelt_Signal	unbehandelt_Detektion	1d Epo_Signal	1d Epo_Detection	3d Epo_Signal	3d Epo_Detection	6d Epo_Signal	6d Epo_Detection	9d Epo_Signal	9d Epo_Detection	12d Epo_Signal	12d Epo_Detection	14d Epo_Signal	14d Epo_Detection
HSC	CD90	THY1	131	A	287	P	137	A	342	A	121	A	310	A	314	P	299	P	329	P	317	P	299	P
	CD110	MPL	657	P	215	A	98	A	165	A	114	A	242	A	164	P	91	A	38	A	10	A	49	A
	CD117	KIT	3632	P	3457	P	8232	P	13087	P	1637	P	1894	P	2170	P	1184	P	1032	P	1106	P	1020	P
	CD135	FLT3	609	P	619	P	303	A	48	A	375	P	559	P	392	P	287	A	124	A	86	A	110	A
	CD243	ABCB1	553	P	330	P	103	A	170	A	632	P	381	P	206	P	163	A	97	A	63	A	114	A
	CD34	CD34	2803	P	1819	P	922	P	659	P	1015	P	1355	P	424	P	381	P	382	P	312	P	358	P
CFU-GEMM	CD33	CD33	41	A	104	A	25	A	22	A	27	A	60	A	92	A	123	A	106	A	38	A	48	A
	CD34	CD34	2803	P	1819	P	922	P	659	P	1015	P	1355	P	424	P	381	P	382	P	312	P	358	P
	CD111	PVRL1	125	A	148	P	131	P	190	P	28	A	177	A	174	A	177	P	183	A	215	P	210	P
	CD112	PVRL2	266	A	699	A	683	A	847	A	438	A	256	A	345	A	398	A	433	A	238	A	280	A
	CD117	KIT	3632	P	3457	P	8232	P	13087	P	1637	P	1894	P	2170	P	1184	P	1032	P	1106	P	1020	P
	CD133	FLT4	21	A	76	A	27	A	31	A	138	A	21	A	92	A	82	A	62	A	72	A	95	A
	CD227	MUC1	48	A	315	A	2356	P	1466	P	183	A	73	A	558	P	500	P	593	P	416	P	373	A
BFU-E	CD33	CD33	41	A	104	A	25	A	22	A	27	A	60	A	92	A	123	A	106	A	38	A	48	A
	CD34	CD34	2803	P	1819	P	922	P	659	P	1015	P	1355	P	424	P	381	P	382	P	312	P	358	P
		EPOR	125	A	169	M	1013	P	1101	P	237	P	276	P	691	P	1004	P	1492	P	2258	P	1754	P
CFU-E	CD36	CD36	312	M	283	M	977	P	2557	P	316	P	455	P	1197	P	2995	P	4331	P	5337	P	5495	P
		EPOR	125	A	169	M	1013	P	1101	P	237	P	276	P	691	P	1004	P	1492	P	2258	P	1754	P
(Pro-) Erythroblast	CD235a	GYPA	26	A	16	A	14	A	356	P	160	A	72	A	423	P	4632	P	9266	P	12407	P	15850	P
	CD235b	GYPB	216	A	151	A	324	A	731	P	188	A	150	A	438	P	4609	P	10794	P	12743	P	14395	P
	CD236	GYPC	2890	P	2147	P	1966	P	2899	P	3072	P	2891	P	3779	P	5460	P	8981	P	11677	P	11599	P
		HBA1	2064	P	1733	P	10560	P	11115	P	16532	P	9240	P	18517	P	40951	P	44192	P	44192	P	44192	P
		HBA2	682	A	1083	M	5982	P	7707	P	12230	P	5629	P	12185	P	27560	P	37268	P	36762	P	38304	P
		HBB	4714	P	8952	P	23164	P	33948	P	13607	P	13743	P	37702	P	37702	P	37702	P	37268	P	35429	P
		HBD	9160	P	13305	P	14462	P	14633	P	917	P	12141	P	20911	P	28413	P	35691	P	33582	P	34816	P
		HBE1	200	A	334	P	737	P	377	A	205	A	250	P	656	P	373	P	578	P	649	P	600	P
		HBG1/HBG2	505	A	2970	P	21211	P	29038	P	14	A	3211	P	24296	P	29287	P	35429	P	35058	P	36762	P
		HBG2	1057	P	4316	P	25006	P	34232	P	266	A	3567	P	27804	P	33582	P	36443	P	37702	P	37702	P
		HBQ1	17	A	30	A	293	A	588	A	14	A	14	A	333	A	274	A	1789	A	2309	A	2085	A
		HBZ	8	A	9	A	7	A	8	A	22	A	7	A	14	A	11	A	186	A	258	A	337	A
		UROS	858	P	824	P	860	P	2228	P	551	P	652	P	875	P	1608	P	2752	P	3875	P	2803	P
		HMBS	863	P	1485	P	2264	P	4359	P	375	P	962	P	1593	P	3716	P	9885	P	13305	P	12840	P
		PPOX	546	P	650	P	2311	P	3719	P	324	P	423	P	762	P	1293	P	3971	P	4513	P	3643	P
		UROD	3350	P	3674	P	6701	P	4584	P	2300	P	3453	P	4759	P	5857	P	11372	P	13255	P	9771	P
		ALAS2	11	A	12	A	286	A	4035	P	13	A	18	A	549	A	3745	P	10516	P	14909	P	16187	P
		TFRC	8668	P	9970	P	14688	P	15210	P	8355	P	9467	P	18890	P	18410	P	25710	P	28040	P	29443	P
		CA1	222	P	236	P	1162	P	2318	P	555	M	589	P	2434	P	11647	P	17602	P	14633	P	12944	P
		SPTA1	165	P	331	P	2446	P	9737	P	126	P	145	P	752	P	1654	P	4247	P	4228	P	5441	P
		SPTB	78	A	99	A	515	M	609	P	93	A	126	A	657	P	1619	P	2972	P	2887	P	2857	P
Reticulozyt/ Erythrozyt	CD35	CR1	25	A	49	P	186	P	105	A	6	A	6	A	116	P	60	P	38	A	251	P	112	P
	CD55	DAF	545	P	627	P	654	P	355	P	309	P	340	P	331	P	349	P	373	P	331	P	534	P
	CD59	CD59	1134	P	1020	P	740	P	665	P	3421	P	1383	P	1485	P	1420	P	1508	P	1327	P	2076	P
	CD147	BSG	1042	P	980	P	340	A	741	P	750	P	661	P	693	P	1243	P	2688	P	3338	P	4533	P
	CD233	SLC4A1	27	A	56	A	612	P	2677	P	63	A	97	A	427	P	6757	P	14577	P	19947	P	21394	P
	CD234	FY	39	A	37	A	98	A	92	A	105	A	36	A	211	A	110	A	510	P	581	P	562	P
	CD238	KEL	50	A	360	P	1637	P	2088	P	134	A	204	A	470	P	844	P	1975	P	1993	P	1902	P
	CD239	LU	90	A	108	A	126	A	423	A	53	A	139	A	67	A	175	A	152	A	154	A	111	A
	CD240CE	RHCE	34	A	51	A	127	A	116	A	27	A	114	A	134	A	887	P	3882	P	5189	P	5460	P
	CD240D	RHD	52	A	27	A	56	A	31	A	25	A	18	A	18	A	763	A	4479	P	4772	P	6091	P
	CD241	RHAG	82	P	90	A	761	P	2851	P	49	A	238	P	1403	P	4545	P	5857	P	7635	P	8848	P
	CD242	ICAM4	237	M	525	P	393	P	265	P	125	A	320	P	593	P	755	P	984	P	1163	P	1345	P

Signal liefern (CD34, KIT, PVRL1, MUC1). Die Signalstärken von PVRL1 zeigen in beiden Serien einen leichten Aufwärtstrend, die Detektion ist aber insgesamt schwach. MUC1 wird erstmals am Tag 3 und dann bis zum Tag 9 detektiert, wobei in der Serie 1 wesentlich höhere Werte als in Serie 2 gemessen wurden.

Die Stufe BFU-E war hier nicht sicher abzugrenzen, weil es keinen Marker gibt, der ausschließlich dieses Stadium kennzeichnet. CD36, typisch für CFU-E, stieg in beiden Serien ab Tag 3 deutlich an und nahm bis zum Tag 14 immer weiter zu.
Die Proerythroblasten sind durch Oberflächen-Antigene nicht eindeutig von ihren Vorläufern und den nachfolgenden Erythroblasten abzugrenzen, es ist jedoch das Stadium, in dem die Transkription der Hämoglobingene und der Gene für Enzyme der Häm-Biosynthese einsetzt [Harris 1990]. Weiterhin beginnt die Transkription der Glycophorine, der Gene für den Transferrin-Rezeptor, für die Karboanhydrase und Spektrine. Es wurden insgesamt 22 Gene untersucht, davon 3 Glycophorine, 9 Hämoglobingene, 6 Gene der Hämsynthese sowie Transferrin-Rezeptor, Karboanhydrase, und 2 erythrozytenspezifische Spektrine. Fast alle untersuchten Gene waren im Zeitverlauf deutlich induziert, meistens ab Tag 3 oder 6. Ausnahmen bilden nur die Hämoglobine epsilon und zeta, welche *in vivo* am Aufbau der Hämoglobin-Tetramere in Embryos beteiligt sind und schon bei der fötalen Erythropoese nicht mehr gebildet werden.
In Reticulozyten und Erythrozyten findet keine Transkription mehr statt, weil diese Stadien keinen Kern mehr haben. Die Transkription der mRNAs, die für die Oberflächenmarker dieser Stadien kodieren, muss daher spätestens in der späten Erythroblastenphase stattfinden. Von 12 untersuchten Markern zeigten 9 eine Induktion, meistens zwischen dem 6. und dem 9. Tag, im Fall von CD241 und CD242 auch schon am Tag 1.
Im untersten Teil der Tabelle 3a sind weitere Proteine aufgeführt. Erstens handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die während der Reifung eine wichtige Rolle spielen. Zweitens sind Proteine des reifen Erythrozyten aufgeführt. Beiden Gruppen ist gemeinsam, dass deren Expressionsbeginn mit der verfügbaren Literatur keinem Stadium eindeutig zuzuordnen war. Die Expressionsverläufe dieser Proteine können aber trotzdem zum Vergleich der verschiedenen Modelle herangezogen werden.

Die Ergebnisse der bisher ausgewerteten zytometrischen und morphologischen Daten sowie der Expressionsdaten des CD34+-Experiments sind zusammenfassend in Tabelle 4 dargestellt. Demnach überwiegen im Ausgangsmaterial und auch am Tag 1 die hämatopoetischen Stammzellen (HSC). CFU-GEMM und BFU-E sind wegen ihrer natürlichen CD34-Expression erwartungsgemäß schon vorhanden, stellen aber noch eine Minderheit dar, da die Expression der CFU-GEMM-Marker PVRL1 und MUC1 im Verlauf der EPO-Stimulation noch deutlich zunimmt. Am Tag 3 haben die meisten Zellen das CFU-GEMM- oder auch schon das BFU-E-Stadium erreicht, nur noch wenige exprimieren den Stammzellmarker

Tabelle 4: zusammenfassende Auswertung der Ergebnisse der Zytometrie, Cytospins und Array-Daten des CD34-Experiments: Es erfolgt eine Aussage darüber, welche Differenzierungsstadien die Zellen zu den untersuchten Zeitpunkten erreicht haben. Begründet durch die Präparationsmethode stellt die Zellpopulation von Anfang an ein Gemisch aus CD34-positiven HSC, CFU-GEMM, BFU-E und anderen CD34-positiven Zellen anderer hämatopoetischer Linien dar. Die Expressionskurven der CFU-GEMM-typischen Marker MUC1 und PVRL1 zeigen durch ihren Anstieg, dass die CFU-GEMM-Population im Verlauf der Differenzierung deutlich zunimmt und von daher keinesfalls die Mehrheit im ursprünglichen Zellgemisch am Tag 0 stellen kann. Nach 3 Tagen EPO-Stimulation exprimieren nur noch wenige Zellen den Stammzellmarker CD34 und erste Glycophorin-A-positive Zellen (Proerythroblasten und alle spätere Stadien) erscheinen. Nach 6 Tagen hat die Mehrheit der Zellen das CFU-E-Stadium erreicht und ist im Zytometer EPOR-positiv. Außerdem zeigen die Array-Daten, dass die Expression von CD36 stark zunimmt. Im weiteren Verlauf nimmt die Population Glycophorin-A-positiver Zellen immer weiter zu und erreicht bei Spender 1 schließlich 88% am Tag 14. Die Cytospins zeigen, dass zwischen Tag 10 und 14 ca. 50% der Zellen zu Normoblasten differenzieren. Erste kernlose Stadien (Reticulozyten) konnten beobachtet werden.
HSC = hämatopoetische Stammzelle, CFU-GEMM = colony stimulating factor-granulocyte-erythrocyte-macrophage-megacaryocyte, BFU-E = boost forming unit-erythrocyt, CFU-E = colony forming unit-erythrocyt, P = Proerythroblast, E = Erythroblast, N = Normoblast, R = Reticulozyt; Fettgedruckt und rot markiert bedeutet, diese Stufe stellt die Mehrheit im Zellgemisch. Grün unterlegt sind Stadien, die noch eine bedeutende Teilmenge darstellen. Farblos und in Klammern bedeutet, dass die Fraktion eine Minderheit darstellt. Prozentangaben beziehen sich auf alle in dieser Tabellenzelle aufgeführten Stadien.

unbehandelt	1d Epo	3d Epo	6d Epo	9d Epo	12d Epo	14d Epo
HSC	**HSC**	(HSC)				
(CFU-GEMM/BFU-E)	(CFU-GEMM/BFU-E)	**(CFU-GEMM/BFU-E)**	(CFU-GEMM/BFU-E)	(CFU-GEMM/BFU-E)		
		CFU-E	**CFU-E**	CFU-E	(CFU-E)	(CFU-E)
		P/E	P/E	**P/E** (73,9%)	**P/E** (82,8%)	**P/E/N/R** (88%)

CD34. Außerdem erscheinen die ersten Glycophorin-A-positiven Zellen. Nach 6 Tagen überwiegen jedoch schon die EPOR-positiven CFU-E. Außerdem steigt das Signal des CD36-Transkripts in den Array-Daten stark an. BFU-E und CFU-E und wahrscheinlich auch CFU-GEMM bleiben allerdings bis zum Ende des Experiments in kleineren Mengen vorhanden, da ihre Marker bis zum Ende des Experiments nachweisbar sind. Im Falle von BFU-E und CFU-E entspricht dies den Erwartungen, da diese beiden Stadien auch *in vivo* zusammen ca. 14 Tage andauern (siehe Tabelle 1, [Bonanou-Tzedaki 1990]). Die Anwesenheit von BFU-E im Ausgangsmaterial erklärt auch, warum Proerythroblasten und Erythroblasten als Glycophorin A-positive Zellen erstmals am 5. Tag zytometrisch nachgewiesen werden können, obwohl sie bei einer reinen HSC-Präparation erst nach mehr als 14 Tagen zu erwarten wären. Die Synthese der Hämoglobin-mRNAs, nicht aber die der Glycophorin-mRNAs ist sogar schon am 3. Tag nachweisbar. Der Anteil Glycophorin-A-positiver Zellen nimmt bis zum Ende des Experiments zu und erreicht schließlich 88% am Tag 14. Normoblasten und erste Reticulozyten erscheinen erstmals am Tag 14.

2.1.2.2. K562 –Modelle

Bei der Stimulation der Zelllinie K562 mit AraC, Butyrat oder Hämin lagen die Behandlungszeiten im Gegensatz zum CD34+-Experiment im Bereich bis zu 2 Tagen (AraC und Butyrat) oder 3 Tagen (Hämin). Im Fall von AraC und Butyrat ist das durch die Zytotoxizität dieser Stoffe begründet. Wegen dieser Zytotoxizität setzen bald Apoptoseprozesse ein, was eine Ausdehnung der Behandlungszeit über 2 Tage hinaus wenig sinnvoll macht. Im Mikroskop wurden bereits nach 24h und verstärkt nach 48h deformierte Zellen und Zelltrümmer beobachtet. Die verwendeten Konzentrationen (1µM AraC bzw. 2mM Butyrat) und Behandlungszeiten entsprechen den von anderen Gruppen publizierten Werten und wurden daher übernommen. Offensichtlich reagieren K562 auf die entsprechenden Stimulanzien einschließlich Hämin aber schnell genug, weswegen auch die von einer anderen Gruppe [Addya et al. 2004] erzeugten und hier mit ausgewerteten K562+Hämin-Datensätze nur diesen Zeitraum bei exakt gleichen Meßzeitpunkten abdecken.
Unbehandelte K562 exprimierten in keinem der 4 vorhandenen Arrays Stammzellmarker (siehe Tabellen 5 und 6). Die Transkription von KIT wurde bei AraC- oder Butyrat-Behandlung erst induziert (bei AraC nach 6h, bei Butyrat nach 48h gemessen). CD34 wurde ebenfalls erst nicht exprimiert aber bei den häminstimulierten (nach 12h) und bei den AraC-stimulierten K562 schwach induziert. Bei allen späteren Differenzierungsstufen wurde immer ein Teil der für diese Stufen typischen Marker gebildet und andere nicht. So findet man Marker für frühe, morphologisch nicht charakterisierbare Progenitoren wie CD33 neben Markern für die späten Stadien wie Glycophorinen und Hämoglobinen, die bei der gesunden Erythropoese nicht gleichzeitig gebildet werden. Demgegenüber fehlte zum Beispiel CD36 als Marker des CFU-E-Stadiums ebenso wie Glycophorin C. Die Transkriptionsfaktoren NFE2L1, NFE2L2 und NFE2L sind wie im CD34+-Modell stark exprimiert und zeigten in allen 3 K562-Modellen ebenfalls keine deutlichen Regulationstendenzen. GATA1, ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Transkription der Hämoglobin- und anderer erythrozytenspezifischer Gene [genecards], ist in K562 bereits recht stark exprimiert. Die GATA1-mRNA, die im CD34+-Modell schnell ansteigt, bleibt bei Hämin-stimulierten K562 nahezu konstant. Bei AraC-Behandlung fällt sie jedoch steil ab und bei Butyrat-Stimulation erreicht sie ein lokales Minimum nach 12 Stunden Behandlungsdauer. Die letzten beiden Ergebnisse sind überraschend, weil es ja in beiden Fällen durchaus zu einer verstärkten Transkription bestimmter Hämoglobin-Gene kommt.

Tabelle 5: K562+AraC und K562+ Butyrat: farbkodierte Signalstärken zum erleichterten Auffinden stadienspezifisch exprimierter Markergene, Prinzip der Darstellungsweise wie in Tabelle 3

			K562+AraC										K562+Butyrat					
		Gen-Symbol	K562-unbehandelt_Signal	K562-unbehandelt-Detektion	K562+6h AraC_Signal	K562+6h AraC_Detektion	K562+12h AraC_Signal	K562+12h AraC_Detektion	K562+24h AraC_Signal	K562+24h AraC_Detektion	K562+48h AraC_Signal	K562+48h AraC_Detektion	K562-unbehandelt_Signal	K562-unbehandelt-Detektion	K562+12h But_Signal	K562+12h But_Detektion	K562+48h But_Signal	K562+48h But_Detektion
HSC	CD90	THY1	97	A	112	A	167	A	226	A	153	A	127	A	51	A	205	A
	CD110	MPL	33	A	13	A	36	A	35	A	18	A	25	A	31	A	15	A
	CD117	KIT	141	A	329	P	215	P	215	P	118	P	217	A	78	A	896	P
	CD135	FLT3	217	A	126	A	213	A	215	A	142	A	80	A	83	A	161	A
	CD243	ABCB1	143	A	138	A	129	A	123	A	283	P	23	A	112	A	151	A
CFU-GEMM	CD33	CD33	998	P	1789	P	216	A	723	A	127	A	874	P	398	P	950	P
	CD34	CD34	208	A	132	A	211	A	162	P	414	A	176	A	146	A	152	A
	CD111	PVRL1	120	A	112	A	83	M	114	A	97	A	114	A	160	A	174	A
	CD112	PVRL2	562	P	445	P	404	A	454	A	397	A	725	P	822	M	958	P
	CD117	KIT	141	A	329	P	215	P	215	P	118	P	217	A	78	A	896	P
	CD133	FLT4	93	A	17	A	32	A	51	A	39	A	10	A	228	A	164	A
	CD227	MUC1	199	A	376	A	218	A	277	A	290	A	583	P	22	A	340	A
BFU-E	CD33	CD33	998	P	1789	P	216	A	723	A	127	A	874	P	398	P	950	P
	CD34	CD34	208	A	132	A	211	A	162	P	414	A	176	A	146	A	152	A
CFU-E	CD36	CD36	12	A	14	A	38	A	74	A	21	A	193	A	53	A	40	A
		EPOR	231	P	263	P	225	P	250	P	438	P	218	M	245	P	215	P
(Pro-) Erythroblast	CD235a	GYPA	5163	P	4509	P	3477	P	4444	P	5620	P	3405	P	1997	P	3421	P
	CD235b	GYPB	7014	P	6801	P	10592	P	12992	P	22945	P	5648	P	4614	P	6928	P
	CD236	GYPC	955	P	1299	P	654	A	658	A	489	A	1828	P	649	A	476	A
		HBA1	1023	P	1832	P	596	A	1594	M	4207	P	17361	P	20215	P	10006	P
		HBA2	237	A	269	A	58	A	44	A	1594	P	7981	P	11893	P	4433	P
		HBB	337	A	364	A	456	A	680	P	341	P	341	M	202	A	313	A
		HBD	236	A	220	A	169	A	264	A	319	A	294	P	260	A	288	A
		HBE1	2055	P	2918	P	2324	P	2495	P	11599	P	2101	P	6297	P	18961	P
		HBG1/HBG2	9071	P	9179	P	8302	P	18080	P	29038	P	23681	P	22945	P	27287	P
		HBG2	16532	P	19427	P	15168	P	24700	P	34232	P	32200	P	34232	P	33166	P
		HBQ1	53	A	80	A	51	A	46	A	38	A	779	A	64	A	89	A
		HBZ	1112	P	1057	P	295	A	1372	P	4964	P	13146	P	8722	P	2290	P
		UROS	261	A	409	P	220	P	242	P	160	M	349	P	598	P	283	P
		HMBS	1198	P	1601	P	862	P	1008	P	2367	P	1875	P	1131	P	1280	P
		PPOX	649	P	481	P	249	P	405	P	536	P	756	P	953	P	869	P
		UROD	12944	P	10480	P	5131	P	6856	P	9615	P	5204	P	3011	P	1350	P
		ALAS2	145	A	353	A	106	A	110	A	376	A	236	A	231	A	790	P
		TFRC	8213	P	8848	P	8644	P	8455	P	10961	P	7816	P	9467	P	11893	P
		CA1	297	A	204	M	557	M	718	A	1721	P	110	A	224	P	225	A
		SPTA1	696	P	522	P	438	P	989	P	988	P	422	P	237	P	316	P
		SPTB	368	A	395	A	42	A	250	A	239	A	767	P	518	M	200	A
Reticulozyt/ Erythrozyt	CD35	CR1	6	A	4	A	12	A	22	A	100	A	8	A	88	A	97	A
	CD55	DAF	1288	P	785	P	1584	P	1492	P	1293	P	561	P	282	P	287	P
	CD59	CD59	725	P	752	P	1081	P	808	P	1263	P	916	P	1219	P	1398	P
	CD147	BSG	791	P	1009	P	526	A	599	A	883	A	1275	P	2519	P	860	P
	CD233	SLC4A1	42	A	21	A	52	A	209	A	1119	P	63	A	215	A	119	A
	CD234	FY	23	A	35	A	24	A	28	A	93	A	19	A	15	A	16	A
	CD238	KEL	549	P	709	P	309	A	427	P	503	P	828	P	931	P	1866	P
	CD239	LU	219	A	257	A	196	A	388	P	266	M	233	A	411	M	503	P
	CD240CE	RHCE	446	A	675	P	351	A	380	A	646	P	344	M	388	M	560	P
	CD240D	RHD	307	A	249	A	646	A	442	A	815	A	234	A	182	A	471	A
	CD241	RHAG	6263	P	4941	P	7314	P	7622	P	14462	P	2948	P	1266	P	2122	P
	CD242	ICAM4	466	P	475	P	132	A	224	P	110	A	503	P	354	P	418	P

Trotz insgesamt hoher Übereinstimmung der 4 Arrays mit unbehandelten K562 verhielten sich die unbehandelten K562 offenbar nicht vollkommen identisch. So wurde zum Beispiel MUC1 bei den unbehandelten K562 des AraC-Experiments nicht detektiert, jedoch bei allen anderen 0h-Werten. Die Signale für die alpha- und epsilon-Ketten des Hämoglobins warenbei den unbehandelten K562 der AraC-Serie zwar detektierbar aber doch wesentlich schwächer als bei allen anderen.

Tabelle 6: K562+Hämin, Serie 1 und Serie 2: farbkodierte Signalstärken zum erleichterten Auffinden stadienspezifisch exprimierter Gene, Prinzip der Darstellung wie in Tabelle 3

			K562+Hämin_Serie 1												K562+Hämin_Serie 2											
		Gene Symbol	K562-unbehandelt_Signal	K562-unbehandelt-Detektion	K562+6h Hämin_Signal	K562+6h Hämin_Detektion	K562+12h Hämin_Signal	K562+12h Hämin_Detektion	K562+24h Hämin_Signal	K562+24h Hämin_Detektion	K562+48h Hämin_Signal	K562+48h Hämin_Detektion	K562+72h Hämin_Signal	K562+72h Hämin_Detektion	K562-unbehandelt_Signal	K562-unbehandelt-Detektion	K562+6h Hämin_Signal	K562+6h Hämin_Detektion	K562+12h Hämin_Signal	K562+12h Hämin_Detektion	K562+24h Hämin_Signal	K562+24h Hämin_Detektion	K562+48h Hämin_Signal	K562+48h Hämin_Detektion	K562+72h Hämin_Signal	K562+72h Hämin_Detektion
HSC	CD90	THY1	127 A	142 A	167 A	172 A	152 A	126 A							202 A	179 A	209 A	141 A	116 A	179 A						
	CD110	MPL	12 A	45 A	16 A	13 A	7 A	24 A							12 A	15 A	39 A	50 A	10 A	10 A						
	CD117	KIT	122 A	120 A	165 M	106 A	23 A	63 A							31 A	81 A	156 A	125 A	68 A	22 A						
	CD135	FLT3	61 A	109 A	111 A	84 A	75 A	109 A							165 A	22 A	151 A	45 A	135 A	53 A						
	CD243	ABCB1	117 A	98 A	65 A	66 A	70 A	47 A							101 A	129 A	92 A	46 A	26 A	6 A						
CFU-GEMM	CD33	CD33	301 P	271 P	279 P	247 P	281 P	344 P							345 P	348 P	242 P	227 A	319 P	239 P						
	CD34	CD34	136 A	166 A	174 P	198 P	150 P	156 P							136 M	143 A	191 P	184 P	190 P	144 P						
	CD111	PVRL1	58 A	99 A	98 A	42 A	115 A	89 A							58 A	58 A	57 A	71 A	29 A	28 A						
	CD112	PVRL2	418 P	382 M	422 M	514 P	548 P	577 P							504 P	387 P	425 A	536 A	701 P	652 P						
	CD117	KIT	122 A	120 A	165 M	106 A	23 A	63 A							31 A	81 A	156 A	125 A	68 A	22 A						
	CD133	FLT4	113 A	106 A	53 A	58 A	75 A	68 A							71 A	61 A	84 A	45 A	79 A	67 A						
	CD227	MUC1	443 P	536 P	493 P	319 P	92 A	125 A							355 P	689 P	432 P	238 A	31 A	71 A						
BFU-E	CD33	CD33	301 P	271 P	279 P	247 P	281 P	344 P							345 P	348 P	242 P	227 A	319 P	239 P						
	CD34	CD34	136 A	166 A	174 P	198 P	150 P	156 P							136 M	143 A	191 P	184 P	190 P	144 P						
CFU-E	CD36	CD36	42 A	44 A	36 A	33 A	35 A	9 A							11 A	65 A	10 A	12 A	12 A	40 A						
		EPOR	173 P	193 P	198 P	258 P	243 P	237 P							160 P	169 P	151 P	134 P	121 P	114 P						
(Pro-) Erythroblast	CD235a	GYPA	1131 P	1222 P	2316 P	2851 P	2995 P	1804 P							1176 P	931 P	2225 P	3162 P	2281 P	1836 P						
	CD235b	GYPB	806 P	867 P	1444 P	1767 P	2239 P	1413 P							789 P	824 P	1388 P	1974 P	1918 P	1450 P						
	CD236/CD23	GYPC	1631 P	1583 P	1887 P	2169 P	2008 P	1380 P							1545 P	1833 P	1909 P	2064 P	1437 P	1323 P						
		HBA1	12631 P	15210 P	19278 P	24700 P	30613 P	29443 P							33338 P	32200 P	29038 P	37702 P	39839 P	36443 P						
		HBA2	10161 P	9179 P	12230 P	13891 P	20288 P	19349 P							23755 P	21394 P	28413 P	26668 P	30613 P	31538 P						
		HBB	338 P	281 M	465 P	382 P	630 P	506 P							541 P	609 P	597 P	793 P	712 P	1072 P						
		HBD	349 P	369 P	670 P	572 P	866 P	887 P							973 P	844 P	556 P	541 P	492 P	520 P						
		HBE1	14842 P	19191 P	25006 P	22344 P	25361 P	26668 P							30613 P	30990 P	39839 P	32471 P	32200 P	31762 P						
		HBG1/HBG2	33166 P	30990 P	33338 P	31146 P	31146 P	30990 P							36762 P	32881 P	37702 P	30990 P	35691 P	38304 P						
		HBG2	34561 P	31762 P	34232 P	33166 P	30990 P	33338 P							33948 P	35691 P	40951 P	35691 P	33166 P	40951 P						
		HBQ1	343 A	155 A	422 A	493 A	346 A	284 A							525 A	278 A	293 A	213 A	745 A	562 A						
		HBZ	2317 P	2314 P	4578 P	4382 P	7284 P	7769 P							11506 P	11720 P	20578 P	16187 P	17661 P	16369 P						
		UROS	308 P	322 P	338 P	383 P	314 P	354 P							347 P	380 P	334 P	452 P	295 P	277 P						
		HMBS	2090 P	1966 P	2262 P	2230 P	2644 P	2827 P							3152 P	3409 P	2663 P	2389 P	1925 P	1789 P						
		PPOX	392 P	383 P	667 P	609 P	621 P	712 P							773 P	902 P	584 P	731 P	603 P	592 P						
		UROD	7336 P	6985 P	7364 P	7666 P	6935 P	6737 P							6317 P	5992 P	3742 P	4068 P	3920 P	3573 P						
		ALAS2	48 A	40 A	97 A	86 A	213 A	52 A							210 A	152 A	297 A	220 A	249 A	197 A						
		TFRC	12230 P	10752 P	4509 P	4584 P	4493 P	5020 P							7249 P	6412 P	8482 P	6801 P	7110 P	6696 P						
		CA1	146 A	167 P	191 P	163 P	223 P	244 P							244 P	288 P	273 P	432 P	397 P	331 P						
		SPTA1	401 P	431 P	990 P	928 P	600 P	636 P							671 P	599 P	855 P	630 P	775 P	746 P						
		SPTB	285 A	258 A	215 A	339 A	320 A	290 A							292 A	244 A	345 A	243 A	231 A	277 A						
Reticulozyt/ Erythrozyt	CD35	CR1	9 A	15 A	37 A	4 A	3 A	4 A							26 A	20 A	6 A	25 A	25 A	5 A						
	CD55	DAF	992 P	684 P	800 P	1001 P	1277 P	1496 P							951 P	693 P	801 P	997 P	1053 P	1513 P						
	CD59	CD59	2062 P	2211 P	1963 P	1316 P	917 P	759 P							1812 P	1981 P	1946 P	1373 P	979 P	757 P						
	CD147	BSG	1582 P	1791 P	2141 P	2049 P	2169 P	1345 P							1901 P	1974 P	2131 P	2030 P	2042 P	1283 P						
	CD233	SLC4A1	121 A	161 A	159 A	203 A	86 A	216 A							108 A	71 A	226 A	174 A	94 A	157 A						
	CD234	FY	10 A	21 A	17 A	15 A	19 A	17 A							26 A	34 A	19 A	27 A	20 A	22 A						
	CD238	KEL	521 P	1106 P	812 P	1199 P	796 P	388 P							373 P	1035 P	1100 P	946 P	661 P	343 P						
	CD239	LU	64 A	109 A	93 A	29 A	155 A	108 A							96 A	31 A	39 A	61 A	84 A	90 A						
	CD240CE	RHCE	292 M	426 P	932 P	733 P	683 P	1186 P							510 M	617 P	758 P	835 P	1107 P	842 P						
	CD240D	RHD	466 P	627 P	660 P	708 P	769 P	575 P							403 A	476 P	715 M	727 P	705 P	581 P						
	CD241	RHAG	3845 P	4571 P	5048 P	5386 P	4283 P	3448 P							4010 P	3769 P	5189 P	5857 P	3873 P	3362 P						
	CD242	ICAM4	421 P	599 P	834 P	647 P	318 P	382 P							476 P	577 P	765 P	752 P	335 P	290 P						

Diese Unterschiede sind zum Teil auf die unterschiedliche Herkunft der K562 zurückzuführen. Obwohl alle K562 von derselben Patientin abstammen, sind die Zelllinien, die heute in den Labors vorhanden sind, nicht mehr als identisch zu betrachten. Es ist ein bekanntes Phänomen, dass Zellen in Kultur weitere Veränderungen ihrer Eigenschaften anhäufen, weil viele Kontrollmechanismen nicht mehr vorhanden sind. Aber auch zwischen dem AraC- und dem Butyrat-Datensatz bestehen Unterschiede, obwohl beide in unserem Labor mit Zellen aus derselben Herkunft erstellt wurden. Unterschiedliche Kulturbedingungen, wie zum Beispiel unterschiedliche FCS-Chargen, könnten eine Rolle spielen.

Im folgendem sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der 3 K562-Experimente noch deutlicher dargestellt werden:

Schon die unbehandelten K562 bildeten die meisten Hämoglobinketten, nämlich die alpha-, beta-, gamma-, epsilon- und zeta-Kette. Nur delta- und theta-Ketten konnten nicht detektiert werden. Dies kann entweder an der Qualität der Probesets liegen oder daran, dass diese Transkripte wirklich nicht gebildet wurden. Da die ursprünglichen Signale zum Teil bereits sehr stark waren, könnten sie schon in der Nähe der Sättigung liegen. Dies ist insbesondere bei den gamma- und epsilon-Ketten der Fall, so dass hier vielleicht vorhandenen deutliche Änderungen gar keine große Signaländerung hervorrufen.

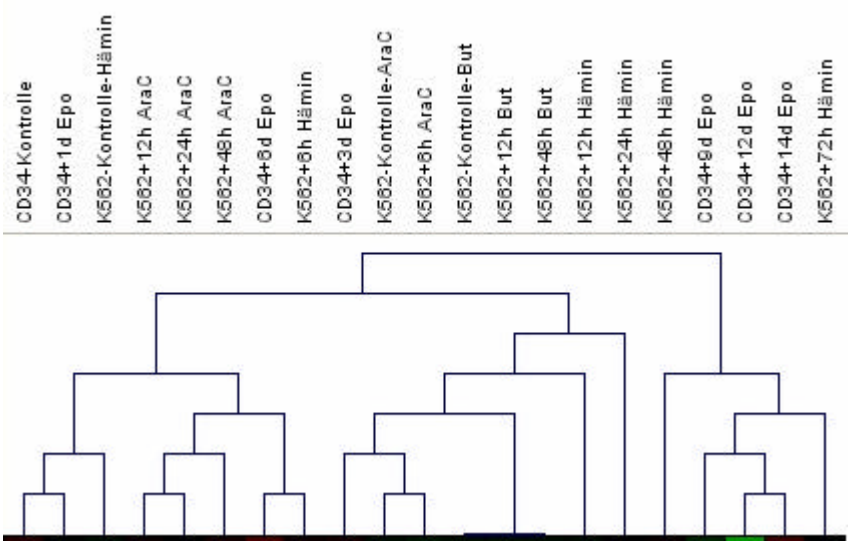
Nach Applikation von AraC verhielt sich die Expression der Hämoglobine wie anhand der Literaturangaben erwartet [Watanabe et al. 1985] und es gab eine deutliche Zunahme der Transkripte kodierend für die alpha-, epsilon-, gamma- und zeta-Ketten. Bei Butyrat-Behandlung wäre zu erwarten, dass epsilon-, gamma- und zeta-Ketten induziert werden [Cioe et al. 1981]. Tatsächlich wurde aber nur die Transkription der epsilon-Kette verstärkt. Hämoglobin gamma blieb auf hohem Niveau konstant, die alpha- und zeta-Ketten wurden sogar herunterreguliert. Hämin erhöhte die Synthese der alpha-, beta-, epsilon und zeta-Ketten, zu erwarten wäre aber nach [Cioe et al. 1981] hauptsächlich eine Erhöhung der gamma- und epsilon-Ketten.

Weitere deutliche Unterschiede gab es zum Beispiel bei der Expression von CD59, welches im AraC- und Butyrat-Modell hoch- und bei beiden Hämin-Datensätzen herunterreguliert wurde. SLC4A1 wurde ausschließlich im AraC-Modell angeschaltet, die Karboanhydrase im AraC- und, allerdings weniger deutlich, im Hämin-Modell.

Im Gegensatz zu den beiden CD34+-Datensätzen sind durch die Farbkodierung der Signalstärken in den einzelnen K562-Tabellen (Tabellen 5,6) kaum Bereiche gleichartig regulierter Gene abgrenzbar. Diese sind nur bei den Glycophorinen und Hämoglobinen ansatzweise zu erkennen.

2.1.3. Charakterisierung der Differenzierungsstadien durch Hierarchisches Clustern

Bild 9: Hierarchisches Clustern aller vorhandenen Datensätze:
Eine Zuordnung der Messpunkte der K562-Experimente zu definierten Stadien der Erythropoese war wegen widersprüchlicher Ergebnisse in den Array-Daten bei der Expression stadienspezifischer Marker nicht möglich. Daher wurde mit Hilfe des Hierarchischen Clusterns ermittelt, mit welchem Messpunkt des CD34+-Experiments (nur Serie 1) jeder Messpunkt der drei K562-Experimente die größte Ähnlichkeit hat. Das Dendrogramm beschreibt die Ähnlichkeit der gesamten Datensätze.
Abstandsmaß: pearsonscher Korrelationskoeffizient , Vereinigungsregel: *average distance*



Eine weitere Möglichkeit, die Array-Datensätze zu vergleichen, bietet das hierarchische Clustern. Der Vorteil des hierarchischen Clusterns liegt darin, dass die gesamten Datensätze mit je 22239 Probesets mit wenig Aufwand maschinell verglichen werden können und man sich nicht auf eine beschränkte Auswahl an Markergenen verlassen muss. Im Gegensatz zum hierarchischen Clustern in Abschnitt 2.1.1. wurden hier nicht die einzelnen Probesets, sondern die ganzen Datensätze nach Ähnlichkeit geordnet. Bei den als Duplikat vorliegenden Experimenten wurde jeweils nur die Serie 1 verwendet. Es wurden die Abstandsmaße „euklidischer Abstand“ und „pearsonscher Korrelationskoeffizient“ und die Vereinigungsregeln „*average distance*“, „*complete linkage*“ und „*single linkage*“ in allen möglichen Kombinationen getestet. Verwertbare Ergebnisse ergab nur der pearsonsche Korrelationskoeffizient kombiniert mit „*average distance*“ bzw. „*complete linkage*“. Die Ergebnisse waren nahezu identisch, deshalb ist im Bild 9 nur das Dendrogramm der Kombination pearsonscher Korrelationskoeffizient - *average distance* dargestellt.

Es ergibt sich eine, allerdings unscharfe, Korrelation der früheren, mittleren und späteren Messpunkte der verschiedenen Experimente. Bezug nehmend auf die in Tabelle 4 dargestellte

Tabelle 7: Durch hierarchisches Clustern wurden die vollständigen K562-Datensätze den Datensätzen des CD34+EPO-Experiments zugeordnet, mit denen sie die größte Ähnlichkeit haben (siehe Bild 9). Da bereits in Tabelle 4 eine Zuordnung der CD34+EPO-Datensätze zu definierten Stadien der Erythropoese erfolgte, werden diese nun auf die K562-Modelle übertragen. Dazu wird jedem K562-Messpunkt dasselbe Differenzierungsstadium zugeordnet, welches dem im Dendrogramm (Bild 9) nächstliegenden Messpunkt des CD34+EPO-Experiments in Tabelle 4 zugeordnet wurde.
Unbehandelte K562 ähneln den HSC (0h-Werte des Hämin-Experiments) bzw. den frühen Differenzierungsstufen CFU-GEMM und BFU-E (0h-Werte der Arac- und Butyrat-Stimulierung). Butyrat-stimulierte K562 verharren in diesem Stadium bis zum Ende des Experiments (48h). Die Expressionsprofile der AraC-stimulierte K562 nähern sich nach 12h den CFU-E an und verbleiben auf diesem Niveau bis zum Ende des Experiments (48h). Hämin-stimulierte K562 haben nach 12h CFU-GEMM- bzw. BFU-E-ähnliche Expressionsprofile. Nach 48h wird ein Proerythroblasten-ähnliches Stadium erreicht und bis zum Ende des Experiments (72h) beibehalten. Eine eindeutige Zuordnung der 48h- bzw. 72h-Hämin-Datensätze zu einem der 3 letzten Messpunkte des CD34+EPO-Experiments ist nicht möglich, weil diese beim Clustern näher aneinander geordnet wurden als an die nächstliegenden Hämin-Datensätze.

	unbehandelt	1d Epo	3d Epo	6d Epo	9d Epo	12d Epo	14d Epo
	HSC	**HSC**	(HSC)				
	(CFU-GEMM/BFU-E)	(CFU-GEMM/BFU-E)	**(CFU-GEMM/BFU-E)**	(CFU-GEMM/BFU-E)	(CFU-GEMM/BFU-E)		
			CFU-E	**CFU-E**	CFU-E	(CFU-E)	(CFU-E)
			P/E	P/E	**P/E** (73,9%)	**P/E** (82,8%)	**P/E/N/R** (88%)
K562+AraC			K562+0h AraC K562+6h AraC	K562+12h AraC K562+24h AraC K562+48h AraC			
K562+But			K562+0h But K562+12h But K562+48h But				
K562+Hämin	K562+0h Hämin	K562+0h Hämin	K562+12h Hämin K562+24h Hämin	K562+6h Hämin	K562+48h Hämin K562+72h Hämin	K562+48h Hämin K562+72h Hämin	K562+48h Hämin K562+72h Hämin

Zuordnung der Messpunkte im CD34+EPO-Experiment zu definierten Differenzierungsstufen, wurden in der Tabelle 7 die Messpunkte der 3 K562-Experimente ebenfalls diesen Differenzierungsstufen zugeordnet. Dies geschah dadurch, dass anhand der vorliegenden Cluster-Dendrogramme alle K562-Datensätze immer dem nächstliegenden CD34+EPO-Datensatz zugeordnet wurden. Bedingt durch die Dendrogrammstruktur ist die Zuordnung nicht immer eindeutig. Sind zum Beispiel zwei verschiedene Messpunkte des CD34+EPO-Experiments miteinander enger verbunden als mit dem nächsten K562-Datensatz, muss dieser beiden CD34-Datensätzen zugeordnet werden. Dadurch sind in Tabelle 7 manche Zeitpunkte der K562-Experimente mehrfach eingetragen.

Da alle 3 K562-Modelle als Modelle der Erythrozytendifferenzierung anerkannt sind, war eine hohe Übereinstimmung trotz der verschiedenen Stimulanzien erwartet worden. Bei der Butyrat-Stimulierung ordnen sich jedoch alle 3 Zeitpunkte im Clusterdendrogramm zusammen. Wenn es überhaupt zu einer Differenzierung kommt, unterscheidet sich diese deutlich von den anderen beiden K562-Experimenten. Bei AraC- und Hämin-Stimulierung ist eine Tendenz zu erkennen, dass sich frühe und späte Zeitpunkte in der richtigen Reihenfolge ordnen, das gilt aber nicht für alle Zeitpunkte. Daher ist anzunehmen, dass es bei AraC- und Hämin-Behandlung durchaus Übereinstimmungen gibt, wodurch die bereits erwähnte Korrelation der früheren, mittleren und späteren Messpunkte dieser 2 Experimente zustande kommt.

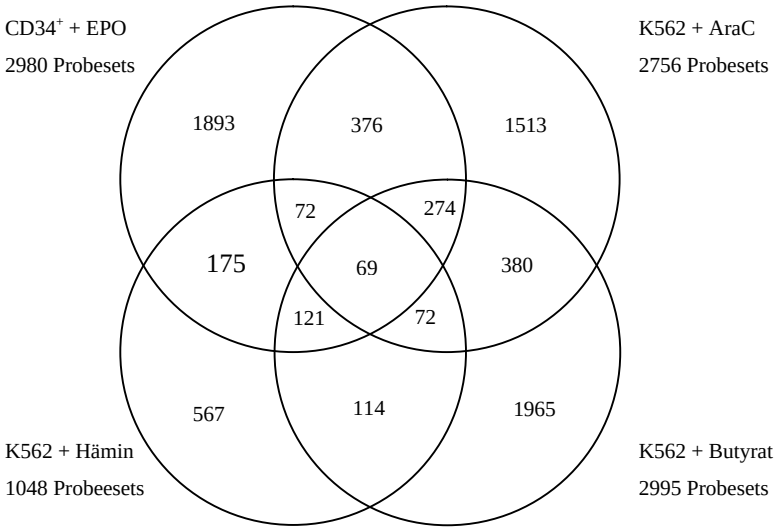
Zur richtigen Interpretation dieser Ergebnisse muss man bedenken, dass der Abstand der Hierarchieebenen in den Dendrogrammen keine quantitative Aussage über das Ausmaß der Verschiedenheit zulässt. Daher bedeutet die in Tabelle 7 gezeigte Zuordnung der Messpunkte der K562-Experimente zu definierten Entwicklungsstadien der Erythropoese nicht, dass diese identisch sind. Es bedeutet nur, dass diese Datensätze mit dem Messpunkt des CD34+EPO-Experiments, der dieses Stadium repräsentiert, eine größere Ähnlichkeit haben, als mit allen anderen CD34+EPO-Datensätzen. Die unbehandelten K562 wurden überwiegend der Differenzierungsstufe CFU-GEMM zugeordnet. Nur im Falle der Hämin-Serien kommt auch eine Einordnung bei den HSC in Betracht. Demnach ähnelt die unbehandelte K562 einer CD34-positiven Zelle, befindet sich aber nicht mehr auf dem Niveau der HSC sondern repräsentiert eher die ebenfalls CD34-positive CFU-GEMM oder eine Übergangsform zwischen beiden. Mit Hämin gelingt es, die Differenzierung von K562 bis zu CFU-E- oder sogar proerythroblastenartigen Stadien voranzutreiben. Mit AraC wird dies im untersuchten Zeitraum nicht ganz erreicht.

Während es beim $CD34^+$-Experiment recht gut gelungen ist, zu jedem untersuchten Zeitpunkt die Mehrheit der Zellen einem bestimmten Differenzierungsstadium zuzuordnen, ist dies bei allen untersuchten K562-Modellen nur ansatzweise möglich.
Das hier vorliegende K562-Ausgangsmaterial ist bezüglich selektiver Oberflächenmarker deutlich von mobilisierten CD34+-Zellen zu unterscheiden, jedoch gibt es bei der Betrachtung des gesamten Transkriptoms durchaus große Übereinstimmungen. Die Applikation von AraC oder Hämin bewirkt, dass ein Phänotyp erreicht wird, der eine gewisse Ähnlichkeit zu einem definierbaren Phänotyp einer erythroiden Vorläuferzelle aufweist. Trotzdem vereinen die Zellen zu jedem Zeitpunkt Eigenschaften, die für verschiedene Stadien typisch sind, andererseits werden nie alle Eigenschaften eines bestimmten Stadiums vollständig präsentiert.

2.1.4. Schnittmengen

Um die Modelle zu vergleichen, wurde nach Genen gesucht, die in allen oder mehreren Modellen differentiell exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden alle kombinatorisch möglichen Schnittmengen gebildet (Bild 10). Die Ergebnisse sind ausführlich in der Datei „CD34_AraC_But_Hemin-Intersections.xls“ auf der beiliegenden CD dargestellt.

Bild 10 zeigt eine schematische Darstellung der Schnittmengen der untersuchten Modelle. Die Summe aller Teilmengen in einem Vollkreis entspricht der Zahl der Gene, die in einem Modell als differentiell exprimiert gefunden wurden. In diesem Diagramm nicht dargestellt sind die Gene die ausschließlich in den Schnittmengen von CD34+EPO mit K562+Butyrat (504 Probesets) bzw. von K562+AraC mit K562+Hämin (163 Probesets) liegen.



Generell fällt auf, dass die Schnittmengen klein sind, obwohl alle Systeme als Modelle der erythroiden Differenzierung anerkannt sind. Weiterhin muss noch beachtet werden, dass ein Gen, das sich in einer Schnittmenge befindet, nicht unbedingt ähnliche Expressionsprofile in den verschieden Experimenten zeigt. Tatsächlich finden sich in den Schnittmengen viele Gene, die in den einzelnen Modellen völlig unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen. Es konnten aber trotzdem einige Gene gefunden werden, deren Transkription in allen Modellen in die gleiche Richtung verändert wird und denen daher möglicherweise eine wichtige Bedeutung bei der Ausprägung der phänotypischen Eigenschaften der Erythrozyten und ihrer Vorläufer zukommt bzw. deren Genprodukt im Erythrozyten nicht mehr benötigt wird (Tabelle 8). Im folgendem sollen Funktion und Bedeutung einiger dieser Gene, speziell der induzierten, erläutert werden:

ASAH1 (*N-Azylsphingosin-Amidohydrolase 1*) ist ein lysosomales Enzym und hydrolysiert das Sphingolipid Ceramid zu Sphingosin und freier Fettsäure. Möglicherweise spielt es beim

Abbau der intrazellulären Membransysteme im Reticulozyten eine Rolle [genecards]. Dafür spricht auch, dass die verstärkte Transkription des ASAH1-Gens im CD34+EPO-Experiment erst spät, nämlich am Tag 9 messbar wird.

Tabelle 8: Von den 69 Probesets, die in allen 4 untersuchten Modellen eine differentielle Expression des zugehörigen Gens anzeigen, werden 5 in allen 4 Modellen hochreguliert und 11 herunterreguliert.

Transkription hochreguliert	**Transkription herunterreguliert**
ASAH1	ACTB
FTHP1	CCT2
GABARAPL1	EIF5A
RPL37A	ENO1
SON	FABP5
	H2BFS
	IFITM3
	MBC2
	MIF
	PRO1843
	TIMM13

GABARAPL1 (*GABA(A) receptor-associated protein like 1*) gehört zu einer Proteinfamilie, deren Mitglieder allgemein im Membranfluss, also zum Beispiel Bildung, Transport und Verschmelzung von Membranvesikeln zu größeren Einheiten, eine Rolle spielen. GABARAPL1 wird in fast allen Geweben gebildet und ist unter anderem im Gehirn und in Leukozyten des peripheren Blutes besonders stark exprimiert [genecards].

SON ist ein nukleäres Protein, welches die DNA-Konsensussequenz 5'-GA[GT]AN[CG][AG]CC-3' erkennt und bindet. Es reprimiert die Transkription von Genen beim HBV [genecards] und wird mit einer antiapoptotischen Funktion in Verbindung gebracht [Greenhalf et al. 1999]. SON wird in vielen Geweben exprimiert, relativ stark in Leukozyten und im Herz [genecards] aber eine spezielle Funktion in der Erythropoese wurde bisher nicht beschrieben.

Die Induktion des Ferritin-Gens (FTHP1) während der Erythropoese war wegen des hohen Eisenbedarfs der erythropoetischen Vorläufer zu erwarten und ist allgemein bekannt.

Weiterhin sollen nur die 3 K562-Experimente verglichen werden, indem mit Hilfe eines Filters jeweils die Signalstärken zu den in Zeitpunkten 0h (unbehandelt), 12h und 48h ausgewertet werden, da für diese Zeitpunkte für alle K562-Modelle Daten vorliegen. Gefiltert werden die Gene, die jeweils in allen 3 K562-Experimenten entweder hoch- oder herunterreguliert sind oder ein lokales Maximum oder Minimum bei 12h haben. Beim Hämin-Experiment wird nur die Serie 1 verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Die Schnittmenge aus den 3 K562-Experimenten (nur Zeitpunkte 0h, 12h und 48h) enthält insgesamt 141 Probesets. 16 Probesets sind hochreguliert und 24 herunterreguliert. 2 weitere Probesets weisen bei 12h ein lokales Minimum auf.

Transkription hochreguliert	**Transkription herunterreguliert**	
ACBD3	ARHGDIB	NDUFS7
BZW1	ATP5I	NPM1
DMXL2	COX5B	NSEP1
ECM1	CYC1	PDCD6
HBE1	EIF3S8	SAH
IER5	HCAP-G	STAT5B
JUN	HIST1H1C	SYNCRIP
KIAA0404	HIST1H2BF	TIMM44
LASP1	HIST2H2AA	
LOC151162	HKE2	
MICB	HMGB3	
NRIP3	HSPC111	
RELN	IDI1	
RTN4	LSM7	
SH3BP5	MINPP1	
TGFB1I4	NDUFB8	
lokales Maximum 12h	**lokales Minimum 12h**	
...	FADS1	
	MBC2	

Dabei wurden zusätzlich zu den 5 Genen, die schon in der Schnittmenge aus CD34+ und allen 3 K562-Experimenten hochreguliert waren, 16 weitere Gene entdeckt, die in allen 3 K562-Experimenten hochreguliert waren. Analog wurden 24 weitere Gene gemeinsam herunterreguliert. Es gab keine lokalen Maxima bei 12h Behandlungsdauer aber 2 Gene zeigen ein lokales Minimum.

JUN als eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1 ist ein besonders intensiv erforschtes Molekül, dessen Bedeutung vor allem in der Umsetzung mitogener Signale, die über den MAP-Kinase-Signalweg eintreffen, liegt. Daneben ist AP-1 auch Effektor in anderen Signalwegen, wie dem Wnt- oder dem Toll-like-Rezeptor-Signalweg. SH3BP5 ist wie JUN ein Substrat der JUN N-terminalen Kinase (JNK). Komplexe aus SH3BP5 und JNK wurden an Mitochondrien assoziiert gefunden [Wiltshire et al. 2002]. Der Hauptbindungspartner von SH3BP5 ist jedoch BTK (Bruton's Tyrosinkinase), deren Aktivität durch SH3BP5 negativ reguliert wird [Yamadori et al. 1999]. BTK ist eigentlich an der Signaltransduktion in B-Zellen nach B-Zell-Rezeptor-Aktivierung beteiligt. Möglicherweise vermittelt SH3BP5 eine Kopplung der Signalwege von JNK und BTK [Wiltshire et al. 2002].

IER5 ist ein Transkriptionsfaktor und Mediator mitogener Signale [Forsberg et al. 2005].

RELN (Reelin) ist eine Serinprotease, die hauptsächlich im Gehirn gebildet wird. Dort moduliert sie in der extrazellulären Matrix Zelladhäsions- und Migrationsvorgänge. Im

CD34+-Modell ist RELN zu keinem Zeitpunkt detektierbar.

Auch RTN4 (Reticulon 4) ist ein integrales Protein der EPR-Membran. Es wird bisher hauptsächlich als neuronales Protein angesehen, allerdings kommt es in mehreren Isoformen mit unterschiedlicher Organspezifität vor. RTN4, inhibiert das Wachstum neuer Neurite und reduziert die antiapoptotische Aktivität von BCL2 möglicherweise indem es BCL2 von der Mitochondrienmembran zum EPR rekrutiert [genecards]. In vielen Krebszelllinien induziert RTN4 die Apoptose wenn es künstlich überexprimiert wird. Umgekehrt ist seine Transkription in verschiedenen Tumoren unterdrückt [Watari und Yutsudo 2003]. In unbehandelten K562 ist die RTN4-mRNA bereits in großen Mengen vorhanden, ebenso in CD34+. Eine deutliche Zunahme nach Induktion gibt es aber nur in den 3 K562-Modellen.

TSC22D1 (TGFB1I4) ist ein transkriptionaler Repressor, der in vielen Geweben exprimiert wird. Seine Transkription wird durch TGFbeta stimuliert [Hardy et al. 2005]. Bisher ist offenbar nur das natriuretische Peptid Typ C als abhängiges Gen bekannt.

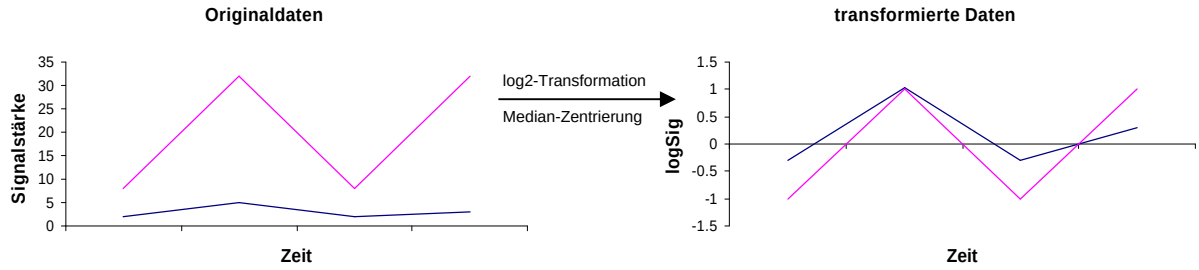
Bei den herunterregulierten Genen fällt auf, dass einige grundlegende Lebensprozesse betroffen sind. Die Produkte der Gene ATP5I, NDUFB8 und NDUFS7 sind Bestandteile der Atmungskette. LSM7 und SYNCR1P sind an der RNA-Prozessierung beteiligt. HCAP-G (Condensin Untereinheit 3) ist ebenso wie die 3 Histone an der Verpackung des Chromatins während der Mitose beteiligt. Diese Veränderungen deuten auf eine allgemeine Abnahme der Vitalität der Zellen hin. Dies stimmt mit den mikroskopischen Beobachtungen bei den AraC- und Butyrat-Modellen gut überein, wurde aber beim Hämin-Modell wegen der laut Literatur [Lowenhaupt und Lingrel 1979] nicht gestörten Proliferation so nicht erwartet.

STAT5 kommt in 2 Isoformen vor, nämlich STAT5A und STAT5B. STAT5B ist in allen drei K562-Modellen herunterreguliert, STAT5A nur bei Butyrat- oder Hämin-Stimulation aber nicht bei AraC-Behandlung. Die Transkription des STAT5A-Gens schwächt sich auch im CD34+-Modell zum Ende hin ab. STAT5 ist wichtiger Bestandteil der Signalkette stromabwärts des EPO-Rezeptors, übernimmt eine ähnliche Funktion aber auch in zahlreichen anderen Signalwegen, die von Wachstumsfaktor- oder Zytokin-Rezeptoren ausgehen. Prozesse, an denen STAT5 beteiligt ist, werden allgemein mit Proliferation und Unterdrückung der Apoptose in Verbindung gebracht. Von daher war zu erwarten, dass die STAT5-Transkription beim Einsatz zytotoxischer Chemikalien wie AraC und Butyrat, die zur Apoptose führen, zurückgeht. Bei der erythroiden Differenzierung werden Proteine der Zellproliferation in der Spätphase ohnehin überflüssig. Dieses Erklärungsmodell versagt jedoch beim Hämin, welches die Proliferation und Überlebensfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigt.

2.1.5. Die transkriptionelle Basis der Differenzierungsstufen: k-means-Clustering

Um festzustellen, wie die Zelle den auslösenden Stimulus in einen Differenzierungsvorgang umsetzt, muss untersucht werden, welche Gene zu welchem Zeitpunkt an- bzw. abgeschaltet werden. Von größtem Interesse sind dabei natürlich Proteine mit Funktion in der Signalübertragung, weswegen sich die folgenden Ausführungen auch auf eine Auswahl besonders wichtiger Klassen von Signalproteinen beschränken wie zum Beispiel Proteinkinasen, und -phosphatasen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Besonderes Augenmerk gilt dabei den Transkriptionsfaktoren, weil deren Expressionsmuster von kooperierenden Bioinformatikern benutzt werden sollen um unter Einbeziehung von ChIP- und anderen Interaktionsdatenbanken *in silico* transkriptionelle Netzwerke zu erstellen.
Die Einordnung der regulierten Gene in Kategorien mit bestimmter molekularer Funktion erfolgte unter Zuhilfenahme der Annotationen des GeneOntology-Konsortiums. Zunächst müssen die Gene danach geordnet werden, ob ihre Expression im Zeitverlauf hoch- oder herunterreguliert wird, bzw. ob die Expressionskurven deutliche lokale Minima oder Maxima aufweisen. Letzteres würde auf eine transiente Aktivierung bzw. Deaktivierung im Differenzierungsprozess hindeuten. Da die Verläufe der Expressionskurven bei mehreren untersuchten Zeitpunkten sehr komplex werden, wurde anstatt eines einfachen Datenfilters der *k-means*-Clusteralgorithmus verwendet. Durch das *Clustering* können also aus der Vielzahl der Gene mit zum Teil völlig unterschiedlichen Expressionsverläufen Gruppen gebildet werden, die aus Genen mit ähnlichen Expressionsverläufen bestehen. Der Clusteralgorithmus wurde nur auf die Gene angewendet, die anhand definierter Kriterien als differentiell exprimiert betrachtet werden.
Vor dem Clustern wurden mit den Expressionsdaten (Signalstärken) noch zwei Transformationen durchgeführt. Zunächst wurde von allen Signalstärken der Logarithmus zur Basis 2 gebildet. Die logarithmierten Signalstärken wurden zeilenweise medianzentriert, d.h. von den logarithmierten Signalstärken aller Messpunkte für jeweils ein Gen wurde der Median dieser Werte subtrahiert. Diese Manipulationen dienen dazu, Expressionsprofile von verschiedenen Genen, die sich zwar im Verlauf ähneln, sich aber in der Signalstärke und in der Deutlichkeit der Änderungen unterscheiden, anzugleichen. In solchen Fällen wird nämlich vermutet, dass ähnliche regulatorische Prinzipien wirken und deshalb ist es erwünscht, dass die Gene ins gleiche Cluster geordnet werden, was durch die Transformationen begünstigt wird.

Bild 11 zeigt schematisch die Auswirkungen der Datentransformationen, die vor dem Clustern durchgeführt wurden. Die Expressionskurven zweier Gene, die sich in der Tendenz zwar ähneln, aber in Signalstärke und Intensität der Änderungen unterscheiden, werden durch Logarithmierung und nachfolgender Median-Zentrierung angenähert. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass beide Gene ins selbe Cluster geordnet werden, was aufgrund der prinzipiellen Ähnlichkeit erwünscht ist. Durch die Subtraktion des Medians kommt es bei den logarithmierten Signalen (logSig) zu negativen Werten.



Die Ergebnisse des Clusterns werden hier nur für das CD34+-Experiment gezeigt und beurteilt. Die Resultate aller Modelle sind im Ordner „Clusterergebnisse“ auf der beiliegenden CD abgelegt.

Die 2980 regulierten Probesets des CD34+-Modells wurden in 40 Cluster eingeteilt. Diese wurden dann wieder zu Gruppen mit ähnlichem Verlauf geordnet, um die Übersichtlichkeit zu erhöhen. Innerhalb dieser Gruppen wurden die Cluster so angeordnet, dass zuerst die Cluster, deren Gene die markanten Regulationsereignisse früher zeigen, vor denen kommen, in denen diese Veränderungen später stattfinden. Das verwendete Clusterprogramm GENESIS gibt die Cluster in einer bestimmten Reihenfolge aus. Anhand dieser Reihenfolge wurden die Cluster durchnummeriert. Diese Nummerierung wurde im weiterem beibehalten und hat nichts mit der Bildung besagter Gruppen zu tun. Es war sehr häufig zu beobachten, dass bei Genen, die durch mehrere Probesets auf dem Array repräsentiert sind, diese Probesets auch in dasselbe Cluster geordnet wurden, was die Qualität und Robustheit der angewendeten Methoden unterstreicht.

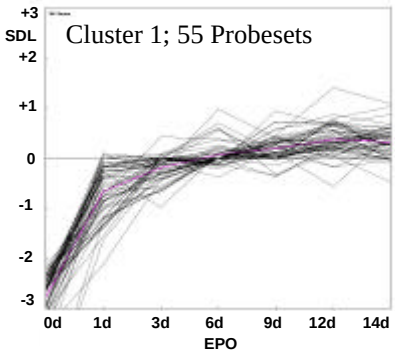
Insgesamt zeigen 1071 Probesets eine aktivierte und 1094 Probesets eine verminderte Transkription. 419 Probesets weisen ein ausgeprägtes lokales Maximum auf, 241 Probesets ein lokales Minimum. 155 Probesets haben sowohl ein lokales Maximum als auch Minimum.

Innerhalb der Cluster wurde nach Genen gesucht, deren Produkte zu wichtigen Familien von Signaltransduktions-Proteinen gehören bzw. an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind. In den folgenden Abbildungen sind diese Familien bzw. Prozesse aufgeführt und zugehörige Gene benannt. Zur Identifikation dieser Gene wurden die GeneOntology-Annotationen sowie von AFFYMETRIX bereitgestellte Datenbankinformationen benutzt.

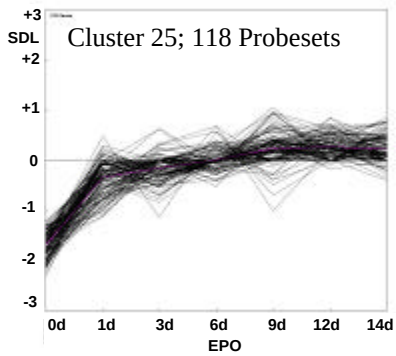
2.1.5.1. Cluster mit steilem Anstieg bis Tag 1

In den Clustern 1, 25 und 38 befinden sich Gene die innerhalb von 24 Sunden nach der Zugabe von EPO induziert wurden. In diesem Zeitraum zeigten die Zellen noch keine morphologischen und zellbiologischen Veränderungen (siehe Abschnitt 2.1.2.1.).

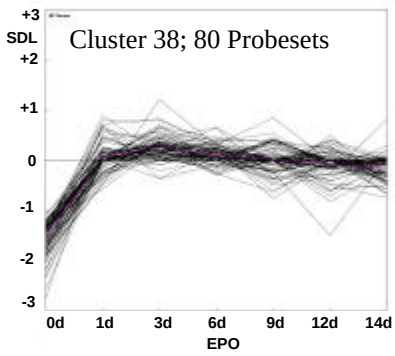
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	NEK2 | STK6 | CDC2 | TTK | PRKAR2B
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	MS4A3
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	MYBL2 | GATA1 | TCF3
Ubiquitinligasen	WHSC1
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CLEC11A
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	BIRC5
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	NUDT1 | TPM1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	CKS1B | PLK4 | PCTK1 | AURKB | CDC2 | BMP2K
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP2R4 | CDC25C | CDKN3 | ANP32E
Rezeptoren	ITGB2 | TFRC
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	FOXM1 | LDB1| PTTG1 | TCF3
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	CKS2 | PIK3R4 | PLK1 | BUB1B | VRK1 | CHEK1 | BUB1
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP1R7 | PPM1G
Rezeptoren	PAQR4 | SPN
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	KHSRP | SMARCA4 | GTF2H3 | DNMT1 | SMARCA5 | ITGB3BP
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



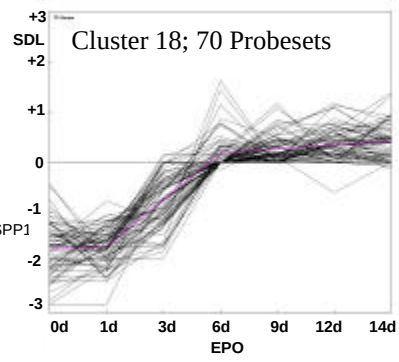
Die Cluster-Gruppe enthält viele Gene, deren Produkte an DNA-Replikation, Zellzyklus und Apoptose beteiligt sind bzw. diese Prozesse kontrollieren. Insbesondere die zahlreichen Proteinkinasen sind größtenteils als Regulatoren der Proliferation bekannt. Diese Ergebnisse stimmen mit der hohen Zellteilungsaktivität überein, welche die Zellen nach Stimulierung mit EPO und den anderen Zytokinen aufweisen. Der Transkriptionsfaktor GATA1 und der

Transferrinrezeptor TFRC sind typische Proteine der erythroiden Differenzierung. Scheinbar widersprüchlich ist, dass zugleich pro- und antiapoptotische Gene angeschaltet wurden. Die Induktion proapoptotischer Gene bei schnell proliferierenden Zellen macht aber dadurch Sinn, dass diese Zellen wegen der intensiven DNA-Replikation besonders gefährdet sind, zu entarten. Daher müssen in schnell proliferierenden Zellen die proapoptotischen Proteine in ausreichender Menge vorhanden sein, um im Falle einer DNA-Schädigung sofort aktiviert werden zu können.

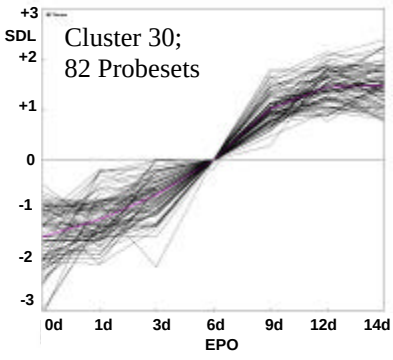
Es zeigt sich hier, das auf RNA-Ebene der Übertritt von der langsam proliferierenden pluripotenten Stammzelle zur schnell proliferierenden CFU-GEMM bzw. BFU-E schon vorbereitet wird, während auf Proteinebene zumindest bei den Markern noch keine Veränderung zu beobachten sind.

2.1.5.2. Cluster mit steilem Anstieg zwischen Tag 1 und 6

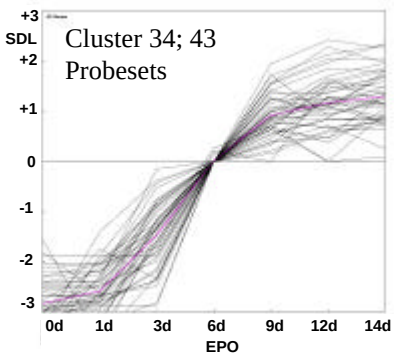
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PBK
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	CCR1 | CCR2 | EPOR | LEPR | MRC1 | ASGR2 | C3AR1 | LTBP1 | SPP1
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	SREBF1 | IRF8
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	PPBP | SPP1
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	DDEF1 | TUBG1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	NUDT4
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	SGK | DYRK3 | MAP2K3
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	DUSP1
Rezeptoren	EPOR | FCGR2B
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	KLF1 | MXI1 | CITED2
Ubiquitinligasen	TRIM58
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	BSG | IRS2



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	EPOR | CD36 | TFR2 | MS4A6A
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	-
Ubiquitinligasen	TRIM10
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	VEGF
andere Signalproteine	-

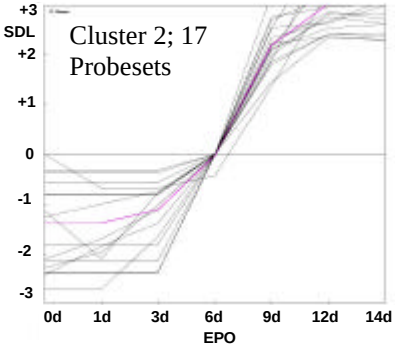


Die Cluster 18, 30 und 34 enthalten ebenfalls viele Zellzyklusgene. Auffallend ist der hohe Anteil Rezeptoren, besonders in Cluster 18. Die meisten dieser Rezeptoren sind zwar mit einer hämatopoetischen Funktion, aber bisher nicht klar mit einer Funktion in der Erythropoese korreliert worden. Der EPO-Rezeptor EPOR ist mit mehreren Probesets auf dem Array vertreten, von denen drei in dieser Gruppe erscheinen. Dass diese drei jeweils in verschiedene Cluster sortiert wurden, spricht dafür, dass es sinnvoll ist, ähnlich liegende Cluster zusammengefasst zu betrachten. Die Induktion des EPOR beim Übergang vom BFU-E- zum CFU-E-Stadium ist ebenso bekannt wie die Anschaltung des CD36-Gens. Die Cluster 18, 30 und 34 sind etwas uneinheitlich und der Anstieg der beinhalteten Gene setzt sich zum Teil noch bis zum Tag 9 hin fort. Daher ist diese Gruppe von der folgenden Gruppe nur unscharf abzugrenzen. Dies äußert sich auch darin, dass beide Gruppen viele Gene enthalten, die für erythrozytenspezifische Proteine wie Hämoglobine, Glycophorine, Enzyme der Häm-Synthese, Karboanhydrase, membranständige Transporter und Zytoskelettproteine kodieren.

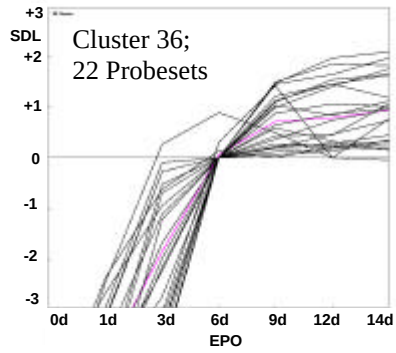
2.1.5.3. Cluster mit steilem Anstieg zwischen Tag 3 und Tag 9

Die Transkription der Gene der Cluster 17 und 36 wurde zwischen Tag 3 und Tag 9 stark induziert. In dieser Gruppe befinden sich relativ wenige Gene, wobei es sich überwiegend um solche handelt, deren Produkte für die Grundfunktionen des Erythrozyten benötigt werden und deren Hochregulation daher zu erwarten war. Signalproteine sind nur wenige vorhanden. GDF15 gehört zur TGFbeta-Familie und ist insgesamt noch sehr schlecht charakterisiert. Die Hämoxygenase HMOX1 spaltet Häm zu Biliverdin und ist eigentlich ein Enzym der Milz, wo seneszente Erythrozyten abgebaut werden. HMOX1 ist aber laut GeneOntology auch an der Signaltransduktion beteiligt.

Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	RAP1GA1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	TNS -
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	- -
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CECR1 | GDF15
andere Signalproteine	HMOX1

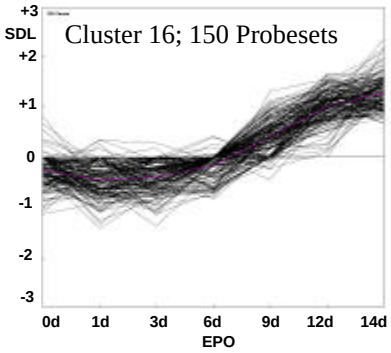


Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	LYZ
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	-
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-

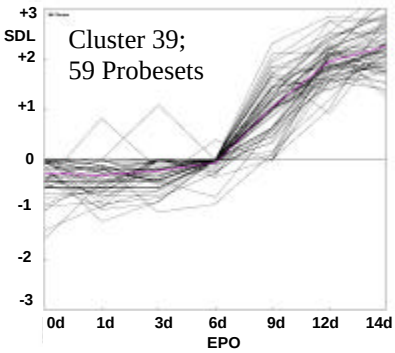


2.1.5.4. Cluster mit steilem Anstieg zwischen 6 und 12 Tagen

Funktion in Apoptose	BAG1
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	ARF4 | RAB6B | GTPBP2 | RAPGEF2
Lipidkinasen	PI4KII | PIP5K1B
Lipidphosphatasen	MTMR3
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PLCL2
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	CDKN2A | EIF2AK1 | MAP2K3 | MARK3 | STK17A | PIM1 | WNK1 | PKN2
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PME-1 | PPM1A | MTMR3
Rezeptoren	EPOR | MMD | IL15RA | SLC1A5 | TLOC1 | IL6ST | ADIPOR1 | RXRA
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	NCOA2 | CREBL2 | RXRA | DDB2 | FOXO3A | NR3C1 | ZNF42 | MONDOA
Ubiquitinligasen	MKRN1 | TRIM38 | RNF10 | FLJ30092 | CDC34 | UBR2 | FBXO9 | MARCH3 | HECTD3 | MYLIP | RNF123 | UBE2H
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	ARHGEF12 | ARL4 | RPIP8
Lipidkinasen	PIP5K2A
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	FKBP1B
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	RIOK3 | WNK1 | MAST3
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	TNS1
Rezeptoren	IGF2R
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	ATF5 | ELL2 | PCAF | BCL6 | FOXO3A | CITED2 | TAL1
Ubiquitinligasen	SIAH2 | MKRN1 | RNF187 | MARCH8
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CCL18
andere Signalproteine	-



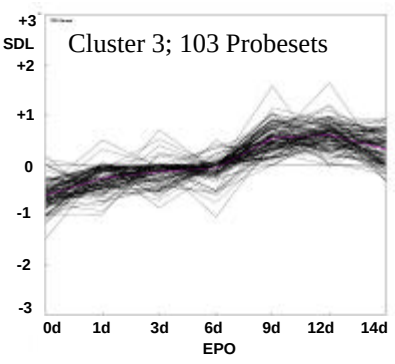
Die Cluster 16 und 39 enthalten die Gene, die erst zwischen Tag 6 und 9 induziert wurden, d.h. wenn die Mehrzahl der Zellen vom CFU-E-Stadium ins Proerythroblasten- bzw. Erythroblastenstadium übergeht. Beide Stadien sind mitotisch aktiv, wobei es bei den Erythroblasten zu einer Verkleinerung der Zellen bei jedem Teilungsschritt kommt.

Diese Gruppe enthält noch einige Gene, die für mitotische Proteine kodieren wie zum Beispiel MAP2K3 oder CDKN2A. Ein weiteres Probeset des EPOR fällt in diese Gruppe und außerdem IL6ST (gp130). IL6ST ist eine Untereinheit des IL6-Rezeptors aber nicht IL6-spezifisch sondern gleichzeitig auch Rezeptor für andere Zytokine wie LIF und IL11. IL6 wurde neben EPO und SCF als drittes Zytokin dem Medium zugesetzt und möglicherweise unterliegt der zugehörige Rezeptor ebenso einer positiven Rückkopplung wie der EPO-Rezeptor. Die IL6-spezifische alpha-Untereinheit des IL6-Rezeptors ist aber auf dem Array nicht nachweisbar.

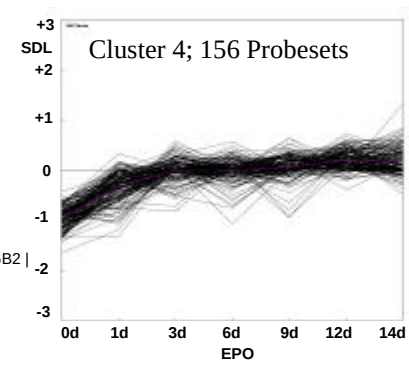
Auf die Transkriptionsfaktoren FOXO3A, BCL6 und CITED2 sowie die Ubiquitinligase SIAH2 soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie im Abschnitt 2.1.6 ausführlich behandelt werden.

2.1.5.5. Cluster mit schwachem Anstieg bzw. moderatem Anstieg über längerem Zeitraum

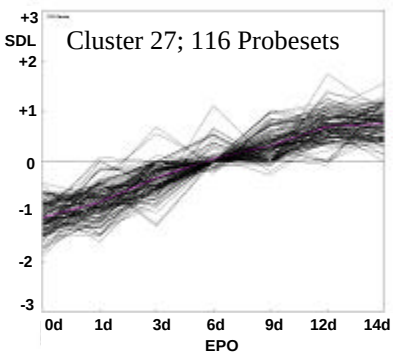
Funktion in Apoptose	BIRC5
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	RABGAP1L | SARA1 | HRIHFB2122 | MINK1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	MAP2K2 | MINK1 | CIT |
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	ILKAP | CDC25B
Rezeptoren	C17orf35 | THRAP5 | PLXND1 | LEPR
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	CARM1 | THRAP5 | RB1 | IRF2 | POLR2I | USF2 | SP3
Ubiquitinligasen	KIAA0317 | C1orf164
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	HDGF
andere Signalproteine	RGS10



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	GSPT1 | GPSM2 | RALGDS
Lipidkinasen	PIK4CB
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	MELK
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP2R5E | DNAJC6 -
Rezeptoren	PGRMC2 | LBR | BZRP | SLC7A1 | THRAP4 | C8orf20
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	SKIIP | BRD8 | TFDP2 | THRAP4 | CREG1 | AFF1 | ZNF217 | HMGB2 | UBN1 | RAD51 | RREB1 | ILF3
Ubiquitinligasen	UBE2C | SMARCA3 | RNF24 | WHSC1 | RNF167
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	ARHGEF12 | TUBA1 | RAB6B | DAAM1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	JAK2 | MAP4K4 | MKNK2 | PTK2B
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP2R1B | PME-1
Rezeptoren	LEPR | EPOR | TFRC | TFR2 | IQWD1
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	UBE2V1 | HEXIM1
Ubiquitinligasen	FBXO7
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	HDGF | S100A6
andere Signalproteine	IRS2

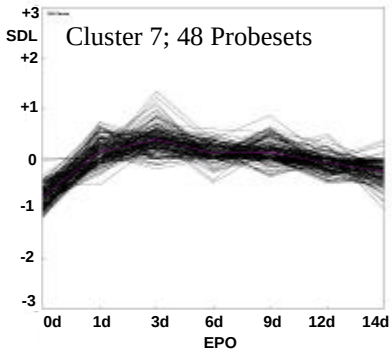


Die Transkription der Gene dieser Clustergruppe (Cluster 3, 4, 27) wächst über den gesamten Zeitraum langsam an. Enthalten sind neben Transferrinrezeptoren und einem EPOR-Probeset hauptsächlich Transkriptionsfaktoren. Unter den wenigen Kinasen befinden sich 2 MAP-Kinasen und einige Kinasen, die mit Entwicklungsprozessen assoziiert sind. Der Leptinrezeptor (LEPR) tritt mit je einem Probeset in Cluster 3 und 27 auf. Er spielt in der Hämatopoese eine Rolle, indem er die Proliferation der hämatopoetischen Progenitorzellen stimuliert [Haluzik et al. 2002], aber eine Funktion explizit in der Erythropoese wurde bisher nicht beschrieben.

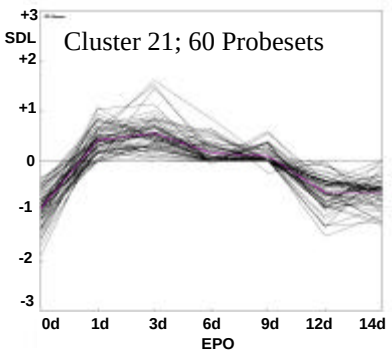
2.1.5.6. Cluster mit lokalem Maximum

Diese Clustergruppe enthält 6 Cluster mit Genen, die während der Differenzierung nur vorübergehend angeschaltet wurden. Anhand der Zeitspanne, während der diese Gene verstärkt transkribiert wurden, und der im Abschnitt 2.1.2.1. erfolgten Zuordnung der einzelnen Messpunkte zu definierten Differenzierungsstadien, kann eine Aussage darüber getroffen werden, in welchen Differenzierungsstadien die Produkte benötigt werden. Die Cluster wurden nach den Zeitpunkten der maximalen Werte geordnet.

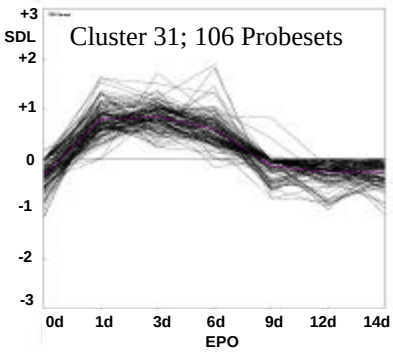
Funktion in Apoptose	CASP3 | BIRC5 | SIVA
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	RAN | RANBP5
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	INPP5D
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PKIG | CDK4 | FASTK
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PTPN7
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	MMS19L | SMARCA4 | TRIP13 | DEAF1 | TCEB3 | HMGA1
Ubiquitinligasen	RBBP6
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	RANBP1 | TBC1D1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP1R14B
Rezeptoren	OPRS1 | SEMA4D
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	SMARCA4 | TRIM28 | PHB
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	BID
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	SOS1 | GNL3
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	PPIG
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	KHDRBS1
Ubiquitinligasen	CHD4 | TTC3 | RNF130
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	STMN1



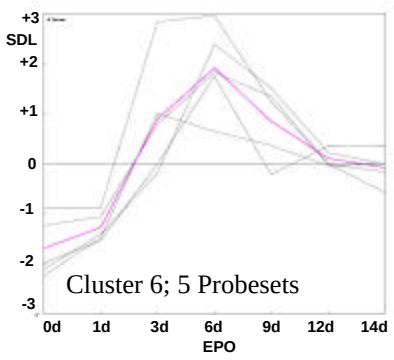
Die Cluster 7, 21 und 31 bilden eine Untergruppe mit Genen, die bereits in den ersten 24 Stunden hochreguliert wurden. Die Abschaltung erfolgte zwischen Tag 6 und Tag 12. Bei Cluster 7 ist die Abschwächung eher gering und daher ist dieses Cluster weniger deutlich von der Gruppe 1 zu unterscheiden, wo Cluster mit sofortiger Induktion ohne nachfolgende Abschaltung geordnet sind.

Die zeitlichen Maxima dieser 3 Cluster fallen mit den Entwicklungsstadien CFU-GEMM und BFU-E zusammen. Daher ist anzunehmen, dass die Produkte dieser Gene wichtig für den Fortgang der Entwicklung während dieser Phasen sind. Allerdings enthalten diese Cluster nur wenige Signalproteine der ausgewählten Kategorien. Insbesondere in Cluster 7 befinden sich mehrere Gene, deren Produkte an der Apoptose beteiligt sind.

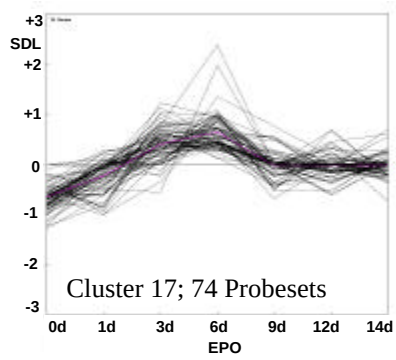
Die Transkription der Gene in Cluster 6 und 17 erreichte maximale Werte am Tag 6. Zu diesem Zeitpunkt haben die meisten Zellen das Stadium CFU-E erreicht. Außerdem sind noch CFU-GEMM und BFU-E vorhanden und es erscheinen schon die ersten Proerythroblasten. Neben einigen Transkriptionsfaktoren befinden sich in diesen Clustern zwei Gene, deren Produkte an Steuerung und Ausführung der Mitose beteiligt sind, nämlich die MAP-Kinase MAP3K5 (MEKK5) sowie Tubulin-beta. Integrin alpha 4 (ITGA4) ist ein Leukozytenantigen und in reifen Erythrozyten nicht exprimiert. Inhibin beta C (INHBC), ein Zytokin der TGFbeta-Familie, fällt ebenfalls in diese Gruppe. Dieser Signalweg wird im Abschnitt 2.1.6

ausführlich diskutiert.

Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	TUBB2
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	-
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	PF4
andere Signalproteine	-

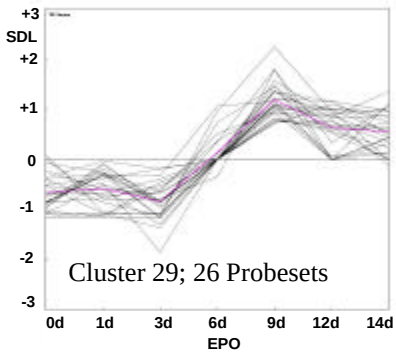


Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	MAP3K5
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	ITGA4 | SEMA4C
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	LDB1 | HIRA | MGC4170 | TTF1
Ubiquitinligasen	FBXO11 | BAZ1A | RFWD3
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CKLF | VWF | INHBC
andere Signalproteine	-



Cluster 29 vereint Gene, deren Transkriptionsmaximum am Tag 9 erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt können ca. 74% der Zellen zytometrisch dem Proerythroblasten- und Erythroblastenstadium zugeordnet werden. Dieses Cluster enthält insgesamt nur wenige Gene. Die Serin-Threonin-Kinase STK11 wirkt als Tumorsuppressor, es ist jedoch nicht bekannt, in welchen Signalweg sie eingebunden ist. Der Transkriptionsfaktor ATF5 wurde mit einem anderen Probeset bereits in Cluster 39 (Gruppe 4) detektiert. Die Cluster 39 und 29 ähneln sich stark bis auf die Abschwächung der Transkription zwischen Tag 9 und 12 in Cluster 29. Letztere ist aber nicht bei allen Genen gleichermaßen stark, so dass bezüglich ATF5 kein Widerspruch entsteht.

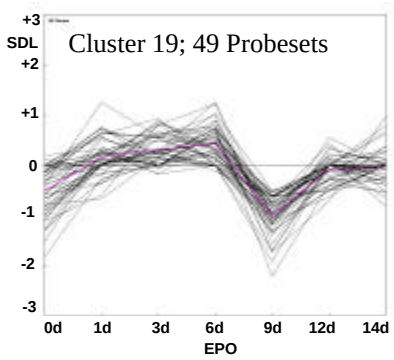
Funktion in Apoptose	LY86 | LGALS1
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	RAB31
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	STK11
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	STAB1 | FCER1G
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	ATF5
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	GRN
andere Signalproteine	TYROBP | S100A9 |



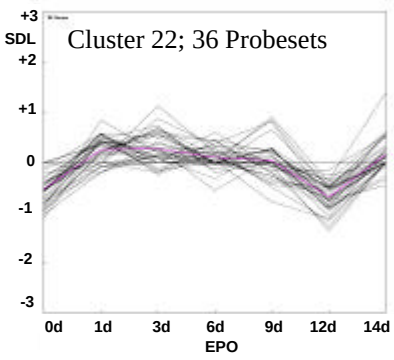
2.1.5.7. Cluster mit lokalen Minima und Maxima

Die folgenden Cluster weisen jeweils ein ausgeprägtes Maximum und Minimum auf. Dabei bilden die Cluster 19 und 22 sowie die Cluster 26 und 35 je eine Untergruppe, die sich darin unterscheiden, ob erst das Maximum und dann das Minimum erreicht wird oder umgekehrt.

Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	PPIG
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	EIF2AK2 | CDC42BPA
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PTP4A2 | SET
Rezeptoren	THRAP2
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	CHES1 | UBXD2
Ubiquitinligasen	RBBP6
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-

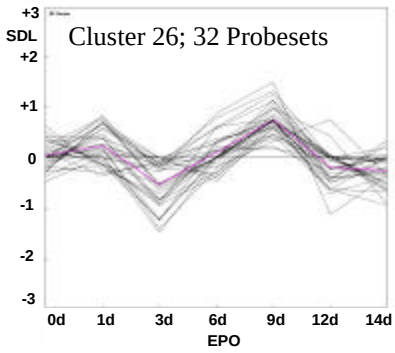


Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	MAP3K5
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	ITGA4 | M6PR | EBP
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	HDAC2 | HMGB1
Ubiquitinligasen	SIAH1 | RNF44
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-

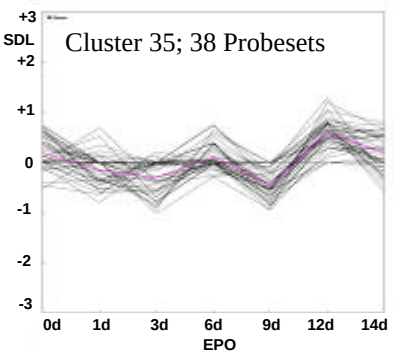


Die Transkripte der Cluster 19 und 22 zeigten eine deutliche Induktion zwischen 0 und 24 Stunden und erreichten dann ihre maximale Präsenz. Anschließend wurde die Transkription stark herunterreguliert bis zu einem Minimum am Tag 9 (Cluster 19) bzw. am Tag 12 (Cluster 22). Am Tag 12 bzw. Tag 14 wurden wieder höhere Werte gemessen. Während die Maxima dieser Cluster in den Zeitraum stärkster Proliferation fallen (CFU-GEMM, BFU-E, CFU-E), markieren die Minima den Übergang zum (Pro-) Erythroblasten. Offensichtlich dürfen bei diesem Übergang bestimmte Proteine nicht vorhanden sein. Nachdem dieser Schritt vollzogen ist, wird die Transkription jedoch wieder angeschaltet, zumal auch die Proerythroblasten und Erythroblasten noch proliferieren. ITGA4 und MAP3K5 wurden schon im Cluster 17 gefunden. Dieses Cluster enthält einige Probesets, deren Kurven denen in Cluster 22 durchaus ähnlich sind.

Funktion in Apoptose	CASP1 | PYCARD
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	RAB31 | ABR
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	HCK
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	-
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	ECGF1
andere Signalproteine	LGALS9



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	TBC1D15 | ARHGEF2
Lipidkinasen	PIK3R1
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	AAK1 | MAP3K7 | RIOK3
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	THRAP1 | PTCRA
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	NFE2L1 | CREB1 | MLL | EP300 | TAF5L | THRAP1
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	WNT6



Die Expressionskurven in Cluster 26 und 35 zeigen zuerst ein Minimum und dann ein Maximum, wobei dieser Verlauf in Cluster 35 nicht ganz so deutlich ist und auch mit einer Oszillation verglichen werden kann. In Cluster 26 gibt es ein deutliches Minimum bei 3 Tagen (CFU-GEMM, BFU-E) und ein Maximum bei 9 Tagen (Erythroblast).

HCK (hemopoietic cell kinase) ist hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen der myeloiden und B-lymphoiden Reihe exprimiert [genecards] und dort je nach Zelltyp an verschiedenen Prozessen beteiligt. AAK1 steuert die Clathrin-vermittelte Endozytose. RIOK3 ist eine in vielen Geweben exprimierte Proteinkinase, deren zellbiologische Funktion noch nicht bekannt ist.

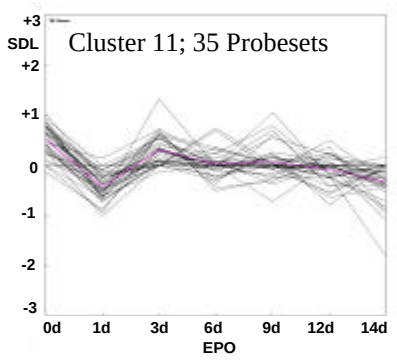
NFE2L1 ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch in der Erythropoese gebildet wird, und wurde bereits im Zusammenhang mit der Zuordnung der Messpunkte zu definierten Differenzierungsstadien im Abschnitt 2.1.2.1. diskutiert.

ECGF1 (endothelial cell growth factor 1) stimuliert die Proliferation endothelialer Zellen und fördert so die Angiogenese.

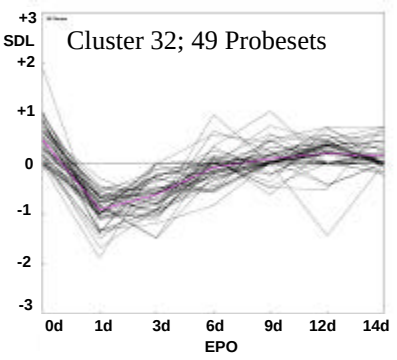
2.1.5.8. Cluster mit lokalem Minimum

Die Expressionskurven der Gene in den folgenden 6 Clustern zeichnen sich durch lokale Minima aus. Diese liegen immer in den frühen Messpunkten und wurden ganz oder annähernd schon am Tag 1 erreicht und dauerten dann unterschiedlich lang an. Lediglich Cluster 20 bildet hier eine Ausnahme, hier liegt das Minimum bei Tag 3.
Die Gene dieser Cluster sind also sowohl in den Progenitorzellen als auch in den späteren Stadien exprimiert. Kritisch ist die Umschaltung vom Stammzellstatus auf das Differenzierungsprogramm sofort nach der Zugabe von EPO, wo die Produkte dieser Gene nicht präsent sein dürfen. Während es bei den Clustern 11 und 32 zu einer schnellen Reaktivierung der Transkription kommt, verzögert sich diese bei den übrigen Clustern auf die Zeitspanne zwischen Tag 3 und Tag 6 bzw. Tag 9. In diesem Bereich differenzieren die CFU-E zu Proerythroblasten.

Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	CSF2RB
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	SMARCD2 | TOE1
Ubiquitinligasen	UBE2A | RING1
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



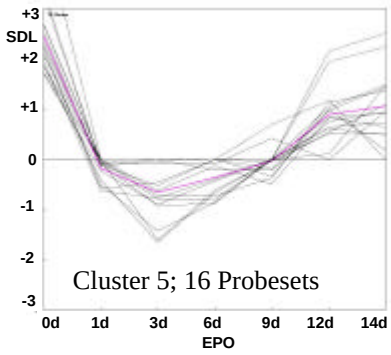
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	GIT1 | ARF5 | RAB27A
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PIM2 | STK19
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP3CB
Rezeptoren	FCGR2A | GRINL1A
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	STAT6 | JUNB | NR3C1 | FOXJ2 | TSC22D2 | ID2
Ubiquitinligasen	TRIM33
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CCL2
andere Signalproteine	DAXX



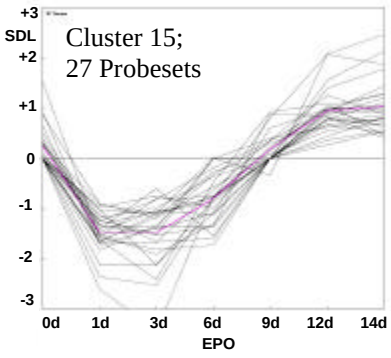
In der Untergruppe aus Cluster 11 und 32 befindet sich die Proteinkinase PIM2, die als Onkogen identifiziert wurde. PIM2 wird neben hämatopoetischen Zellen auch im Dünndarm, Dickdarm und Hoden exprimiert. Eine Überexpression wurde in Leukämien, Lymphomen und kolorektalen Adenokarzinomen beobachtet.
Einige bedeutende Transkriptionsfaktoren wie STAT6, JUNB und ID2 erscheinen ebenfalls in

dieser Gruppe. Zwei weitere Probesets von ID2 fallen allerdings in die Cluster 15 und 23 der folgenden Untergruppe. STAT6 wird durch Interleukin 4 aktiviert, während ID-Proteine Effektoren von Zytokinen der TGFbeta-Familie sind.

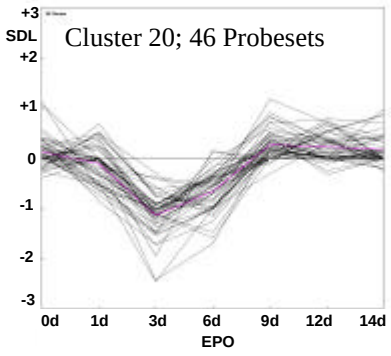
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	CDKN1A
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	ATF3 | NFKB2 | KLF6
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



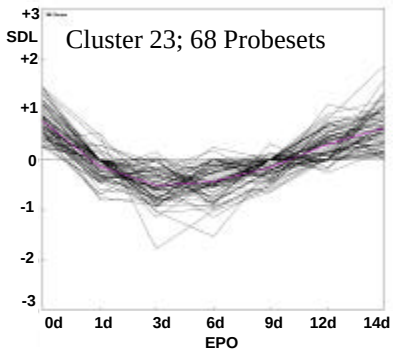
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	TBC1D3
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	TRIB3
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	CALCOCO1 | DDIT3 | BTG2 | HBP1 | CEBPB | ID2
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	CLK3
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	TENS1
Rezeptoren	NPC1
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	LITAF | ISGF3G | TSC22D3
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	EHD1 | EIF5 | ARF1 | RGL1 | ARL2BP
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	NEK7
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	DUSP5
Rezeptoren	IL10RA | CRLF3 | MTVR1
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	NCOA3 | JARID1B | KLF10 | IRF1 | BACH1 | PHF1 | BTG1 | ID2
Ubiquitinligasen	UBE2B | RNF103 | RNF11 | UBE2H
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



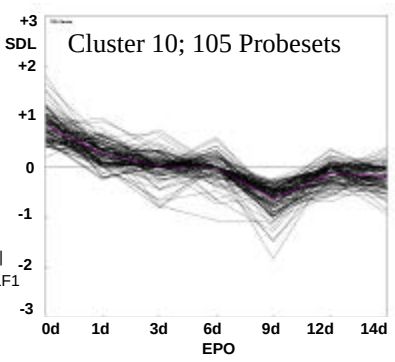
Die Untergruppe aus Cluster 5, 15, 20 und 23 enthält auffällig viele Transkriptionsfaktoren und nur wenige Signalproteine anderer funktioneller Kategorien. NFKB2 ist ein Protein ähnlich der p105-Untereinheit von NFkappaB (NFKB1) und wird auch als p100 bezeichnet.

TSC22D3 hat zelltypabhängig sehr unterschiedliche Funktionen. Bei IL2-Entzug reprimiert es den Transkriptionsfaktor FOXO3A, wodurch wiederum die Transkription des BCL2L11-Gens verhindert wird, dessen Produkt proapoptotisch wirkt. (FOXO3A wird ebenfalls zwischen Tag 6 und Tag 9 hochreguliert, siehe Cluster 39 in Gruppe 4). TSC22D3 wirkt generell entzündungshemmend. In T-Lymphozyten unterdrückt es die Funktion von NFkappaB, indem es dessen Translokation in den Kern sowie die DNA-Bindung verhindert [genecards].

2.1.5.9. Cluster mit insgesamt herunterregulierter Genexpression und lokalem Minimum

Die Cluster 8, 9, 10 und 24 enthalten Gene, deren Transkription über den gesamten Zeitverlauf herunterreguliert wurde. Dabei erreicht Cluster 10 ein deutliches Minimum am Tag 9, die Cluster 8, 9 und 24 erreichen ein Minimum am Tag 12. Die Interpretation dieses Expressionsverhaltens ist wesentlich schwieriger als bei den vorangegangenen Gruppen. Um den Tag 9 erfolgt bei der Mehrheit der Zellen der Übergang vom CFU-E-Stadium zum Proerythroblasten. Das erklärt eventuell das Minimum bei Cluster 10. Der 12-Tage-Messpunkt lässt sich dagegen nicht klar mit einer bestimmten zellbiologischen Veränderung korrelieren, weil die letzten morphologisch unterscheidbaren Entwicklungsstufen in relativ kurzen Zeitabständen aufeinander folgen. Offensichtlich ist auch die Regulation dieser letzten Reifungsschritte so komplex, dass es auch kurz vor der Kernextrusion noch zu Veränderungen des Transkriptoms kommen muss.

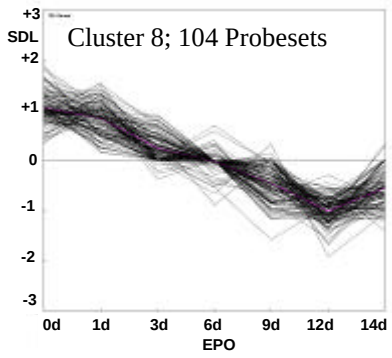
Funktion in Apoptose	CFLAR
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	GNAI2 | RABGAP1 | NET1 | RAB11FIP3
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PRKAR1A | PRKCB1 | PRKCQ | MAP3K7IP2 | PAK2 | RFP
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PTPN2 | PPP1R8
Rezeptoren	KDELR2 | THRAP1 | FOLR1 | NOTCH2 | PTPN2 | RFP
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	THRAP1 | NOTCH2 | SF1 | SOX18 | TAF7 | NCOA3 | BTG1 | ZNF85 | SATB1 | ZNF263 | FOXJ3 | SUPT6H | GATAD1 | MAX | NFATC1 | ELF1
Ubiquitinligasen	RNF13 | ARIH1 | RNF144 | RFP | UBE2N | TRIM8
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	FAM3C
andere Signalproteine	HRMT1L1



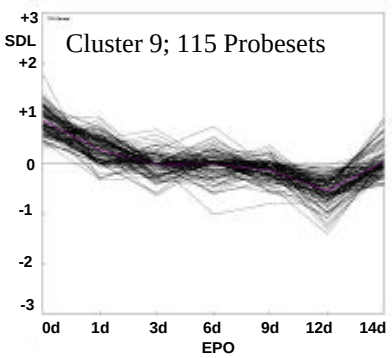
Cluster 10 enthält in etwa so viele Transkriptionsfaktoren wie die folgenden 3 Cluster, deren

Minimum erst am Tag 12 erreicht wird. Das macht insofern Sinn, als die biologische Wirkung von Transkriptionsfaktoren im Gegensatz zu anderen Signalproteinen zeitlich verzögert eintritt. Die von ihnen regulierten Gene bzw. Proteine müssen erst wieder den gesamten Transkriptions- und Translationsprozess durchlaufen, bis sie für ihre Aufgaben zur Verfügung stehen. Da am Tag 12 die Kernextrusion kurz bevorsteht, müssen die wenigen Transkriptionsfaktoren, die dann noch synthetisiert werden, schnell zum Einsatz kommen.

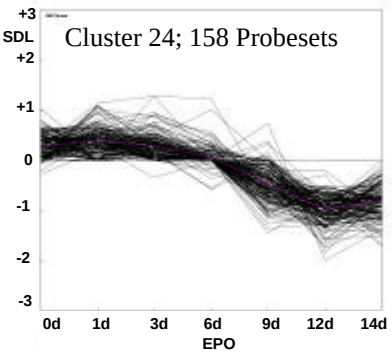
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	RAC2 | BCR | EEF1D | GNB1 | RANBP2
Lipidkinasen	PIK3CD
Lipidphosphatasen	INPP1
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	RANBP2
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	BCR | ABCC1 | PIK3CD | LYN | PRKD3 | PRKRA
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	ITGA5 | GUCY1A3
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	HSBP1 | AIP | NRIP1 | TRIM24 | XBP1 | HHEX | CHES1 | IFI16 | BCLAF1
Ubiquitinligasen	UBE2L3 | ANAPC5 | RCHY1 | TRIM24
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CKLFSF6
andere Signalproteine	FLNA



Funktion in Apoptose	BCL10
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	GDI2 | RAB3-GAP150 | SMAP1 | AKAP13 | IQGAP1 | RAB6A | RAB9A | RHOQ | RASSF2
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PRKAR1A | MAPKAPK2 | RPS6KA3 | STK38L | ROCK1| AKAP13
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP2CB | DUSP11
Rezeptoren	CXCR4 | PGRMC1 | TRAM1 | CD44 | ICAM1
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	CSDA | PSMC3 | HCFC1 | STAT1 | UBXD2
Ubiquitinligasen	FBXL5
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	GMFB | HDGFRP3
andere Signalproteine	STMN1 | CD53 | DXYS155E



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	RAB14 | IQGAP1 | NET1 | IPO7
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	PPIB | PPIF | PPID | FKBP11
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PDIA3 | ANXA1
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	MASK | RIOK2 | SYK | LYN
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	SET
Rezeptoren	SP110 | RRBP1| WDR77 | ITGAE | ITGA2B | SRPRB
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	LAT1-3TM | LRRFIP1 | IFI16
Ubiquitinligasen	UBE2N | TRIM24 | UBE3A
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	TGFB1
andere Signalproteine	-

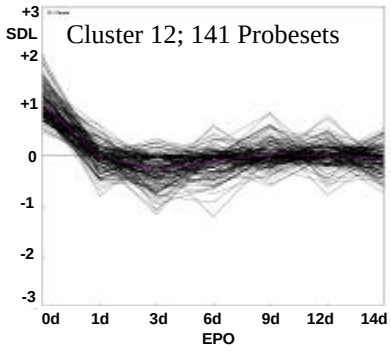


Alle 4 Cluster dieser Gruppe enthalten zahlreiche Proteinkinasen. Im Gegensatz zu den Clustern mit hochregulierten Genen befinden sich jedoch keine Cyclin-abhängigen Proteinkinasen darunter. Es sind jedoch mehrere Kinasen der PKA- und PKC-Familien enthalten, nämlich PRKAR1A, PKCB1, PRKCQ und PRKD3. Diese steuern zwar auch die Pro-

liferation, üben dabei aber keine allgemeine Funktion aus. Vielmehr übermitteln sie die Information definierter extrazellulärer Signalmoleküle. Es sind jedoch mehrere Kinasen der PKA- und PKC-Familien darunter, nämlich PRKAR1A, PKCB1, PRKCQ und PRKD3. Diese steuern zwar auch die Proliferation, üben dabei aber keine allgemeine Funktion aus. Vielmehr übermitteln sie die Information definierter extrazellulärer Signalmoleküle. Dies deutet darauf hin, dass hier ganze Signalwege unterbrochen werden und die Zellen sich von diesen extrazellulären Botenstoffen unabhängig machen. Weiterhin erscheinen die als Onkogen bekannte Proteinkinase LYN sowie die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase delta in dieser Gruppe. Es fällt auf, dass ausschließlich Cluster 24 drei Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen der Cyclophilin-Familie enthält, nämlich Cyclophilin B, D und F.

2.1.5.10. Cluster mit stark abfallender Expression zwischen Tag 0 und Tag1

Funktion in Apoptose	TNFRSF10B | CFLAR | BIRC2
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	RALBP1 | SRPR | RAB6A | EHD1 | RAB5A | RAB27A | TUBA2 | GNA11 | ARHGEF7 | RABIF | RGL2 | CDC42SE1 | GDI1
Lipidkinasen	PIP5K1A
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	FYN | LYK5 | GAK | BRD2 | CSNK1D | PCTK2
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PTPN9 | PPP2R5C | CTDSP2
Rezeptoren	CXCR4 | SRPR | IFNGR2 | SDFR1 | CD44 | LENG4 | TNFRSF10B | IL2RA | SEMA4A | GPR27 | CD40
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	HIF1A | GTF3C1 | NFE2L1 | GTF2A2 | HOXB2
Ubiquitinligasen	BIRC2 | C20orf18 | MNAB
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



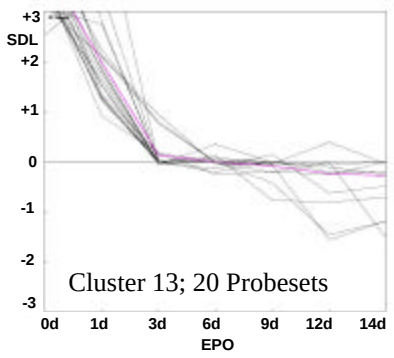
Die Transkription der Gene des Clusters 12 fällt sofort nach der Zugabe von EPO steil ab, d.h. die Produkte dieser Gene wurden für die folgenden Differenzierungsschritte nicht mehr benötigt bzw. würden die weitere Entwicklung sogar behindern.

Dieses Cluster enthält 6 Proteine, die zu den regulatorischen GTPasen der RAS-Onkogen-Familie gehören bzw. mit solchen Proteinen assoziiert sind (RAB5A, RAB6A, RAB27A, RABIF, RGL2, RALBP1).

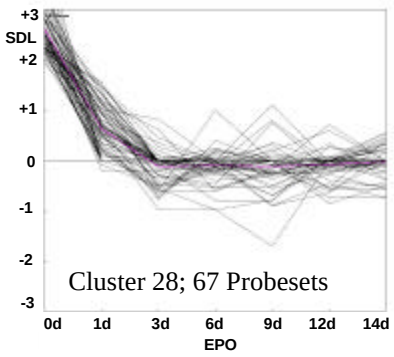
2.1.5.11. Cluster mit stark abfallender Expression zwischen Tag 0 und Tag 3

Die Gene der Cluster 13, 28 und 33 wurden nach Applikation von EPO sofort herunterreguliert, erreichten ihr Minimum jedoch erst zwischen Tag 1 und Tag 3.

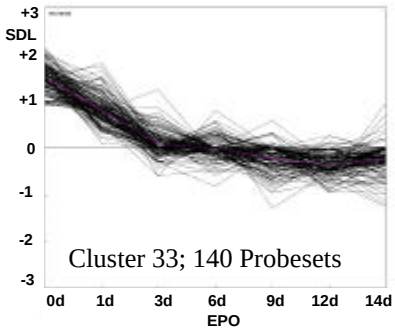
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	-
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	SYNJ2
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	CCR7 | TNFRSF4
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	BHLHB2 | NFKBIA
Ubiquitinligasen	BIRC3
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CCL4 | CCL3 | CXCL13 | CCL1 | CXCL2 | IL8 | IL6 | CSF2 | IL1B | TNFSF10
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	MX1 | GBP2 | RASGRP3 | FMNL1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	ACVR1B
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	DUSP6
Rezeptoren	IL2RG | PLXNB2 | TRBV21-1 | ACVR1B | ICAM1 | CD69
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	JUN | RELB | IRF7 | NFKB1 | NFKB2 | SMAD3 | SSBP2 | KLF6
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	CXCL10 | CXCL3 | IL32 | EBI3 | IL1A
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	PSCD4 | VAV3 | ARHGAP25 | RAB13 | MX2 | RAB33A | TUBA3 | ARL3
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	JAK1 | MAP3K7IP2 | MAP2K1 | PRKCH | DAPK1 | IKBKB | AKT3
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP1R16B | SSH1 | PTPRC
Rezeptoren	TNFRSF1A | CD44 | PTPRC | TRBV19 | GRIK5
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	PRDM4 | C19orf2| NFE2L2 | NFIL3 | GABPB2 | STAT4 | NFAT5 | GATA2 | ELF1 | LASS6 | TRIM22 | STAT1 | ARID5B
Ubiquitinligasen	UBE2N | TRIM22
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	PBEF1 | HDGFRP3
andere Signalproteine	GGPS1 | SOCS2



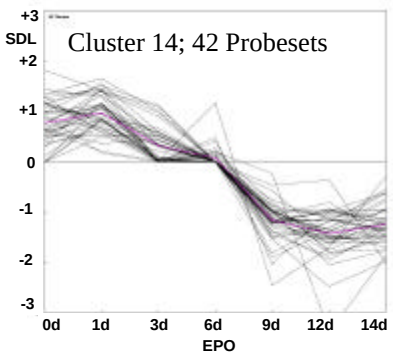
Wie schon in Cluster 12 befinden sich in dieser Gruppe mehrere regulatorische GTPasen der RAS-Familie bzw. assoziierte Proteine. NFKB1 (p105) und NFKB2 (p100) finden sich zusammen mit NFKBIA, einem Inhibitor von NFkappaB, der dieses im Zytoplasma zurückhält, und der IkappaB-Kinase (IKBKB). Dies kann einerseits bedeuten, dass der NFkappaB-Signalweg speziell in dieser Differenzierungslinie eine untergeordnete Rolle spielt. Andererseits ist es möglich, dass NFkappaB wegen seiner bekannten antiproliferativen

Wirkung in Zellen, die schnell proliferieren sollen, herunterreguliert werden muss. Um dies zu beantworten, müssten Expressionsdaten aus ähnlichen Experimenten mit anderen hämatopoetischen Differenzierungslinien und sonstigen mitotisch aktiven Geweben zum Vergleich herangezogen werden.
Die Proteinkinase AKT3 wird wie schon die andere Isoform AKT1 (Gruppe 10; Cluster 37) herunterreguliert, wobei sich aber die Verläufe der Expressionskurven unterscheiden. Ferner sind 7 Chemokine, 5 Interleukine und 4 Zytokine in dieser Gruppe sortiert.

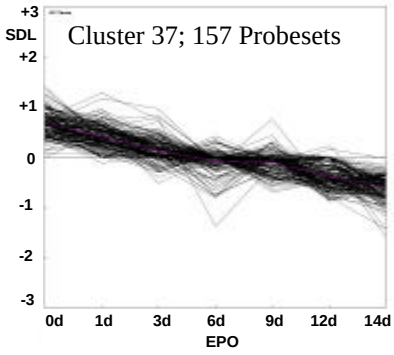
2.1.5.12. Cluster, deren Gene über einen längeren Zeitraum herunterreguliert werden

Die Gene der Cluster 14, 37 und 40 werden allmählich herunterreguliert, wobei sich dieser Vorgang nahezu über den gesamten untersuchten Zeitraum erstreckt. Cluster 37 enthält eine Reihe Proteinkinasen, von denen außer AKT1 die meisten bisher schlecht charakterisiert sind. Zu AKT werden im Abschnitt 2.2. noch genauere Aussagen getroffen. Die Casein-Kinasen CSNK1G2 und CSNK2A2 übertragen Signale im Wnt-Weg und stromabwärts verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen und akzeptieren jeweils verschiedene Proteine als Substrat. CSK phosphoryliert und inaktiviert SRC. Die Transkriptionsfaktoren der RUNX-Familie gelten als Tumorsuppressoren und sind in verschiedenen soliden Tumoren und Leukämien häufig deletiert, mutiert oder die Promotoren sind hypermethyliert. Während RUNX1 (AML1) vorwiegend mit AML und myelodysplastischem Syndrom korreliert ist, wurde RUNX3 bisher hauptsächlich im Magenkarzinom mutiert gefunden. In Cluster 14 befindet sich außerdem CBFB, ein Kofaktor der RUNX-Transkriptionsfaktoren. MEIS1 wird ähnlich wie RUNX1 in myeloischen Leukämien überexprimiert. Wahrscheinlich verhindern diese Transkriptionsfaktoren nur die Differenzierung der Progenitorzelle, wirken aber nicht antimitotisch. Unter diesen Bedingungen gäbe es keinen Widerspruch zwischen ihrer Abschaltung in schnell proliferierenden und gleichzeitig differenzierenden Zellen der erythroiden Reihe einerseits und ihrer starken Expression in ebenfalls schnell proliferierenden aber nicht differenzierenden Leukämiezellen andererseits.

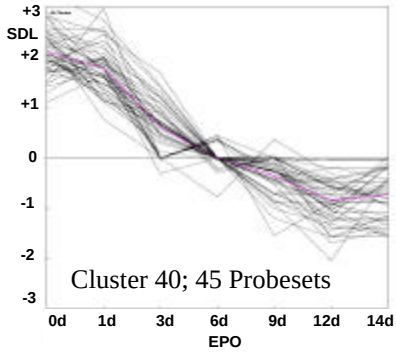
Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -aktivatoren, -inhibitoren	IQGAP1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PRKACB
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Rezeptoren	IL9R
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	CBFB | MEIS1 | NRIP1 | SOX4 | RUNX3 | ZNF91 | RUNX1 | ERG | ZKSCAN1 | BCLAF1 | IFI16
Ubiquitinligasen	UBE2L3
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	ARL1 | GNA15 | GTPBP3 | ARHGDIA | IQGAP2 | ARF3 | NOLC1
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	FKBP2
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PLCG2
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	AKT1 | CSK | CSNK1G2 | STK38 | CSNK2A2 | CDC2L5 | STK10
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PPP3CA
Rezeptoren	-
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	SP110 | STAT3
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	ADCY3



Funktion in Apoptose	-
GTPasen, -Aktivatoren, -Inhibitoren	RHOH | GPR56
Lipidkinasen	-
Lipidphosphatasen	-
Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerasen	-
Phospholipasen, -aktivatoren, -inhibitoren	-
Proteinkinasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PRKCQ
Proteinphosphatasen, -aktivatoren, -inhibitoren	PTPRC
Rezeptoren	IL4R | IGHM | GPR56 | PTPRC | IGHM
Transkriptionsfaktoren, -koaktivatoren, -repressoren	ETS2 | RUNX3 | MEF2C | GATA2 | HOXA9 | HOXA5 | HHEX | ELK3
Ubiquitinligasen	-
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren	-
andere Signalproteine	-



2.1. 6. Regulatorische Proteine mit besonderer Bedeutung in der Erythroiden Differenzierung oder CML

In diesem Abschnitt sollen einzelne Gene identifiziert und beschrieben werden, deren Produkte möglicherweise zentrale Bedeutung für

1. die Ausbildung des Phänotyps „Erythrozyt“ oder
2. die Etablierung und Aufrechterhaltung des Phänotyps „CML“ haben.

Dazu wurden von den in Datei „CD34_AraC_But_Hemin.xls“ dargestellten differentiell exprimierten Genen nur diejenigen ausgewertet, deren Signalstärke sich innerhalb eines Experiments mindestens um den Faktor 4 ändert oder wo zwischen den unbehandelten CD34+- und K562-Zellen ein Unterschied von mindestens Faktor 8 besteht. Diese Gene wurden nach solchen durchsucht, die für regulatorische Proteine kodieren. Dies geschah, indem die Datensätze mit Annotationen verschiedener Herkunft verknüpft wurden, nämlich der *target information* von AFFYMETRIX und den GeneOntology-Annotationen. In diesen Annotationen wurde dann nach folgenden Termen gesucht: *receptor*, *kinase*, *phosphatase*, *transcription factor*, *growth factor*, *leukemia*, *cancer*, *tumor*, *oncogene*, *induction of apoptosis*, *negative regulation of apoptosis/anti-apoptosis*, *lectin* und *smad*. Die Treffer wurden anschließend überprüft und Gene, die nichts mit Signaltransduktion zu tun haben, wurden aussortiert. Die Ergebnisse sind ausführlich in der Datei „alleHits+GO-Annot“ auf der beiliegenden CD dargestellt.
Als besonders interessant werden regulatorische Proteine angesehen, die

1. im CD34-Experiment hochreguliert werden.
2. in CD34+-Zellen stark exprimiert sind und in unbehandelten K562 nicht.
3. in CD34+-Zellen stark exprimiert sind und unter EPO-Einfluss später abgeschaltet werden und die in K562 ebenfalls stark exprimiert und evtl. im Verlauf der Behandlung mit AraC oder Butyrat abgeschaltet werden.
4. in K562 exprimiert und im CD34-Modell nicht oder schwach exprimiert werden bzw. die in K562 exprimiert und nach Applikation von AraC hoch- oder herunterreguliert werden aber im CD34-Modell nicht exprimiert sind.

Bei Genen, die im CD34+-Modell hochreguliert werden, ist anzunehmen, dass sie eine wichtige Rolle bei der erythroiden Differenzierung spielen. Gene der Gruppe 2 werden in CD34+-Zellen aber nicht in K562 exprimiert. Diese könnten durch den Funktionsausfall ihrer

Produkte in K562 eng mit dem Krankheitsbild der CML verknüpft sein, insbesondere wenn es sich um Proteine der Zellzyklus-Kontrolle oder proapoptotische Proteine handelt.

Die unter 3. und 4. beschriebenen Gruppen können Proteine enthalten, die neben BCR-ABL den undifferenzierten Zustand der CML aufrechterhalten. Proteine der Gruppe 3 sind also in der Stammzelle oder in den sich anschließenden stark proliferierenden Stadien wichtig, müssen später aber abgeschaltet werden. Wenn K562 diese Proteine bildet, könnten sie ursächlich mit der Pathogenese der CML in Verbindung stehen. Ein endgültiger Beweis für einen ursächlichen Zusammenhang ist die alleinige Expression in K562 natürlich noch nicht, da sie wegen der allgemeinen Deregulation der Genexpression in Krebserkrankungen auch vollkommen bedeutungslose sein kann. Ähnliches gilt für die 4. Gruppe. Auch dort kann die Bildung der entsprechenden Proteine in K562 mit Ursache für die Entartung sein, aber andererseits auch wiederum unbedeutendes Nebenprodukt. Möglicherweise spielen diese Proteine auch in anderen hämatopoetischen Differenzierungswegen eine Rolle, denn prinzipiell besitzt ja die CML-Stammzelle die Fähigkeit, in alle Formen von Blutzellen auszudifferenzieren. Für Proteine der Gruppen 3 und 4 ist es aber als zusätzliches Indiz für deren Bedeutung für die Pathogenese der CML zu werten, wenn diese während der durch das Krebstherapeutikum AraC oder auch durch Butyrat oder Hämin bewirkten Differenzierung abgeschaltet werden. Kommt es hingegen in Gruppe 4 sogar zu einer Verstärkung der Gentranskription bei K562, kann das bedeuten, dass die Zelle versucht, dadurch dem Zelltod zu entgehen. Demnach hätte das Genprodukt evtl. eine antiapoptotische Funktion und seine erhöhte Expression im Vergleich zu den CD34+-Zellen könnte es als potentielles Tumor-Protein interessant machen. Bei der Gruppe 3 muss allerdings eingeschränkt werden, dass die Ausgangsbasis der aufgereinigten CD34+-Zellen ein heterogenes Gemisch ist und ein Teil dieser Zellen schon auf andere Differenzierungswege festgelegt ist. Diese Zellen sterben aber bis ca. Tag 7 ab (siehe Abschnitt 2.1.2.1. Bild 8). Die gemessene scheinbare Abschaltung könnte daher nicht nur ein Differenzierungsmerkmal sein, sondern auch einfach durch das Verschwinden dieser Zellen verursacht werden.

Im folgendem sollen einige der hier identifizierten Gene exemplarisch vorgestellt werden. Für 11 ausgewählte Gene wurden die Expressionsdaten der Microarrays durch *Real-Time-PCR* bestätigt. Für weitere 3 Gene (SIAH2, PTPRR, ZNF239), welche die oben genannten Sortier-kriterien nur knapp verfehlten, wurden ebenfalls *Real-Time-PCRs* durchgeführt.

Bezüglich der in den Diagrammen dargestellten Expressionsverläufe ist zu sagen, dass bei der *Real-Time-PCR* beim K562+Butyrat-Modell gegenüber den Array-Daten zusätzliche Zeit-punkte untersucht wurden, nämlich 6h und 24h Inkubation. Bei der *Real-Time-PCR* wird die

Signalstärke als *Fold Change* dargestellt. Bei PCR-Daten muss man grundsätzlich eine andere Normalisierungsmethode anwenden als bei den Array-Daten. Die PCR-Daten für das interessierende Gen werden im ersten Normalisierungsschritt auf ein Haushaltsgen bezogen.

In diesem Fall wurde das ribosomale Protein RPS13 ausgewählt, da es bei den Array-Daten geringere Schwankungen aufzeigte als Aktin oder andere. Der *Fold Change* wird nach dieser Formel berechnet:

$$FC = \frac{conc_{target(sample)}}{conc_{reference(sample)}} \div \frac{conc_{target(calibrator)}}{conc_{reference(calibrator)}}$$

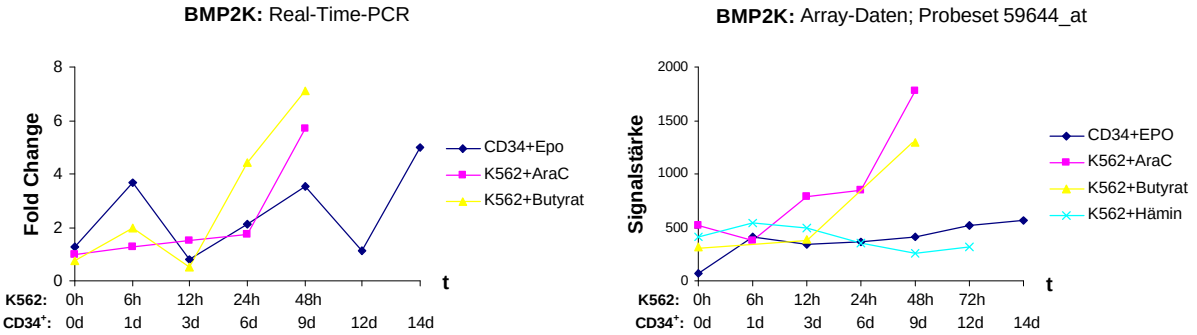
target: ein bestimmtes Transkript, dessen cDNA bestimmt werden soll
reference: Transkript eines Haushaltsgens, das als Bezugsgröße zur Normalisierung der *target*-Konzentration auf cDNA-Gehalt und -qualität einer cDNA-Präparation *(sample*) ausgewählt wurde (hier RPS13)
sample: eine cDNA-Präparation, deren Gehalt an target und reference bestimmt werden soll
calibrator: eine cDNA-Präparation, die als Bezugsgröße zum Vergleich der verschiedenen cDNAs untereinander gewählt wurde (hier unbehandelte K562 aus dem AraC-Experiment)

Der Fold Change ist also der Faktor, um welchen sich die Konzentration eines bestimmten Transkripts in einer cDNA-Präparation relativ zur Konzentration des gleichen Transkripts in einer anderen cDNA-Präparation ändert. Als Bezugs-cDNA für den zweiten Normalisierungsschritt wurde hier die Präparation aus den unbehandelten K562-Zellen des AraC-Experiments verwendet. Durch diese doppelte Normalisierung werden die Werte aller Modelle vergleichbar.

2.1.6.1. Gruppe 1: Gene, die in CD34+-Modell induziert sind

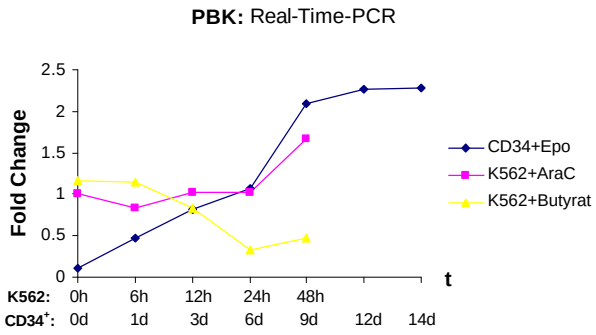
Gruppe 1: Kinasen

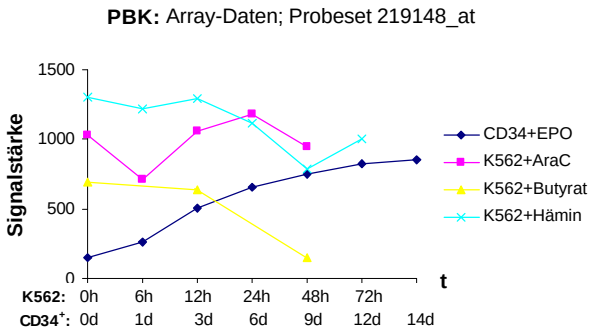
BMP2K, BMP2 inducible kinase



BMP2K wurde in CD34+ unter EPO-Einfluss aber auch in AraC- und Butyrat-stimulierten K562 induziert. Über BMP2K ist bisher sehr wenig publiziert. Es handelt sich um eine Ser/Thr-Kinase, die im Kern lokalisiert ist. Es wurde beobachtet, dass die Transkription von BMP2K in der Prächondroblasten-Zelllinie MLB13MYC Clone 17 nach BMP2-Behandlung um den Faktor 10 gesteigert wird [Kearns et al. 2001]. MLB13MYC differenzierte nach BMP2-Applikation zu osteoblastenartigen Zellen. In BMP2K-überexprimierenden MC3T3-E1-Zellen (embryonale Mausfibroblasten) wurde jedoch von denselben Autoren beobachtet, dass BMP2K die Osteoblasten-Differenzierung eher abschwächt als fördert. Es ist bisher nicht beschrieben, dass BMP2K eine Funktion im blutbildenden System hat. Anhand der hier vorgestellten Expressionsdaten liegt eine Bedeutung von BMP2K in der Erythrozyten-Differenzierung nahe. Es ist daher anzunehmen, dass BMP2K eine allgemeine Funktion bei Entwicklungsprozessen übernimmt und vielleicht auch noch viele andere Differenzierungslinien innerhalb und außerhalb des blutbildenden Systems betroffen sind. Für das allgemeine Wirkungsprinzip spricht ferner, dass BMP2K in MC3T3-E1-Zellen unabhängig von Cbfa1 wirkt [Kearns et al. 2001]. Cbfa1 ist ein Transkriptionsfaktor und wichtiger Effektor bei der Ausbildung eines verknöcherten Skeletts bzw. Regulator vieler Osteoblasten-spezifischer Gene. Die Expression von Cbfa1 wird durch BMP2 angeschaltet.

PBK, PDZ binding kinase





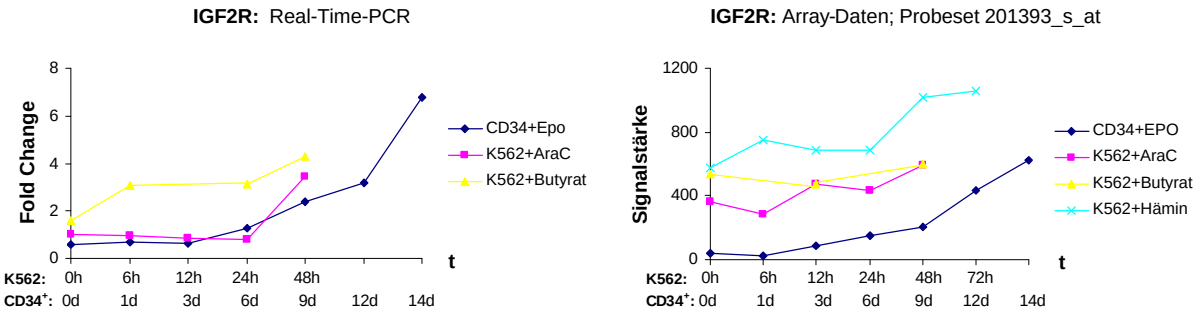
PBK wurde in CD34+-Zellen durch EPO sofort induziert. In allen K562-Experimenten ist es auf hohem Niveau exprimiert, bleibt bei AraC- und Hämin-Stimulation unverändert und wird durch Butyrat herunterreguliert. PBK ist eine Ser/Thr-Kinase, phosphoryliert p38 und spielt eine Rolle bei der Aktivierung von Lymphzellen [genecards]. Das Enzym scheint nur während der Mitose aktiv zu sein [genecards]. In einer Reihe von Tumoren, insbesondere in Leukämien (AML, ALL und andere) wurden das PBK-Transkript bis auf wenige Ausnahmen regelmäßig in hohen Konzentrationen nachgewiesen [Nandi et al. 2004]. Andererseits wurde von denselben Autoren gezeigt, dass PBK in mit G-CSF mobilisierten CD34-positiven Zellen nur schwach exprimiert ist. Daher können mit den vorliegenden Ergebnissen die Literatur-daten bezüglich der CD34+-Zellen bestätigt und bezüglich der Leukämien auf CML erweitert werden. Es passt gut ins Bild, dass PBK in den langsam proliferierenden CD34+-Zellen schwach exprimiert ist und die Synthese des Transkripts verstärkt wird, wenn die Zellen nach EPO-Gabe in die stark proliferierenden Entwicklungsstadien BFU-E und CFU-E übertreten. Wird die AML-Zelllinie HL-60 mit TPA zur Differenzierung gebracht, was mit einem Proliferationsstop verbunden ist, wird die PBK-Transkription stark verringert [Nandi et al. 2004]. Dasselbe beobachten wir bei Applikation von Butyrat, interessanterweise aber nicht bei AraC, obwohl beide Chemikalien den Zellzyklus hemmen.

weitere Kinasen der Gruppe 1, die hier nicht näher diskutiert werden:

DYRK3	PAQR4	PRKAR2B	STK11
JAK2	PCTK1	PTK2	STK17A
MAP2K3	PIP5K2A	RIOK3	TTK
MKNK2	PLK1	SGK	VRK1
NEK2	PLK4	STK6	WNK

Gruppe 1: Rezeptoren

IGF2R, insulin-like growth factor 2 receptor



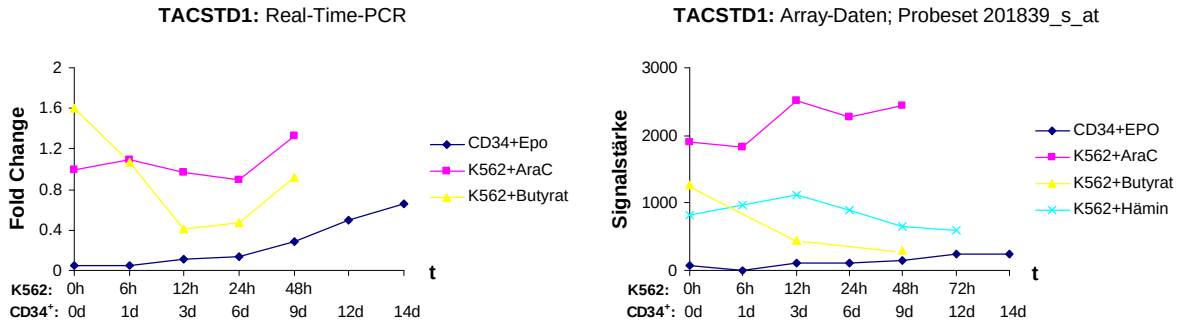
IGF2R wurde in CD34+-Zellen nicht exprimiert aber durch EPO stark induziert. In K562 war das Transkript immer nachzuweisen und zeigte in allen drei K562-Modellen durch die eingesetzten Agenzien eine schwache Aufwärtstendenz. IG2FR bindet eine Vielzahl anderer Proteine neben IGF2, nämlich auch Protein-Liganden, die Mannose-6-Phosphat (Man-6-P)-Reste tragen wie zum Beispiel LIF (*leukemia inhibitory factor*). Die Bindung an IGF2R wird dabei über verschiedene Bindestellen realisiert. Der Rezeptor ist hauptsächlich im lytischen Kompartiment lokalisiert, wo er an der Rekrutierung Man-6-P-haltiger Enzyme (Glycosidasen, Proteasen) ins lytische Kompartiment beteiligt ist [Kornfeld 1992]. Außerdem ist IGF2R aber auch in der Plasmamembran vorhanden, wo es die Internalisierung und Degradation von IGF2 [Kiess et al. 1988] und LIF vermittelt sowie die Aktivierung des TGFbeta-Präkursors [Godar et al. 1999] bewirkt. Im Serum gibt es noch eine lösliche Form. IGF2R reguliert also nur die verfügbaren Konzentrationen verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, die Bindung dieser Moleküle an IGF2R bewirkt aber keine Übertragung wachstumsfördernder Signale [Blanchard et al. 1999]. Die Übertragung der mitogenen und antiapoptotischen Signale des IGF2 erfolgt über den IGF1-Rezeptor und den Insulin-Rezeptor Isoform A [Scalia et al. 2001; Schwartz et al. 1996]. In verschiedenen Tumoren wurden Deletionen oder Punktmutationen des IGF2R-Gens gefunden. Dies korrelierte mit einer erhöhten Serumkonzentration des wachstumsfördernden IGF2 und einer verringerten Konzentration des potenten Wachstums-Inhibitors TGFbeta.

Prinzipiell ist also zu erwarten, dass bei der gesunden Erythropoese in den frühen, schnell proliferierenden Stadien nur geringe Mengen IGF2R gebildet werden und später, bei nachlassender Teilungsaktivität und Reifung, die Expression angeschaltet wird. Tatsächlich beobachten wir die Anschaltung schon zwischen Tag 3 und Tag 6, wenn sich die meisten

Zellen noch im BFU-E/CFU-E-Stadium befinden. Wegen der Heterogenität der Zellpopulation (siehe Abschnitt 1.1. bzw. 1.2.1.), sind zu diesem Zeitpunkt schon erste Erythroblasten vorhanden. In diesem Stadium proliferieren die Zellen immer langsamer und machen intensive Veränderungen, die zum erythroiden Phänotyp führen, durch. Es ist also anzunehmen, dass die Induktion des IGF2R-Gens ab Tag 3 nur auf diese wenigen Erythroblasten zurückzuführen ist. Dass sich die Intensität bis Tag 14 kontinuierlich erhöht, erhärtet diese Vermutung. Bis dahin verringert sich nämlich stetig der Anteil der Zellen, die das Erythroblastenstadium oder spätere Stadien noch nicht erreicht haben.

Überraschend ist die starke Transkription des IGFR2-Gens in K562. Hier wäre, wie in anderen Tumoren gezeigt, eher eine schwache Expression zu erwarten. Es kann aber anhand der Datenlage keine sichere Aussage gemacht werden kann, ob die mRNA translatiert wird und ob wegen etwaiger Mutationen in K562 überhaupt ein funktionales Protein entsteht. Vielleicht ist die starke Transkription des IGF2R-Gens ein Versuch der Zellen, einen möglichen Funktionsausfall zu kompensieren. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass K562 in seinem Phänotyp durchaus auch dem Proerythroblasten oder Erythroblasten ähnelt, da zum Beispiel auch bereits geringe Mengen Hämoglobin vorhanden sind. Somit stünde die unerwartet hohe Expression von IGF2R in K562 im Einklang mit seiner hohen Expression im CD34+-Experiment, wo IGF2R zwischen 9 und 12 Tagen stark induziert wird.

TACSTD1, tumor-associated calcium signal transducer 1, Ep-CAM



Die Transkription von TACSTD1 wurde in CD34+ am Tag 3 nach EPO-Gabe nachweisbar und verstärkte sich weiter bis zum Tag 12, blieb aber insgesamt recht schwach. In K562 war das Gen von Anfang an wesentlich stärker exprimiert. Butyrat verursachte einen starken Rückgang des Transkripts, während AraC und Hämin kaum einen Einfluss hatten. Die Daten aus der Real-Time-PCR lassen im CD34+-Modell eine deutliche Induktion zwischen Tag 6 und Tag 9 erkennen, die aber auch bei den Microarray-Daten andeutungsweise zu sehen ist.

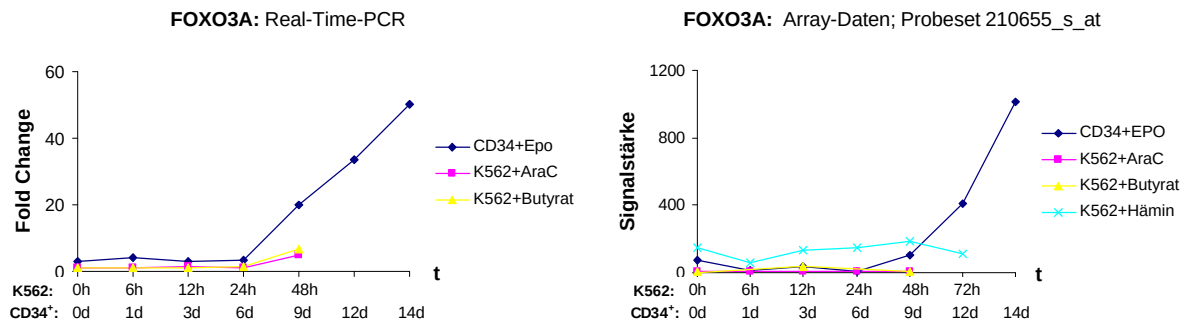
TACSTD1 ist ein Transmembranprotein und wirkt als homotypisches interzelluläres Adhäsionsmolekül [Litvinov et al. 1994]. Es wird aber auch eine Funktion als Wachstumsfaktor-Rezeptor vermutet [genecards] bzw. dass die Bindung des Rezeptors wachstumsfördernde intrazelluläre Signaltransduktions-Ereignisse zur Folge hat. Es wurde gezeigt, dass TACSTD1 in Kolon-Karzinomen gegenüber gesundem Gewebe überexprimiert ist [Xie et al. 2005]. In Retinoblastomen wurde eine erhöhte Expression mit erhöhter Invasivität und geringerem Differenzierungsgrad des Tumors korreliert [Krishnakumar et al. 2004]. Bei Patienten mit Gallenblasen-Karzinom verschlechtert sich die Prognose, wenn TACSTD1 überexprimiert ist [Varga et al. 2004]. Die Bedeutung von TACSTD1 bei soliden Tumoren wurde also schon erkannt und zum Beispiel Versuche mit einer Immuntherapie unternommen [Riethmuller et al. 1998]. Dass dieses Molekül in CML oder anderen Leukämien eine Rolle spielt, konnte durch die verfügbaren Literatur-Datenbanken nicht belegt werden. Es ist ohnehin überraschend, dass eine Leukämie bzw. Suspensions-Zelllinie ein interzelluläres Adhäsionsmolekül so stark exprimiert. Möglicherweise ist das Protein in K562 mutiert, so dass es auch ohne Ligandenbindung zur Übertragung wachstumsfördernder Signale kommt.

weitere Rezeptoren der Gruppe 1, die hier nicht näher diskutiert werden:

CCR2, EPOR, PCK2

Gruppe 1: Transkriptionsfaktoren:

FOXO3A, forkhead box O3A



FOXO3A wurde in allen untersuchten Modellen zunächst auf sehr niedrigem Niveau exprimiert. Ausschließlich im CD34+-Modell stieg die FOXO3A-mRNA zwischen Tag 9 und

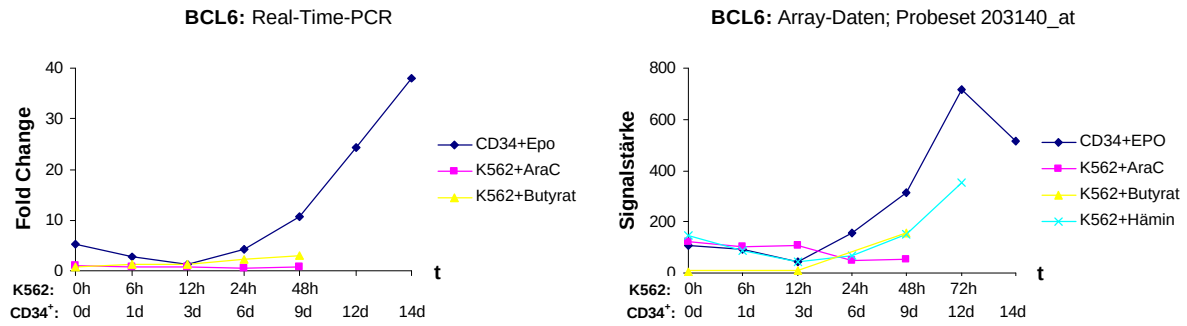
14 steil an. Diese Zeitspanne markiert den Übergang der meisten Zellen vom BFU-E/CFU-E-Stadium zum (Pro-) Erythroblasten, also von einer maximalen Proliferationsgeschwindigkeit zu einer deutlich verringerten Wachstumsgeschwindigkeit.

FOXO3A kann die Apoptose auslösen, indem es die Expression von Genen stimuliert, deren Produkte in diesem Prozess wirken. FOXO3A wird über den PI3-Kinase-Weg in einem inaktiven Zustand gehalten, indem es durch AKT1, und SGK/SGK1 phosphoryliert wird [genecards], wodurch FOXO3A im Zytoplasma zurückgehalten wird. [Zhu et al. 2004]. Dazu passend wird im CD34+-Modell ein starker Rückgang der Transkription zumindest bei einer PI3-Kinase, nämlich der katalytischen Untereinheit der Isoform delta, beobachtet. Auch unabhängig vom PI3-Kinaseweg kann FOXO3A zum Beispiel durch IKK (*inhibitor of kappa-B kinase*) [Hu et al. 2004] oder durch das beim ALCL (*anaplastic large-cell lymphoma*) auftretende Fusionsprotein NPMALK (*nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase*) phosphoryliert und inaktiviert werden.

Ein durch Phosphorylierung begründeter Funktionsverlust wurde bei sehr vielen Tumoren festgestellt. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass FOXO3A in HCT116 Kolon-Karzinom-Zellen bei oxidativem Stress dephosphoryliert wird, und so offenbar das Überleben der Zellen ermöglicht wird [Yin et al. 2004]. Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass das Überlebenssignal von EPO und SCF bei der erythroiden Differenzierung über die Phosphorylierung von FOXO3A und auch anderen Mitgliedern der Forkhead-Box-Familie vermittelt wird. Dies gilt aber nur für die frühen Entwicklungsstadien, in denen FOXO3A ohnehin nur schwach exprimiert ist. Neuere Forschungen [Bakker et al. 2004] belegen, dass FOXO3A in der Endphase der Erythropoese induziert wird, wie auch wir bestätigen. Daher muss seine bisherige Rolle als rein proapoptotisches Protein auf eine Funktion in Reifungsprozessen erweitert werden. Wichtige durch FOXO3A angeschaltete Proteine sind BTG1 ([Bakker et al. 2004] und BCL6 (siehe unten), wobei über BTG1 ein antiproliferatives Signal übertragen wird.

In K562 hält BCR-ABL oder eine nachgeschaltete Kinase FOXO3A inaktiv und somit entgehen diese Zellen der Apoptose und Differenzierung. Wird BCR-ABL durch STI571 gehemmt, wird FOXO3A aktiviert [Fernandez de Mattos et al. 2004].

BCL6, B-cell lymphoma 6 protein

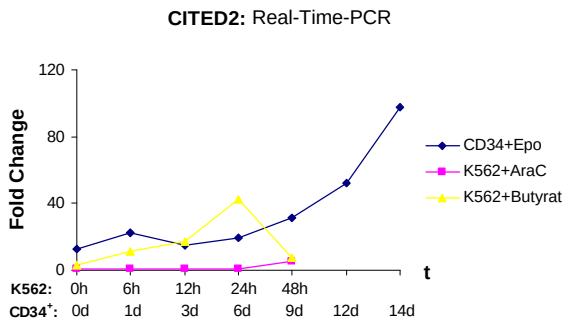


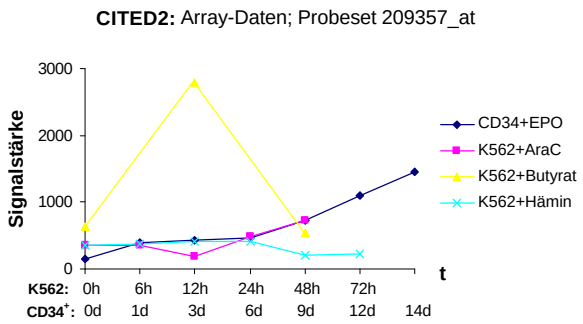
BCL6 wurde in CD34+-Zellen und K562 schwach exprimiert und fast parallel zu FOXO3A in den differenzierenden CD34+-Zellen angeschaltet. In Butyrat- und Hämin-stimulierten K562 kam es ebenfalls zu einer Induktion, die allerdings weniger deutlich war. Bei AraC-Behandlung sank die Transkriptionsrate.

BCL6 ist ein Transkriptions-Repressor, dessen Expression durch FOXO3A direkt angeschaltet wird [Tang et al. 2002]. Noch mehr als FOXO3A ist BCL6 von einer Ambivalenz in seiner Funktion geprägt. BCL6 kann onkogen wirken sowohl bei erhöhter als auch bei verringerter Expression. Bei Überexpression wurde einerseits eine antiapoptotische Wirkung beschrieben [Kurosu et al. 2003], darüber hinaus trägt BCL6 zur Immortalisierung bei, indem Cyclin D1 überexprimiert wird [Bos et al. 2003]. Demgegenüber erkennt BCL6 eine Bindestelle im Promotor des Cyclin D2-Gens und reprimiert dessen Expression, wodurch der Zellzyklus in der G1-Phase arretiert wird. In Brustkrebs wurde eine positive Korrelation zwischen BCL6, p53 und HIF1alpha gefunden [Bos et al. 2003]. Es sind mehrere Translokationen unter Beteiligung des BCL6-Gens bekannt, die zu verschiedenen lymphoblastischen Leukämien führen.

Es wurde bereits vermutet, dass BCL6 eine Rolle in Differenzierungsprozessen spielt [Albagli-Curiel 2003]. Die Induktion und Funktion des BCL6-Gens in der Erythropoese wurde bisher aber noch nicht beschrieben. Die Korrelation der Expression von BCL6 mit der von HIF1alpha in manchen Tumoren besteht jedoch nicht im vorliegenden CD34+-Experiment. Dort wird die Transkription des HIF1alpha-Gens unter EPO-Einfluss sofort deutlich herunterreguliert. Die Korrelation zwischen der Expression von BCL6 und HIFalpha ist also nicht zwingend. Trotzdem sind weiter unten noch mehr Gene aufgeführt, welche die Aktivität von HIF1alpha auf verschiedenen Ebenen positiv regulieren, und ihrerseits auf Transkriptionsniveau hochreguliert sind.

CITED2, Cbp/p300-interacting transactivator 2





CITED2 wurde im CD34+-Experiment von Anfang an schwach exprimiert und ab Tag 9 deutlich induziert. In K562 wurde dieses Gen ebenfalls schwach exprimiert. Bei Butyrat-Stimulation gab es ein lokales Maximum nach 12h Behandlungsdauer, in den beiden anderen K562-Experimenten wurde die Transkription von CITED2 nicht beeinflusst.

CITED2 wird durch verschiedene Stimuli wie Hypoxie, Zytokine (zum Beispiel IL1,-4,-6,-9,-11, GM-CSF, PDGF, INFgamma, Insulin) und Lipopolysaccharide induziert [Yokota et al. 2003; Sun et al. 1998]. Das Protein bindet an p300/CBP und blockiert damit dessen Interaktion mit HIF1alpha, wodurch kein Präinitiationskomplex an HIF1alpha-abhängigen Promotoren zustande kommt. Die Interaktion zwischen p300/CBP und anderen Transkriptionsfaktoren wird durch diese Bindung nicht gestört. Man vermutet, dass CITED2 bei der Zellantwort auf Hypoxie eine negative Rückkopplung vermittelt [Bhattacharya et al. 1999].

Dass CITED2 eine Rolle in Differenzierungsprozessen spielt, wurde bereits im Mausmodell nachgewiesen. CITED2(-/-)-Mäuse sterben noch *in utero* an Fehlbildungen des Gehirns und des Herzes [Barbera et al. 2002]. Dabei ist das Protein unerlässlich für das Überleben neuroepithelialer Zellen und sein Fehlen führt zu massiver Apoptose. Die künstliche Überexpression hingegen führt in Zellkultur zum Verlust der Kontaktinhibition und in Nacktmäusen zur Tumorbildung [Sun et al. 1998]. Bei der Aktivierung von CITED2 spielen Janus-Kinasen und STAT-Proteine eine Rolle [genecards].

Dass verschiedene Zytokine prinzipiell die Transkription des CITED2-Gens stimulieren können, wurde weiter oben bereits erwähnt. Die Beteiligung von CITED2 an Vorgängen in der Hämatopoese ist jedoch noch nicht beschrieben worden. Im CD34+-Modell wurde das Kulturmedium mit SCF, EPO und IL6 angereichert, wobei letzteres schon als Induktor von CITED2 bekannt ist. Hier stellt sich die Frage, ob die erhöhte CITED2-Expression nur eine Folge des IL6-Zusatzes ist oder auch EPO die Expression von CITED2 verstärkt. Das heißt, es ist nicht sicher, ob die Induktion von CITED2 ein generelles Merkmal der Erythropoese ist

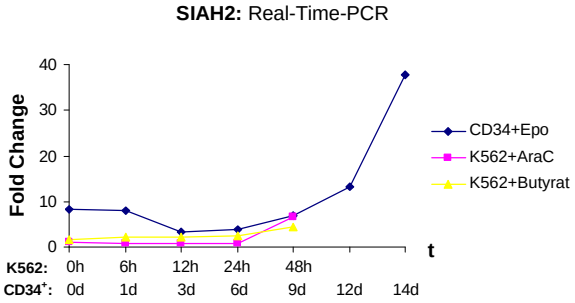
oder ein Artefakt der Zellkultur-Bedingungen. Gegen die Befürchtung, dass der Effekt ausschließlich vom IL6 herrührt, spricht aber, dass eine sichtbare Steigerung erst am Tag 9 eintritt. Demnach ist er wahrscheinlich doch Teil des komplexen Differenzierungsprogramms unter Beteiligung von EPO. Man könnte das Verhalten von CITED2 im selben Zellkultur-System aber mit IL3 statt IL6 untersuchen, da IL6 ohne weiteres durch IL3 ersetzt werden kann und eine Induktion durch IL3 bisher noch nicht beschrieben wurde.

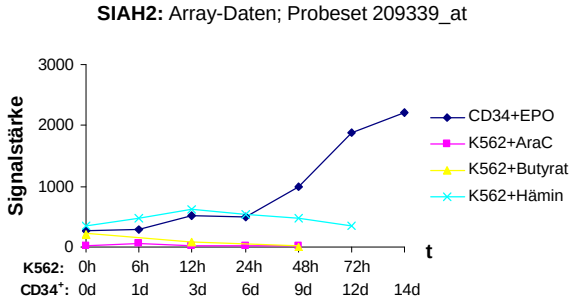
weitere Transkriptionsfaktoren der Gruppe 1, die hier nicht näher diskutiert werden:

ATF5, CEBPB, FLJ23311, FOXM1, GATA1, GTF2H3, KLF1, MYBL2, NFE2, PTTG1, SREBF1, TCF3, TFDP1, TFDP2, SMARCA4

Ubiquitin-Ligasen

SIAH2, seven in absentia (Drosophila) homolog 2





SIAH2 wurde in CD34+-Zellen am Beginn auf niedrigem Niveau exprimiert. Ab Tag 3 nach Zugabe von EPO wurde die Transkription stimuliert und erreichte ihr Maximum am Tag 14. Bei den K562-Modellen war SIAH2 während der gesamten Zeitdauer schwach exprimiert bzw. nicht nachweisbar.

SIAH2 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, d.h. es vermittelt die gezielte Degradation bestimmter Proteine, zum Beispiel der Transkriptionsfaktoren POU2AF1, PML und NCOR1, des Rezeptors DCC, des antiapoptotischen Proteins BAG1 und von TRAF2 [genecards]. Damit ist SIAH2 an der Steuerung einer Vielzahl von Prozessen beteiligt wie Zellzyklus-Kontrolle, Tumor-Suppression, Transkription und Apoptose. Die aufgeführten Gene sind alle auf dem AFFYMETRIX U133A-Array repräsentiert, es wurde aber bei keinem eine Herunter-regulation im CD34+-Experiment beobachtet, die meisten waren ohnehin nur schwach exprimiert. Der durch SIAH2 vermittelte Abbau seiner Zielproteine wurde also nicht durch

eine Abschaltung der Transkription der diese Zielproteine kodierenden Gene begleitet. Wahrscheinlich werden aber auch noch viele andere Proteine durch SIAH2 zum Abbau markiert, wo der Zusammenhang noch unbekannt ist und daher nicht überprüft werden konnte. Um den Tag 3 erfolgt im CD34+-Experiment der Übertritt der Mehrheit der Zellen vom Stadium des pluripotenten Progenitors zum BFU-E/CFU-E. Da SIAH2 zu dieser Zeit induziert wurde, ist anzunehmen, dass seine Zielproteine an der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Stammzell-Status beteiligt sind.

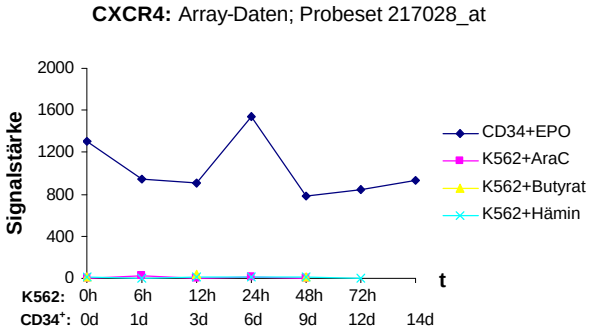
Weiterhin ist bekannt, dass SIAH2 unter Hypoxie-Bedingungen die Degradation der HIF1alpha-spezifischen Prolyl-Hydroxylasen PHD1 und PHD3 einleitet [Nakayama et al. 2004]. Durch PHD1 und PHD3 wird die Hydroxylierung von Prolin-Resten des HIF1alpha-Proteins bewirkt, was eine Voraussetzung für dessen schnellen Abbau ist. Daher stabilisiert SIAH2 indirekt den Hypoxie-spezifischen Transkriptionsfaktor HIF1alpha.

Ein Zusammenhang zwischen der Differenzierung roter Blutkörperchen und der Expression von SIAH2 wurde bisher nicht publiziert.

2.1.6.2. Gruppe 2: Gene, die in CD34+-Zellen stark exprimiert sind und in unbehandelten K562 nicht

Gruppe 2: Rezeptoren

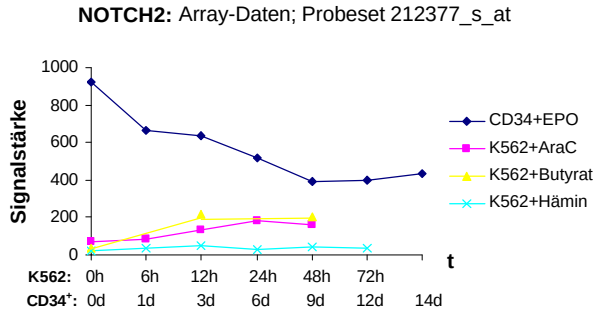
CXCR4



CXCR4 ist der Rezeptor für SDF-1 (*stromal cell derived factor 1*). Er gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und spielt eine Rolle in der Hämatopoese und in der Entwicklung des Nervensystems. Darüber hinaus ist er Rezeptor für HIV2. Bei der Untersuchung der Expression und Funktion von CXCR4 in EPO-stimulierten CD34+-Zellen wurde gezeigt, dass die Konzentration des Rezeptors an der Zelloberfläche während der Reifung schon im BFU-

E-Stadium deutlich abnimmt [Gibellini et al. 2000], obwohl die mRNA-Konzentration, wie auch in den vorliegenden Datensätzen, kaum abnimmt. Nach Ligandenbindung aktiviert er den MAP-Kinase- sowie den PI3-Kinase-Signalweg, jedoch hatte die Gabe von SDF-1 zu den EPO-stimulierten CD34+-Zellen keinen Effekt auf die erythroide Differenzierung [Gibellini et al. 2000]. Die Funktion von SDF-1/CXCR4 liegt eher in Chemotaxis und *homing*, d.h. der Zurückhaltung unreifer hämatopoetischer Zellen im Knochenmark [Kollet et al. 2003].
Das CXCR4-Transkript ist in K562 nicht sicher detektierbar, das Protein muss aber zumindest in niedrigen Konzentrationen vorhanden sein, da K562 durch SDF-1 reizbar ist und die Migrationsaktivität erhöht wird [Fruehauf et al. 2002]. Auch könnte die stark verringerte Expression die Ausschwemmung der Leukämiezellen ins periphere Blut begünstigen, da ja kein *homing* mehr vermittelt wird.

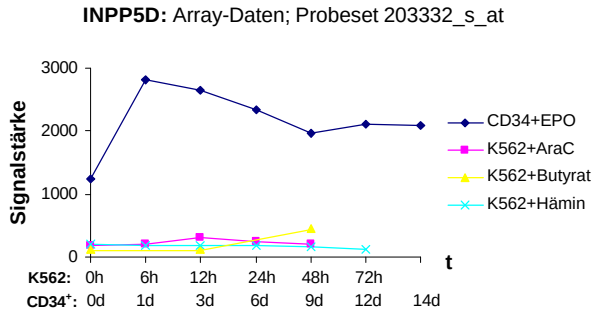
NOTCH2



NOTCH2 ist in CD34+-Zellen stark exprimiert und wird dann im Verlauf der Differenzierung herunterreguliert. In K562 ist es zunächst sehr schwach exprimiert, die Transkription wird aber unter Butyrat-Einfluss aktiviert. NOTCH1 ist überall auf niedrigem Niveau exprimiert, NOTCH3 und 4 sind nicht detektierbar.
NOTCH2 ist ein membranständiger Rezeptor, der nach Ligandenbindung seine intrazelluläre Domäne abspaltet, die dann als aktiver Transkriptionsfaktor in den Kern einwandert. Die Liganden von NOTCH2 sind die auf den Oberflächen anderer Zellen präsentierten Proteine Jagged1, Jagged2 und Delta1. Prinzipiell ist NOTCH2 in Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose involviert. NOTCH2 wie auch NOTCH1 unterbinden in 32D myeloiden Progenitoren die durch GM-CSF (nur NOTCH2) oder G-CSF (nur NOTCH1) induzierte Differenzierung zu Granulozyten [Bigas et al. 1998]. Die Literatursuche nach einer Funktion in der Erythropoese brachte keine Ergebnisse, ebenso ist bisher nichts über die schwache Expression in K562 oder CML publiziert worden.

Gruppe 2: Phosphatasen

INPP5D, SH2 containing inositol-5-phosphatase, SHIP



INPP5D wird in allen K562-Experimenten gar nicht bzw. sehr schwach exprimiert. In den CD34+-Zellen wurde INPP5D von beginn an stark exprimiert und nach Applikation von EPO noch zusätzlich induziert, wobei am Tag 1 ein lokales Maximum erreicht wurde.
INPP5D spaltet den Phosphatrest am C5 des Phosphatidylinositol 3,4,5-Phosphates sowie des Inositol 1,3,4,5-Phosphates ab. Dadurch inhibiert INPP5D den PI3K-AKT-Signalweg, über den antiapoptotische Signale übertragen werden. In AML wurden Mutanten mit reduzierter enzymatischer Aktivität gefunden [Luo et al. 2003]. Trotzdem ist eine hohe INPP5D-Expression nicht gleichbedeutend mit erfolgreicher Tumorsuppression. Es gibt in normalen und malignen hämatopoetischen Zellen zahlreiche Spleißvarianten und posttranslationale Modifikationen, die schwerwiegende Auswirkungen auf die Entwicklung der betroffenen Zellen haben [Geier et al. 1997]. Dabei ist auch in der normalen Hämatopoese die differentielle Expression unterschiedlicher Isoformen von der Differenzierungslinie und dem aktuellen Entwicklungsstadium abhängig. BCR-ABL unterdrückt die Expression von INPP5D [Sattler et al. 1999], weswegen in K562 weder das translatierte Protein noch das zugehörige Transkript nachweisbar sind. [Siegel et al. 1999].

Gruppe 2: Transkriptionsfaktoren

HOXA9, ISGF3G, RUNX, SATB1

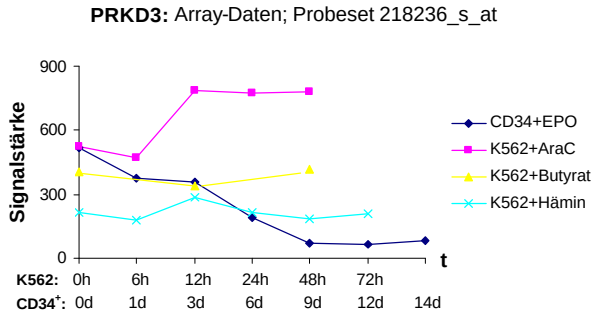
Gruppe 2: Wachstumsfaktoren

PPBP, S100A6

2.1.6.3. Gruppe 3: Gene, die in CD34+-Zellen und K562 stark exprimiert sind und durch EPO bzw. AraC oder Butyrat später abgeschaltet werden

Gruppe 3:Kinasen

PRKD3, Proteinkinase D3, PKC-NU



Die Proteinkinase C wurde sowohl in CD34+-Zellen als auch in K562 exprimiert. Die Inkubation mit EPO verursachte in CD34-positiven Zellen eine starke Reduktion des Transkripts, die zwischen Tag 0 und Tag 1 begann und sich bis zum Tag 9 erstreckte. Butyrat und Hämin bewirkten in K562 keine deutlichen Veränderungen, AraC bewirkte eine verstärkte Transkription des PRKD3-Gens.

Die Proteinkinase C kommt in verschiedenen Isoformen vor, von denen zum Teil noch Varianten unterschieden werden. PRKD3 sowie PRKD1 (PKC-mu) und PRKD2 sind Varianten der PKCdelta, die aber durch verschiedene Gene kodiert werden und nicht als Spleiß- oder Proteolysevarianten entstehen. PRKD3 ist eine Diacylglycerol-abhängige aber Ca2+-unabhängige Form der Proteinkinase C.

Die Transkription der Gene anderer Isoformen der PKC (PKCbeta, PKCtheta) wurde im CD34+- und im K562+AraC-Experiment während der Differenzierung ebenfalls reduziert, nur war der Effekt weniger deutlich. PKCeta wurde in CD34+ auch herunterreguliert, war aber in K562 sehr schwach bzw. gar nicht exprimiert. Mehrere Isoformen waren in keinem der Modelle vorhanden, nämlich zum Beispiel PKCepsilon und zeta. In der Literatur wird nicht immer genau zwischen den Varianten von PKCdelta unterschieden.

PRKD3 ist in MEL-Zellen für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands verantwortlich [Pessino et al. 1995]. Die Behandlung dieser Zellen mit der Differenzierung auslösenden Chemikalie Hexamethylenbisacetamid (HMBA) verursacht einen deutlichen Rückgang der PRKD3-mRNA.

weitere Kinasen der Gruppe 3, die hier nicht näher diskutiert werden:

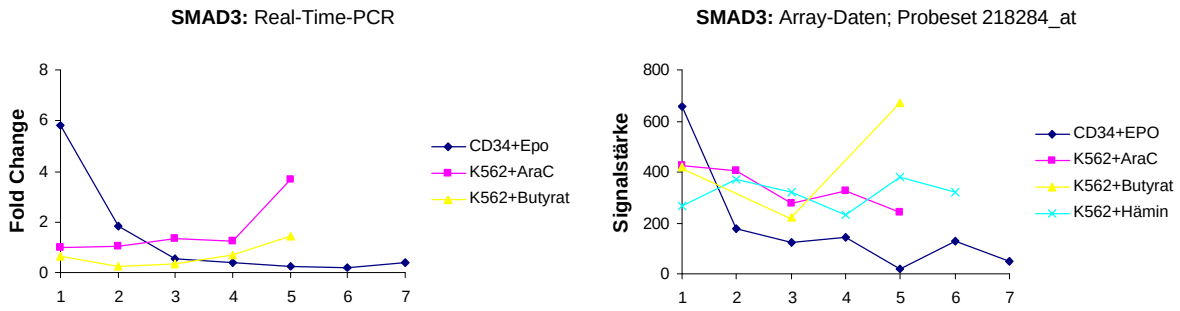
MAP2K1, PIK3CD

Gruppe 3: Rezeptoren

IL10RA, IL2RQ, PTPRC, TNFRSFB

Gruppe 3: Transkriptionsfaktoren

SMAD3



SMAD3 ist in CD34+-Zellen stark exprimiert und wird schon am Tag 1 herunterreguliert. Auch in K562 wird das Gen exprimiert und bleibt bei Hämin- und Butyrat-Behandlung unverändert. Beim AraC liefern *Real-Time-PCR* und Microarray unterschiedliche Ergebnisse, wobei die *Real-Time-PCR* eine Induktion und die Array-Daten eine Verringerung der Expression anzeigen.

SMAD3 gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die durch Rezeptoren der TGFbeta-Rezeptor-Familie, welche eine Ser/Thr-Kinase-Aktivität haben, phosphoryliert werden. Nach Phosphorylierung binden sie an so genannte Co-Smads (zum Beispiel SMAD4) und wandern in den Kern, wo sie die Transkription abhängiger Gene ermöglichen. SMAD3 wird ebenso wie SMAD2 durch den TGFbeta-Rezeptor sowie durch den Activin-Rezeptor

aktiviert, die SMAD2-mRNA bleibt aber im CD34+-Modell auf konstantem Niveau. Prinzipiell werden durch TGFbeta Signale übertragen, die eher antiproliferativ oder sogar proapoptotisch wirken bzw. Differenzierungsvorgänge auslösen. Trotzdem ist TGFbeta in vielen Tumoren überexprimiert bzw. bei Tumoren gleicher Herkunft ist eine erhöhte TGFbeta-Produktion mit erhöhter Aggressivität und einer schlechteren Prognose verbunden.
Da SMAD3 schon am Tag 1 nach EPO-Zugabe nahezu auf sein endgültiges Niveau herunterreguliert wird, dürfte es zu den *early-response*-Genen gehören, die sofort nach Eintreffen eines Reizes Veränderungen zeigen. Verständlich ist das insofern, als TGFbeta antiproliferativ wirkt, die Zellen jedoch in die schnell proliferierenden Stadien BFU-E/CFU-E übertreten müssen. Andererseits sollen die Zellen auch differenzieren und es kommt in den sich anschließenden (Pro-) Erythroblasten-Stadien nicht zu einer erneuten Anschaltung von SMAD3. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Gruppen, wonach TGFbeta die Proliferation erythroider Präkursoren inhibiert und die terminale Differenzierung erythroider Zellen fördert [Zermati et al. 2000; Krystal et al. 1994]. Die Transkripte der 3 Rezeptoren für TGFbeta (TGFBR1/2/3) sind im CD34+-Modell zu allen Zeitpunkten nicht nachweisbar. (Siehe dazu auch TGFBR3 in Gruppe 4 weiter unten.) Ab Tag 6 wird auch die Transkription des TGFbeta-Gens selbst heruntergefahren, es bleibt aber nachweisbar. Da die Rezeptoren fehlen, dient dieses autogene TGFbeta *in vivo* ohnehin kaum einer autokrinen Stimulation, sondern eher einer interzellulären Signalübertragung. 3 verschiedene Gene, von denen bekannt ist, dass sie durch TGFbeta angeschaltet werden, wurden sowohl als von Anfang an stark exprimiert (TGFB1I4), nicht exprimiert (TGFB1I1) als auch im Zeitverlauf hochreguliert (TGFBI) gefunden. Schon dieses unterschiedliche Verhalten zeigt, dass die Expression dieser Gene auch noch durch andere Wege gesteuert wird und kann daher nicht zur Beurteilung herangezogen werden.
Im Gegensatz zu den TGFbeta-Rezeptoren sind im CD34+-Modell mehrere Activin-Rezeptoren exprimiert und werden schon nach einem Tag EPO-Behandlung, also parallel zu SMAD3, deutlich herunterreguliert. Dies betrifft ACVR1 (ALK2), ACVR1B (ALK4), ACVR2 und ACVR2B. ACVRL1 (ALK1), der sowohl als Rezeptor für TGFbeta als auch für Activin fungiert, ist nicht exprimiert. Auch für Activin wurde beschrieben, dass es die erythroide Differenzierung stimulieren kann. Dies wurde allerdings in der murinen Erythroleukämie-Zelllinie F5-5 gezeigt und nicht in Primärzellen [Chiba et al. 2003].
Anhand der vorliegenden Daten kann zusammengefasst werden, dass Activin wahrscheinlich nur in den Progenitoren eine Rolle spielt, und TGFbeta wegen der nicht oder sehr schwach exprimierten Rezeptoren vielleicht gar keinen Einfluss hat. Bei den sich anschließenden

Differenzierungsschritten werden alle Activin-Rezeptoren und der Signalüberträger SMAD3 herunterreguliert, zum Teil ganz abgeschaltet. Dass SMAD2 als alternatives Signalmolekül exprimiert bleibt, kann damit nicht erklärt werden, möglicherweise spielt es in anderen Signalwegen auch eine Rolle oder überträgt die Signale der auf niedrigem Niveau verbliebenen Activin-Rezeptoren.
Es ist fraglich, ob die von anderen Autoren beobachtete, sowohl durch TGFbeta als auch Activin künstlich auslösbare, terminale Differenzierung wirklich Bedeutung für die Verhältnisse *in vivo* hat. Möglicherweise ist es nur der generelle Effekt, dass ein erzwungener Proliferationsstop zu Differenzierungsvorgängen führt. Auf diesem Effekt basieren ja auch viele andere Zellkultur-Systeme, die zum Studium der Zelldifferenzierung etabliert wurden. Dies schließt zum Beispiel die hier verwendeten Chemikalien AraC und Butyrat mit ein.

In allen K562-Experimenten ist das SMAD3- wie auch das SMAD2-Transkript zu jedem Zeitpunkt nachweisbar und schwankt bei AraC- und Hämin-Behandlung nur wenig. Von den TGFbeta-Rezeptoren wird TGFBR3 immer, die anderen beiden sowie ACVRL1 werden nicht exprimiert. Die Transkripte der Activin-Rezeptoren sind immer nachweisbar. Bei keinem der 3 untersuchten K562-Modellen wird die Activin-abhängige Signaltransduktion so deutlich heruntergefahren wie im CD34+-Modell. Demgegenüber scheint wie auch bei CD34+ der TGFbeta-Signalweg von geringer Bedeutung zu sein, da die TGFbeta-Rezeptoren nicht exprimiert werden außer TGFBR3. TGFBR3 bindet zwar TGFbeta aber präsentiert den Liganden nur den anderen TGFbeta-Rezeptoren und leitet selbst keine Signale ins Zellinnere weiter. Bei Butyrat-Stimulation zeigen sowohl SMAD3 als auch TGFBR3 eine interessante Übereinstimmung der Expressionskurven wobei SMAD3 ein lokales Minimum bei 12h aufweist.

weitere Transkriptionsfaktoren der Gruppe 3, die hier nicht näher diskutiert werden:

BHLHB2, CBFB, ELK3, HHEX, HOXB2, JUN, MEF2C, MEIS1, SOX4, ZKSCAN1

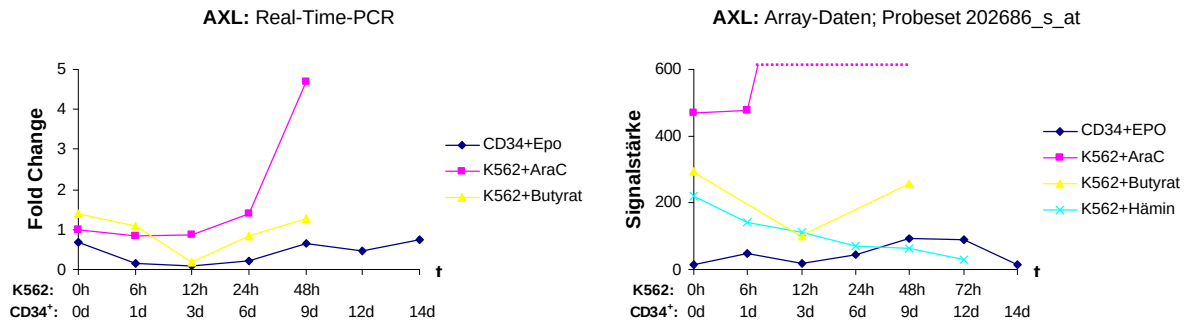
Gruppe 3: Wachstumsfaktoren

HDGFRP3

2.1.6.4. Gruppe 4: Gene, die in K562 exprimiert und im CD34-Modell nicht oder schwach exprimiert werden

Gruppe 4: Rezeptoren

AXL

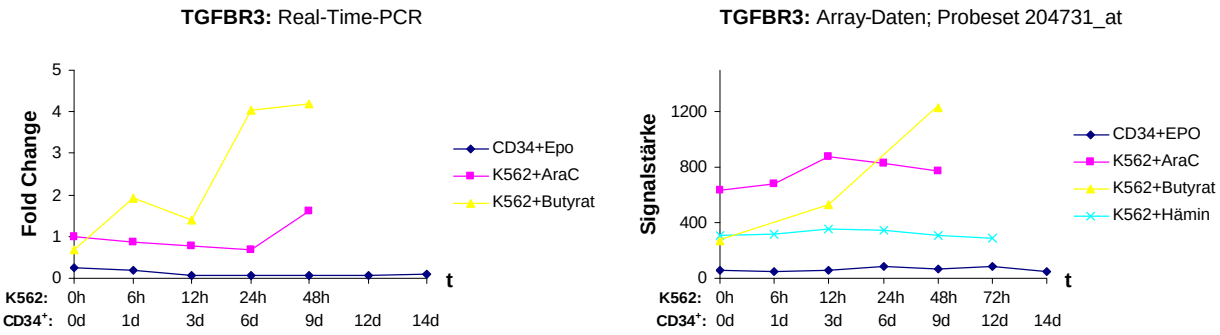


AXL wird im CD34+-Experiment zu keinem Zeitpunkt exprimiert. In unbehandelten K562-Zellen ist das Transkript vorhanden. Durch AraC wird die Transkription enorm verstärkt, *Real-Time-PCR* und Array-Daten unterscheiden sich aber im Zeitpunkt ab dem diese Steigerung beginnt. Bei Butyrat-Stimulation weist der Expressionsverlauf ein Minimum bei 12h auf, Hämin verursacht die Abschaltung dieses Gens.

AXL gehört zusammen mit SKY zu einer eigenständigen, funktional noch wenig charakterisierten Gruppe von Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird durch den Ligand GAS6 (*growth arrest specific gene 6*) aktiviert. AXL wird sehr häufig in CML aber auch in anderen myeloischen Leukämien als überexprimiert gefunden, jedoch nicht in anderen Tumoren. Im Gegensatz zu anderen Onkogenen wird die erhöhte enzymatische Aktivität allein durch die Überexpression verursacht und nicht durch Mutationen [O'Bryan et al. 1991]. Werden NIH-3T3-Zellen, die normalerweise eine ausgeprägte Kontaktinhibition zeigen, mit einem AXL-kodierenden Expressionsvektor transfiziert, bilden sie Zellhaufen, so genannte *foci*. Dieses Experiment beweist das onkogene Potential dieser Kinase. 2 verschiedene Spleißvarianten haben sich als gleichermaßen aktiv erwiesen [O'Bryan et al. 1991]. Andere Autoren bezweifeln allerdings einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der AXL-Überexpression und der Tumorigenese der CML, zumal Mäuse mit ectopischer Expression von AXL in Zellen der myeloiden Reihe nicht erkrankten [Augustine et al. 1999]. Interessant ist in K562 das verschiedenartige Verhalten der AXL-Expression nach Exposition zu verschiedenen Chemikalien. Wir zeigen erstmals eine starke Induktion durch AraC. O´Bryan et.al

beobachteten ebenfalls eine starke Induktion in K562, die mit TPA behandelt wurden [O'Bryan et al. 1991]. Hämin bewirkt demgegenüber eine Abschaltung des Gens. Die Auswirkungen von AraC, TPA und Butyrat sind viel drastischer als die von Hämin, da sie im Gegensatz zu letzterem einen Proliferationsstop und Apoptose auslösen. Die Induktion bei AraC- und TPA-Exposition legt daher nahe, dass AXL antiapoptotische Signale überträgt und damit das Überleben transformierter Zellen sichert bzw. die Zellen durch die erhöhte AXL-Synthese versuchen, dem Zelltod zu entgehen. Dafür spricht weiterhin, dass AXL Bindestellen für PI3-Kinasen hat und dieser Signalweg wie auch der MAP-Kinase-Signalweg nach Ligandenbindung aktiviert werden [Goruppi et al. 1997].

TGFBR3, TGFbeta receptor type III



Das TGFBR3-Transkript ist in CD34+ zu allen Zeitpunkten wie auch alle anderen TGFbeta-Rezeptoren nicht oder sehr schwach nachweisbar. In unbehandelten K562 ist es deutlich stärker repräsentiert und wird durch Butyrat noch verstärkt, was auch durch die Real-Time-PCR gut bestätigt werden konnte.

TGFBR3 existiert einerseits als membrangebundene Form und andererseits als lösliche Form in der extrazellulären Matrix und im Serum. TGFBR3 kann selbst keine Signale ins Zellinnere weiterleiten, sondern bindet den Liganden um ihn den anderen Rezeptoren zu präsentieren. TGFBR3 bindet alle TGFbeta-Isoformen, die TGFbeta-Signalübertragung scheint aber auch in Zellen ohne funktionalem TGFBR3 zu funktionieren [Cheifetz et al. 1990]. Eine Ausnahme bildet aber unter anderem die Erythropoese in homozygoten TGFBR3-knock-out-Mäusen. Diese haben nämlich einen Defekt in der Blutbildung, der sich darin äußert, dass viele kernhaltige Erythrozyten vorhanden sind [Stenvers et al. 2003]. Die lösliche Form des Rezeptors entsteht durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne der membranständigen Form und bindet freies TGFbeta. Damit wird dessen Bindung an den Membran-Rezeptor verhindert. Die lösliche Form wirkt so der membranständigen entgegen, obwohl auch für die

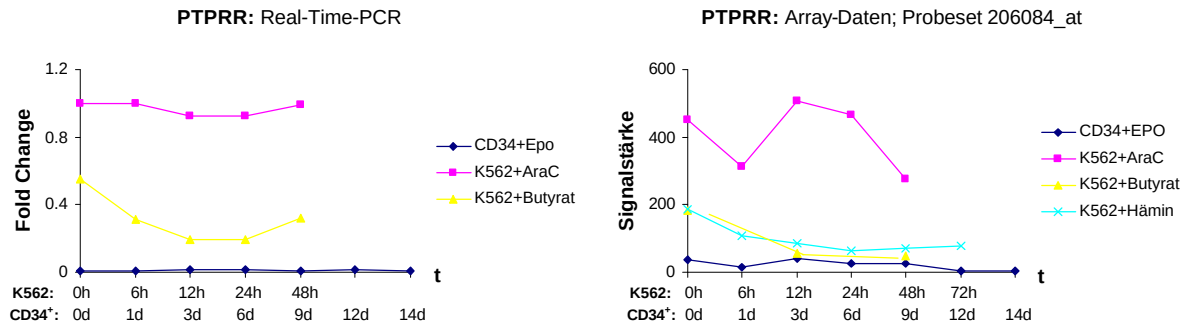
membranständige Form eine antagonistische Wirkung auf die TGFbeta-Signalübertragung beschrieben wurde [Eickelberg et al. 2002]. TGFBR3 ist nicht nur Rezeptor für TGFbeta sondern auch für Inhibin. Wie bei TGFbeta unterstützt er die Bindung von Inhibin an dessen eigentlichen Rezeptor ACVR2 (Activin Rezeptor Typ II) sowie an weitere Typ II-Rezeptoren der BMP-Familie [Wiater und Vale 2003]. Inhibin ist der Antagonist des Activins und durch die Bindung von Inhibin an ACVRI2 wird das Activin-Signal blockiert. TGFBR3 beeinflusst also auf sehr vielfältige Weise die Aktivitäten verschiedener Mitglieder der TGFbeta-Superfamilie und es ist daher nicht möglich, nur anhand der Array-Daten Schlussfolgerungen für seine Funktion in K562 zu ziehen.

weitere Rezeptoren der Gruppe 4, die hier nicht näher diskutiert werden:

NR2F2

Gruppe 4: Phosphatasen

PTPRR, (Protein-Tyrosin-Phosphatase, Rezeptor Typ R)



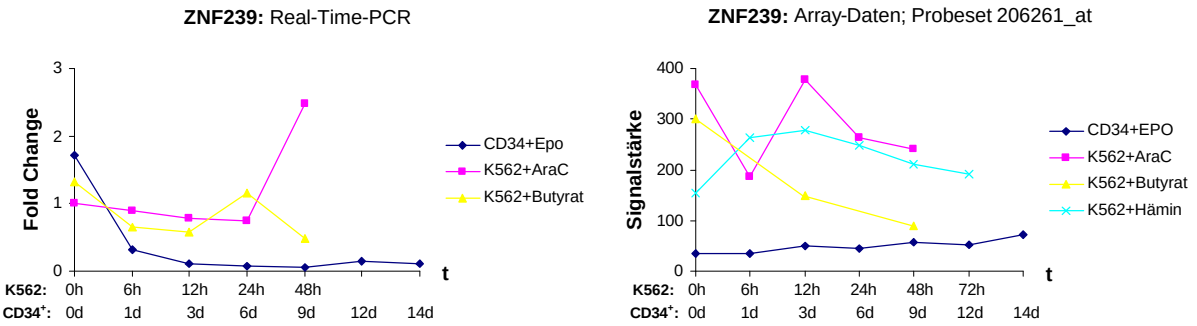
PTPRR wird in EPO-stimulierten CD34+-Zellen zu allen Zeitpunkt schwach oder gar nicht exprimiert. In allen unbehandelten K562 ist das Transkript nachweisbar, Butyrat und Hämin bewirken eine Abschwächung.

PTPRR dephosphoryliert und inaktiviert MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), ERK5 und MAPK14 (p38alpha). Demnach spielt es eine wichtige Rolle bei der Abschaltung der Zellantwort auf mitogene Signale. PTPRR wird selbst durch PKA phosphoryliert und inaktiviert [Blanco-Aparicio et al. 1999]. Es gibt 4 verschiedene Isoformen des translatierten Proteins. Die Isoformen alpha und beta sind Typ 1-Membranproteine, die Isoformen gamma und delta sind perinukleär im Zytoplasma lokalisiert. In metastasierenden Leberkarzinomen

wurde das Transkript gegenüber nicht metastasierenden Leberkarzinomen überexprimiert gefunden [Song et al. 2005]. Ein Fusionsprotein aus PTPRR und dem Transkriptionsfaktor ETV6 (TEL), welches durch die Inversion inv(12)(p13q13) entsteht, wurde bei Patienten mit AML entdeckt [Nakamura et al. 2005]. Es sind schon viele Chromosomenmutationen bekannt, bei denen unter Beteiligung von ETV6 Fusionsprodukte mit anderen Proteinen entstehen, welche in Leukämien relevant sind. Diese Fusionsproteine sind sowohl in AML als auch in CML gefunden worden. Anhand der Array-Daten kann nicht erkannt werden, ob in der CML-Linie K562 auch eine ETV6-Fusion vorliegt und ob PTPRR beteiligt ist. Das ETV6-Transkript ist nicht detektierbar. Das durch die Inversion inv(12)(p13q13) entstehende Fusionsprotein enthält den N-terminalen Teil von ETV6 und den C-terminalen Teil von PTPRR. Das auf U133A verwendete Probeset zur Detektion des ETV6-Transkripts liegt an dessen äußersten 3´-Ende. Da beim Fusionstranskript der 3´-Terminus fehlt, kann es mit dem ETV6-Probeset gar nicht detektiert werden. Dass kein ETV6-Transkript detektiert wird, könnte mit einer solchen Mutation aber nur erklärt werden, wenn diese homozygot vorliegt, da bei Heterozygotie ja noch das Transkript des anderen Chromosoms vorhanden wäre. Klarheit kann hier nur die Klonierung und Sequenzierung der entsprechenden cDNAs bringen. In den Literaturdatenbanken wurde kein Hinweis auf eine solche Chromosomenmutation in K562 gefunden.

Transkriptionsfaktoren

ZNF239, Zinkfinger-Protein 239



ZNF239 wurde in CD34+-Zellen deutlich schwächer exprimiert als in K562. Die PCR-Daten zeigten für CD34+ eine Abschaltung zwischen Tag 0 und Tag 1 an, während bei den AraC-stimulierten K562 eine Zunahme des ZNF239-Transkripts zwischen 24h und 48h beobachtet wurde.

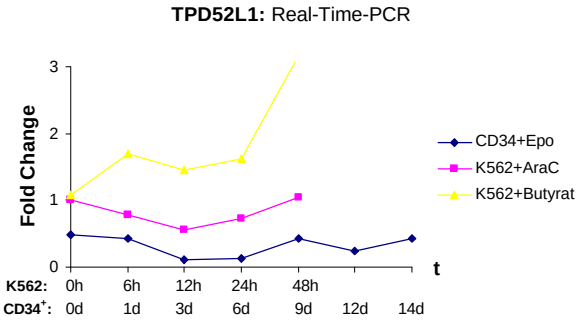
ZNF239 reguliert die Transkription von PAX3 und IRBP, beides Proteine, die bei der Entwicklung des Gehirns eine Rolle spielen [Arranz et al. 2001]. Über eine Beteiligung dieses Proteins an der Pathogenese von Leukämien oder anderen Tumoren wurde bisher nichts veröffentlicht.

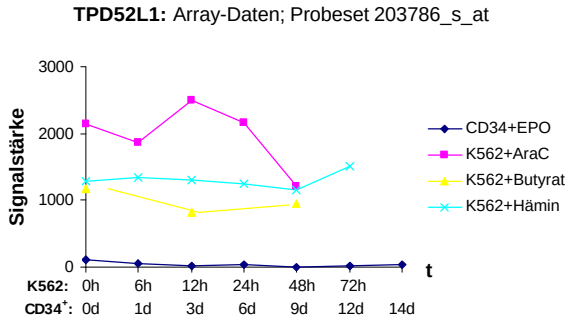
weitere Transkriptionsfaktoren der Gruppe 4, die hier nicht diskutiert werden:

HOXA1, NR2F2, SATB2, TFAB2B, WT1

Gruppe 4: Sonstige

TPD52L1, tumor protein D52-like 1





Das TPD52L1-Transkript wurde in K562 in höheren Konzentrationen nachgewiesen als in CD34+-Zellen, wobei dieser Unterschied durch Real-Time-PCR nicht so deutlich zu sehen war wie in den Array-Daten. Die PCR-Daten zeigten bei Butyrat-stimulierten K562 eine Aktivierung an.

Die konkrete Funktion von TPD52L1 ist bisher unbekannt. Es wurde in Mammakarzinomen in hohen Konzentrationen nachgewiesen und man nimmt an, dass es eine Rolle in der Kalzium-vermittelten Signalübertragung spielt. In synchronisierten Mammakarzinom-Zellen wird TPD52L1 am G2-M-Übergang parallel zu Cyclin B1 hochreguliert [Boutros und Byrne 2005]. Dabei interagiert TPD52L1 mit 14-3-3, einem negativen Regulator des G2-M-Übergangs [Boutros und Byrne 2005] und fördert die MAP3K5-induzierte Apoptose [SOURCE].

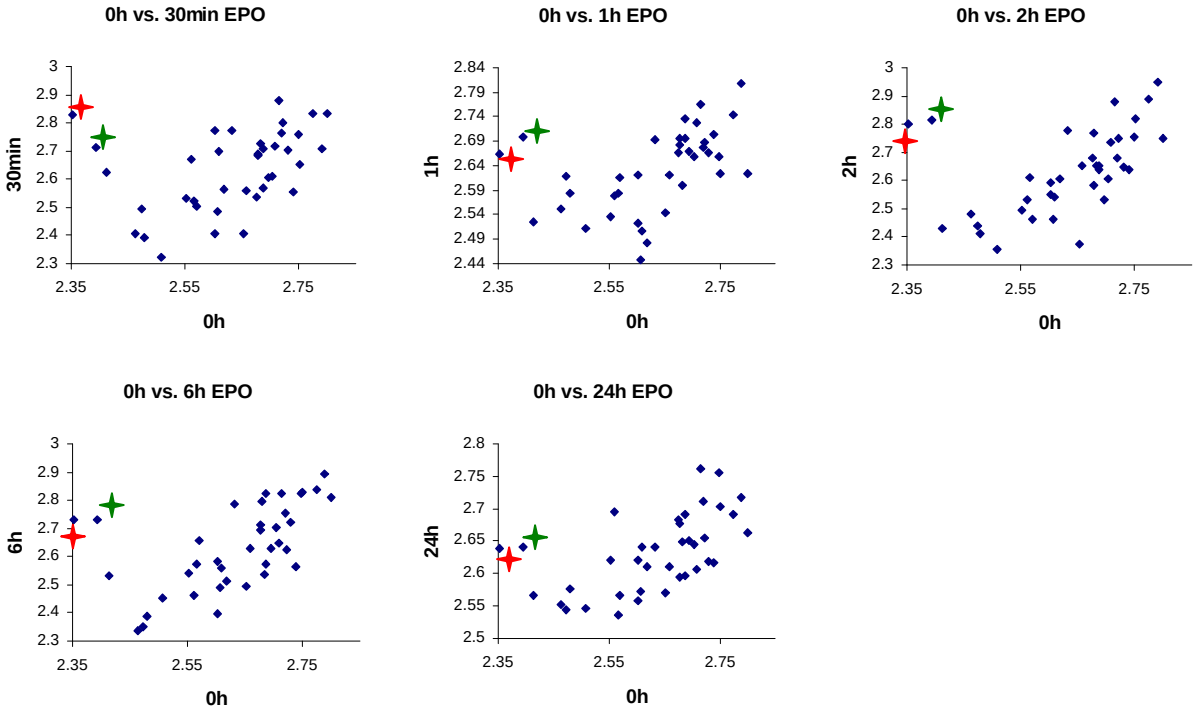
2.2. Anwendung eines neuartigen phosphorylierungsspezifischen Antikörper-Arrays zur Detektion von Veränderungen der Phosphorylierung wichtiger Signalproteine während der erythroiden Differenzierung EPO-stimulierter CD34+-Zellen

CD34+-Zellen wurden präpariert, kultiviert und mit EPO stimuliert wie in Abschnitt 4.2.1.1. beschrieben. Für die Analyse der Phosphorylierung wichtiger Signalproteine wurden aus unbehandelten CD34+-Zellen des Spenders 1 sowie 30 min, 1h, 2h, 6h und 24h nach EPO-Zugabe Proteinextrakte hergestellt. Die Proteinextrakte wurden biotinyliert und mit einem Microarray inkubiert, welches phosphorylierungsspezifische Antikörper als Sonden trägt. Die CD34-Zellen des Spenders 3 wurden analog kultiviert und die Proteinextrakte für Immunoblots zur Bestätigung der Array-Daten verwendet. Bei diesem Microarray handelt es sich um das unter 1.6.1. beschriebene Microarray im Array-Tube-(AT)-Format.

2.2.1.Auswertung der Array-Daten mit Scatterplots

Obwohl bei allen Arrays gleiche Proteinmengen (10 µg) eingesetzt wurden, schwankten die Werte des als Normalisierungsgrundlage vorgesehenen Phosphotyrosins so stark, dass es nicht zur Normalisierung verwendet werden konnte. Stattdessen wurden auf das Gesamtsignal des Arrays normalisiert (Näheres siehe Material und Methoden). Mit diesen Werten wurden Punktdiagramme (*Scatterplots*) gezeichnet, die in Bild 12 abgebildet sind. Punktdiagramme sind eine einfache und robuste Möglichkeit, Array-Daten darzustellen und Veränderungen nachzuweisen. Aufwändigen Normalisierungsverfahren werden nicht benötigt. Es entsteht eine diagonale Punktwolke aus den Proteinen, die keinen oder nur geringfügigen Änderungen ihrer Phosphorylierung unterliegen. Treten starke Veränderungen ein, liegen die Punkte deutlich abseits dieser Punktwolke. Hier wurden die unbehandelten CD34+ (0h EPO) mit allen späteren Messpunkte verglichen.
Eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung wurde bei den Proteinkinasen AKT (PKB) und p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase 1*) gemessen.

Bild 12: Die normalisierten Array-Daten wurden in Punktdiagrammen dargestellt. Mit dieser Methode kann man immer zwei Zeitpunkte vergleichen. Hier wurden alle späteren Messpunkte auf unbehandelte CD34 (0h) bezogen. Die farbige Markierung kennzeichnet zwei Proteine, die sich über der diagonalen Punktwolke befinden, deren Phosphorylierung also zunimmt. Es handelt sich um AKT( ) und p70S6K ( ). Nach 24h Inkubationsdauer verringert sich der Abstand beider Proteine zur Punktwolke. Der Phosphorylierungsgrad nähert sich also wieder den ursprünglichen Werten.

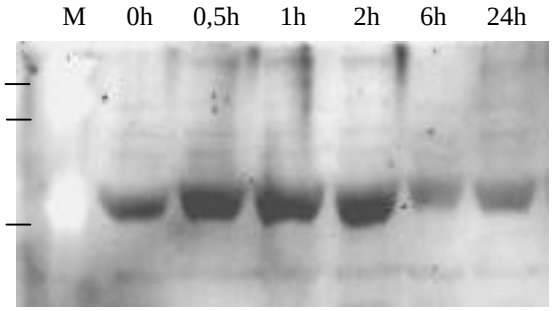


2.2.2. Bestätigung der Ergebnisse durch Immunoblots

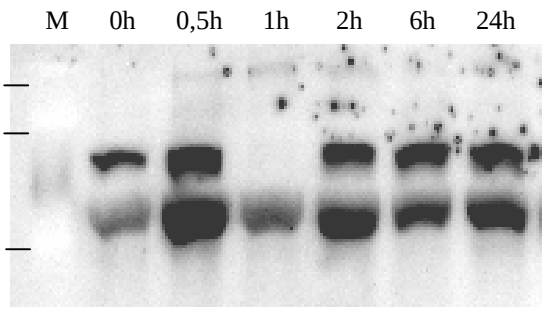
Die Proteinextrakte aus den analog stimulierten CD34+-Zellen des Spenders 3 wurden auf zwei PAGE-Gele aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Auf Blot 1 wurde zunächst mit Hilfe des Anti-Phospho-Akt(Thr308)-Antikörpers das 57 kDa große phosphorylierte AKT nachgewiesen (Bild 13, links oben). Nach der Inkubation mit Sekundärantikörper wurde das Blot fotografiert und anschließend die Antikörperkomplexe mit *Reprobing*-Puffer abgelöst. Das Blot wurde dann mit AKT inkubiert, um die Gesamtmenge von AKT sichtbar zu machen (Bild 13, links unten). Auf Blot 2 (Bild 13, rechte Bildhälfte) wurde mit dem Anti-Phospho-p70S6K(Thr389)-Antikörper die Phosphorylierung der p70S6K (59 kDa) nachgewiesen und mit Anti-p70S6K die Gesamtmenge an p70S6K bestimmt. Blot 2 wurde zusätzlich noch mit Anti-Aktin inkubiert. Aktin wird als so genanntes Haushaltsgen angesehen. Die Produkte der Haushaltsgene haben elementare Funktionen im Zellstoffwechsel. Ihre Expression schwankt bei zellbiologischen Veränderungen nur in engen Grenzen, daher wurden sie als

Bild 13: CD34+-Zellen wurden mit EPO inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 30min, 1h, 2h, 6h und 24h sowie von unbehandelten CD34+-Zellen wurden Zellproben entnommen. Die präparierten Proteine wurden auf zwei PAGE-Gele aufgetragen und diese auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Auf Blot 1(linke Bildhälfte) wurde zunächst mit Hilfe des Anti-Phospho-Akt-Antikörpers das 57 kDa große phosphorylierte AKT nachgewiesen. Nach dem Fotografieren wurde der Antikörper mit *Reprobing*-Puffer abgewaschen. Das Blot wurde dann mit Anti-AKT inkubiert, um die Gesamtmenge von AKT sichtbar zu machen. Mit Blot 2 (rechte Bildhälfte) wurde analog verfahren, nur dass die Phosphorylierung der p70S6K (59 kDa) nachzuweisen war. Nach dem erneuten Abwaschen aller Antikörper wurde Blot 2 noch mit Anti-Aktin inkubiert, um einen weiteren Nachweis über die Konstanz der eingesetzten Proteinmengen zu erlangen.
Die Marker-Banden sind in den dargestellten Ausschnitten 216, 132 und 78 kDa groß. Die durch den Marker angezeigten Größen stimmen nicht mit den tatsächlichen Molekulargewichten von AKT und p70S6K überein. Dass jedoch bei beiden Blots der phosphorylierungsspezifische Antikörper sowie der nicht phosphorylierungsspezifische Antikörper dieselbe Bande erkennen, wird als Beweis gewertet, dass die richtigen Banden erkannt wurden. Darüber hinaus laufen die fast gleichgroßen Proteine AKT und p70S6K erwartungsgemäß auf vergleichbarer Höhe. Anti-Phospho-p70S6K erkennt 2 Banden. Die untere ist identisch mit der Bande, die Anti-p70S6K erkennt und wird daher zur Auswertung genutzt.

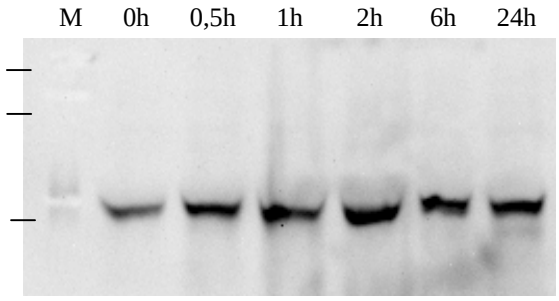
Blot 1: **P-AKT**



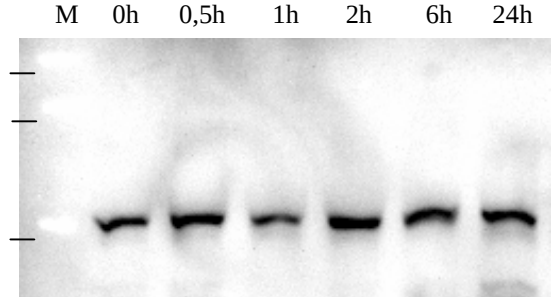
Blot 2: **P-p70 S6-Kinase**



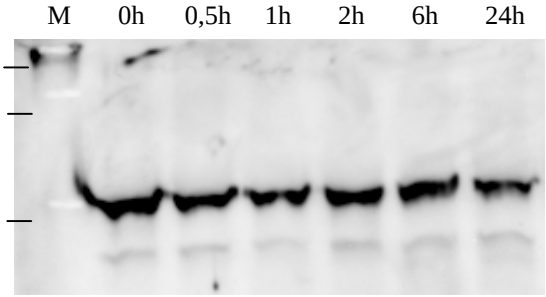
Blot 1: **AKT**



Blot 2: **p70 S6-Kinase**



Blot 2: **Aktin**



Bezugsgrößen bei quantitativen Auswertungen verwendet. Sowohl für Blot 1 als auch Blot 2 konnte mit den nicht phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass sich die Menge des jeweils untersuchten Proteins nur geringfügig ändert. Gleiches gilt für Aktin auf Blot 2. Wesentlich stärker änderten sich die Signale der phosphorylierungsspezifischen Antikörper. Der Anteil an phosphoryliertem AKT nahm in folge der durch EPO ausgelösten Signalereignisse stark zu. Zwischen 2h und 6h nach der Zugabe von EPO fiel die Phosphorylierung jedoch auf niedrigere Werte ab als in den unbehandelten CD34+ gemessen wurden. Bei p70S6K erkannte der Antikörper zwei Banden. Beide Banden zeigten jedoch tendenziell den gleichen Verlauf. Da der nicht phosphorylierungsspezifische Anti-p70S6K nur die untere Bande erkannte, wurde nur diese zur Auswertung herangezogen. 30min nach EPO-Applikation wurde eine starke Zunahme der Phosphorylierung von p70S6K gemessen, die nach 1h wieder auf den Ausgangswert zurückging. Nach 2h Inkubation stieg die Phosphorylierung wieder an und blieb bis zum Versuchende auf diesem Niveau.

Damit konnten die AT-Daten durch die Immunoblots bestätigt werden. Beide Methoden belegen die Phosphorylierung von AKT und p70S6K innerhalb von 30 min nach der Stimulierung mit EPO. Im weiteren Zeitverlauf liefern die Methoden aber unterschiedliche Ergebnisse. Die auf dem Immunoblot nach 6h angezeigte Deaktivierung von AKT ist in den AT-Daten erst nach 24h zu erkennen. Ebenso ist die zwischenzeitliche Dephosphorylierung der p70S6K nach 1h in den Array-Daten nicht zu finden.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die Zelldifferenzierung während der Erythropoese zu beschreiben. Dies geschah durch die Analyse des Transkriptoms mittels AFFYMETRIX-Microarrays und durch die Analyse des Phosphoproteoms mit Hilfe eines neu entwickelten Protein-Microarrays.

3.1 Transkriptomanalyse

Es wurden 4 verschiedene Zellkulturmodelle der erythroiden Differenzierung untersucht, verglichen und hinsichtlich ihrer Eignung bewertet. Differentiell exprimierte Gene mit verschiedener Bedeutung ihrer Produkte in der Erythropoese oder Leukämogenese wurden identifiziert. Die verwendeten Zellkulturmodelle waren:

1. CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen eines gesunden Spenders wurden mit 7 U/ml Erythropoietin zur erythroiden Differenzierung stimuliert. Vor Beginn der Stimulation wurde eine Probe unbehandelter Zellen entnommen. Weitere Proben wurden nach 1, 3, 6, 9, 12 und 14 Tagen genommen und die RNA präpariert. In einer weiteren Serie wurde mit CD34+-Zellen eines anderen gesunden Spenders genauso verfahren, Proben wurden wiederum von den unbehandelten Zellen, sowie nach 1, 3 und 6 Tagen präpariert.
2. K562-Zellen (Chronisch-Myeloische-Leukämie-Zelllinie), die 6h, 12h, 24h und 48h mit 1µM AraC im Medium stimuliert wurden, sowie unbehandelte Zellen wurden präpariert.
3. In K562-Zellen wurde mit 2mM Butyrat die erythroide Differenzierung ausgelöst. Proben wurden von unbehandelten Zellen sowie nach 6h, 12h, 24h und 48h präpariert.
4. K562-Zellen wurden mit 50µM Hämin stimuliert. Proben wurden von unbehandelten Zellen sowie nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h präpariert.

Die RNA-Präparationen wurden zur Synthese von fluoreszenzmarkierten cRNAs verwendet, welche dann auf dem AFFYMETRIX U133A-Microarray hybridisiert wurden. Außerdem wurde von allen Proben, mit Ausnahme der Hämin-stimulierten K562, cDNA hergestellt und zur Bestätigung der Array-Daten *Real-Time*-RT-PCR durchgeführt.

Die Microarray-Daten wurden normalisiert und mittels mathematisch definierter Kriterien nach differentiell exprimierten Genen durchsucht. Dabei wurde einerseits jeweils innerhalb einer Serie nach Genen gesucht, deren Expression sich während der Differenzierung ändert. Andererseits wurden die Zellkulturmodelle verglichen und Gene identifiziert, deren Expression sich in CD34+ deutlich von der in K562 unterscheidet.

Der Vergleich von Datensätzen, die als Duplikate vorliegen, ergab eine sehr hohe Übereinstimmung. Um diesen Vergleich zu ermöglichen, wurden die Expressionsdaten der zuvor als „differentiell exprimiert“ eingestuften Gene eines Experiments zusammengestellt und hierarchisch geclustert. Bei dieser mathematischen Methode werden Gene mit ähnlichem Expressionsverlauf zusammengeordnet, es entstehen Cluster. Die Ergebnisse wurden als *heatplots* dargestellt, bei denen die Signalstärken mit einem Farbcode beschrieben werden. Durch die Clusterbildung entstehen im *heatplot* Farbmuster. Diese Farbmuster sind bei den duplizierten Serien des K562+Hämin-Experiments nahezu identisch. Dies bedeutet, dass die beiden Serien des CD34+EPO-Experiments weitgehend übereinstimmen, jedoch gibt es auch Unterschiede. Die Ursache dieser Unterschiede wird hauptsächlich in der biologischen Variabilität des Ausgangsmaterials, das ja von verschiedenen Spendern stammt, gesehen. Weiterhin können chargenspezifische Unterschiede der verwendeten Medien und Zytokine dazu beigetragen haben. Insgesamt kann anhand der Duplikate eine sehr gute Reproduzierbarkeit und generelle Zuverlässigkeit der Array-Daten festgestellt werden.

Die Differenzierung der Erythrozyten aus hämatopoetischen Progenitoren verläuft über definierte Zwischenstufen, die in der Literatur ausführlich beschrieben sind. Es wurde daher versucht, den zu den jeweiligen Messpunkten erreichten Entwicklungsstand diesen Zwischenstufen zuzuordnen. Damit sollte auch die Vergleichbarkeit der CD34+- und K562-Modelle ermöglicht werden, die wegen der völlig unterschiedlichen Anwendungsdauer der Stimulanzien sonst nicht gegeben wäre.

Zur Bestimmung der Differenzierungsstadien wurde zunächst die Expression von Oberflächenmarkern und anderen Proteinen herangezogen, die für Erythrozyten bzw. ihre unreifen Vorläufer typisch sind. Bei den EPO-stimulierten CD34+-Zellen wurden außerdem morphologische Kriterien mit einbezogen. Man muss davon ausgehen, dass das CD34+-Ausgangsmaterial neben hämatopoetischen Progenitoren auch die frühen und ebenfalls CD34-positiven Differenzierungsstufen der myeloiden und lymphoiden Reihe sowie ca. 10% CD34-negative Leukozyten enthält. Bei den CD34-negativen Leukozyten dürfte es sich wegen der Präparationsbedingungen fast ausschließlich um reife Leukozyten des peripheren Blutes

handeln. Falls durch G-CSF auch CD34-negative hämatopoetische Stammzellen mobilisiert werden, käme es nicht zu deren selektiver Anreicherung, und sie könnten wegen der überragenden Mehrheit anderer Leukozyten nur einen verschwindend kleinen Teil der Kontamination ausmachen. Wegen der Heterogenität des Ausgangsmaterials kann auch zu allen folgenden Zeitpunkten nicht erwartet werden, dass alle Zellen denselben Differenzierungsstatus erreicht haben. Dies wurde bei der weiteren Auswertung berücksichtigt. Im Zellgemisch konnten immer mehrere Zelltypen konkret erkannt werden, wobei jeweils ein bestimmtes Stadium überrepräsentiert war. Die überwiegende Mehrheit der Zellen vollendete die erythroide Differenzierung im untersuchten Zeitraum nicht, erreichte aber die letzten kernhaltigen Stadien (Pro-) Erythroblast und Normoblast. Kontaminierende Zellen, die nicht zur erythroiden Differenzierungsreihe gehörten, starben bis zum Tag 7 größtenteils ab, da sie mit den dargebotenen Wachstumsfaktoren nicht überleben konnten.

Eine Zuordnung der differenzierenden K562-Zellen aller 3 Experimente zu definierten Stadien anhand von Oberflächenmarkern und anderen erythrozytentypischen Genen war nicht möglich. Kein Phänotyp eines der in Frage kommenden Zelltypen wurde vollständig ausgeprägt. Es wurde daher versucht, mittels hierarchischem Clustern aller vorhandenen Datensätze, Ähnlichkeiten zwischen den Datensätzen zu erkennen. Insbesondere sollte jeder Datensatz eines K562-Experiments dem Datensatz des CD34+EPO-Experiments zugeordnet werden, mit dem er die größte Ähnlichkeit hat. Tatsächlich ließ sich bei AraC- und Hämin-Behandlung ein Trend erkennen, wonach frühe Zeitpunkte des CD34+-Experiments mit frühen Zeitpunkten der K562-Experimente korrelieren und analog auch die späteren Zeitpunkte aller Experimente korrelieren. Demnach ähnelt die unbehandelte K562-Zelle mehr den frühen Differenzierungsstufen CFU-GEMM bzw. BFU-E als der undifferenzierten hämatopoetischen Stammzelle. Bei AraC-Stimulation bilden die Zellen CFU-E- ähnliche Eigenschaften aus, bei Hämin-Stimulation wird sogar ein proerythroblastenartiges Stadium erreicht. Diese Korrelationen rechtfertigen jedoch keine eindeutigen Zuordnungen, da viele Widersprüche unerklärt bleiben. Unter anderem ist die unbehandelte K562 trotz ihrer Ähnlichkeit zum CD34-positiven Vorläufer CFU-GEMM CD34-negativ und synthetisiert auf niedrigem Niveau Hämoglobin. Die Hämoglobinsynthese beginnt normalerweise aber erst im Proerythroblasten. Die Butyrat-stimulierte K562 verblieben während des gesamten Experiments in einem CFU-GEMM- oder BFU-E-ähnlichen Stadium. Die Behandlung mit Butyrat bewirkt zwar auch deutliche Veränderungen im Expressionsprofil, diese wirken aber nicht oder nur wenig in Richtung erythroide Differenzierung.

Offensichtlich ist das K562-Ausgangsmaterial das Produkt einer deregulierten Hämatopoese. Möglicherweise werden in den untersuchten Modellen auch noch Marker bzw. allgemeine Eigenschaften anderer Differenzierungslinien reguliert. Dies war aber nicht Gegenstand dieser Untersuchung. Es ist bekannt, dass K562 zum Beispiel auch in die Megakaryozyten-Linie differenzieren kann, wenn mit TPA behandelt wird [Tetteroo et al. 1984]. Die Zelllinie K562 wurde aus einer CML im Endstadium (Blastenkrise) etabliert. Die Blastenkrise als klinischer Begriff meint das Auftreten großer Mengen „undifferenzierter Blasten“ im Blut und Knochenmark. Diese Blasten tragen neben BCR-ABL im Allgemeinen noch weitere Mutationen.

Obwohl außer bei häminstimulierten K562 in jedem Modell mehr als 2000 Probesets eine differentielle Expression anzeigen, enthält die Schnittmenge aller 4 Experimente lediglich 69 Probesets. Von diesen 69 Probesets wurden wiederum nur 5 in allen Modellen hochreguliert und 11 in allen Modellen herunterreguliert. Es war eine sehr viel höhere Übereinstimmung erwartet worden, da alle 4 Zellkultursysteme Modelle des gleichen biologischen Vorgangs sind. Betrachtet man die Schnittmenge aus den 3 K562-Modellen ist die Übereinstimmung mit 16 hochregulierten und 24 herunterregulierten Genen zwar deutlich größer, aber immer noch viel geringer als vermutet.
Es zeigt sich eine große Abweichung zwischen den mit CD34-positiven Primärzellen bzw. den mit der Zelllinie K562 durchgeführten Experimenten. Dabei wird angenommen, dass das CD34-Experiment die i*n-vivo*-Bedingungen in jeder Hinsicht viel besser simuliert als die K562-Modelle. Daraus wird gefolgert, dass auch die Ergebnisse des CD34-Experiments die biologische Wahrheit viel besser repräsentieren als die Ergebnisse der K562-Experimente. Generell ist die eingeschränkte Tauglichkeit von Zelllinien zur Untersuchung der erythroiden Differenzierung schon von Dolznig et al.[Dolznig et al. 2001] erkannt worden, wobei diese Autoren aber nur die terminale Differenzierungen von Erythroblasten der Maus untersuchten. Die Akkumulation von Hämoglobin wurde in der Vergangenheit als verlässlicher Marker der erythroiden Differenzierung angesehen und daher Zellkulturmodelle, bei denen es zu einer gesteigerten Hämoglobinsynthese kommt, als Modelle der erythroiden Differenzierung akzeptiert. Anhand der vorliegenden Daten muss die Kritik von Dolznig et al. an Zelllinien-modellen der Erythrozytendifferenzierung bestätigt und auf die humanen K562-Modelle ausgedehnt werden.

Es wird allgemein angenommen, dass Gene mit ähnlichen Expressionkurven auch ähnlichen bzw. identischen zellulären Regulationsprinzipien unterliegen. Solche Regulationsprinzipien zu erkennen, ist Gegenstand eines Projekts, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Ein Schwerpunkt der Auswertung liegt daher auf dem, Expressionsverhalten von Transkriptionsfaktoren aber auch anderer Proteine der Signaltransduktion. Kooperierende Bioinformatiker sollen aus diesen Daten und Datenbankinformationen transkriptionelle Netzwerke modellieren.

Zunächst wurden die Expressionskurven aller als „differentiell exprimiert“ eingestuften Gene eines Experiments durch *k-means clustering* zu Gruppen mit ähnlichen Kurvenverläufen geordnet. Die Methode *k-means-clustering* wurde angewendet, weil *k-means,* entsprechend einer mündlichen Mitteilung von Ulrich Möller (Bioinformatics-Group, HKI Jena), bei dieser Problemstellung bessere Ergebnisse erbringt als andere häufig verwendete Cluster-Algorithmen. Die Anwendung dieses Clusteralgorithmus wurde erforderlich, weil bei mehr als 2 Messpunkten nicht mehr nur zwischen hoch- und herunterreguliert zu unterscheiden ist, sondern auch viel kompliziertere Verläufe der Expressionskurven möglich sind. Mit einem einfachen Datenfilter kann man dieser Komplexität nicht gerecht werden. Bei den Experimenten, die als Duplikate vorlagen, wurde jeweils nur eine Serie zum Clustern ausgewählt. Eine detaillierte Auswertung wurde nur bei den Daten des CD34+EPO-Experiments vorgenommen. Nach dem Clustern wurden die Cluster nach Genen durchsucht, deren Produkte zu wichtigen Gruppen regulatorischer Proteine gehören. Dabei wurde eine Vielzahl regulatorischer Proteine entdeckt, über deren Beteiligung an der erythroiden Differenzierung bisher nichts bekannt ist. In anderen Fällen konnten bekannte Zusammenhänge bestätigt bzw. von anderen Zellsystemen auf dieses übertragen werden. Darüber hinaus konnte umfangreiches Datenmaterial für weiterführende bioinformatische Auswertungen zur Verfügung gestellt werden.

Viele Gene sind durch mehr als ein Probeset auf dem Array repräsentiert. Es wurde regelmäßig beobachtet, dass mehrere Probesets eines Gens ins gleiche Cluster bzw. in sehr ähnliche Cluster sortiert wurden. Dies bestätigt sowohl die Qualität der Microarraydaten als auch die Eignung der Datenfilter und Clustermethode.

Unabhängig von den oben beschriebenen *k-means*-Clustern wurden die Daten der CD34+- und K562-Experimente nach Genen durchsucht, deren Produkte möglicherweise besondere Bedeutung bei der erythroiden Differenzierung oder der Pathogenese der CML haben. Zunächst wurden nur besonders stark regulierte Probesets gefiltert, deren Signale innerhalb

einer Serie mindestens um den Faktor 4 schwanken. Außerdem wurde nach Probesets gesucht, deren Signale in unbehandelten CD34+ versus unbehandelten K562 mindestens um den Faktor 8 verschieden sind. In den resultierenden Listen wurden regulatorische Proteine identifiziert, für die aufgrund ihrer Expressionsmuster eine besondere Bedeutung in der Differenzierung von Erythrozyten oder der CML-Pathogenese angenommen wird. Für 14 dieser Proteine wurden die Array-Daten mit *Real-Time-PCR* als unabhängiger Methode bestätigt. Die Bedeutung dieser 14 sowie 4 weiterer Proteine wurde wegen der großen Datenmenge direkt im Zusammenhang mit den Ergebnissen unter 2.1.6. diskutiert. Hier sollen nur die wesentlichsten Ergebnisse zusammengefasst werden. Unter anderem konnten Zusammenhänge, die bisher nur für andere zelluläre Systeme publiziert waren, auch bei der erythroiden Differenzierung hämatopoetischer Progenitoren beobachtet werden. So wurde zum Beispiel im CD34+-Modell für die Transkriptionsfaktoren FOXO3A und BCL6 ein gleichzeitiger Anstieg der zugehörigen Transkripte zwischen Tag 6 und 9 beobachtet. Die Expression von BCL6 wird direkt durch FOXO3A stimuliert, was bisher aber nur für HeLa-Zellen gezeigt wurde [Tang et al. 2002]. Weitere Proteine, deren Bedeutung in der Regulation der Erythropoese bisher nicht erkannt wurde, wurden entdeckt. Zum Beispiel wurden durch EPO die Proteinkinase BMP2K und eine Reihe weiterer Kinasen sowie der Rezeptor IGF2R induziert. Signalmoleküle, insbesondere Rezeptoren und Kinasen, deren Expressionsverlauf in den K562-Modellen deutlich von dem in EPO-stimulierten hämatopoetischen Progenitoren abweicht, könnten unter Umständen lohnende Angriffspunkte zukünftiger Therapien werden. Kandidaten sind insbesondere Proteine, die in K562 deutlich stärker exprimiert sind als in CD34+-Zellen oder deren Expression sowohl im Primärzellmodell als auch in K562 während der Differenzierung stark nach unten korrigiert wird. Dies deutet nämlich darauf hin, dass die Funktion dieser Proteine in den undifferenzierten Stadien benötigt wird und in differenzierten Stadien abgeschaltet werden muss. Eine fehlerhafte Expression dieser Proteine könnte daher neben BCR-ABL zur Pathogenese der CML beitragen. In diese Gruppe gehören unter anderem die Proteinphosphatase PTPRR, die Ubiquitinligase SIAH2 und der TGFbeta-Rezeptor 3. Die Wichtigkeit von Molekülen mit vermeintlich sekundärer Bedeutung für die Inititiation und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps wurde im Falle der AML bereits von Castilla et al. [Castilla et al. 1999] erkannt. Diese Aussage lässt sich sicher auch auf die CML ausdehnen. Hier zeigt sich der eigentliche Wert der K562-Modelle, insbesondere bei Stimulation mit AraC oder Butyrat. AraC ist ein Zytostatikum, welches bei AML und auch bei CML eingesetzt wird. Butyrat vertritt hier eine Gruppe von Derivaten kurzkettiger Fettsäuren, die ebenfalls als Histondeacetylase-Hemmer wirken, und als Therapeutika in der

Erprobung sind. Somit sollten diese beiden Modelle besser als Modelle einer CML-Therapie betrachtet und benutzt werden anstatt als Modelle der Erythropoese. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, die Ergebnisse aus den K562 in anderen CML- und auch AML-Zelllinien und möglichst auch in Patientenmaterial zu überprüfen um festzustellen, ob sie von genereller Gültigkeit in CML und ggf. auch anderen myeloischen Leukämien sind. Besonders eine Bestätigung der Array-Daten auf Proteinebene wäre notwendig, um die differentielle Expression endgültig zu beweisen.
Weiterhin müsste überprüft werden, ob die hier aufgeführten Proteine durch ihre abberante Expression auch wirklich eine Bedeutung in der Leukämogenese haben. Dazu müsste man die Expression dieser Gene künstlich erhöhen bzw. abschalten. Ersteres kann durch die Transfektion eines Expressionsvektors erreicht werden, der den Leserahmen des gewünschten Gens unter einem konstitutiv aktiven oder induzierbaren Promotor trägt. Für die Abschaltung der Genexpression käme zum Beispiel die Ausnutzung der RNA-Interferenz (RNAi) durch Transfektion synthetischer siRNAs in Frage.

3.2 Analyse des Phosphoproteoms mit einem Protein-Microarray

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Veränderungen des Phosphoproteoms während der Erythropoese. Dabei kam ein Microarray zum Einsatz, dessen Sonden aus gespotteten Antikörpern gegen wichtige Signalproteine bestehen. Die verwendeten Antikörper sind phosphorylierungsspezifisch, das heißt sie erkennen ihre Zielproteine nur wenn diese an bestimmten Aminosäuren Phosphatreste tragen. Die Entwicklung dieses Microarrays wird als Kooperation unserer Gruppe mit der Firma CLONDIAG chip technologies GmbH durchgeführt. CLONDIAG stellt dabei die Array-Platform (Array-Tube-Format) und die Spotting-Technologie bereit.
Dieses Array wurde benutzt, um die Veränderungen der Proteinphosphorylierung zu untersuchen, die eintreten, wenn CD34+-Zellen mit EPO stimuliert werden. Verglichen wurden Extrakte aus unbehandelte CD34+-Zellen mit solchen, die nach 30min, 1h, 2h, 6h und 24h EPO-Stimulation gewonnen wurden. Bereits nach 30min wurde eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung bei den Proteinkinasen AKT und p70S6K beobachtet. Diese Ergebnisse konnten insgesamt bestätigt werden, indem dieselben Proteinextrakte in Immunoblots untersucht wurden. Die Immunoblots zeigten aber beim AKT nach 6h eine Dephosphorylierung an, die im Array weniger deutlich und zeitversetzt gemessen wurde. Auch die p70S6-Kinase zeigt im Immunoblot bei 1h eine zwischenzeitliche Deaktivierung, die in Array-Daten nicht

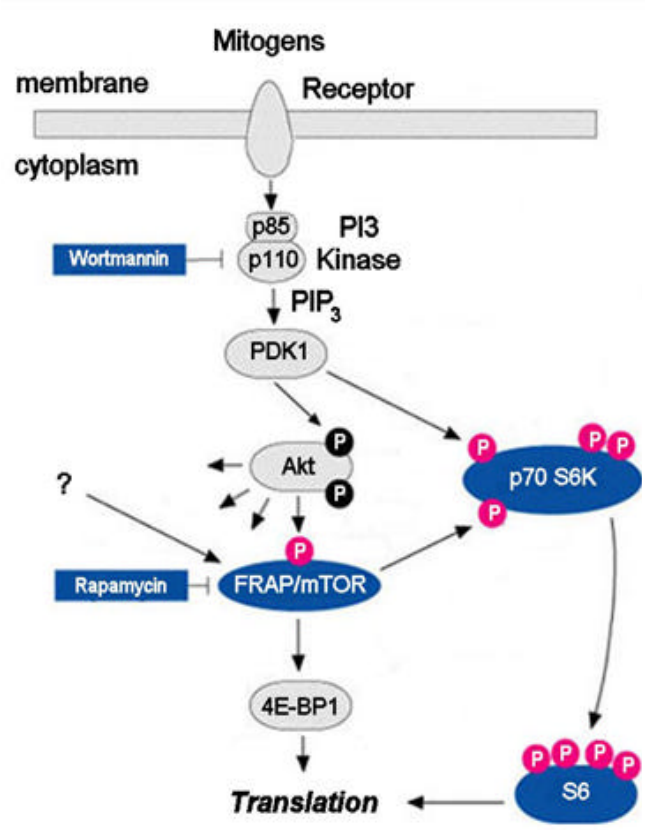


Bild 14: Der PI3K-AKT-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine (zum Beispiel EPO) gleichermaßen aktiviert. Aktiviertes AKT phosphoryliert eine Vielzahl von Substraten, wodurch einerseits die Apoptose unterdrückt und andererseits die Proliferation angeschaltet wird. Der hier dargestellte Teil dieses Signalweges zeigt, wie es durch die Aktivierung von FRAP/mTOR und p70S6K zur Phosphorylierung des Ribosomalen Proteins S6 kommt. Nur wenn das Ribosomale Protein S6 phosphoryliert ist, können mRNAs mit 5´-Oligopyrimidin-Trakt, die für ribosomale Proteine kodieren, translatiert werden. Damit wird eine wichtige Voraussetzung zum Aufbau neuer Ribosomen geschaffen und eine erhöhte Proteinsynthese und Proliferation ermöglicht.
Quelle: http://www.ebiotrade.com.

beobachtet werden konnte.

Der Zusammenhang zwischen der Stimulierung mit einem Mitogen und der Aktivierung von AKT und p70S6K wurde schon in vielen Zellsystemen gefunden, einschließlich Erythropoietin-stimulierter erythroider Progenitoren [Barth-Baus et al. 2002]. Der infolge der Ligandenbindung aktivierte Rezeptor aktiviert die Phosphatidyl-Inositol-3´-Kinase (PI3K). Die katalytische Untereinheit des Enzyms (p85) phosphoryliert Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphat und Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat am 3´-Kohlensoff des Inositols. Das entstehende Phospholipid (PIP3) bindet und aktiviert PDK1 (phosphoinositide dependent protein kinase). PDK1 phosphoryliert AKT am Thr308 und p70S6K am Thr229. In der vorliegenden Arbeit wurde aber nur die p70S6K-Phosphorylierung am Thr389 nachgewiesen. Diese entsteht durch FRAP/mTOR, welches selbst erst durch AKT aktiviert werden muss (siehe Bild 14).

Der PI3K-AKT-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für Überleben und Proliferation der Zellen, wobei AKT eine zentrale Rolle spielt. FRAP/mTOR (FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein/mammalian target of rapamycin) ist ein Sensor für die Verfügbarkeit von ATP und Aminosäuren. Damit vermittelt diese Kinase zwischen den von außen eintreffenden mitogenen Signalen und der physiologischen Bereitschaft der Zelle zur Proliferation. Wenn ausreichend Ressourcen vorhanden sind, phosphoryliert mTOR die

p70S6K an Thr389 und außerdem an Thr371. p70S6K phosphoryliert das Ribosomale Protein S6. Diese Phosphorylierung ist entscheidend für die Translation von mRNAs, die einen 5´-Oligopyrimidin-Trakt tragen. Diese Sequenz ist typisch für die mRNAs der ribosomalen Proteine. Über den beschriebenen Signalweg wird also die Synthese neuer Ribosomen kontrolliert.
Besonders interessant ist die hier beobachtete Schwankung der p70S6K-Phosphorylierung. Für die 1h nach EPO-Applikation beobachtete Dephosphorylierung wurden keine Belege in der Literatur gefunden. Möglicherweise ist eine noch unbekannte Wechselwirkung mit Proteinen anderer Signalwege oder eine negative Rückkopplung die Ursache.

Obwohl sich mit dem Array-Tube durchaus reproduzierbare Ergebnisse gewinnen lassen, ist das niedrige Signal-Hintergrund-Verhältnis noch unbefriedigend. Die Spots erscheinen insgesamt zu blass. Dafür kommen verschiedene Ursachen in frage. Als größtes Problem wird eine ungenügende Zugänglichkeit der Antikörper angesehen, falls diese teilweise als Präzipitat mit dem BSA des *Spotting*-Puffers vorliegen. Das BSA wird zugesetzt, weil Proteine sich grundsätzlich gegenseitig stabilisieren. Beim notwendigen Trocknen der Arrays nach dem *Spotting* besteht natürlich die Gefahr, dass die Proteine denaturieren. Durch Zusatz von Trehalose wurde versucht, die Proteinstrukturen zu stabilisieren. Trehalose ist ein Kohlenhydrat, das besonders gut Wasserstoffbrücken zu den hydrophilen Aminosäure-seitenketten der Proteine ausbilden kann. Eine wässrige Umgebung wird imitiert und die Proteine vor dem Verkleben bewahrt. Inwieweit dieser Ansatz hier erfolgreich ist, lässt sich jedoch schwer nachprüfen. Hier müsste versucht werden, durch alternative *Spotting*-Puffer und durch den Zusatz von Detergentien bessere Ergebnisse zu erzielen. Weitere denkbare Ansatzpunkte sind die Erhöhung der Konzentration an biotinyliertem Protein und die Verlängerung Inkubationszeit. Beides wurde versucht, brachte aber auch nicht den gewünschten Erfolg.
Eine weitere Variable ist die Konzentration des Biotin-NHS-Esters in der Biotinylierungs-reaktion. Von dieser Konzentration hängt der Biotinylierungsgrad der Proteinmoleküle ab. Es sollte natürlich jedes Proteinmolekül mindestens einmal biotinyliert werden, eine Über-biotinylierung muss aber verhindert werden, weil dadurch die Löslichkeit herabgesetzt und die Präzipitierung des gesamten Zellproteins begünstigt wird. Die Wahl der Biotin-konzentration bleibt immer ein Kompromiss, zumal der Extrakt eine Vielzahl von Proteinen enthält, die zum Teil unterschiedliche optimale Biotinylierungsbedingungen haben.

Die Normalisierung der Daten ist demgegenüber ein kleineres Problem. Als Normalisierungsvermutung wurde ursprünglich angenommen, dass der Phosphorylierungsgrad des gesamten Proteoms nur in engen Grenzen schwankt. Zur Normalisierung der Signalstärken auf die eingesetzte Proteinmenge bzw. die gesamte Tyrosin-Phosphorylierung des Proteoms war ein Anti-Phosphotyrosin-Antikörper abgelegt worden. Das Signal dieses Antikörpers variierte jedoch teilweise so stark, dass es als Normalisierungsgrundlage ungeeignet angesehen wird. Dazu kommt, dass der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper die Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten nicht widerspiegelt.

Auf dem Array ist nur eine kleine Auswahl an Phosphoproteinen repräsentiert. Bei einer gleichzeitigen (De-)Aktivierung mehrerer biochemischer Signalwege, könnte auch die Phosphorylierung eines Großteils der auf dem Array repräsentierten Proteine ab- oder zunehmen, was zu einem Normalisierungsfehler führen würde.

Ungenauigkeiten durch unterschiedlich starke Signale aufgrund unterschiedlicher Mengen an eingesetztem Protein können durch sorgfältige Bestimmung der Proteinkonzentration bzw. der Anzahl der präparierten Zellen begrenzt werden. Bei der anschließenden Auftragung zu vergleichender Daten als Punktdiagramme kommt es zu einer Selbstnormalisierung der Daten. Eine ähnlich elegante Lösung für das Problem einer generellen Zu- oder Abnahme des Phosphorylierungsgrades der untersuchten Proteine gibt es leider nicht. Solange nicht alle untersuchten Proteine gleichermaßen betroffen sind, was unwahrscheinlich ist, käme es aber trotzdem zu Verschiebungen im Punktdiagramm.

Somit kann dieses Array derzeit nur für *Screening*-Anwendungen eingesetzt werden. Die Ergebnisse müssen unbedingt mit sensitiveren Methoden bestätigt werden

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

Alle nicht einzeln aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen **ROTH** oder **SIGMA** bezogen.

Acrylamid-Lösung 40%ig, 19:1 (38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	ROTH
Agarose	Biozym
Ammoniumazetat 7,5M; RNase-frei	Ambion
APS	Bio-Rad
Biotinamidocaproat-N-Hydroxysuccinimid-Ester	Sigma
Bradford	Sigma
BSA	Sigma
Cytosinarabinosid	Sigma
DMSO	Sigma
DNA-Marker: 100bp-Leiter	Fermentas
DTT	Sigma
DTT	Fluka
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Glycogen 5mg/ml	Novagen
Hämin	Sigma
HEPES	Sigma
Leupeptin	Sigma
Mercaptoethanol	ROTH
Milchpulver (fettfrei)	ROTH
Natriumbutyrat	Sigma
Natriumfluorid	Sigma
Natriumorthovanadat	Sigma
Nonidet NP-40	Sigma

Phase Lock Gel, aliquotiert in Eppendorf-Tubes	Eppendorf
Phenol:Cloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, 10mM Tris pH 8,0)	ROTH
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Protein-Marker: Kaleidoscope 161-0324	BioRad
TEMED	ROTH
TMB (Tetramethylbenzidin, TrueBlue)	KPL

4.1.2. Enzyme

AMV Reverse Transcriptase	Promega
DNase I	Promega
Streptavidin-HRP-Konjugat 1mg/ml	Clondiag Chip Technologies

4.1.3. Kits

BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo
CliniMACS CD34 cell selection	Miltenyi
ECL-Western Blotting Detection	Amersham
Light Cycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I	Roche
Qiaquick-PCR-Purification-Kit	Qiagen
RNeasy	Qiagen
SuperScript Choice system	Gibco

4.1.4. Verbrauchsmaterial

Nitrozellulosemembran Protran BA85, Porengröße 0,45µm	Schleicher & Schuell
Qiashredder	Qiagen

4.1.5. Oligonukleotide (Primer)

T7-dT24	5´-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-dT24-3´	Affymetrix
dT18VN		MWG-Biotech

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die quantitative RT-PCR sind unter diesem Punkt zusammen mit den PCR-Bedingungen in einer Tabelle zusammengefasst

4.1.6. Geräte

Agarosegelkammer Agagel Maxi/Mini	Biometra
AT-Reader	Clondiag Chip Technologies
CliniMACS-System	Miltenyi
Coulter Epics Profile (Durchflusszytometer)	Coulter
Elektrophorese- und Tankblot-Apparatur	BioRad
LAS1000	Fujifilm
LightCycler (Real-Time-PCR-Gerät)	Roche
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik
Zellzählgerät	Coulter

4.1.7. Zellkultur

BSA	Terry Fox
FCS	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
EPO	Ortho Biotec
hrIL6	Roche
hrSCF	Amgen
Transferrin, eisengesättigt	Sigma
große Flaschen, 75 cm^2	Greiner
kleine Flaschen 25 cm^2	Greiner
IMDM	Gibco
RPMI-1640	Gibco
PBS	Gibco

4.1.8. Zellen

K562	American Type Culture Collection

4.1.9. Antikörper

Antikörper für Array-Tube	**Quelle**	**Hersteller**
Anti-Chicken IgG	Kaninchen-polyklonal	Sigma
Catenin-beta Ab2	Kaninchen-polyklonal	Dianova
C-Jun (H-79)X	Kaninchen-polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
c-Myc	Maus-monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
p38 MAPK	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho Stat3 (Ser727)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho Stat5 14H2	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt (Thr308)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-Erk5 (Thr218/Tyr220)	Kaninchen-polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-GSK3beta (Ser9)	Kaninchen-polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-NF-kappaB (Ser536)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-p38 MAPK (Thr182/Tyr185)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-p53 (Ser15)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-p70 S6K (Thr389)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-Smad1 (Ser463/Ser465)	Ziege-polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-Smad2/3 (Ser433/Ser435)	Ziege-polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-Tyrosin	Maus-monoklonal	Cell Signaling Technology
Retinoblastoma(Rb) Ab6	Kaninchen-polyklonal	Dianova
Antikörper für Immunblotting	**Quelle**	**Hersteller**
Akt	Kaninchen-polyklonal	Cell Signaling Technology
Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat	Ziege-polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
p70S6K	Kaninchen-polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt (Thr308)	Kaninchen-polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-p70S6K (Thr389)	Kaninchen-polyklonal	Cell Signaling Technology
Antikörper für Durchflusszytometrie	**Quelle**	**Hersteller**
anti-GlyA-PE	Maus-monoklonal	Dako
SCFR-FITC (SCF-R)	Maus-monoklonal	Pharmingen
anti-CD34 -PC5	Maus-monoklonal	Beckman Coulter
anti-EpoR	Maus-monoklonal	R&D
Isotypkontrolle	Maus	Beckman Coulter

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkultur

4.2.1.1. CD34-positive hämatopoetische Stammzellen

CD34+ -Zellen von gesunden Spendern wurden mit G-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert und nach 4 Tagen zusammen mit den Leukozyten durch Apherese separiert. Die CD34-positiven Zellen wurden immunomagnetisch mit dem CliniMACS-System von den Leukozyten isoliert. Nach dem Waschen der Säule mit PBS erfolgte eine erste Ausspülung mit PBS zur Gewinnung eines Transplantats. Der Inhalt der zweiten Spülung stand mit Genehmigung der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung. Diese Zellen wurden zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Nach dem Auftauen wurden die Zellen einen Tag bei 37°C und 5% CO_2 in IMDM- Medium kultiviert, dem 30 % FCS, 1% BSA, 7,5µl/ml L-Glutamin, 40µg/ml eisengesättigtes Transferrin, 10^{-6} M Mercaptoethanol, 10ng/ml hrSCF und 100U/ml hrIL6 zugesetzt wurden. Nach diesem Tag wurde eine Zellprobe entnommen (0h bzw. 0d, Ausgangsmaterial) und anschließend 7U/ml EPO zugegeben. Aller 3 Tage wurde das Medium gewechselt und dabei frische Zytokine zugesetzt.
Dieses Experiment wurde mit dem Zellmaterial von 3 verschiedenen Spendern durchgeführt.

- Spender 1: Proben zur Proteinpräparation (10^6 Zellen) wurden nach 0h, 30min, 1h, 2h, 6h, und 1d entnommen. Für die RNA Präparation wurden nach 0d, 1d, 3d, 6d, 9d, 12d und 14d je 2* 10^6 Zellen entnommen. Die mit dem Material dieses Spenders hybridisierten AFFYMETRIX-Microarrays werden als Serie 1 geführt.
- Spender 2: Für die RNA Präparation wurden nach 0d, 1d, 3d, 6d je 2* 10^6 Zellen entnommen. Die mit dem Material dieses Spenders hybridisierten AFFYMETRIX-Microarrays werden als Serie 2 geführt.
- Spender 3: Proben zur Proteinpräparation (5*10^5 Zellen) wurden nach 0h, 30min, 1h, 2h, 6h, und 1d entnommen und ausschließlich für Immunoblots verwendet.

Von Spender 1 wurden zusätzlich am Tag 5, 7 und 10 nach der Zugabe von EPO Zellproben für die Durchflusszytometrie und zur Erzeugung von Cytospins entnommen.

4.2.1.2. K562

K562-Zellen wurden aufgetaut, in RPMI1640 mit 10% FCS ausgesät und jeweils ca. 5 Tage bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert, bis ausreichend Material zur Verfügung stand. Aller 3 Tage wurde das Medium gewechselt. 12 Stunden vor Zugabe von 1µM AraC oder 2mM Natriumbutyrat wurden 10^5 Zellen/ml in frischem Medium ausgesät. Unmittelbar vor der Zugabe der Chemikalien wurde eine Zellprobe entnommen und die RNA präpariert (0h, Ausgangsmaterial). Weitere Zellproben zur Präparation der RNA wurden nach 6h, 12h, 24h und 48h entnommen.
Die Stimulierung von K562 mit 50µM Hämin wurde von Addya et al. (2004) durchgeführt. Die Kultur erfolgte wie oben angegeben, dem Medium wurden jedoch noch 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin zugesetzt.

4.2.2. Durchflusszytometrie

5 *10^4 Zellen pro Probe wurden in PBS mit Polyglobin gewaschen. Anschließend wurde 30min bei Raumtemperatur mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und erneut gewaschen. Je 10000 Zellen wurden im Coulter Epics Profile analysiert.

4.2.3. RNA-Präparation

Die Gesamt-RNA der Zellen wurde mit dem RNeasy-Kit nach den Vorgaben des Herstellers präpariert. Reste chromosomaler DNA wurden mit DNase I verdaut. Die Konzentration und Reinheit jedes RNA-Präparates wurde mit UV-Spektroskopie bestimmt. Alle RNA-Präparate wurden im Agarosegel hinsichtlich ihrer Integrität überprüft. Die Herstellung dieser Gele erfolgte mit RNase freier Agarose (Biozym) und TAE-Puffer aus sterilfiltriertem Reinstwasser (aus Millipore-Anlage). Außer Einwegprodukten wurden alle verwendeten Laborutensilien, wie zum Beispiel Messzylinder, Gelkammern und Gelkämme, 10 Minuten in 3% H_2O_2 gespült.

4.2.4. AFFYMETRIX-Arrays

4.2.4.1. Synthese der Hybridisierungsproben für AFFYMETRIX-Arrays

Die Hybridisierungsproben für die AFFYMETRIX-U133A-Microarrays wurden hergestellt, wie in der von AFFYMETRIX herausgegebenen Vorschrift angegeben. Das Verfahren besteht aus 3 Schritten:

1. Die eingesetzte Gesamt-RNA dient als Matrize zur Synthese einer cDNA (Erststrangsynthese). Der Primer T7-(dT)24 garantiert durch seinen 3´-Oligo-dT-Teil, dass nur von mRNA-Molekülen mit intaktem PolyA-Trakt eine Kopie erstellt wird. (Wir verwenden ausschließlich den Originalprimer von AFFYMETRIX, Produkte anderer Hersteller lieferten schlechtere Proben.)
2. Ein DNA-Zweitstrang wird synthetisiert. RNase H schneidet die mRNA, die mit der cDNA als Heteroduplex vorliegt, in Stücke, die für DNA-Polymerase I als Primer dienen. Die Polymerase hat eine 5´-3´-Exonucleaseaktivität und baut vor ihr liegende RNA- und DNA-Fragmente (Nick-Translation) ab. DNA-Ligase verbindet Zweitstrang-Fragmente, wenn die DNA-Polymerase vorzeitig abdissoziiert ist. T4 DNA-Polymerase garantiert, dass der Zweitstrang bis zum 5´-Ende des Erststrangs verlängert wird.
3. Die Doppelstrang-cDNA dient als Vorlage zur Herstellung einer Biotin-markierten cRNA (In-Vitro-Transkription). Dabei dient der 3´-terminale Teil des Zweitstrangs als Promotor für die T7-RNA-Polymerase.

zu 1. Erststrangsynthese: Außer RNA und RNase-freiem H_2O sind alle in diesem und nächstem Schritt benötigten Komponenten im SuperScript Choice system enthalten.

Hybridisierung des Primers	5µg Gesamt-RNA 1µl 100µM T7-dT24 H_2O zu 13µl Gesamtvolumen	10´ 70°C 5´ 0°C
Temperatureinstellung auf 42°C	Zugabe von 4µl 5x First Strand cDNA Buffer 2 µl 0,1M DTT 1 µl 10mM dNTP-Mix	2´ 42°C
Synthese	Zugabe von 1µl 200U/µl Superscript II	1h 42°C

Nach der Reaktion werden die Reaktionsgemische auf Eis gekühlt und Kondenswasser herunter zentrifugiert.

zu 2. Zweitstrangsynthese: Den Reaktionsgemischen werden folgende Komponenten zugesetzt und inkubiert wie angegeben.

Zweitstrangsynthese	91µl H_2O 30µl Second Strand Reaction Buffer 3µl dNTP-Mix 10mM/Base 1µl 10U/µl DNA Ligase 4µl 10U/µl DNA Polymerase I 1µl 2U/µl RNase H	2h 16°C
Auffüllen des 3´-Endes	2µl 5U/µl T4 DNA-Polymerase	5´ 16°C
Reaktionsstop	10µl 0,5M EDTA	

Anschließend erfolgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung der cDNA:

- Zugabe von 162µl Phenol:Cloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 zu den Reaktionsgemischen, kräftig mischen
- Transfer der Reaktionsgemische in Eppendorf-Tubes mit Phase-Lock-Gel, vorsichtig mischen und bei 12000g zentrifugieren
- wässrige Phase in neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 0,5 Volumen 7,5M Ammoniumazetat und 2,5 Volumen Ethanol (vorgekühlt auf -20°C) und 1µl 5mg/ml Glycogen, 20min zentrifugieren bei 12000g und Raumtemperatur
- Waschen des cDNA-Pellets mit 0,5ml 80% Ethanol (vorgekühlt auf -20°C), 5min bei

12000g und Raumtemperatur zentrifugieren

- Pellet lufttrocknen und in 12µl H_2O resuspendieren, Konzentration messen

zu 3. i*n-vitro*-Transkription: Außer cDNA und RNase-freiem H_2O sind alle in diesem Schritt benötigten Komponenten im BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit enthalten.

Synthese einer Biotin-markierten cRNA	1µg cDNA H_2O zu 11µl Endvolumen 2µl 10x HY Reaction Buffer 2µl 10x Biotin-Labeled Ribonucleotides 2µl10x DTT 2µl 10x RNase Inhibitor Mix 1µl 20x T7 RNA Polymerase	5h 37°C, aller 30 min kurz mischen

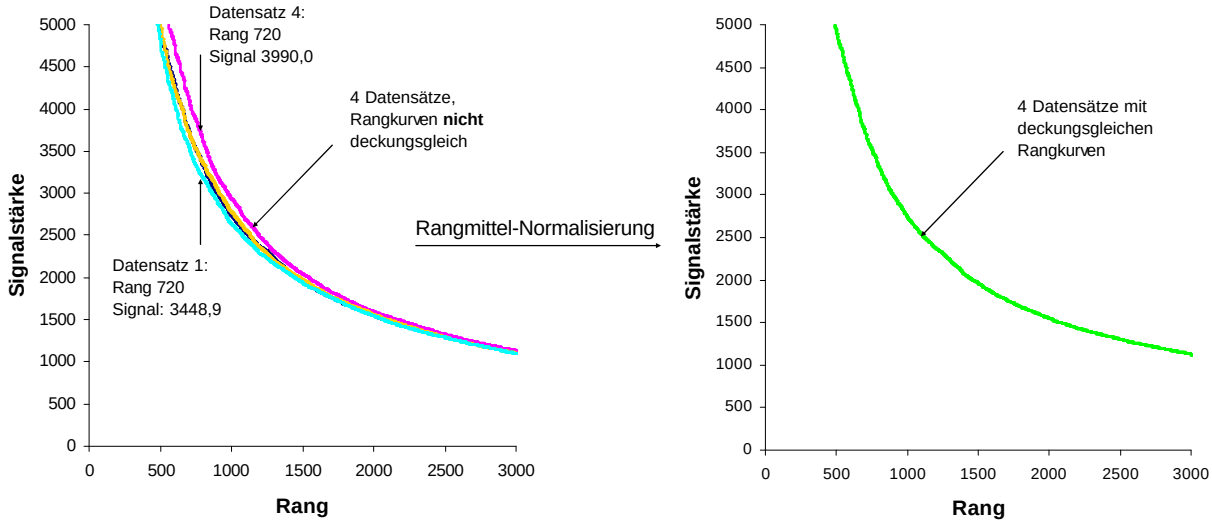
Die markierte cRNA wird mit dem RNeasy-Kit gereinigt.
Die gereinigte cRNA wurde ans IZKF nach Leipzig geschickt. Dort wurden alle weiteren Schritte gemäß AFFYMETRIX-Protokoll durchgeführt, weil dafür spezielle Geräte nötig sind. Über das weitere Vorgehen wird daher nur ein grober Überblick gegeben.

- cRNA wird fragmentiert
- Präparation der Hybridisierungslösung: neben Puffer und H2O werden eine Reihe Kontroll-RNAs zugesetzt
- Hybridisierung der cRNA auf dem Array: Für die 16-stündige Hybridisierung wird ein spezielles Gerät (*Fluidics Station*) benötigt, wo auch alle folgenden Wasch- und Färbeschritte durchgeführt werden. Anschließend wird das Array gewaschen.
- Zur Färbung wird mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat inkubiert. Anschließend wird das Array gewaschen.
- Scannen des Arrays mit einem speziellen Mikroarray-Chip-Lesegerät (Gene Chip Instrument System)

4.2.4.2. Normalisierung der Daten

Die Auswertung der Array-Rohdaten erfolgte mit dem Programm MAS 5.1. Dieses Programm liefert numerische Datensätze, die auf einen wählbaren Mittelwert (zum Beispiel 500) normalisiert sind. Darüber hinaus berechnet MAS 5.1 die statistische Sicherheit, mit der ein bestimmtes Transkript durch ein bestimmtes Probeset relativ zum unspezifischen Hintergrund detektiert wird. Diese statistische Sicherheit wird als *detection p-value* ausgedrückt, für den ein Grenzwert von 0,05 festgelegt wurde. D.h., nur wenn die Wahrscheinlichkeit, dass ein Transkript spezifisch detektiert wird, größer als 95% ist, wird das Transkript als sicher detektiert betrachtet. In diesem Fall erhält das Probeset einen „P-call“ (P = *present*). Andernfalls wird ein „A-call“ (A = *absent*) vergeben. P-call und A-call werden zusammen als *detection call* bezeichnet.

Bild 15: Das linke Diagramm zeigt einen Ausschnitt der Rangkurven von vier Datensätzen aus einer Serie. Die Kurven weichen teils deutlich voneinander ab, was für Rang 720 beispielhaft aufgeführt ist. Nach der Rangmittel-Normalisierung sind alle Rangkurven deckungsgleich.



Die von MAS 5.1 ausgegebenen Daten können bereits für vergleichende Auswertungen benutzt werden. Wir unterziehen die Datensätze jedoch noch einem weiteren Normalisierungsschritt. Die Vergleichbarkeit von Microarray-Datensätzen kann durch Rangintensitätsplots sichtbar gemacht werden [Kroll und Wolfl 2002]. Davon abgeleitet entwickelten Bolstad et al. [Bolstad et al. 2003] die Rangmittel-Normalisierung (*rank-mean-normalization*). Die Idee dieses Verfahrens ist folgende: Nicht nur die Mittelwerte, sondern auch alle Quantile der Rangkurven aller Datensätze, die verglichen werden sollen, müssen gleich sein. Eine Rangkurve erhält man, indem man in einer Datentabelle alle Signale eines

Datensatzes der Größe nach absteigend ordnet und anschließend in einem Liniendiagramm darstellt. Stellt man diese Kurven von mehreren Datensätzen in einem Diagramm dar, erkennt man, dass sie trotz vorangegangener Normalisierung in MAS 5.1 nicht deckungsgleich sind. Eine befriedigende Erklärung für diesen regelmäßig beobachteten Effekt existiert bis jetzt nicht. Die Normalisierungsvermutung besagt jedoch, dass man die Datensätze nur vergleichen kann, wenn die Rangkurven deckungsgleich sind. Daher wurden die Daten mit geeigneter Software (MATLAB) umgerechnet, so dass die Deckungsgleichheit hergestellt wurde (Bild 15). Ergebnis dieser Normalisierung ist außerdem, dass die Signalstärken aller in dieser Arbeit behandelten Datensätze im Median 100 und im Mittel 485 betragen.

4.2.4.3. Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Nach der Rangmittel-Normalisierung wurden alle Signalstärken, die kleiner als der Median (100) waren, gleich 100 gesetzt. Anschließend wurden die jeweils zu einem Experiment gehörenden Datensätze verglichen und nach differentiell exprimierten Genen durchsucht. Dazu wurde in *EXCEL* ein entsprechender Filter eingesetzt, der nach folgenden Kriterien sortiert:

- Innerhalb einer Serie muss das größte Signal eines Probesets mindestens 450 betragen.
- Innerhalb einer Serie muss das größte Signal eines Probesets sicher vom unspezifischen Hintergrund unterscheidbar sein (mit „P-call“ gekennzeichnet).
- Zwei Signale eines Probesets innerhalb einer Serie müssen sich mindestens um den Faktor 2 unterscheiden (SLR>1 oder <-1)*.

Durch die Anhebung aller Signalstärken, die kleiner als der Median (100) waren auf 100, wurde vermieden, dass starke Signalschwankungen im tendenziell unsicher detektierten Bereich niedriger Signalstärken zur Berechnung unrealistisch hoher SLRs* führen. Darüber hinaus hätten starke Schwankungen im unteren Signalbereich besonders beim *k-means*-Clustern die Ergebnisse verfälscht. (Allgemein gilt, dass die Detektion im Bereich niedriger Signalstärken tendenziell unsicherer ist als bei starken Signalen. Signalschwankungen bei insgesamt schwachen Signalen haben daher oft keine biologischen sondern methodische oder messtechnische Ursachen.) Bei den ganz oder teilweise duplizierten Experimenten (CD34+EPO und K562+Hämin) wurde der Datensatz von Spender 1 (CD34+EPO) bzw. die Serie 1 (K562+Hämin) zur Identifikation differentiell exprimierter Gene ausgewählt.

Mit einem zweiten Filter wurden die unbehandelten CD34+ mit unbehandelten K562 verglichen. Es wurde nach Genen gesucht, die in CD34+ wesentlich stärker exprimiert sind als in K562 und umgekehrt. Folgende Kriterien wurden festgelegt:

- Das größere Signal muss mindestens 450 betragen und „P-call“ haben.
- Das kleinere Signal muss „A-call“ haben.
- Die Signale müssen sich mindestens um den Faktor 8 (SLR>3 oder <-3)* unterscheiden.

* SLR: *dual signal log ratio*: Das Verhältnis zweier Signalstärken ausgedrückt als zur Basis 2 logarithmierter Quotient dieser Signalstärken

$$SLR = \log 2\left(\frac{Signal1}{Signal2}\right)$$

4.2.4.4. Erstellung von *Heatplots*

Zunächst wurden alle Rangmittel-normalisierten Signale der als differentiell exprimiert eingestuften Gene zur Basis 2 logarithmiert. Die logarithmierten Signale eines Probesets in einer Serie wurden dann um den Mittelwert aus allen logarithmierten Signalen dieses Probesets in dieser Serie zentriert, d.h. von allen Signalen wurde der Mittelwert subtrahiert. Dadurch entstanden positive und negative Werte. Die transformierten Signalwerte beider Serien eines Experiments wurden hintereinander in eine EXCEL-Datei kopiert. In der linken Spalte wurden die Probesets angeordnet und in den folgenden Spalten die Signalwerte in ihrer zeitlichen Reihenfolge. Jede Zeile enthält also die Signalwerte eines Probesets, wobei die komplette Serie 2 auf die komplette Serie 1 folgt. Anschließend wurden die Probesets hierarchisch geclustert mit dem „euklidischen Abstand“ als Abstandsmaß und der Vereinigungsregel „*average linkage*“.

4.2.5. cDNA-Synthese (zur Herstellung von cDNAs für die Quantitative RT-PCR)

Gemisch 1:

2µg Gesamt-RNA
2µl 100µM dT18VN
H_2O zu 10µl Gesamtvolumen

Gemisch 2:

5µl 5x AMV-Puffer
2µl dNTPs 10mM/Base
H_2O zu 15µl Gesamtvolumen
2µl AMV

- Inkubation Gemisch 1: 10´ 70°C
- Gemisch 1: 5´ auf Eiswasser
- Zugabe von Gemisch 2 zu Gemisch 1, Inkubation 1h bei 42°C
- Reaktion gestoppt durch Erhitzen 5´ bei 90°C
- Reinigung der cDNA mit Qiaquick-PCR-Purification-Kit nach Herstellerprotokoll

4.2.6. Quantitative RT-PCR

Die quantitativen RT-PCRs wurden mit dem LightCycler durchgeführt. Als Standards für die Eichkurven wurden PCR-Produkte verwendet, die mit dem jeweiligen Primerpaar und einem cDNA-Gemisch als Matrize hergestellt und mit dem Qiaquick-PCR-Purification-Kit aufgereinigt wurden. Die Standards wurden in 10er-Schritten verdünnt und in geeigneten Konzentrationen eingesetzt, so dass immer ein Bereich von 4 dekadischen Größenordnungen überspannt wurde. Die Sequenzen wurden so gewählt, dass Produkte in einer Größe von 100-150 bp entstehen, die 2 Exons verbinden. Die Bedingungen für PCR-Reaktionen sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Die Primer-Mixe enthalten beide Primer in einer Konzentration von je 50µM. Der Mix a+b besteht aus Komponenten, die im Kit (Light Cycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I) enthalten sind. Darin sind Puffer, Enzym, Nukleotide und SYBR-Green für die PCR enthalten. Wasser muss abhängig vom eingesetzten Volumen der cDNA und Primer zu einem Endvolumen von 20µl pro Reaktion zugegeben werden. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt, um ein größeres Volumen (5µl) einsetzen zu können, dass sich präziser pipettieren lässt.
Vor der PCR wurden die fertigen Reaktionsgemische 10 min bei 95°C erhitzt um das PCR-Enzym zu aktivieren. Nach der PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt, um die Reinheit des Produkts zu überprüfen. Darüber hinaus wurden bei allen Reaktionen mittels Agarose-Gelelektrophorese die Größe und Reinheit des Produkts überprüft.

Gen	**Primer** (in 5´-3´-Richtung)	**Mix**	**Programm**
AKTIN	GGGGAAATCGTGCGTGACAT-V GAACTTTGGGGGATGCTCGC-R	5µl cDNA, 1µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 17´´72°C
AXL:	CGTGGAGAACAGCGAGATTT-V TTCCCGCAGCTCTGTAAAAC-R	5µl cDNA, 0,4µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,6µl H2O	5´´95°C, 10´´63°C, 10´´72°C
BCL6	TGAGAAGCCCTATCCCTGTG-V CTGGCTTTTGTGACGGAAAT-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
BMP2K	CCCCTCAAGAGTTCTCACCA-V GCAATGGCCTCTTTATCAGC-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
CITED2	GTCCCCTCTATGTGCTGCTG-V CCATCATATGGTCTGCCATT-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´57°C, 6´´72°C
FOXO3A	GGGGAACTTCACTGGTGCTA-V GAGAGCAGATTTGGCAAAGG-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
IGF2R	GCTGACCACTTGCTGTAGGA-V GCAGCTGGATCTCTTCCATC-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
PBK	TTAAAGGCGATTTTGAAACAA-V ACACCATTCTCCTCCACAGC-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´57°C, 6´´72°C
PTPRR	TTGTGGATGCACTAAGCATTG-V CATACAGGCACAGAGCATGG-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
RPS13	ACG ACG TGA AGG AGC AGA TT AGG GCA GAG GCT GTA GAT GA	5µl cDNA, 0,4µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,6µl H2O	5´´95°C, 10´´63°C, 17´´72°C
SIAH2	TCAGGAACCTGGCTATGGAG-V GGTTTCTCCGTATGGTGCAG-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
SMAD3	GGAGGGCAGGCTTGGGGAAAATG-V GGGGAGGCTGCCGGTGGTGTAATA-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
TACSTD1	GCAGGGTCTAAAAGCTGGTG-V CCCTATGCATCTCACCCATC-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´57°C, 6´´72°C
TGFBR3	CTGGACACCCTAACCGTGAT-V GACTTGCTGCCTTCCTGCT-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´59°C, 6´´72°C
TPD52L1	TTTGAGGAGAGGGTTGAGACA-V AGCCTCCTGCCAAGCTCT-R	5µl cDNA, 0,5µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,5µl H2O	5´´95°C, 10´´63°C, 10´´72°C
ZNF239	TGATGCTGGGCAACTACAGA-V TCCAAAACTAGCCAGGAGGA-R	5µl cDNA, 0,36µl Primer-Mix 4µl Mix a+b, 10,64µl H2O	5´´95°C, 10´´57°C, 6´´72°C

4.2.7. Phosphorylierungsspezifisches Antikörper-Array (Array-Tube)

4.2.7.1. Proteinextraktion, Biotinylierung und Inkubation des Arrays

Zur Präparation der Proteinextrakte wurden je 10^6 Zellen abzentrifugiert, dreimal mit PBS gewaschen und 5 Minuten in 500µl eiskalten Lysepuffer lysiert. Anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert, die Proteinkonzentration bestimmt (Bradford) sowie die Extrakte aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Der Aufbau des Arrays ist in Bild 16 dargestellt.

Biotinylierung des Proteinextrakts:

10µg Protein
PBS-T zu 100µl Gesamtvolumen
0,5µl Biotin-NHS-Ester (100µg/µl in DMSO)
1h bei 35°C schütteln
Reaktion mit 11µl 10% BSA stoppen

Protein-Sättigung des Arrays:

250µl Blockpuffer in Array-Tube
1h bei 35°C schütteln
Blockpuffer absaugen, 1 x 5´ mit PBS waschen

Inkubation:

biotinylierter Proteinextrakt in Array-Tube, 2h bei 35°C schütteln
2 x 5´ mit PBS-T waschen
100µl Streptavidin-HRP-Konjugat (1:10000 in PBS-T) zugeben, 30´ bei 35°C schütteln
2 x 5´ mit PBS-T waschen

Entwicklung:

Zugabe von 100µl TMB-Lösung (TrueBlue), Array-Tube sofort in AT-Reader und Aufnahme der Bildserie beginnen

Lysepuffer:

20mM HEPES pH 7,4
150mm NaCl
1% Triton X-100
5µg/ml Leupeptin
10mM EDTA
2mM EGTA
1mM DTT
1mM PMSF
50mM NaF
2mM Natriumorthovanadat

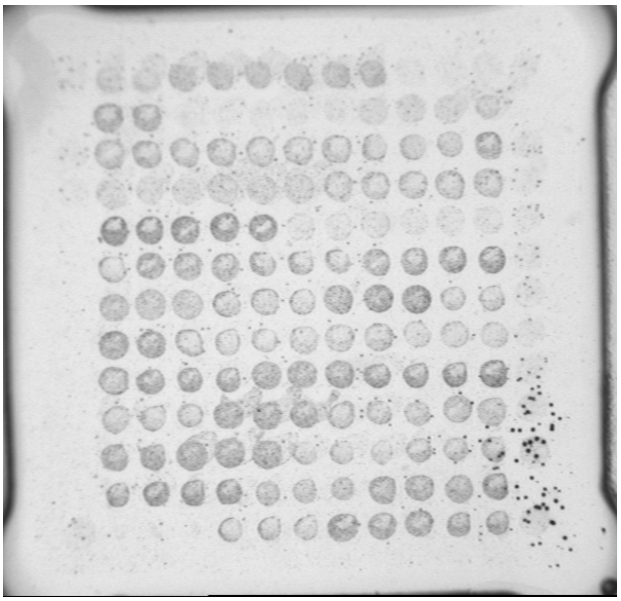
PBS-T:

PBS + 0,2% Tween 20

Blockpuffer:

PBS-T + 5% Milchpulver (5´ bei 95°C erhitzt, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert)

Bild 16 zeigt links oben ein Originalbild eines Array-Tubes. Jedem Antikörper bzw. jeder Kontrolle ist eine Nummer zugeordnet, wie in der Tabelle im rechten Teil der Graphik dargestellt. Links unten befindet sich eine schematische Darstellung des Arrays. Alle Antikörper und Kontrollen wurden in PBS mit 2% Milchpulver und 20mM Trehalose verdünnt. Jeder Antikörper ist in einer Stammkonzentration (bevorzugt 1-2 µg/µl) und in einer 1:5-Verdünnung als Triplikat abgelegt.



49	45	45	46	46	46	47	47	47	48	48	48	49
	41	41	42	42	43	43	43	44	44	44	45	
49	37	38	38	38	39	39	39	40	40	40	41	49
49	34	34	34	35	35	35	36	36	36	37	37	49
	30	30	31	31	31	32	32	32	33	33	33	49
	26	27	27	27	28	28	28	29	29	29	30	49
	23	23	23	24	24	24	25	25	25	26	26	49
	19	19	20	20	20	21	21	21	22	22	22	49
	15	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	49
	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	49
	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	49
	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	
49	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	49

SPOT ID	NAME	Herkunft	Konz. (µg/µl)
1	1xPBS, 20 mM Trehalose		
2	1:5 verd. Phpspho-Erk5		
3	Phpspho-Erk5	polyklonal	2.0
4	1:5 verd.p38 MAP Kinase SF11		
5	p38 MAP Kinase SF11	monoklonal	1.7
6	1:5 verd. phospho-p38		
7	phospho-p38	monoklonal	2.0
8	1:5 verd. Phospho-p44/42 MAP Kinase		
9	Phospho-p44/42 MAP Kinase	monoklonal	1.9
10	1:5 verd. Phospho-p70 S6 Kinase		
11	Phospho-p70 S6 Kinase	monoklonal	0.8
12	1:5 verd. Phospho-NF-kappaB		
13	Phospho-NF-kappaB	monoklonal	1.1
14	1:5 verd. Phospho-p53		
15	Phospho-p53	monoklonal	2.0
16	1:5 verd. Phospho-GSK3beta		
17	Phospho-GSK3beta	polyklonal	0.8
18	1:5 verd. Phospho-SAPK/JNK		
19	Phospho-SAPK/JNK	monoklonal	0.8
20	1:5 verd. Phospho-Akt 4E2		
21	Phospho-Akt 4E2	monoklonal	1.0
22	1:5 Phospho-Tyrosin		
23	Phospho-Tyrosin	monoklonal	1.8
24	1:5 verd. Phospho Stat3 6E4		
25	Phospho Stat3 6E4	monoklonal	1.0
26	1:5 verd. Phospho Stat5 14H2		
27	Phospho Stat5 14H2	monoklonal	0.8
28	1:5 verd. Retinoblastoma(Rb) Ab6		
29	Retinoblastoma(Rb) Ab6	polyklonal	1.0
30	1:5 verd. Catenin-beta Ab2		
31	Catenin-beta Ab2	polyklonal	1.0
32	1:5 verd. c-Myc		
33	c-Myc	monoklonal	2.0
34	1:5 verd. p-Smad1		
35	p-Smad1	polyklonal	2.0
36	1:5 verd. p-Smad2/3		
37	p-Smad2/3	polyklonal	0.6
38	1:5 verd. C-Jun (H-79)X		
39	C-Jun (H-79)X	polyklonal	2.0
40	1:5 verd. Anti-Chicken IgG		
41	Anti-Chicken IgG	polyklonal	1.0
42	MBP ohne Biotin 1:100		
43	MBP ohne Biotin 1:10		
44	MBP ohne Biotin		4.0
45	MBP biotiniliert 1:100		
46	MBP biotiniliert 1:10		
47	MBP biotiniliert		5.5
48	2% Milchpulver in 1xPBS 20mM Trehalose		
49	Biotin-Marke		

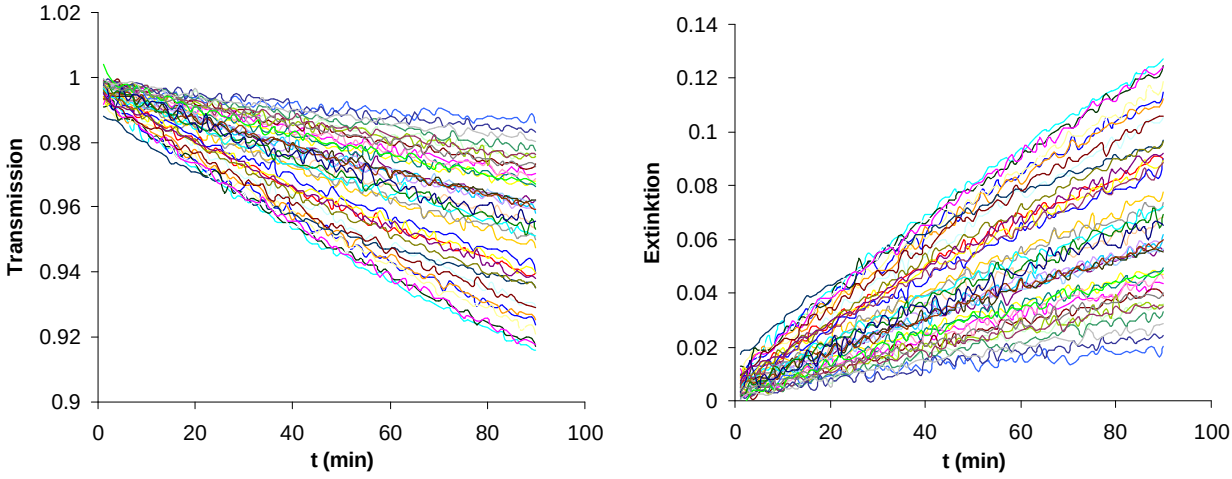
4.2.7.2. Datenakquisition und Auswertung

Nach der Zugabe des TMB bringt man das Array-Tube sofort in den AT-Reader, der die Niederschlagsbildung über die Zeit verfolgt. Die Akquisition der Daten erfolgt, indem das Array in wählbaren Zeitabständen fotografiert wird und die Transmission des Arrays an allen Spotpositionen gemessen wird. Der Verlauf der Transmissionen und Extinktionen an den einzelnen Spots ist in Bild 17 dargestellt. Das Programm ICONOCLUST fasst die Triplikate zusammen und stellt den Verlauf der Transmission während der Farbentwicklung dar. Durch

diese Darstellung der ganzen Bildserie wird es ermöglicht, ein Bild von einem geeigneten Zeitpunkt für die eigentliche Datenanalyse auszuwählen. Dieser Zeitpunkt ist dadurch gekennzeichnet, dass bei insgesamt möglichst minimaler Transmission noch keine Kurve Sättigungseffekte zeigt. Sättigungseffekt bedeutet, dass sich die Farbstoffbildung verlangsamt und nicht mehr linear mit der Enzymmenge verläuft.

Anhand des ausgewählten Bildes berechnet die Software die Intensitäten aller Antikörper- und Kontroll-Triplikate.

Bild 17 zeigt im linken Diagramm anhand eines ausgewählten Experiments den Verlauf der Transmission an allen Spotpositionen. (Die Transmission ist definiert als $T=(I/I_0)$; I_0 = einfallendes Licht, I = transmittiertes Licht). Die Kurven verlaufen nicht linear, sondern weisen eine leichte Wölbung nach unten auf, was auf einen logarithmischen Zusammenhang hindeutet. Berechnet man die Extinktion über die Beziehung $E=-\log(T)=\log(I_0/I)$, kommt man zu linearen Anstiegen wie im rechten Diagramm dargestellt. In diesem Bereich ist anzunehmen, dass die Zunahme des Farbstoffs linear mit der Zeit erfolgt und proportional zur Menge des gebundenen HRP-Enzyms ist. Die hier dargestellten Kurven repräsentieren nur den linearen Bereich der Farbentwicklung. Später kommt es zu einer Abflachung der Extinktionskurven in folge von Sättigungseffekten. Gleichzeitig nimmt dann die Hintergrundfärbung überproportional zu. Zur Auswertung sollte daher ein Bild herangezogen werden, welches möglichst am Ende des linearen Bereichs aufgenommen wurde.



4.2.7.3. Normalisierung der Protein-Array-Daten

Die Triplikate der Antikörperspots wurden zu einem Wert vereinigt, indem aus den 3 Einzelwerten der Mittelwert berechnet wurde. Dann wurde die Summe aller Triplikatmittelwerte der Antikörper gebildet. Die Kontrollen, einschließlich des Rabbit-anti-Chicken-Antikörpers, wurden von dieser Berechnung ausgeklammert. Anschließend wurde der prozentuale Beitrag jedes Antikörper-Triplikats an der Summe aus allen Antikörper-Triplikate berechnet.

4.2.8. SDS-PAGE und Immunoblotting

Die Kombination dieser beiden Methoden dient der Trennung und dem Nachweis von Proteinen bzw. Modifikationen an Proteinen wie zum Beispiel Phosphorylierung.
Es wurde ein diskontinuierliches Gelsystem im Midi-Format (10cm x 6,7cm) verwendet, d.h. über dem bei pH 8,8 gepufferten 10%igen Trenngel befindet sich ein bei pH 6,8 gepuffertes 5%iges Sammelgel. Zur Probenvorbereitung wurden je $5*10^5$ Zellen in 100µl Laemmli-Puffer bei 95°C denaturiert. Davon wurden 25µl aufgetragen, anschließend erfolgte die elektrophoretische Trennung bei 100V. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in einem Tank-Transfersystem auf eine Nitrozellulosemembran 1,5h bei 350mA geblottet. Die Blots wurden in TBS-T mit 5% Milchpulver mit Protein gesättigt und mit TBS-T gespült. Die Blots wurden über Nacht bei 4°C mit den phosphospezifischen Primärantikörpern inkubiert, die 1:1000 in TBS-T mit 5% BSA verdünnt wurden. Anschließend wurde dreimal je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern, die 1:2000 in TBS-T mit 5% Milchpulver verdünnt waren, erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen (wie oben) wurden die Blots unter Verwendung des ECL-Western-Blotting-Detection-Kits im LAS2000 fotografiert. Danach wurden die Antikörperkomplexe durch eine zweistündige Inkubation in *Reprobing*-Puffer abgelöst. Die Blots wurden wieder mit Protein abgesättigt, mit Sekundärantikörper inkubiert und fotografiert. Damit wurde nachgewiesen, dass der Primärantikörper vollständig entfernt wurde. Im folgendem wurde mit dem nicht phosphorylierungsspezifischen Antikörper (1:1000 in TBS-T mit 5% BSA verdünnt) die Gesamtmenge des jeweiligen Proteins bestimmt. Zuletzt wurde ohne erneutes Ablösen der Antikörper noch Aktin nachgewiesen.

4 x Sammelgelpuffer:

0,5M Tris/HCl pH 6,8
0,4% SDS

4 x Trenngelpuffer:

1,5M Tris/HCl pH 8,8
0,4% SDS

Laufpuffer:

33mM Tris
190mM Glycin
0,1% SDS

Laemmli-Puffer:

1 x Sammelgelpuffer
3%SDS
3% Mercaptoethanol
20% Glycerol
0,02% Bromphenolblau

Transferpuffer:

3g Tris
14,4g Glycin
H2O auf 800ml auffüllen
200ml Methanol

TBS-T:

20mM Tris pH 7,5
150mM NaCl
0,1% Tween 20

Reprobing-Puffer:

20mM Glycin/HCl pH 2,5

5. Literatur

Addya, S., M. A. Keller, K. Delgrosso, C. M. Ponte, R. Vadigepalli, G. E. Gonye, and S. Surrey. 2004. Erythroid-induced commitment of K562 cells results in clusters of differentially expressed genes enriched for specific transcription regulatory elements. *Physiol Genomics* 19: 117-30.

Akashi, K., X. He, J. Chen, H. Iwasaki, C. Niu, B. Steenhard, J. Zhang, J. Haug, and L. Li. 2003. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 101: 383-9.

Albagli-Curiel, O. 2003. Ambivalent role of BCL6 in cell survival and transformation. *Oncogene* 22: 507-16.

Allan, N. C., S. M. Richards, and P. C. Shepherd. 1995. UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia. *Lancet* 345: 1392-7.

Arranz, V., C. Dreuillet, P. Crisanti, J. Tillit, M. Kress, and M. Ernoult-Lange. 2001. The zinc finger transcription factor, MOK2, negatively modulates expression of the interphotoreceptor retinoid-binding protein gene, IRBP. *J Biol Chem* 276: 11963-9.

Augustine, K. A., R. M. Rossi, G. Van, J. Housman, K. Stark, D. Danilenko, B. Varnum, and E. Medlock. 1999. Noninsulin-dependent diabetes mellitus occurs in mice ectopically expressing the human Axl tyrosine kinase receptor. *J Cell Physiol* 181: 433-47.

Bakker, W. J., M. Blazquez-Domingo, A. Kolbus, J. Besooyen, P. Steinlein, H. Beug, P. J. Coffer, B. Lowenberg, M. von Lindern, and T. B. van Dijk. 2004. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* 164: 175-84.

Barbera, J. P., T. A. Rodriguez, N. D. Greene, W. J. Weninger, A. Simeone, A. J. Copp, R. S. Beddington, and S. Dunwoodie. 2002. Folic acid prevents exencephaly in Cited2 deficient mice. *Hum Mol Genet* 11: 283-93.

Barth-Baus, D., C. A. Stratton, L. Parrott, H. Myerson, O. Meyuhas, D. J. Templeton, G. E. Landreth, and J. O. Hensold. 2002. S6 phosphorylation-independent pathways regulate translation of 5'-terminal oligopyrimidine tract-containing mRNAs in differentiating hematopoietic cells. *Nucleic Acids Res* 30: 1919-28.

Bazzoni, G., N. Carlesso, J. D. Griffin, and M. E. Hemler. 1996. Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. *J Clin Invest* 98: 521-8.

Ben-Neriah, Y., G. Q. Daley, A. M. Mes-Masson, O. N. Witte, and D. Baltimore. 1986. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233: 212-4.

Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. Gralnick, C. Sultan, and C. Cox. 1994. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol* 87: 746-54.

Bessis. 1973. *Living Blood Cells and their Ultrastructure*.

Bhatia, M., D. Bonnet, B. Murdoch, O. I. Gan, and J. E. Dick. 1998. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4: 1038-45.

Bhatia, M., J. C. Wang, U. Kapp, D. Bonnet, and J. E. Dick. 1997. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5320-5.

Bhattacharya, S., C. L. Michels, M. K. Leung, Z. P. Arany, A. L. Kung, and D. M. Livingston. 1999. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13: 64-75.

Bigas, A., D. I. Martin, and L. A. Milner. 1998. Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* 18: 2324-33.

Blanchard, F., L. Duplomb, S. Raher, P. Vusio, B. Hoflack, Y. Jacques, and A. Godard. 1999. Mannose 6-Phosphate/Insulin-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction. *J Biol Chem* 274: 24685-93.

Blanco-Aparicio, C., J. Torres, and R. Pulido. 1999. A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* 147: 1129-36.

Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, M. Astrand, and T. P. Speed. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19: 185-93.

Bonanou-Tzedaki, S. A., Arnstein, H. R. V. 1990. Macromolecular Synthesis and Degradation during Terminal Erythroid Cell Development in J. R. Harris, ed. *Erythroid Cells*. Plenum Press, New York.

Bonanou-Tzedaki, S. A., M. Sohi, and H. R. Arnstein. 1981. Regulation of erythroid cell differentiation by haemin. *Cell Differ* 10: 267-79.

Bos, R., P. J. van Diest, P. van der Groep, A. E. Greijer, M. A. Hermsen, I. Heijnen, G. A. Meijer, J. P. Baak, H. M. Pinedo, E. van der Wall, and A. Shvarts. 2003. Protein expression of B-cell lymphoma gene 6 (BCL-6) in invasive breast cancer is associated with cyclin D1 and hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Oncogene* 22: 8948-51.

Boutros, R., and J. A. Byrne. 2005. D53 (TPD52L1) is a cell cycle-regulated protein maximally expressed at the G2-M transition in breast cancer cells. *Exp Cell Res* 310: 152-65.

Brummendorf, T. H., T. L. Holyoake, N. Rufer, M. J. Barnett, M. Schulzer, C. J. Eaves, A. C. Eaves, and P. M. Lansdorp. 2000. Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 95: 1883-90.

Buchdunger, E., C. L. Cioffi, N. Law, D. Stover, S. Ohno-Jones, B. J. Druker, and N. B. Lydon. 2000. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 139-45.

Burchert, A., S. Wolfl, M. Schmidt, C. Brendel, B. Denecke, D. Cai, L. Odyvanova, T. Lahaye, M. C. Muller, T. Berg, H. Gschaidmeier, B. Wittig, R. Hehlmann, A. Hochhaus, and A. Neubauer. 2003. Interferon-alpha, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia. *Blood* 101: 259-64.

Castilla, L. H., L. Garrett, N. Adya, D. Orlic, A. Dutra, S. Anderson, J. Owens, M. Eckhaus, D. Bodine, and P. P. Liu. 1999. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 23: 144-6.

Charnay, P., and T. Maniatis. 1983. Transcriptional regulation of globin gene expression in the human erythroid cell line K562. *Science* 220: 1281-3.

Cheifetz, S., H. Hernandez, M. Laiho, P. ten Dijke, K. K. Iwata, and J. Massague. 1990. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 265: 20533-8.

Chiba, S., K. Takeshita, Y. Imai, K. Kumano, M. Kurokawa, S. Masuda, K. Shimizu, S. Nakamura, F. H. Ruddle, and H. Hirai. 2003. Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15577-82.

Cioe, L., A. McNab, H. R. Hubbell, P. Meo, P. Curtis, and G. Rovera. 1981. Differential expression of the globin genes in human leukemia K562(S) cells induced to differentiate by hemin or butyric acid. *Cancer Res* 41: 237-43.

Clark, R. E., J. Grzybowski, C. M. Broughton, N. T. Pender, D. G. Spiller, C. G. Brammer, R. V. Giles, and D. M. Tidd. 1999. Clinical use of streptolysin-O to facilitate antisense oligodeoxyribonucleotide delivery for purging autografts in chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 23: 1303-8.

Clarkson, B. D., A. Strife, D. Wisniewski, C. Lambek, and N. Carpino. 1997. New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia. *Leukemia* 11: 1404-28.

Dai, C. H., S. B. Krantz, and K. M. Zsebo. 1991. Human burst-forming units-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood* 78: 2493-7.

Deutsch, E., A. Dugray, B. AbdulKarim, E. Marangoni, L. Maggiorella, S. Vaganay, R. M'Kacher, S. D. Rasy, F. Eschwege, W. Vainchenker, A. G. Turhan, and J. Bourhis. 2001. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 97: 2084-90.

Dolznig, H., F. Boulme, K. Stangl, E. M. Deiner, W. Mikulits, H. Beug, and E. W. Mullner. 2001. Establishment of normal, terminally differentiating mouse erythroid progenitors: molecular characterization by cDNA arrays. *Faseb J* 15: 1442-4.

Dowding, C. R., M. Y. Gordon, and J. M. Goldman. 1986. Primitive progenitor cells in the blood of patients with chronic granulocytic leukemia. *Int J Cell Cloning* 4: 331-40.

Druker, B. J., and N. B. Lydon. 2000. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105: 3-7.

Druker, B. J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, and N. B. Lydon. 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2: 561-6.

Eickelberg, O., M. Centrella, M. Reiss, M. Kashgarian, and R. G. Wells. 2002. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 277: 823-9.

Fefer, A., M. A. Cheever, E. D. Thomas, C. Boyd, R. Ramberg, H. Glucksberg, C. D. Buckner, and R. Storb. 1979. Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *N Engl J Med* 300: 333-7.

Fernandez de Mattos, S., A. Essafi, I. Soeiro, A. M. Pietersen, K. U. Birkenkamp, C. S. Edwards, A. Martino, B. H. Nelson, J. M. Francis, M. C. Jones, J. J. Brosens, P. J. Coffer, and E. W. Lam. 2004. FoxO3a and

BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 24: 10058-71.

Ferrajoli, A., M. Fizzotti, A. M. Liberati, and F. Grignani. 1996. Chronic myelogenous leukemia: an update on the biological findings and therapeutic approaches. *Crit Rev Oncol Hematol* 22: 151-74.

Forsberg, E. C., S. S. Prohaska, S. Katzman, G. C. Heffner, J. M. Stuart, and I. L. Weissman. 2005. Differential Expression of Novel Potential Regulators in Hematopoietic Stem Cells. *PLoS Genet* 1: e28.

Fruehauf, S., K. Srbic, R. Seggewiss, J. Topaly, and A. D. Ho. 2002. Functional characterization of podia formation in normal and malignant hematopoietic cells. *J Leukoc Biol* 71: 425-32.

Geier, S. J., P. A. Algate, K. Carlberg, D. Flowers, C. Friedman, B. Trask, and L. R. Rohrschneider. 1997. The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood. *Blood* 89: 1876-85.

genecards. www.genecards.org.

Gewirtz, A. M. 1999. Myb targeted therapeutics for the treatment of human malignancies. *Oncogene* 18: 3056-62.

Ghadially, F. N. 1979. Haemorrhage and haemosiderin. *J. Submicrosc. Cytol.* 11: 121–129.

Gibellini, D., A. Bassini, M. C. Re, C. Ponti, S. Miscia, A. Gonelli, M. La Placa, and G. Zauli. 2000. Stroma-derived factor 1alpha induces a selective inhibition of human erythroid development via the functional upregulation of Fas/CD95 ligand. *Br J Haematol* 111: 432-40.

Gishizky, M. L., D. Cortez, and A. M. Pendergast. 1995. Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10889-93.

Gmeiner, W. H., A. Skradis, R. T. Pon, and J. Liu. 1998. Cytarabine-induced destabilization of a model Okazaki fragment. *Nucleic Acids Res* 26: 2359-65.

Godar, S., V. Horejsi, U. H. Weidle, B. R. Binder, C. Hansmann, and H. Stockinger. 1999. M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1. *Eur J Immunol* 29: 1004-13.

Gordon, M. Y., and J. M. Goldman. 1996. Cellular and molecular mechanisms in chronic myeloid leukaemia: biology and treatment. *Br J Haematol* 95: 10-20.

Goruppi, S., E. Ruaro, B. Varnum, and C. Schneider. 1997. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 17: 4442-53.

Graf, T. 2002. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 99: 3089-101.

Greenhalf, W., J. Lee, and B. Chaudhuri. 1999. A selection system for human apoptosis inhibitors using yeast. *Yeast* 15: 1307-21.

Haase, D., Alves, F., Gassmann, W. 2003. Myelodysplastische Syndrome in D. Ganten, Ruckpaul, K., ed. *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. Springer, Berlin.

Hagemeijer, A. 1987. Chromosome abnormalities in CML. *Baillieres Clin Haematol* 1: 963-81.

Haluzik, M., M. Markova, J. J. Slaby, J. Jiskra, J. Krizova, and T. Hass. 2002. The changes of serum leptin and soluble leptin receptor levels in patients undergoing mobilization of peripheral blood stem cells before autologous stem cells transplantation. *Endocr Res* 28: 189-97.

Hardy, K., L. Mansfield, A. Mackay, S. Benvenuti, S. Ismail, P. Arora, M. J. O'Hare, and P. S. Jat. 2005. Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. *Mol Biol Cell* 16: 943-53.

Harris. 1990. Erythroid Cells.

Hochhaus, A., Hehlmann, R. 2001. *Chronisch myeloische Leukämie*. UNI-MED-Verlag AG, Bremen.

Holyoake, T., X. Jiang, C. Eaves, and A. Eaves. 1999. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* 94: 2056-64.

Hu, M., D. Krause, M. Greaves, S. Sharkis, M. Dexter, C. Heyworth, and T. Enver. 1997. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* 11: 774-85.

Hu, M. C., D. F. Lee, W. Xia, L. S. Golfman, F. Ou-Yang, J. Y. Yang, Y. Zou, S. Bao, N. Hanada, H. Saso, R. Kobayashi, and M. C. Hung. 2004. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117: 225-37.

Ikebuchi, K., G. G. Wong, S. C. Clark, J. N. Ihle, Y. Hirai, and M. Ogawa. 1987. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9035-9.

Kearns, A. E., M. M. Donohue, B. Sanyal, and M. B. Demay. 2001. Cloning and characterization of a novel protein kinase that impairs osteoblast differentiation in vitro. *J Biol Chem* 276: 42213-8.

Kiess, W., G. D. Blickenstaff, M. M. Sklar, C. L. Thomas, S. P. Nissley, and G. G. Sahagian. 1988. Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263: 9339-44.

Kipreos, E. T., and J. Y. Wang. 1990. Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science* 248: 217-20.

Kollet, O., S. Shivtiel, Y. Q. Chen, J. Suriawinata, S. N. Thung, M. D. Dabeva, J. Kahn, A. Spiegel, A. Dar, S. Samira, P. Goichberg, A. Kalinkovich, F. Arenzana-Seisdedos, A. Nagler, I. Hardan, M. Revel, D. A. Shafritz, and T. Lapidot. 2003. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112: 160-9.

Kondo, M., D. C. Scherer, T. Miyamoto, A. G. King, K. Akashi, K. Sugamura, and I. L. Weissman. 2000. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* 407: 383-6.

Kornfeld, S. 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61: 307-30.

Koury, M. J., and M. C. Bondurant. 1988. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J Cell Physiol* 137: 65-74.

Koury, M. J., S. T. Sawyer, and S. J. Brandt. 2002. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 9: 93-100.

Kramer, A., S. Horner, A. Willer, S. Fruehauf, A. Hochhaus, M. Hallek, and R. Hehlmann. 1999. Adhesion to fibronectin stimulates proliferation of wild-type and bcr/abl-transfected murine hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2087-92.

Kramer, A., H. Loffler, J. Bergmann, A. Hochhaus, and R. Hehlmann. 2001. Proliferating status of peripheral blood progenitor cells from patients with BCR/ABL-positive chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 15: 62-8.

Krishnakumar, S., A. Mohan, K. Mallikarjuna, N. Venkatesan, J. Biswas, M. P. Shanmugam, and L. Ren-Heidenreich. 2004. EpCAM expression in retinoblastoma: a novel molecular target for therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 4247-50.

Kroll, T. C., and S. Wolfl. 2002. Ranking: a closer look on globalisation methods for normalisation of gene expression arrays. *Nucleic Acids Res* 30: e50.

Kruh, J. 1982. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* 42: 65-82.

Krystal, G., V. Lam, W. Dragowska, C. Takahashi, J. Appel, A. Gontier, A. Jenkins, H. Lam, L. Quon, and P. Lansdorp. 1994. Transforming growth factor beta 1 is an inducer of erythroid differentiation. *J Exp Med* 180: 851-60.

Kurosu, T., T. Fukuda, T. Miki, and O. Miura. 2003. BCL6 overexpression prevents increase in reactive oxygen species and inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic reagents in B-cell lymphoma cells. *Oncogene* 22: 4459-68.

Leary, J. F., B. M. Ohlsson-Wilhelm, R. Giuliano, S. LaBella, B. Farley, and P. T. Rowley. 1987. Multipotent human hematopoietic cell line K562: lineage-specific constitutive and inducible antigens. *Leuk Res* 11: 807-15.

Lewis, J. M., and M. A. Schwartz. 1998. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem* 273: 14225-30.

Litvinov, S. V., M. P. Velders, H. A. Bakker, G. J. Fleuren, and S. O. Warnaar. 1994. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125: 437-46.

Lowenhaupt, K., and J. B. Lingrel. 1979. Synthesis and turnover of globin mRNA in murine erythroleukemia cells induced with hemin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5173-7.

Lozzio, C. B., and B. B. Lozzio. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-34.

Luisi-DeLuca, C., T. Mitchell, D. Spriggs, and D. W. Kufe. 1984. Induction of terminal differentiation in human K562 erythroleukemia cells by arabinofuranosylcytosine. *J Clin Invest* 74: 821-7.

Luo, J. M., H. Yoshida, S. Komura, N. Ohishi, L. Pan, K. Shigeno, I. Hanamura, K. Miura, S. Iida, R. Ueda, T. Naoe, Y. Akao, R. Ohno, and K. Ohnishi. 2003. Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17: 1-8.

Mager, D., and A. Bernstein. 1979. The role of heme in the regulation of the late program of Friend cell erythroid differentiation. *J Cell Physiol* 100: 467-79.

Majka, M., A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak, K. Ehrenman, Z. Pietrzkowski, M. A. Kowalska, A. M. Gewirtz, S. G. Emerson, and M. Z. Ratajczak. 2001. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97: 3075-85.

McWhirter, J. R., and J. Y. Wang. 1991. Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol Cell Biol* 11: 1553-65.

Metcalf, D. 1998. Lineage commitment in the progeny of murine hematopoietic preprogenitor cells: influence of thrombopoietin and interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6408-12.

Nakamura, F., Y. Nakamura, K. Maki, Y. Sato, and K. Mitani. 2005. Cloning and characterization of the novel chimeric gene TEL/PTPRR in acute myelogenous leukemia with inv(12)(p13q13). *Cancer Res* 65: 6612-21.

Nakayama, K., I. J. Frew, M. Hagensen, M. Skals, H. Habelhah, A. Bhoumik, T. Kadoya, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P. B. Frappell, D. D. Bowtell, and Z. Ronai. 2004. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 117: 941-52.

Nandi, A., M. Tidwell, J. Karp, and A. P. Rapoport. 2004. Protein expression of PDZ-binding kinase is up-regulated in hematologic malignancies and strongly down-regulated during terminal differentiation of HL-60 leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 32: 240-5.

Ney, P. A., N. C. Andrews, S. M. Jane, B. Safer, M. E. Purucker, S. Weremowicz, C. C. Morton, S. C. Goff, S. H. Orkin, and A. W. Nienhuis. 1993. Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner. *Mol Cell Biol* 13: 5604-12.

Ney, P. A., B. P. Sorrentino, C. H. Lowrey, and A. W. Nienhuis. 1990. Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucleic Acids Res* 18: 6011-7.

O'Bryan, J. P., R. A. Frye, P. C. Cogswell, A. Neubauer, B. Kitch, C. Prokop, R. Espinosa, 3rd, M. M. Le Beau, H. S. Earp, and E. T. Liu. 1991. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 11: 5016-31.

Pessino, A., M. Passalacqua, B. Sparatore, M. Patrone, E. Melloni, and S. Pontremoli. 1995. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of delta protein kinase C expression accelerates induced differentiation of murine erythroleukaemia cells. *Biochem J* 312 (Pt 2): 549-54.

Quesenberry, P. J. 1986. Synergistic hematopoietic growth factors. *Int J Cell Cloning* 4: 3-15.

Rapoport, S. M., and T. Schewe. 1986. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim Biophys Acta* 864: 471-95.

Reiter, A., S. B. Marley, A. Hochhaus, J. Sohal, P. Raanani, R. Hehlmann, M. Y. Gordon, J. M. Goldman, and N. C. Cross. 1998. BCR-ABL-positive progenitors in chronic myeloid leukaemia patients in complete cytogenetic remission after treatment with interferon-alpha. *Br J Haematol* 102: 1271-8.

Rich, I. N. 1998. Homeobox genes and hematopoiesis: an emerging picture for genomic therapy. *J Hematother* 7: 515-20.

Richardson, J. M., A. O. Morla, and J. Y. Wang. 1987. Reduction in protein tyrosine phosphorylation during differentiation of human leukemia cell line K-562. *Cancer Res* 47: 4066-70.

Riethmuller, G., E. Holz, G. Schlimok, W. Schmiegel, R. Raab, K. Hoffken, R. Gruber, I. Funke, H. Pichlmaier, H. Hirche, P. Buggisch, J. Witte, and R. Pichlmayr. 1998. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 16: 1788-94.

Ross, J., and D. Sautner. 1976. Induction of globin mRNA accumulation by hemin in cultured erythroleukemic cells. *Cell* 8: 513-20.

Rutherford, T. R., J. B. Clegg, and D. J. Weatherall. 1979. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature* 280: 164-5.

Sattler, M., S. Verma, C. H. Byrne, G. Shrikhande, T. Winkler, P. A. Algate, L. R. Rohrschneider, and J. D. Griffin. 1999. BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 19: 7473-80.

Sawyers, C. L., J. McLaughlin, and O. N. Witte. 1995. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 181: 307-13.

Scalia, P., E. Heart, L. Comai, R. Vigneri, and C. K. Sung. 2001. Regulation of the Akt/Glycogen synthase kinase-3 axis by insulin-like growth factor-II via activation of the human insulin receptor isoform-A. *J Cell Biochem* 82: 610-8.

Schwartz, G. N., M. K. Warren, K. Sakano, J. M. Szabo, S. W. Kessler, A. Pashapour, R. E. Gress, and J. F. Perdue. 1996. Comparative effects of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-II mutants specific for IGF-II/CIM6-P or IGF-I receptors on in vitro hematopoiesis. *Stem Cells* 14: 337-50.

Siegel, J., Y. Li, and P. Whyte. 1999. SHIP-mediated inhibition of K562 erythroid differentiation requires an intact catalytic domain and Shc binding site. *Oncogene* 18: 7135-48.

Simpson, C. F., and J. M. Kling. 1967. The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J Cell Biol* 35: 237-45.

Skutelsky, E., and D. Danon. 1967. An electron microscopic study of nuclear elimination from the late erythroblast. *J Cell Biol* 33: 625-35.

Song, B., J. W. Tang, B. Wang, X. N. Cui, C. H. Zhou, and L. Hou. 2005. [Screening for lymphatic metastasis-associated genes in mouse hepatocarcinoma cell lines Hca-F and Hca-P using gene chip]. *Ai Zheng* 24: 774-80.

SOURCE. The Stanford Online Universal Resource for Clones and ESTs, http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/SMD/source/sourceSearch.

Stenvers, K. L., M. L. Tursky, K. W. Harder, N. Kountouri, S. Amatayakul-Chantler, D. Grail, C. Small, R. A. Weinberg, A. M. Sizeland, and H. J. Zhu. 2003. Heart and liver defects and reduced transforming

growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23: 4371-85.

Sun, H. B., Y. X. Zhu, T. Yin, G. Sledge, and Y. C. Yang. 1998. MRG1, the product of a melanocyte-specific gene related gene, is a cytokine-inducible transcription factor with transformation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13555-60.

Szczylik, C., T. Skorski, N. C. Nicolaides, L. Manzella, L. Malaguarnera, D. Venturelli, A. M. Gewirtz, and B. Calabretta. 1991. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 253: 562-5.

Takagaki, K., S. Katsuma, Y. Kaminishi, T. Horio, T. Tanaka, T. Ohgi, and J. Yano. 2005. Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Genes Cells* 10: 97-106.

Tang, T. T., D. Dowbenko, A. Jackson, L. Toney, D. A. Lewin, A. L. Dent, and L. A. Lasky. 2002. The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem* 277: 14255-65.

Tepperman, A. D., J. E. Curtis, and E. A. McCulloch. 1974. Erythropietic colonies in cultures of human marrow. *Blood* 44: 659-69.

Tetteroo, P. A., F. Massaro, A. Mulder, R. Schreuder-van Gelder, and A. E. von dem Borne. 1984. Megakaryoblastic differentiation of proerythroblastic K562 cell-line cells. *Leuk Res* 8: 197-206.

Thijsen, S., G. Schuurhuis, J. van Oostveen, and G. Ossenkoppele. 1999. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. *Leukemia* 13: 1646-74.

Varga, M., P. Obrist, S. Schneeberger, G. Muhlmann, C. Felgel-Farnholz, D. Fong, M. Zitt, T. Brunhuber, G. Schafer, G. Gastl, and G. Spizzo. 2004. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* 10: 3131-6.

Verfaillie, C. M. 1998. Chronic myelogenous leukemia: too much or too little growth, or both? *Leukemia* 12: 136-8.

Watanabe, T., T. Mitchell, E. Sariban, K. Sabbath, J. Griffin, and D. Kufe. 1985. Effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and phorbol ester on differentiation of human K562 erythroleukemia cells. *Mol Pharmacol* 27: 683-8.

Watari, A., and M. Yutsudo. 2003. Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4: apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis* 8: 5-9.

Welch, P. J., and J. Y. Wang. 1993. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75: 779-90.

Wen, S. T., P. K. Jackson, and R. A. Van Etten. 1996. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *Embo J* 15: 1583-95.

Wiater, E., and W. Vale. 2003. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 278: 7934-41.

Wiltshire, C., M. Matsushita, S. Tsukada, D. A. Gillespie, and G. H. May. 2002. A new c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein, Sab (SH3BP5), associates with mitochondria. *Biochem J* 367: 577-85.

Witt, O., K. Sand, and A. Pekrun. 2000. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* 95: 2391-6.

Xie, X., C. Y. Wang, Y. X. Cao, W. Wang, R. Zhuang, L. H. Chen, N. N. Dang, L. Fang, and B. Q. Jin. 2005. Expression pattern of epithelial cell adhesion molecule on normal and malignant colon tissues. *World J Gastroenterol* 11: 344-7.

Yamadori, T., Y. Baba, M. Matsushita, S. Hashimoto, M. Kurosaki, T. Kurosaki, T. Kishimoto, and S. Tsukada. 1999. Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6341-6.

Yin, L., L. Huang, and D. Kufe. 2004. MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress. *J Biol Chem* 279: 45721-7.

Yokota, H., M. B. Goldring, and H. B. Sun. 2003. CITED2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear. *J Biol Chem* 278: 47275-80.

Yuan, Z. M., H. Shioya, T. Ishiko, X. Sun, J. Gu, Y. Y. Huang, H. Lu, S. Kharbanda, R. Weichselbaum, and D. Kufe. 1999. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399: 814-7.

Zermati, Y., S. Fichelson, F. Valensi, J. M. Freyssinier, P. Rouyer-Fessard, E. Cramer, J. Guichard, B. Varet, and O. Hermine. 2000. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol* 28: 885-94.

Zhu, W., G. N. Bijur, N. A. Styles, and X. Li. 2004. Regulation of FOXO3a by brain-derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 126: 45-56.

Anhang

Abkürzungen und Fachbegriffe

AML	Akute Myeloische Leukämie
AraC	Cytosinarabinosid, Arabinosyl-Cytosin
BCR-ABL	konstitutiv aktive Proteinkinase, Fusionsprodukt der Gene BCR und ABL infolge Chromosomentranslokation, Hauptursache der CML
BFU-E	*boost forming unit erythroid*
CFU-E	*colony forming unit erythroid*
CFU-GEMM	*colony forming unit granulocyte-erythrocyte-monocyte-macrophage*
CFU-GM	*colony forming unit granulocyte-macrophage*
CML	Chronisch-Myeloische Leukämie
Datensatz	Daten, die von einem physischen Array stammen, also nur aus Zellen, die in einem Experiment zu einem bestimmten Zeitpunkt entnommen wurden
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin-Rezeptor
Experiment	umfasst alle Datensätze, die bei der Stimulierung eines Zelltyps mit einem bestimmten Agens erzeugt wurden (schließt ggf. beide Duplikate ein)
G-CSF	*granulocyte colony stimulating factor*
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	*polymerase chain reaction,* Polymerasekettenreaktion
SDL	*signal dual logarithm*: das zur Basis 2 logarithmierte Signal eines Probesets
Serie	wenn ein Experiment ganz oder teilweise dupliziert wurde, werden 2 Serien unterschieden
SLR	*signal dual logratio*: der zur Basis 2 logarithmierte Quotient der Signale eines Probsets von 2 Arrays

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben. An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Stefan Wölfl, der das Thema bereitstellte und mich über die Jahre hinweg mit allen Höhen und Tiefen betreute und unterstützte. Frau Prof. Dr. Katharina Pachmann und Herrn Dr. Joachim Clement danke ich für ihre konstruktive Kritik, die mich immer auf´s Neue ermunterte, mich in naturwissenschaftlicher wie medizinischer Hinsicht mit der Vielseitigkeit des gestellten Aufgabenkomplexes auseinanderzusetzten. Besonders danke ich auch Herrn Dr. Torsten Kroll und Herrn Dr. Martin Hoffmann für ihre Hilfe bei der Auswahl und Anwendung bioinformatischer Methoden. Vielen Dank auch an Frau Dr. Larissa Pusch für ihre Unterstützung bei meinen Laborarbeiten.

Ein großer Dank gilt natürlich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekularbiologie“ sowie den Mitarbeitern und Studenten des „Onkologischen Forschungslabors“ der Klinik für Innere Medizin II für das stets sehr gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft sowie die Geduld in schlechteren Zeiten.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre moralische Unterstützung und die Förderung meines Studiums, und ein ganz großes Dankeschön an Jule.

Herzlichen Dank!

Lebenslauf

Geburtsdatum:	07.01.1972
Geburtsort:	Stollberg
Familienstand:	ledig
01.09.1978 – 30.06.1988:	POS Anton-Ackermann in Thalheim; Abschluss 10. Klasse
01.09.1988 – 15.07.1990:	VEB KSG Gornsdorf; Lehre Maschinen- und Anlagenmonteur; Abschlusszeugnis Facharbeiter
16.07.1990 – 30.04.1992:	Zeiten beruflicher Fortbildungsmaßnahmen und kurzfristiger Arbeitsverhältnisse
01.05.1992 – 31.07.1993:	Zivildienst Gemeinde Gornsdorf
01.09.1993 – 21.06.1996:	Erwachsenenkolleg Breitenbrunn; Erwerb der allg. Hochschulreife
01.10.1996 - 27.07.2001:	Studium Biochemie an Friedrich-Schiller-Universität Jena; Abschluss Diplom Thema: Untersuchung regulatorischer DNA- und RNA-Elemente durch FACS-Analyse der differentiellen Expression fluoreszierender Proteine
seit 01.10.2001:	angestellt am Klinikum der FSU Jena als wiss. Mitarbeiter/Doktorand; Promotionsthema: Transkriptionelle Regulation bei Differenzierungsprozessen

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 10.04.2006

Stefan Knoth

Erklärung zur Bewerbung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und daß ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg ist mir bekannt.

Jena, den 10.04.2006

Stefan Knoth