

**Der Einfluss von
BCR-ABL
auf
STAT5
in BCR-ABL-positiven
Leukämiezellen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biol. Michael Schaller-Schönitz
geboren am 26.01.1978 in Gera

2010

| | |
|--------------------|---------------------------------|
| Referentin: | Prof. Dr. Michaela Scherr, MHH |
| Korreferent: | Prof. Dr. Christopher Baum, MHH |
| Tag der Promotion: | 03. Dezember 2010 |

Für meine Frau und meinen kleinen Sonnenschein

Vanessa

Zusammenfassung

Die t(9;22) (q34;q22) – Translokation mit dem daraus resultierenden Philadelphia- (Ph) Chromosom und der Expression der konstitutiv-aktiven p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinase ist für die Entwicklung der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) ausschlaggebend.

Das p210^{BCR-ABL}-Onkoprotein aktiviert eine Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden, die mit Zytokin-induzierten Signalwegen (RAS/RAF/ERK, PI3K/Akt, JAK2/STAT5) überlappen können. Die spezifische Inhibition der p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinaseaktivität durch selektive Inhibitoren, wie z.B. Imatinib mesylate, stellt die gegenwärtige Erstlinientherapie der CML dar. Resistenzentwicklung und die Notwendigkeit einer lebenslangen Medikation limitieren jedoch den therapeutischen Wert aktueller Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Die Identifizierung und gezielte Modulation potenzieller Zielstrukturen von p210^{BCR-ABL} könnte neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Dabei repräsentiert die Familie der STAT-Moleküle eine sehr interessante Klasse von Zielproteinen, wobei die Abhängigkeit von STAT5 in der p210^{BCR-ABL}-vermittelten Tumorgenese bereits gezeigt werden konnte. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit ein differentieller Einfluss von p210^{BCR-ABL} auf beide STAT5-Isoformen, STAT5A und STAT5B, vertiefend untersucht.

Unter Zuhilfenahme eines konditionell p210^{BCR-ABL}-induzierbaren, lymphatischen Zellkultursystems (TonB = Tet on Ba/F3-p210^{BCR-ABL}) konnten Zytokin- und Onkoprotein-abhängige Effekte im gleichen genetischen Hintergrund untersucht werden.

Eine differentielle Analyse von STAT5A und STAT5B bei der Proliferation und dem Überleben von TonB-Zellen zeigte im Hintergrund einer Isoform-spezifischen RNA-Interferenz (RNAi) einen redundanten Phänotyp für beide STAT5-Isoformen unter Zytokin-vermittelter Proliferation, während vor allem das Vorhandensein von STAT5B für das Wachstum und das Überleben der Zellen in der Anwesenheit von BCR-ABL erforderlich ist.

Demgegenüber weist lediglich STAT5A in der Anwesenheit von BCR-ABL eine veränderte intrazelluläre Lokalisation auf und wird an einem zusätzlichen Tyrosinrest (Tyr-683) phosphoryliert. Unter Verwendung von STAT5A-Tyrosinmutanten konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung an Tyr-683 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A in der Anwesenheit von BCR-ABL in TonB-Zellen ausübt.

Aus diesem Grund wurden alternative Funktionen für die p210^{BCR-ABL}-abhängige Phosphorylierung in STAT5A untersucht. Während ein spezifischer Einfluss auf die Proliferation, die Degradation und diverse post-translationale Modifikationen ausgeschlossen werden kann, lieferten die Daten aus der STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung die vielversprechendsten Ergebnisse in der funktionellen Charakterisierung der neu identifizierten Phosphorylierungsstelle.

Schlagnworte: Chronische Myeloische Leukämie, CML, BCR-ABL, STAT5, RNAi

Summary

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease characterized by accumulation of neoplastic cells exhibiting the chromosomal translocation t(9;22) (q34;q22), named the Philadelphia (Ph) chromosome. The respective oncogene encodes a 210 kDa oncoprotein (p210^{BCR-ABL}) that displays constitutive tyrosine kinase activity. BCR-ABL activates a number of target molecules, including RAS, PI3K and STAT5, which promote growth, proliferation and survival of Ph⁺ cells. The activation of either Akt, a downstream target of PI3K, RAS or STAT5 confers cytokine-independent survival to IL-3-dependent Ba/F3 cells.

BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors, e.g. imatinib mesylate, have successfully been introduced in the treatment of CML. However, mutations in the catalytic domain of BCR-ABL lead to imatinib resistance and the requirement of life-long drug-treatment for CML patients underscore the importance of discovering novel BCR-ABL targets in CML.

The members of the STAT family represent an interesting class of p210^{BCR-ABL} target proteins. STATs are persistently tyrosine phosphorylated and activated in many growth factor dysregulated cancers. In particular, STAT5 has been shown to be essential in p210^{BCR-ABL}-mediated tumorigenesis.

In this work, oncoprotein-dependent effects on the two highly conserved STAT5 isoforms, STAT5A and STAT5B, were analyzed, using a tetracycline-inducible p210^{BCR-ABL}-expressing lymphatic cell line (TonB=Tet **on** Ba/F3-p210^{BCR-ABL-WT}).

Redundant and non-redundant phenotypes were observed in the background of a highly isoform-selective and efficient endogenous RNAi-mediated STAT5A or STAT5B knock-down. While a lack of either STAT5A or STAT5B in TonB cells is redundant, when cells are cultured in the presence of IL-3, proliferation and survival of the cells in the presence of BCR-ABL are strictly dependent on STAT5B.

Furthermore, in the presence of IL-3 or BCR-ABL, both STAT5 isoforms exhibit different intracellular localization patterns. While STAT5B is constitutively localized in the nucleus, STAT5A localized in the nucleus in the presence of IL-3, but exhibited a predominantly diffuse localization upon BCR-ABL expression.

Moreover, only STAT5A is exclusively phosphorylated on an additional tyrosine residue (Tyr-683) in the presence of BCR-ABL.

However, the altered intracellular localization of STAT5A in the presence of BCR-ABL was not influenced by Tyr-683 phosphorylation. Therefore, other potential functions of p210^{BCR-ABL}-induced STAT5A (Tyr-683) phosphorylation were analyzed. Using STAT5A tyrosine mutants, we were able to demonstrate, that BCR-ABL-induced phosphorylation of Tyr-683 elicited no specific effect on cell proliferation, protein degradation or additional post-trans-

lational modifications. Interestingly, an alteration in STAT5A:STAT5B heterodimerization was observed and, thus, represent the most likely function of the p210^{BCR-ABL}-specific STAT5A tyrosine phosphorylation.

Key words: chronic myeloid leukemia, CML, BCR-ABL, STAT5, RNAi

Inhaltsverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Zusammenfassung | I |
| Summary | III |
| Inhaltsverzeichnis | V |
| Abkürzungen | 1 |
| Formelzeichen und Einheiten | 3 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Chronische Myeloische Leukämie | 5 |
| 1.1.1 Charakteristik der Chronischen Myeloischen Leukämie | 5 |
| 1.1.2 Zytogenetische und molekulare Grundlagen der CML | 5 |
| 1.1.3 Das p210 ^{BCR-ABL} -Onkoprotein | 6 |
| 1.1.4 Die p210 ^{BCR-ABL} -vermittelte Signaltransduktion | 7 |
| 1.1.5 Behandlungsstrategien bei CML | 9 |
| 1.1.6 Imatinib, Imatinib-Resistenz und therapeutische Alternativen | 10 |
| 1.2 Der Einfluss von STAT-Molekülen in p210 ^{BCR-ABL} -vermittelter Leukämie | 11 |
| 1.2.1 Die STAT-Proteinfamilie | 11 |
| 1.2.2 Aktivierung von STAT-Proteinen und der JAK/STAT-Signalweg | 13 |
| 1.2.3 Negative Regulation von STAT-Proteinen | 14 |
| 1.2.4 STAT-Proteine in der Tumorgenese | 16 |
| 1.2.5 STAT5A und STAT5B | 17 |
| 1.2.6 Der Einfluss von BCR-ABL auf STAT5 | 19 |
| 1.2.7 RNA-Interferenz (RNAi) als Werkzeug für die Modulation endogener Zielstrukturen | 20 |
| 1.2.8 p210 ^{BCR-ABL} -Modellsysteme | 23 |
| 1.3 Zielsetzung | 25 |
| 2. Material und Methoden | 27 |
| 2.1 Material | 27 |
| 2.1.1 Geräte | 27 |
| 2.1.2 Chemikalien | 28 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterial | 30 |
| 2.1.4 Transfermembranen | 31 |
| 2.1.5 Molekulargewichts- und Längenstandards | 31 |
| 2.1.6 Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets ("Kits") | 31 |
| 2.1.7 Enzyme und Fertigpuffer für enzymatische Reaktionen | 32 |
| 2.1.8 Plasmide | 32 |
| 2.1.9 Oligonukleotide | 32 |
| 2.1.10 Primer für die Mutagenese von STAT5A | 33 |
| 2.1.11 Oligonukleotide für die Herstellung STAT5-spezifischer shRNAs | 33 |
| 2.1.12 Primer für die Sequenzierung | 33 |
| 2.1.13 Sonden und Primer für die quantitative <i>Realtime</i> -PCR (TaqMan) | 34 |
| 2.1.14 Primer für die quantitative <i>Realtime</i> -PCR (CYBR®Green) | 34 |
| 2.1.15 Antikörper | 34 |
| 2.1.16 Medien und Medienzusätze für die Bakterienkultur | 35 |
| 2.1.17 Bakterienstämme | 35 |
| 2.1.18 Medien und Medienzusätze für die Zell- und Gewebekultur | 35 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.19 | Medienzusätze für die Herstellung und Verwendung von Lentiviren..... | 35 |
| 2.1.20 | Inhibitoren in der Zellkultur und Proteomanalytik | 36 |
| 2.1.21 | Zelllinien..... | 36 |
| 2.1.22 | Software..... | 36 |
| 2.2 | Methoden | 37 |
| 2.2.1 | Gentechnische Arbeitsmethoden | 37 |
| 2.2.1.1 | Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 37 |
| 2.2.1.2 | Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> | 37 |
| 2.2.1.3 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 38 |
| 2.2.1.4 | Konzentrationsmessungen von Nukleinsäuren | 38 |
| 2.2.1.5 | Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen | 38 |
| 2.2.1.6 | Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase | 39 |
| 2.2.1.7 | Auffüllung von 5'-DNA-Überhängen mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I..... | 40 |
| 2.2.1.8 | Phosphorylierung und Hybridisierung von synthetischen Oligo- nukleotiden | 40 |
| 2.2.1.9 | Fällung von Nukleinsäuren | 41 |
| 2.2.1.10 | Ligation von DNA-Fragmenten | 41 |
| 2.2.1.11 | Agarose-Gelelektrophorese | 42 |
| 2.2.1.12 | Isolation von RNA mit Trizol-Reagenz | 42 |
| 2.2.1.13 | Reverse Transkription..... | 43 |
| 2.2.1.14 | Quantitative <i>Realtime</i> -Polymerasekettenreaktion (<i>qRealtime</i> -PCR) | 43 |
| 2.2.1.15 | Auswertung der quantitativen <i>Realtime</i> -PCR Ergebnisse | 45 |
| 2.2.1.16 | Ortsspezifische Mutagenese | 45 |
| 2.2.1.17 | Sequenzierung von Nukleinsäuren | 46 |
| 2.2.2 | Zellbiologische Arbeitsmethoden..... | 47 |
| 2.2.2.1 | Kultivierung und Induktion eukaryotischer Zelllinien..... | 47 |
| 2.2.2.2 | Kryokonservierung und Auftauen von Zellen | 47 |
| 2.2.2.3 | Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität..... | 48 |
| 2.2.2.4 | Isolation von PBMC-Zellen aus dem Vollblut durch Ficoll-Dichte- gradientenzentrifugation | 49 |
| 2.2.2.5 | Herstellung von Einzelklonen durch serielle Verdünnung | 50 |
| 2.2.2.6 | Kotransfektionsassay durch transiente Transfektion mit FuGENE-6..... | 50 |
| 2.2.2.7 | Herstellung, Konzentrierung und Titration von Lentiviren..... | 52 |
| 2.2.2.8 | Messung von transgenen Expressionsstärken und Zellsortierung mittels FACS | 54 |
| 2.2.2.9 | Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von STAT5-Molekülen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM)..... | 56 |
| 2.2.3 | Proteinchemische Arbeiten | 60 |
| 2.2.3.1 | Isolation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten | 60 |
| 2.2.3.2 | Isolation von Proteinen aus zellulären Subfraktionen | 61 |
| 2.2.3.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford | 62 |
| 2.2.3.4 | Immunologische Fällungen von Proteinen | 63 |
| 2.2.3.5 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 64 |
| 2.2.3.6 | Anfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen | 66 |
| 2.2.3.7 | Die massenspektroskopische Identifizierung von Phosphorylierungs- stellen (MIDAS) | 67 |
| 2.2.3.8 | Nachweis spezifischer Proteine im <i>WesternBlot</i> | 68 |
| 2.2.3.9 | Die Analyse der STAT5A-Proteinstabilität im Degradationsassay..... | 70 |
| 3. | Ergebnisse | 71 |
| 3.1 | Überprüfung der Funktionalität des TonB-Zellkultursystems | 71 |
| 3.2 | Der Einfluss von STAT5 auf die Proliferation und das Überleben von TonB-Zellen in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL..... | 73 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3 | Analyse der intrazellulären Lokalisation von STAT5 im TonB-Zellkultur-system..... | 78 |
| 3.4 | Die Untersuchung von p210 ^{BCR-ABL} -spezifischen Phosphorylierungs-mustern an STAT5-Molekülen..... | 80 |
| 3.5 | Identifizierung der STAT5A-Tyrosinphosphorylierungsstelle..... | 85 |
| 3.6 | Die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von STAT5A-Tyrosin-mutanten in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL..... | 87 |
| 3.7 | Fortführende Charakterisierung der p210 ^{BCR-ABL} -spezifischen Tyrosinphos-phorylierung an STAT5A..... | 89 |
| 3.7.1 | Die Proliferation von TonB-Zellen bei transgener Expression von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten..... | 89 |
| 3.7.2 | Untersuchungen zur STAT5A-Proteinstabilität..... | 91 |
| 3.7.3 | Die Analyse von post-translationellen Modifikationen an STAT5A..... | 95 |
| 3.7.4 | Untersuchungen zur STAT5A/B-Heterodimerisierung im TonB-Zell-kultursystem..... | 97 |
| 4. | Diskussion..... | 103 |
| 4.1 | Der Einfluss von BCR-ABL auf STAT5 im TonB-Zellkultursystem..... | 103 |
| 4.2 | Der Einfluss von BCR-ABL auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT5-Proteinen..... | 106 |
| 4.3 | Die Identifizierung p210 ^{BCR-ABL} -spezifischer Phosphorylierungsstellen in STAT5-Molekülen und die Problematik mit primären Patientenmaterial..... | 110 |
| 4.4 | Auf der Suche nach der Funktion..... | 112 |
| 4.5 | Ein hypothetisches Modell für die Effekte von BCR-ABL auf STAT5 im TonB-Zellkulturmodell..... | 117 |
| 5. | Ausblick und offene Fragestellungen..... | 121 |
| 5.1 | Fortführende Analysen in der intrazellulären Lokalisation von STAT5A in der Anwesenheit von BCR-ABL..... | 121 |
| 5.2 | Die Identifizierung von STAT5A-co-präzipitierbaren Proteinen..... | 121 |
| 5.3 | Fortführende Analysen in der Funktion der p210 ^{BCR-ABL} -spezifischen Phosphorylierung an STAT5A..... | 122 |
| | Literaturverzeichnis..... | A |
| | Lebenslauf..... | U |
| | Danksagungen..... | V |
| | Erklärung zur Dissertation..... | W |

Abkürzungen

| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Abb | Abbildung |
| ABD | <i>actin binding domain</i> |
| ABL | <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 = p150</i> |
| AK | Antikörper |
| AKT(1/2/3) | Proteinkinase B ($\alpha/\beta/\gamma$) |
| AML | Akute Myeloische Leukämie |
| Amp | Ampicillin |
| APL-L | Akute Promyelozytisch-ähnliche Leukämie |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Arg | Arginin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B2M | β 2-Mikroglobulin |
| BCR | <i>breakpoint cluster region</i> |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>) |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CBP | <i>CREB binding protein</i> |
| cc | coiled-coil |
| CDK | Zyklusabhängige Kinase (<i>cycline dependent kinase</i>) |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| ChIP | Chromatin-Immunopräzipitation |
| CIS | <i>cytokine-inducible SH2 containing protein</i> |
| CML | Chronische Myeloische Leukämie |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CrkL | <i>Crk-like protein</i> |
| CT | <i>cycle threshold</i> |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DBD | DNA-Bindungsdomäne |
| ddNTP | <i>dideoxy-nucleotide-triphosphate</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dn | dominant-negativ |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | <i>desoxy-nucleotide-triphosphate</i> |
| Dox | Doxyzyklin |
| DTT | 1,4-Dithio-DL-threitol |
| ECL | verstärkende Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>) |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> |
| EGFP | <i>enhanced green fluorescence protein</i> |
| EMSA | <i>electrophoretic mobility shift assay</i> |
| Epo | Erythropoetin |
| et al. | <i>et alterii</i> |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| FBS | fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>) |
| GAB2 | <i>GRB2-associated-binding protein 2</i> |
| GAS | γ -interferon activated sequence |
| G-CSF | <i>granulocyte-colony stimulating factor</i> |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GFP | <i>green fluorescence protein</i> |
| ggü. | gegenüber |
| GH | <i>growth hormone</i> |
| GlcNAc | N-Azetylglukosamin |
| GRB2 | <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| GTP | Guanosintriphosphat |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|
| HBS | <i>HEPES buffered saline</i> |
| HDAC | Histon-Deazetylasekomplex |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| HSC | <i>hematopoietic stem cell</i> |
| IB | Immunoblot |
| IFN | Interferon ($\alpha/\beta/\gamma$) |
| IFNAR | <i>interferon alpha receptor (1-2)</i> |
| IFNGR | <i>interferon gamma receptor (1-2)</i> |
| IL | Interleukin |
| IL-2R | <i>Interleukin-2 receptor (α/β)</i> |
| IP | Immunopräzipitation |
| IRES | Interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosome entry site</i>) |
| ISG | <i>interferon stimulated genes</i> |
| JAK | Januskinasen (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk1 und Tyk2) |
| JNK | c-Jun-NH2-terminale Kinase |
| Kana | Kanamycin |
| kb | Kilobasen |
| KD | Kinasedomäne |
| LB | <i>Luria broth</i> |
| LNGFR | <i>Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor</i> |
| LSM | <i>laser scanning microscope</i> |
| LTR | <i>long terminal repeat</i> |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| M-CSF | <i>macrophage-colony stimulating factor</i> |
| MES | Morpholinoethansulfonsäure |
| MFI | <i>mean fluorescence intensity</i> |
| MIDAS | <i>Multiple Reaction Monitoring-Initiated Detection and Sequencing</i> |
| M-MLV | <i>Moloney murine leukaemia virus</i> |
| MOPS | Morpholinpropansulfonsäure |
| MPD | Myeloproliferative Erkrankung (<i>myeloproliferative disease</i>) |
| mRNA | messenger RNA |
| MS | Massenspektroskopie |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| n.a. | nicht analysiert |
| ND | N-terminale Domäne |
| NES | <i>nuclear export sequence</i> |
| NF κ B | <i>nuclear factor kappa B</i> |
| NGFR | <i>nerve growth factor receptor</i> |
| NLS | <i>nuclear localization sequence</i> |
| NPC | <i>nuclear pore complex</i> |
| Nr. | Nummer |
| nt | Nukleotid |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBMC | <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerasenkettenreaktion |
| PDGFR | <i>platelet-derived growth factor receptor</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| Ph | Philadelphia |
| PH3 | <i>pleckstrin-homology domain-3</i> |
| PI | Propidiumjodid |
| PIAS | <i>protein inhibitor of activated STATs</i> |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PML | <i>promyelocytic leukemia</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PNK | Polynukleotidkinase |
| Polybren | Hexadimethrinbromid |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PTK | <i>protein tyrosine kinase</i> |

| | |
|-----------|------------------------------------------------------------|
| PRL | Prolaktin |
| RAF-1 | <i>rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma-1</i> |
| RARA | <i>Retinolsäurerezeptor-α</i> |
| RB | Retinoblastom |
| RFP | <i>red fluorescence protein</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | <i>RNA-interference</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptortyrosinkinase |
| SAPK | <i>stress activated protein kinase</i> |
| Ser/S | Serin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>) |
| SH(2,3) | Src-homologie (2,3) |
| SHC | <i>SH containing protein</i> |
| SHP | <i>SH2-containing phosphatases (1-2)</i> |
| shRNA | <i>small-hairpin RNA</i> |
| SL | Stammlösung |
| SOS | <i>son of sevenless</i> |
| SOCS | <i>suppressor of cytokine signalling (1-3, CIS)</i> |
| SRC | <i>cellular und sarcoma</i> |
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| SUMO | <i>small ubiquitin modifier</i> |
| SZT | Stammzelltransplantation |
| TAD | Transaktivierungsdomäne |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>) |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin |
| TOF | <i>time of flight</i> |
| Tpo | Thrombopoetin |
| Tris | α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin |
| Tween-20 | Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat |
| Thr/T | Threonin |
| Tyr/Y | Tyrosin |
| u/o | und/oder |
| Ub | Ubiquitin |
| UV | Ultraviolett |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VSV.G | Vesikuläre-Stomatitis-Virus-Glykoprotein |
| WEHI-3BCM | WEHI-3B konditioniertes Medium |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.N. | zur Normalisierung |

Formelzeichen und Einheiten

| | | | |
|---------|-----------------------------|---------------|--------------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius | min | Minuten |
| % | Prozent | ml | Milliliter |
| % (v/v) | Volumenprozent | mM | Millimolar |
| % (w/v) | Gewichtsprozent pro Volumen | n | nano |
| cm | Zentimeter | ng | Nanogramm |
| Da | Dalton | nm | Nanometer |
| f | femto | s | Sekunden |
| g | Gramm | U | Enzymeinheiten (<i>units</i>) |
| h | Stunde | rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) |
| kDa | Kilodalton | V | Volumen (<i>volume</i>) |
| l | Liter | W | Watt |
| m | Meter | μg | Mikrogramm |
| M | Molarität | μl | Mikroliter |
| mg | Milligramm | | |

1. Einleitung

1.1 Chronische Myeloische Leukämie

1.1.1 Charakteristik der Chronischen Myeloischen Leukämie

Die Chronische Myeloische Leukämie (CML) stellt eine klonale, myeloproliferative Erkrankung dar und ist durch eine periphere Leukozytose, verbunden mit der Ausschwemmung myeloischer Zellen aller Reifungsstadien aus dem Knochenmark in das periphere Blut und einer gesteigerten Myelopoese im Knochenmark, gekennzeichnet [SAWYERS *et al.*, 1999]. Ausgelöst wird die Erkrankung durch abnormal proliferierende, hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSC), die auf Grund ihres Wachstumsverhaltens die Population von normal proliferierenden HSCs nach und nach verdrängen.

Das Krankheitsbild der CML umfasst einen zwei- bis dreiphasigen Verlauf. Nach einer mehrjährigen chronischen Phase wird die finale Blastenkrise entweder direkt oder über eine Akzelerationsphase eingeleitet. Während der chronischen Phase bleiben über 50% der Patienten beschwerdefrei und die Erkrankung wird meist bei Routineuntersuchungen diagnostiziert. Typisches Kennzeichen für eine CML in der chronischen Phase ist die 10- bis 100-fach erhöhte Anzahl an Granulozyten im peripheren Blut, Splenomegalie und ein hyperzelluläres Knochenmark. In der Akzelerationsphase und der Blastenkrise erhöht sich die Anzahl an unreifen Vorstufen (Blasten) im peripheren Blut und im Knochenmark signifikant. Ferner treten in der Blastenkrise weitere Komplikationen wie Blutungen und Infektionen auf. In diesem Stadium gleicht die CML klinisch einer Akuten Myeloischen Leukämie (AML) mit schnellem Voranschreiten der Erkrankung und schlechten Therapieaussichten [SOKAL *et al.*, 1988]. Bis zum Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) betrug das mediane Überleben nach Diagnostizierung der CML 4 – 6 Jahre, bei Patienten in der Blastenkrise 3 – 9 Monate [PASTERNAK *et al.*, 1998; SACCHI *et al.*, 1999, SAWYERS *et al.*, 2002]

1.1.2 Zytogenetische und molekulare Grundlagen der CML

Die CML stellt die erste neoplastische Erkrankung dar, die mit einer zytogenetischen Abnormalität in Verbindung gebracht werden konnte. Erstmals wurde 1960 durch NOWELL und HUNGERFORD in leukämischen Zellen eine spezifische chromosomale Veränderung beschrieben, die gemäß dem Ort ihrer Entdeckung als „Philadelphia-Chromosom (Ph)“ bezeichnet und später als verkürztes Chromosom 22 identifiziert werden konnte. Über chromosomale Anfärbetechniken konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Ph-Chro-

mosom um das Resultat einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22, t(9;22) (q34;q11), handelt [ROWLEY *et al.*, 1973]. Durch die Translokation wird ein Großteil des c-ABL-Gens (*Abelson*), das eine Tyrosinkinase kodiert, mit einem Teil des BCR-Gens (*breakpoint cluster region*) miteinander verknüpft. Das daraus resultierende Fusionsgen, BCR-ABL, kodiert für ein 210-kDa großes Protein mit konstitutiver Tyrosinkinaseaktivität und zytoplasmatischer Lokalisation [SHTIVELMAN *et al.*, 1985; LUGO *et al.*, 1990].

Bis heute konnte an unterschiedlichen biologischen Modellsystemen gezeigt werden, dass für die Entstehung und die Pathogenese der CML, das p210^{BCR-ABL}-Onkoprotein notwendig und hinreichend ist. Die ektopische Expression von BCR-ABL in primären Knochenmarkszellen und etablierten hämatopoetischen Zelllinien vermittelt das Zytokin-unabhängige Wachstum und Überleben dieser Zellen *in-vitro*, unter gleichzeitiger Reduktion der Zelladhäsion gegenüber Fibronectin [REN *et al.*, 2002; RAMARAJ *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2001]. Ferner löst die Expression des Onkoproteins in murinen Knochenmarkszellen sowohl myeloproliferative, CML-ähnliche als auch lymphoproliferative, ALL-ähnliche Erkrankungen aus [DALEY *et al.*, 1990; KELLIHER *et al.*, 1990; ELEFANTY *et al.*, 1990; VONCKEN *et al.*, 1995; HUETTNER *et al.*, 2000].

Der Übergang von der chronischen Phase der CML in die Akzelerationsphase oder Blastenkrise ist häufig durch die Akkumulation weiterer zytogenetischer und molekularer Aberrationen gekennzeichnet [FADERL *et al.*, 1999]. Bei einigen Patienten in der Blastenkrise konnten verstärkt Mutationen in den Genen von p53, RB und p16^{INK4A} detektiert werden. Eine CML-typische, genomische Instabilität könnte zudem die Entstehung weiterer genomischer Aberrationen oder Fusionsproteine mit onkogenem Charakter begünstigen. Vor diesem Hintergrund könnten kooperativ wirkende Onkogene die Proliferationsfähigkeit von CML-Blasten und die Progression der Erkrankung positiv beeinflussen [CUENCO *et al.*, 2001].

1.1.3 Das p210^{BCR-ABL}-Onkoprotein

Die Tyrosinkinaseaktivität von c-ABL ist für die p210^{BCR-ABL}-vermittelte Leukämogenese notwendig und hinreichend, da bei der Expression eines katalytisch inaktiven Onkoproteins in der Maus keine myeloproliferativen Erkrankungen mehr induziert werden können [ZHANG und REN, 1998].

Das onkogene Potenzial von BCR-ABL ist aber nicht ausschließlich auf die Tyrosinkinaseaktivität von c-ABL beschränkt, denn BCR-ABL verfügt über eine Vielzahl an Domänen und Strukturmotiven, die es dem Protein ermöglichen, mit intrazellulären Signaltransduktionswegen zu interagieren (Abbildung 1.1).

Eine N-terminal lokalisierte *coiled-coil* (CC) Oligomerisierungsdomäne im BCR-Teil des Onkoproteins begünstigt die Dimerisierung und Tetramerisierung von p210^{BCR-ABL}-Molekülen sowie die gegenseitige Autophosphorylierung von Tyrosinresten. Diese beeinflussen entweder die Aktivität der ABL-Tyrosinkinase oder dienen als potentielle Erkennungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen (*Src-homology 2*) [PENDERGAST *et al.*, 1993].

Ein weiteres Strukturmotiv in der BCR-Region von BCR-ABL stellt die GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) Bindungsstelle dar. GRB2 präsentiert Anlagerungsmöglichkeiten für SOS (*son of sevenless*), den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor von RAS, und GAB2 (*GRB2-associated binding protein 2*). Die Ausbildung eines Signalkomplexes bestehend aus BCR-ABL, GRB2, SOS und GAB2 ist abhängig von einer Phosphorylierung im BCR-Teil am Tyrosinrest-177. Die zwingende Notwendigkeit der Tyrosin-177 Phosphorylierungsstelle für die Entstehung p210^{BCR-ABL}-induzierter, myeloproliferativer Erkrankungen konnte im Mausexperiment unter Expression einer BCR-ABL-Y177F-Mutante gezeigt werden [PUIL *et al.*, 1994; SATTLER *et al.*, 2002].

Im ABL-Teil von BCR-ABL befinden sich zudem eine Tyrosinphosphorylierungsstelle (Y1294) und eine SH2-Domäne, die in der Lage sind, RAS kooperativ zu aktivieren [GOGA *et al.*, 1995]. Mutationen in der SH2-Domäne von ABL oder die Expression einer BCR-ABL-Y1294F-Mutante reduzieren signifikant die Fähigkeit des Onkogens zur Ausbildung einer CML-ähnlichen, myeloproliferativen Erkrankung in der Maus [ROUMIANTSEV *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2001].

Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Struktur motive und Domänen in BCR-ABL überlappende Funktionen ausüben. So führt die simultane Deletion der SH2- und SH3-Domänen im ABL-Teil des Onkoproteins im Vergleich zu den Einzelmutationen zu deutlich stärkeren Defekten bei der Induktion von Leukämien in der Maus [NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 1999].

1.1.4 Die p210^{BCR-ABL}-vermittelte Signaltransduktion

Bis heute konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, die über verschiedene funktionale Domänen oder Struktur motive mit BCR-ABL interagieren oder durch das Onkoprotein aktivierend phosphoryliert werden.

So korreliert die p210^{BCR-ABL}-vermittelte Transformation mit der direkten oder indirekten Aktivierung unterschiedlichster Signalmoleküle, wie z.B. SHC [PUIL *et al.*, 1994], GRB2 [PENDERGAST *et al.*, 1993; PUIL *et al.*, 1994], CRKL [TEN HOEVE *et al.*, 1994], BAD [NESHAT *et al.*, 2000], RAS [CORTEZ *et al.*, 1996; MANDANAS *et al.*, 1993; PENDERGAST *et al.*, 1993; SKORSKI *et al.*, 1994], p85 [SKORSKI *et al.*, 1995 und 1997; GESBERT *et al.*, 2000], RAF-1 [SKORSKI *et al.*, 1995; OKUDA *et al.*, 1994], NFκB [REUTHER *et al.*, 1998], MYC [CLEVELAND *et al.*, 1989; SAWYERS *et al.*, 1992], JAK2 [WILSON-RAWLS *et al.*, 1996],

c-JUN [RAITANO *et al.*, 1995] und STAT5 [ILARIA und VAN ETTEN *et al.*, 1996, CARLESSO *et al.*, 1996; SHUAI *et al.*, 1996].

Nach deren Aktivierung stimulieren diese Proteine eine Fülle an intrazellulären Signalkaskaden, wie z.B. PI3K/AKT, JNK, SRC, RAS/MAPK sowie Protein- und Lipidphosphatasen und deren stromabwärts gelegene Zielproteine oder beeinflussen im Falle von aktivierten Transkriptionsfaktoren, wie z.B. STATs, MYC und NFκB, die Genexpression. Durch die Stimulation dieser Signalwege ist das Onkoprotein in der Lage, die Proliferation von hämatopoetischen Zellen zu gewährleisten (Abbildung 1.1).

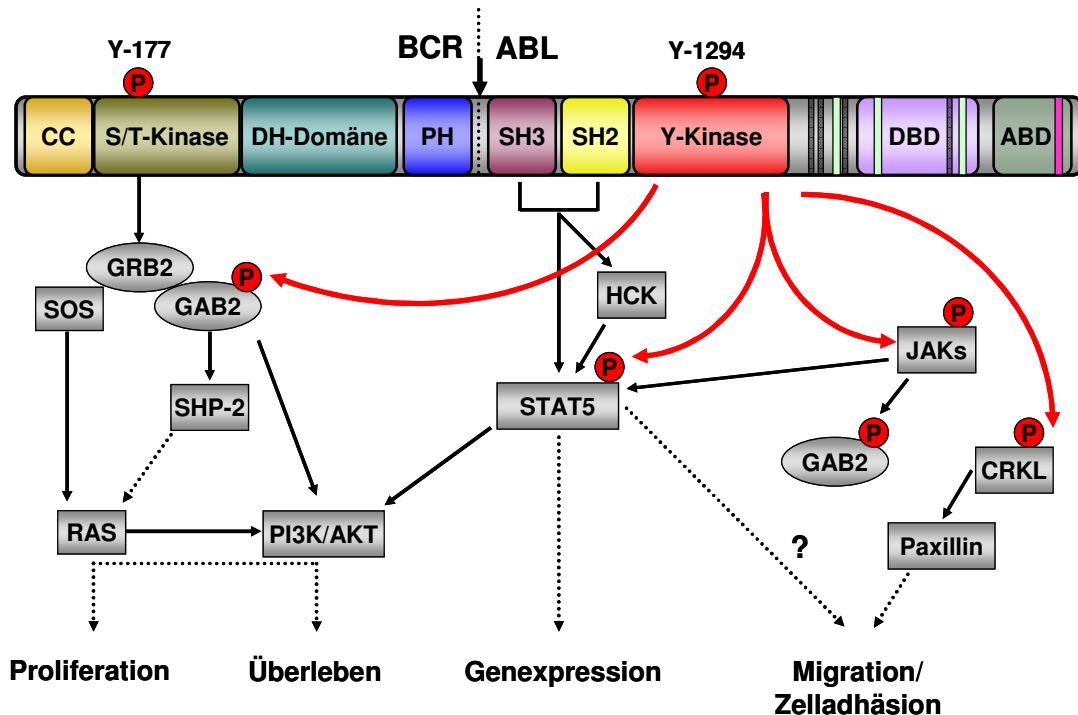


Abb. 1.1: Domänenstruktur und Signaltransduktion von BCR-ABL. Das Onkoprotein verfügt über eine Vielzahl an Domänen und Strukturmotiven, die es dem Molekül erlauben mit zahlreichen Signaltransduktionskaskaden zu interferieren. Eine durch die CC-Domäne vermittelte Dimerisierung oder Tetramerisierung von BCR-ABL-Molekülen ermöglicht die gegenseitige Autophosphorylierung an Tyrosinresten. Die Phosphorylierung des Tyrosinrests Y177 schafft eine hoch-affine Bindungsstelle für das Adaptorprotein GRB2. GRB2 rekrutiert über seine SH3-Domänen die Proteine SOS und GAB2, die stromabwärts den RAS/MAPK- und den PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg aktivieren. Beide Signalwege stimulieren die Proliferation und das Überleben von p210^{BCR-ABL}-positiven Zellen. BCR-ABL kann STAT5 auf direktem Weg phosphorylieren. Dieser Vorgang ist abhängig von intakten SH2- und SH3-Domänen in BCR-ABL. Zusätzlich ist eine indirekte Aktivierung von STAT5 durch Janus-Kinasen oder Vertreter der SRC-Kinasen (HCK, LYN) möglich. Ein weiteres Substrat von BCR-ABL stellt das Adaptorprotein CRKL dar. In anti-CRKL Immunopräzipitaten von CML-Patienten konnte neben BCR-ABL und v-ABL zusätzlich das Fokaladhäsionsprotein Paxillin detektiert werden. Ein BCR-ABL/CRKL/Paxillin-Komplex stellt die Verbindung mit dem Zelladhäsions- und Zellmigrationsapparat einer Zelle her. Zusätzlich ist BCR-ABL in der Lage über seine Aktinbindedomäne an Aktin zu binden. Die intrazelluläre Lokalisation des Proteins wird durch drei NLS-Sequenzen (*nuclear localization sequence*) und eine NES-Sequenz (*nuclear export sequence*) im ABL-Teil des Onkoproteins beeinflusst. Vier prolinreiche SH3-Bindungsstellen im ABL-Teil des Onkoproteins schaffen potentielle Anlagerungsstellen für Proteine mit SH3-Domänen.

Abkürzungen: CC = *Coiled-Coil* Domäne, S/T-Kinase = Serin/Threonin-Kinasedomäne, DH-Domäne = DBL/CDC24-Guaninnukleotidaustauschfaktor-Homologiedomäne, PH3 = Pleckstrin Homologiedomäne, SH2 = SRC-Homologiedomäne 2, SH3 = SRC-Homologiedomäne 3, Y-Kinase = Tyrosinkinasedomäne, DBD = DNA-Bindungsdomäne, ABD = Aktinbindungsdomäne

BCR-ABL rekrutiert das Adaptorprotein GAB2 unter Mitwirkung von GRB2 und einer Phosphorylierung an Tyr-177. GAB2 enthält wichtige Bindungsstellen für die SH2-Domänen von p85, der kleinen Untereinheit der PI3K, und SHP2. Beide Proteine könnten für die p210^{BCR-ABL}-induzierte Leukämogenese von großer Wichtigkeit sein, da eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges in zahlreichen humanen Tumoren beobachtet wurde [VIVANCO und SAWYERS, 2002] und die Expression des Gens begünstigende Mutationen im SHP2-Genlocus (*gain-of-function mutations*) bei etwa 50% der Patienten mit Noonan Syndrom nachgewiesen werden konnten [KOSAKI *et al.*, 2002; TARTAGLIA *et al.*, 2001 und 2003].

Neben BCR-ABL aktiviert auch SHP2 den RAS/ERK-Signalweg, einen Schlüsselsignalweg, über den die meisten Rezeptortyrosinkinasen und Zytokinrezeptoren extrazelluläre Signale in die Zelle weiterleiten [HABIB *et al.*, 2003]. Konstitutiv-aktive Varianten von RAS konnten bei 20% – 30% aller Fälle von AML, MPD und myelodysplastischen Syndrom beobachtet werden [YUNIS *et al.*, 1989]. Zusätzlich begünstigt die Expression von onkogenen RAS-Varianten (KRAS, NRAS) in der Maus die Entstehung myeloproliferativer Erkrankungen [BRAUN *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2004].

BCR-ABL ist ferner in der Lage, die DNA-Reparaturmechanismen in CML-Zellen zu inhibieren. Das fördert die genomische Instabilität und macht die betroffenen Zellen anfälliger gegenüber der Akkumulation sekundärer, genetischer Abnormalitäten und den Übergang von der chronischen Phase der CML in die Blastenkrise [PENSERGA und SKORSKI, 2007].

1.1.5 Behandlungsstrategien bei CML

Konventionell wurde die CML vor 1980 mit Hydroxyharnstoff oder Busulfan behandelt. Jedoch können diese Methoden keine Verbesserung der Prognose für den CML-Patienten herbeiführen, denn beide Substanzen sind nicht in der Lage, die Progression der Erkrankung zu verhindern [SAVONA und TALPAZ, 2006]. Seit den frühen 1980er Jahren wurde IFN- α (Interferon-alpha) zur Behandlung der CML eingesetzt. Interferon ist durch seine immunomodulatorische Aktivität in der Lage, bei 70% – 80% der behandelten CML-Fälle stabile hämatologische Remissionen und bei 5% – 15% dauerhafte zytogenetische Remissionen herbeizuführen [BONIFAZI *et al.*, 2001].

Die bis heute einzige kurative Therapie bei CML stellt die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT) dar. Allerdings ist diese Methode mit hohen Risiken für den Stammzellempfänger verbunden, sodass die Vorteile und Risiken gut abgewogen werden müssen [HOCHHAUS *et al.*, 2004; Saussele *et al.*, 2010].

Mit wachsendem Verständnis gegenüber der chemischen und physiologischen Natur von BCR-ABL, konnten in den letzten Jahren Wirkstoffe entwickelt werden, die eine spezifische Inhibition der ABL-Tyrosinkinaseaktivität herbeiführen. Diese selektiven Inhibitoren,

allem voran Imatinib, stellen heute die Erstlinientherapie bei einer neu diagnostizierten CML dar und haben die allo-SZT zunehmend an Bedeutung verlieren lassen.

1.1.6 Imatinib, Imatinib-Resistenz und therapeutische Alternativen

Imatinib mesylate (Glivec®, Novartis, Basel, Switzerland) repräsentiert einen spezifischen Inhibitor der ABL-Tyrosinkinase. Neben c-ABL und seinem Derivat BCR-ABL inhibiert Imatinib noch weitere Typ-III Tyrosinkinasen, wie z.B. PDGF-R, c-KIT und ARG [BUCHDUNGER *et al.*, 2000]. Die kompetitive Bindung von Imatinib an die inaktive Konformation der Tyrosinkinase erfolgt im Bereich der ATP-Bindungstasche, wodurch die Aufnahme von ATP beeinträchtigt und die Tyrosinphosphorylierung von Zielproteinen der p210^{BCR-ABL}-Signaltransduktionskaskade gehemmt wird [HOCHHAUS *et al.*, 2004].

Im CML-Patienten vermittelt die Verabreichung von Imatinib die rasche Reduktion des leukämischen Zellklons, begleitet von einer Rekonstitution der normalen Hämatopoese [GOLDMAN und MELO, 2003]. Nichtsdestotrotz muss auch nach dem Erreichen einer kompletten, zytogenetischen Remission die Imatinib-Therapie unverändert fortgesetzt werden, um die Tumorlast niedrig zu halten und einer Resistenzentwicklung entgegenzuwirken [HOCHHAUS *et al.*, 2004].

Erworbene Resistenzen gegenüber Imatinib mesylate konnten mit einer genomischen Amplifizierung und Überexpression des Onkoproteins in Verbindung gebracht werden [MAHON *et al.*, 2000; VON BUBNOFF *et al.*, 2003]. Viel häufiger (bei 50% der resistenten Patienten) wird die Imatinib-Resistenz aber durch Mutationen in der p210^{BCR-ABL}-Kinasedomäne (KD) verursacht. GORRE *et al.* konnten 2001 die erste p210^{BCR-ABL}-KD-Mutante beschreiben, bei der ein Threoninrest an der Aminosäureposition 315 von ABL durch einen Isoleuzinrest (BCR-ABL-T315I) substituiert vorlag. Die aus dem Größenunterschied beider Aminosäuren resultierende sterische Hinderung in der ATP-Bindungstasche von BCR-ABL verhindert die Bindung und inhibitorische Wirkung von Imatinib. Bis heute konnten über 30 weitere dieser p210^{BCR-ABL}-KD-Mutanten identifiziert werden [CORBIN *et al.*, 2003; HOCHHAUS *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 2002].

Resistenzen gegenüber Imatinib mesylate machen eine ständige Neu- und Weiterentwicklung von potenten p210^{BCR-ABL}-Inhibitoren erforderlich. In den letzten Jahren konnten daher neuartige ABL-Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation, wie z.B. Dasatinib (SPRYCEL®, Bristol-Myers Squibb, NY, USA) und Nilotinib (Tasigna®, Novartis, Basel, Switzerland) entwickelt und vorklinisch getestet werden. Das dem Imatinib strukturell nicht verwandte Dasatinib bindet mit einer 300-fach höheren Affinität an die aktive, offene Konformation der ABL-Kinasedomäne und ist gegen die meisten p210^{BCR-ABL}-KD-Mutanten aktiv [SHAH *et al.*, 2004; HURON *et al.*, 2003; O'HARE *et al.*, 2005]. Nilotinib stellt dagegen ein Strukturderivat von Imatinib dar. Wie Imatinib bindet es an die inaktive, geschlossene

Konformation von BCR-ABL, jedoch mit einer 25-fach höheren Affinität. Nilotinib zeigt ebenfalls bei den meisten p210^{BCR-ABL}-KD-Mutanten Wirkung [WEISBERG *et al.*, 2005; O'HARE *et al.*, 2005]. Beide Inhibitoren sind jedoch gegenüber der BCR-ABL-T315I-Mutante wirkungslos.

Eine kombinatorische Behandlung von Patienten mit verschiedenen Inhibitoren gegen BCR-ABL und ausgewählten, stromabwärts gelegenen Zielmolekülen des Onkoproteins stellt einen weiteren interessanten Ansatz in der Überwindung von erworbenen Wirkstoffresistenzen dar. Bei der Hemmung von RAF1, MEK1, PI3K/AKT, mTOR und CDKs konnten synergetische und additive Effekte bei einer Inhibition der p210^{BCR-ABL}-vermittelten Transformation beobachtet werden [DEININGER *et al.*, 2004]. Zusätzlich führte eine kombinatorische Verabreichung von Nilotinib und Imatinib in präklinischen Studien zu einer gesteigerten Zytotoxizität von p210^{BCR-ABL}-positiven Zellen [WEISBERG *et al.*, 2007].

1.2 Der Einfluss von STAT-Molekülen in p210^{BCR-ABL}-vermittelter Leukämie

STAT-Proteine (*signal transducer and activator of transcription*) repräsentieren eine einzigartige Familie von Transkriptionsfaktoren. Sie verbinden die Interaktionen von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren, gebunden an ihrem Zelloberflächenrezeptor mit dem Transkriptom und gewährleisten auf diese Weise die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der stimulierten Zellen. Die Mechanismen zur STAT-Aktivierung sind gut erforscht und umfassen die rezeptorvermittelte Tyrosinphosphorylierung, Dimerisierung, nukleare Translokation, Bindung an spezifische DNA-Erkennungssequenzen, Sequestrierung von Aktivatoren oder Repressoren und die transkriptionelle Induktion oder Repression von STAT-Zielgenen. Konsequenterweise ist die Aktivität von STAT-Proteinen stringent reguliert und umfasst sowohl post-translationale Modifikationen als auch proteolytische Prozessierung und Protein-Protein-Interaktionen mit negativ regulierenden Proteinen [BRIERLEY und FISH, 2005].

1.2.1 Die STAT-Proteinfamilie

Die STAT-Proteinfamilie setzt sich aus 7 homologen Mitgliedern (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6) zusammen [DARNELL, 1997], deren Gene auf den Chromosomen 2, 12 und 17 arrangiert sind [IHLE, 2001]. Trotz funktioneller Unterschiede zwischen den verschiedenen STAT-Molekülen weisen alle Mitglieder 6 hoch konservierte Domänen mit spezifischen Funktionen auf [TAKEDA und AKIRA, 2000] (Abbildung 1.2).

Die N-terminale Domäne (ND) erstreckt sich über die ersten 130 Aminosäuren des STAT-Proteins und ist hoch konserviert. Sie vermittelt Protein-Protein-Interaktionen und ist für

die Tetramerisierung von STAT-Dimeren sowie die kooperative Bindung an niedrig-affine Tandem-GAS-Elemente (*gamma activated sequence*) erforderlich [JOHN *et al.*, 1999; VINKEMEIER *et al.*, 1998]. Ferner fördert die ND die Interaktion mit Mitgliedern der PIAS-Familie und sie reguliert die intrazelluläre Lokalisation der STAT-Proteine [KISSELEVA *et al.*, 2002]

Die *Coiled-Coil* (CC) Domäne im Bereich zwischen den Aminosäuren 135 und 315 des STAT-Moleküls weist 4 flexible α -Helices auf und ist neben der Rezeptorbindung auch an weiteren Protein-Protein-Interaktionen und der intrazellulären Lokalisation beteiligt [ZHANG *et al.*, 2000; SCHINDLER, 2002]

Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) befindet sich C-terminal der CC-Domäne im Bereich zwischen den Aminosäuren 320 und 480 des STAT-Proteins. Die DBD weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit gegenüber den Bindungsdomänen von p53 und NF κ B auf [CHEN *et al.*, 1998] und ist für die spezifische DNA-Bindung erforderlich [HORVATH, 2000].

Die Linker-Domäne in STAT-Proteinen verbindet die DBD des Proteins mit der SH2-Dimerisierungsdomäne und befindet sich zwischen den Aminosäuren 480 und 580. Die Linker-Domäne ist für die korrekte Faltung der DBD verantwortlich und scheint zudem die transkriptionelle Aktivität des Proteins zu beeinflussen [YANG *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 1998].

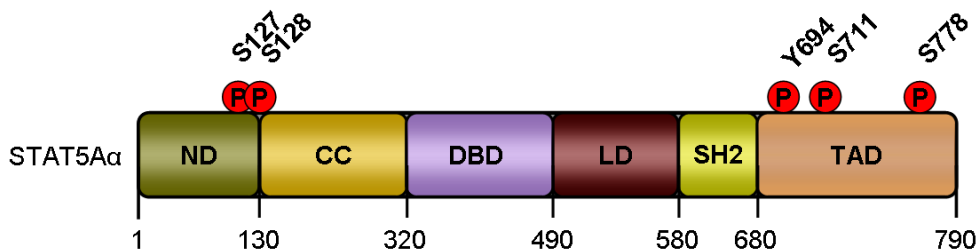


Abb. 1.2: Domänenstruktur von STAT5A Wie alle Vertreter dieser Proteinfamilie verfügt STAT5A über 6 konservierte Domänen, welche die Dimerisierung, Tetramerisierung, DNA-Bindungsfähigkeit, Genexpression und die intrazelluläre Lokalisation des Proteins maßgeblich beeinflussen. Die Phosphorylierung eines kritischen Tyrosinrests (Y694) vermittelt die Dimerisierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors, während zusätzliche Phosphorylierungen an Serinresten die transkriptionelle Aktivität und Promotorspezifität von STAT5A modulieren. Abkürzungen: ND = N-terminale Domäne, CC = *Coiled-Coil* Domäne, DBD = DNA-Bindungsdomäne, LD = Linkerdomäne, SH2 = SRC-Homologie 2-Domäne, TAD = Transaktivierungsdomäne

Die SH2-Domäne in STAT-Proteinen stellt die am stärksten konservierte Domäne dar. Sie befindet sich zwischen den Aminosäuren 580 bis 700 und erfüllt eine wichtige Funktion bei der Erkennung spezifischer phospho-Tyrosin-Motive an aktivierten Rezeptorketten sowie der Homo- oder Heterodimerisierung von Tyrosin-phosphorylierten STAT-Molekülen [BARAHMAND-POUR *et al.*, 1998; GUPTA *et al.*, 1996; SHUAI, 1999].

Die C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) ist unter den STAT-Molekülen kaum konserviert. Sie variiert daher stark in ihrer Länge und Aminosäuresequenz. Die TAD stellt die Verbindung zum Transkriptionsapparat her und weitere Phosphorylierungen an konservierten Serinresten beeinflussen die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine zusätzlich [IMADA und LEONARD, 2000]. Diverse C-terminal verkürzte Isoformen von STAT3, STAT4 und STAT5 konnten identifiziert werden [MORIGGL *et al.*, 1996; AZAM *et al.*, 1997; MEYER *et al.*, 1998]. Diese scheinen in der Zelle eine Funktion als dominant-negative Regulatoren der Transkription wahrzunehmen [HENDRY und JOHN, 2004].

Neben den 6 konservierten Domänen besitzt jedes STAT-Molekül einen kritischen Tyrosinrest (STAT1: Tyr-701, STAT2: Tyr-690, STAT3: Tyr-705, STAT4: Tyr-696, STAT5A: Tyr-694, STAT5B: Tyr-699 und STAT6: Tyr-641), der sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu der SH2-Domäne befindet. Die Phosphorylierung dieses Tyrosinrests vermittelt die Dimerisierung und die nukleare Lokalisation der STAT-Moleküle [CHATTERJEE-KISHORE *et al.*, 2000; MEYER *et al.*, 2004]

1.2.2 Aktivierung von STAT-Proteinen und der JAK/STAT-Signalweg

Die Signaltransduktionswege, die zu aktivierten STAT-Proteinen führen, wurden erstmals bei Genexpressionsstudien mit Zytokin- oder Wachstumsfaktor-stimulierten Säugetierzellen entdeckt. Schnell stellte sich heraus, dass diese Signalwege hoch konserviert sind und eine zentrale Rolle bei der Regulierung biologischer Prozesse, wie z.B. dem Zellwachstum, der Differenzierung, der Apoptose, bei der Immunantwort, an Entzündungsreaktionen, der Zelltransformation und der Tumorentwicklung, spielen [CALO *et al.*, 2003; WITTIG *et al.*, 2005; VALENTINO *et al.*, 2006].

Im Allgemeinen erfolgt die Aktivierung von STAT-Molekülen nach der Bindung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Signalpeptiden an die extrazellulären Domänen spezifischer Zelloberflächenrezeptoren. Unabhängig davon können STAT-Moleküle auch von Nicht-Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. SRC und ABL, aktivierend phosphoryliert werden [WANG *et al.*, 2000; CHATURVEDI *et al.*, 1997].

Die Bindung eines Zytokins, wie z.B. Interferone oder Interleukine, an den entsprechenden Zytokinrezeptor vermittelt die Dimerisierung, seltener die Oligomerisierung, von Rezeptorketten. Da diese in der Regel nicht über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität verfügen, sind am zytoplasmatischen Teil des Rezeptors Mitglieder der Janus-Kinasen, wie z.B. JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2, assoziiert. Die Janus-Kinasen repräsentieren eine eigene Familie zytoplasmatisch lokalisierter Proteintyrosinkinasen (PTK) und wirken als Intermediat bei der Aktivierung von STAT-Proteinen [IHLE *et al.*, 1995 und 1996]. Die aus der Rezeptorketten-Dimerisierung resultierende räumliche Nähe begünstigt die gegenseitige Aktivierung der gebundenen Janus-Kinasen, die daraufhin Tyrosinreste der intrazel-

lulären Rezeptorketten phosphorylieren und Anlagerungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen schaffen.

Latent im Zytoplasma vorkommende STAT-Moleküle sind über ihre SH2-Domäne in der Lage, Tyrosin-phosphorylierte Rezeptorketten zu erkennen und daran zu binden. Durch die unmittelbare Nachbarschaft zu rezeptorgebundenen PTKs werden STAT-Moleküle an den kritischen Tyrosinresten phosphoryliert und aktiviert.

Dieses Phosphorylierungsereignis induziert die Dissoziation vom Rezeptor und die reziproke Homo- oder Heterodimerisierung zwischen den kritischen phospho-Tyrosinresten und den SH2-Domänen zweier STAT-Moleküle. STAT-Dimere lokalisieren in den Zellkern, binden dort an spezifische Erkennungssequenzen in Promotoren von Zielgenen und beeinflussen deren Transkription. Das volle transaktivatorische Potential von STAT-Proteinen wird durch die Interaktion mit weiteren transkriptionellen Aktivatoren, Histon-Azetylasen oder Histon-Deazetylasen, im Falle einer transkriptionellen Repression, mit der TAD-Domäne der STAT-Moleküle vermittelt [SEIDEL *et al.*, 1995; PAULSON *et al.*, 1999; SHUAI *et al.*, 2005] (Abbildung 1.3).

Im Gegensatz zur Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren verfügen Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. EGF-R (*epidermal growth factor-receptor*) oder PDGF-R (*platelet derived growth factor-receptor*) über eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Diese befähigt den Rezeptor zur direkten Aktivierung von STAT-Proteinen.

1.2.3 Negative Regulation von STAT-Proteinen

Die Aktivierung kritischer Signaltransduktionwege in einer Zelle ist beschränkt auf die Dauer der Aktivität und den Zelltyp. Um diese Spezifität zu gewährleisten, werden Proteine oftmals negativ reguliert. Drei molekulare Mechanismen für die negative Regulation von STAT-Proteinen sind bekannt und bereits gut erforscht [CHEN *et al.*, 2004] (Abbildung 1.3).

Im Allgemeinen werden Proteine durch einfache oder multiple Phosphorylierung an Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten im Molekül aktiviert. Phosphorylierungen stellen jedoch reversible Veränderungen am Protein dar und diese können durch Phosphatasen wieder entfernt werden. SHP1 und SHP2 (*SH2-containing phosphatases*) sind zwei Vertreter von Tyrosin-Phosphatasen. Über ihre SH2-Domänen sind sie in der Lage, an Tyrosin-phosphorylierte Rezeptorketten zu binden. Die räumliche Nähe zu JAK- und STAT-Molekülen induziert die Phosphataseaktivität der gebundenen SHP-Proteine, was die Unterbrechung der JAK/STAT-Signaltransduktion zur Folge hat [VALENTINO, 2006].

PIAS-Proteine (*protein inhibitor of activated STATs*) stellen eine weitere Klasse von negativ STAT-regulierenden Molekülen dar. PIAS-Proteine interagieren direkt mit aktiven STAT-Dimeren im Zellkern. Die daraus resultierenden Komplexe verhindern die Induktion

der Transkription, entweder durch Rekrutierung transkriptioneller Repressoren oder durch eine verminderte Fähigkeit des STAT-Dimers an spezifische DNA-Bereiche zu binden [SHUAI *et al.*, 2005].

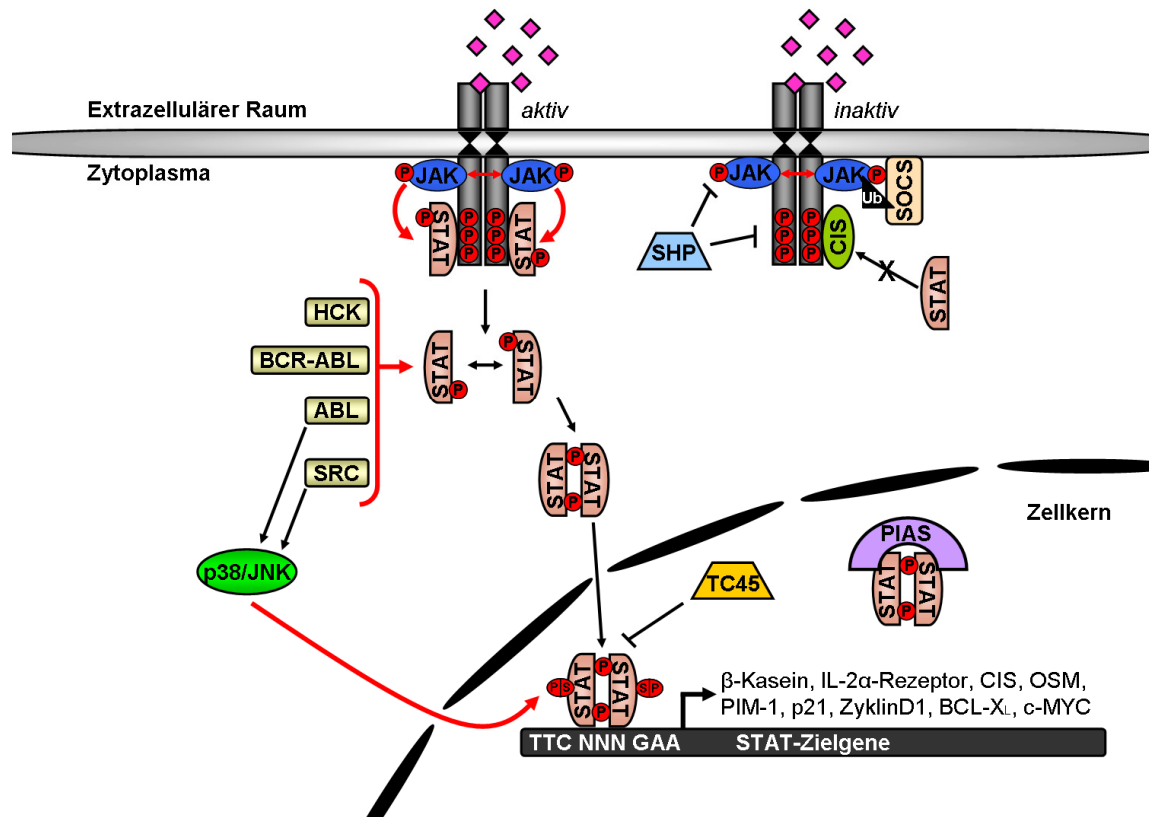


Abb 1.3: Die Aktivierung und Inhibition der JAK/STAT-Signaltransduktion. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone vermitteln die Rezeptordimerisierung und die Aktivierung von Janus-Kinasen. Diese phosphorylieren Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptorkette und schaffen Anlagerungsmöglichkeiten für Proteine mit SH2-Domänen. STAT-Moleküle werden nach Bindung an den Rezeptor von Janus-Kinasen aktivierend phosphoryliert, was die Homo- oder Heterodimerisierung von STAT-Molekülen, die Translokation in den Zellkern und die Genexpression vermittelt. Unabhängig von extrazellulären Stimuli können STAT-Proteine von Vertretern der SRC-Kinasen aktiviert werden. Dabei kommt es zur simultanen Aktivierung von Serin-/Threoninkinasen, die STAT-Moleküle an Serinresten phosphorylieren und das Transaktivierungspotenzial der STAT-Dimere weiter modulieren. Mit TC45 konnte eine Phosphatase identifiziert werden, die STAT-Dimere spezifisch im Zellkern deaktiviert. PIAS-Proteine verhindern durch ihre Interaktion mit STAT-Dimeren die erfolgreiche Bindung an die DNA. Im Gegensatz dazu konkurrieren im Zytoplasma die Vertreter der SOCS-Proteine (SOCS-2, SOCS-3 und CIS) um Rezeptorbindungsstellen oder führen im Falle von SOCS-1, aktivierte Janus-Kinasen durch Ubiquitinierung der proteasomalen Degradation zu. Zusätzlich können zytoplasmatische Phosphatasen aktivierte Janus-Kinasen und Rezeptorketten dephosphorylieren und auf diesem Weg die Signaltransduktion zum Erliegen bringen.

Die dritte Gruppe negativer STAT-Regulatoren stellen SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signaling*) dar. Deren Expression ist STAT-abhängig, sodass bei anhaltender JAK/STAT-Signaltransduktion die SOCS-Proteinspiegel in der Zelle kontinuierlich ansteigen. SOCS-Proteine inhibieren in einer negativen Rückkopplung die Zytokin-vermittelte JAK/STAT-Signaltransduktion auf unterschiedlichen Ebenen. Neben der direkten Erkennung und Ubiquitinierung von Janus-Kinasen durch SOCS-1, bindet CIS direkt an phos-

phorylierte Rezeptorketten und vermittelt auf diesem Weg die Maskierung von potenziellen Bindungsstellen [ALEXANDER *et al.*, 2004].

1.2.4 STAT-Proteine in der Tumorgenese

Die Aktivierung von STAT-Proteinen durch extrazelluläre Signalmoleküle stellt in normal proliferierenden Zellen einen transienten und streng regulierten Prozess dar. In vielen Primärtumoren und daraus abgeleiteten Tumorzelllinien ist diese stringente Regulation jedoch nicht mehr gegeben.

STAT-Proteine mit konstitutiver Aktivität konnten in einer Reihe von Primärtumoren des blutbildenden Systems (Leukämien, Lymphomen, multiple Myelome) sowie soliden Neoplasmen (Kopf, Nacken, Brust, Hirn, Pankreas, Lunge, Prostata) detektiert werden [CHAN *et al.*, 2004; XI *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2003; BARTON *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2003; STERNBERG *et al.*, 2004; CLEVENGER *et al.*, 2004; MITCHELL *et al.*, 2005]. Besonders die konstitutiv-aktiven Formen von STAT3 und STAT5 weisen ein transformierendes Potenzial auf, da ihre Aktivität stark mit einer Tumorentwicklung assoziiert wird [BOWMAN *et al.*, 2000]. Im Gegensatz dazu stellt STAT1 einen Tumorsuppressor dar, da dessen Aktivität vor allem eine Inhibition der Proliferation vermittelt [DURBIN *et al.*, 1996].

Aberrante Fusionsproteine mit einer konstitutiven Tyrosinkinaseaktivität, wie BCR-ABL oder TEL-JAK2, oder onkogene Vertreter der SRC-Tyrosinkinasen und deren verwandte Kinasen, wie z.B. v-SRC, LCK, c-FES, stellen potente Möglichkeiten für eine permanente Aktivierung von STAT-Molekülen dar [GARCIA *et al.*, 1997; LUND *et al.*, 1997; NELSON *et al.*, 1998; YU *et al.*, 1997]. Die Expression von TEL-JAK2 in hämatopoetischen Zelllinien bewirkt die konstitutive Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 und induziert das faktorunabhängige Wachstum dieser Zellen [SCHWALLER *et al.*, 1998]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass LCK die konstitutive Aktivierung von STAT1 und STAT3 induziert [LUND *et al.*, 1997].

Die Bedeutung von STAT-Proteinen für die Tumorgenese von Zellen liegt in der Vielzahl an Genen begründet, die durch diese Moleküle transkriptionell reguliert werden. STAT-Moleküle modulieren wichtige zelluläre Prozesse, wie z.B. Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese. STAT3 und STAT5 fördern durch die transkriptionelle Aktivierung anti-apoptotischer Gene, wie z.B. BCL_{xL}, MCL-1 und Survivin, das Zellüberleben während die Expression dominant-negativer Formen von STAT3 und STAT5 die Apoptoseinduktion in Magenkrebszellen und Lymphomen vermittelt [DUMON *et al.*, 1999; EPLING-BURNETTE *et al.*, 2001; KANDA *et al.*, 2004].

STAT-Proteine kontrollieren ebenfalls die Expression wichtiger Regulatoren des Zellzyklus. STAT5 induziert die Expression von ZyklinD1 und -D2 [MATSUMURA *et al.*, 1999;

MARTINO *et al.*, 2001] sowie c-MYC [LORD *et al.*, 2000]. Diese Proteine sind für den Eintritt der Zelle in eine neue Teilungsrunde essentiell [LUNDBERG und WEINBERG, 1999].

Zusätzlich vermittelt STAT3, neben der Induktion von Typ-D-Zyklinen, auch die Expression von ZyklinA und CDC25A sowie die transkriptionelle Repression von p27, p21 und p53 [FUKADA *et al.*, 1998]. Letztere stellen negative Regulatoren der Zellproliferation dar, da deren verstärkte Expression zu einer Arretierung des Zellzyklus führt [SHERR und ROBERTS, 1999].

STAT1 wird als Tumorsuppressor angesehen, da das Protein als pro-apoptotischer Faktor wirkt und in normal proliferierenden Zellen einen Wachstumsstopp vermittelt. STAT1 wird durch die Bindung von Interferonen (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) an die Interferonrezeptoren (IFNAR1/2 bzw. IFNGR1/2) JAK-abhängig aktiviert. In Abhängigkeit des signalisierenden Interferons kommt es zur Homodimerisierung oder zur Heterodimerisierung mit STAT2-Molekülen und zur Expression von ISGs (*interferon stimulated genes*) [DARNELL *et al.*, 1994; BLUYSEN *et al.*, 1996].

Auf noch unbekannte Art und Weise scheinen die pro-proliferativen Eigenschaften von STAT3 und STAT5 über die anti-proliferativen Eigenschaften von STAT1 zu dominieren, da in einigen Tumoren die kooperative Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 beobachtet werden konnte, STAT1 in diesen Tumoren aber nicht in der Lage ist, das onkogene Wachstum der Zellen einzuschränken.

1.2.5 STAT5A und STAT5B

Diese beiden Vertreter der STAT-Proteinfamilie weisen untereinander eine Homologie in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von über 90% auf. Nichtsdestotrotz werden beide Proteine von unterschiedlichen Genen kodiert [MUI *et al.*, 1995], die wahrscheinlich aus einer evolutionären Genduplikation mit anschließender Diversifikation hervorgegangen sind [GRIMLEY *et al.*, 1999]. Die größten Unterschiede sind in den Transaktivierungsdomänen (TAD) beider Proteine vorzufinden. STAT5A- (794 Aminosäuren, 94 kDa) und STAT5B- (783 Aminosäuren, 92 kDa) Moleküle können Homodimere, Heterodimere und Tetramere ausbilden [MORIGGL *et al.*, 2005].

Beide STAT-Proteine werden in nahezu allen Geweben konstitutiv exprimiert und zelltypspezifisch durch eine Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren, wie IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, Erythropoetin, Prolaktin, GM-CSF [AZAM *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1995; GOUILLEUX *et al.*, 1995; MUI *et al.*, 1995], Thrombopoetin [PALLARD *et al.*, 1995], EGF [RUFF-JAMISON *et al.*, 1995] und PDGF [PAUKKU *et al.*, 2000] aktiviert.

Die Funktion von STAT5A und STAT5B wurde in *knockout*-Mäusen gründlich untersucht. Die dabei gefundenen Auswirkungen waren jedoch nicht so gravierend, wie man auf

Grund der ubiquitären Expression und der Vielzahl an extrazellulären Aktivatoren hätte erwarten können.

Beide Proteine erfüllen unterschiedliche aber auch überlappende Funktionen in der Zelle. Während STAT5A vorwiegend das Wachstum des Brustgewebes in der Schwangerschaft und die Laktogenese steuert, ist STAT5B für den GH-abhängigen (*growth hormone*) Sexualdimorphismus, das Körperwachstum und die Regulation der Genexpression in der Leber verantwortlich [UDY *et al.*, 1997; AKIRA *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 1999]. Eine kooperative Aktivität beider Proteine konnte dagegen bei der Zytokin-abhängigen Proliferation myeloischer 32D-Zellen beobachtet werden [ILARIA *et al.*, 1999].

STAT5-Proteine unterliegen mannigfaltiger Modifikation. Dabei beeinflussen in erster Linie zusätzliche Phosphorylierungen und proteolytische Prozessierung die Eigenschaften beider Proteine. Prolaktin induziert die Phosphorylierung von konservierten Serinresten (STAT5A: Ser-725 und STAT5B: Ser-730) innerhalb einer PSP- (Prolin-Serin-Prolin) Sequenz der Moleküle [YAMASHITA *et al.*, 1998]. Zusätzlich wurden Serin-127, Serin-128 und Serin-779 in STAT5A [PIRCHER *et al.*, 1999; BEUVINK *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2004] sowie Y-724, Y-739 und Y-742 in STAT5B [WEAVER *et al.*, 2006; KLOTH *et al.*, 2002] als Phosphorylierungsstellen identifiziert. Dabei scheint die hohe Variabilität im Phosphorylierungsmuster von STAT5 eine wichtige Rolle für die promotor-spezifische Rekrutierung aktivatorischer oder repressorischer Transkriptionsproteine zu spielen [PARK *et al.*, 2001].

Verschiedene C-terminal verkürzte STAT5-Varianten konnten bis heute identifiziert werden. Sie können in der Zelle durch alternatives Spleißen (STAT5 β) oder proteolytischen Verdau (STAT5 γ) entstehen. Beide Varianten unterscheiden sich im Umfang der C-terminalen Verkürzung. Verkürzte STAT5-Varianten lokalisieren bevorzugt in den Zellkern und aktivieren, im Vergleich zum nicht verkürzten STAT5 α Protein, lediglich einen marginalen Anteil an Zielgenen [MARITANO *et al.*, 2004; HOEY *et al.*, 2003]. Mit Cathepsin-G und Calpain konnten zwei STAT5-spezifische Proteasen identifiziert werden [SCHUSTER *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2003; ODA *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 1999].

Verkürzte STAT-Varianten scheinen für die Pathologie der AML und dem T-Zell-Lymphom eine wichtige Rolle zu spielen. In AML-Blasten konnten bei über 80% der untersuchten Zellen verkürzte Formen von STAT3 und STAT5 nachgewiesen werden. Bei lediglich 20% – 30% der AML-Blasten erfolgte die Aktivierung des nicht verkürzten STAT-Moleküls [XIA *et al.*, 1998]. Verkürzte STAT5-Varianten könnten leukämischen Zellen somit einen Überlebensvorteil verschaffen, indem sie die Differenzierung der Zellen verhindern oder das Überleben der Zellen fördern [PIAZZA *et al.*, 2000; BOVOLENTA *et al.*, 1998]. Gestützt wird diese Annahme durch Beobachtungen bei der transgenen Expression einer spaltungs-

resistenten STAT5-Variante. Diese fördert die Induktion von Apoptose und Differenzierung in myeloischen Vorläuferzellen [PIAZZA *et al.*, 2000].

1.2.6 Der Einfluss von BCR-ABL auf STAT5

STAT5 wird durch onkogene Tyrosinkinase, wie z.B. v-ABL, konstitutiv aktiviert. Dieser Vorgang scheint abhängig von Janus-Kinasen zu sein. Tatsächlich zeigen JAK1 und JAK3 in v-ABL-exprimierenden Zellen eine konstitutive Aktivität und es konnte eine direkte physiologische Assoziation zwischen v-ABL und JAK1 in diesen Zellen beobachtet werden [DANIAL *et al.*, 1995 und 1998]. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Ergebnisse bei der Expression von dominant-negativen JAK1-Proteinen in v-ABL-transformierten Zellen. Diese Zellen sind weder zum faktorunabhängigen Wachstum, noch zur Induktion eines Tumors in der Maus fähig. Im Gegensatz dazu ist BCR-ABL auch in der Abwesenheit konstitutiver JAK-Aktivität zur permanenten STAT5-Phosphorylierung in der Lage [CARLESSO *et al.*, 1996; ILARIA und VAN ETTEN *et al.*, 1996; SHUAI *et al.*, 1996; KLEJMAN *et al.*, 2002], was auf alternative Aktivierungsmechanismen von STAT5 durch BCR-ABL schließen lässt. Tatsächlich scheint zwischen beiden Proteinen ein physiologischer Kontakt zu bestehen, der über die SH2- und SH3-Domänen in BCR-ABL und Mitgliedern der SRC-Kinasen (LCK, HCK) vermittelt wird [NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 1999; KLEJMAN *et al.*, 2002] (Abbildung 1.3).

Die Wichtigkeit von STAT5 in der p210^{BCR-ABL}-vermittelten Tumorgenese konnte durch dominant-negative (STAT5A Δ 749) und konstitutiv-aktive STAT5- (STAT5A/B1*6, cS5F) Proteine veranschaulicht werden [NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 1999; DE GROOT *et al.*, 1999; ONISHI *et al.*, 1998]. Letztere zeigen bei ihrer artifiziellen Expression in Zelllinien eine konstitutive Phosphorylierung des kritischen Tyrosinrests und eine permanente DNA-Bindungsaktivität [ONISHI *et al.*, 1998]. Die Expression von STAT5A1*6 induziert in der Maus eine schwere myeloproliferative Erkrankung, während die cS5F-Mutante in der Lage ist, multiple Leukämien auszulösen. Ferner vermag die cS5F-Variante, den Phänotyp von STAT5A/B-*knockout*-Mäusen zu revertieren [ONISHI *et al.*, 1998; MORIGGL *et al.*, 2005].

Im Gegensatz zu seiner klassischen Funktion als Transkriptionsfaktor konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass konstitutiv-aktive STAT5- (cS5F) Moleküle verstärkt im Zytoplasma leukämischer Knochenmarkszellen akkumulieren und dort eine physiologische Bindung mit GAB2 und p85 eingehen [HARIR *et al.*, 2007]. Diese Interaktion stimuliert die Aktivierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges, der sich positiv auf das Wachstum und das Überleben der leukämischen Zellen auswirkt [SANTOS *et al.*, 2001; NYGA *et al.*, 2005].

Die p210^{BCR-ABL}-vermittelte Transformation myeloischer Zellen zum Zytokin-unabhängigen Wachstum, scheint zudem von aktiven HCK-Kinasen [LIONBERGER *et al.*, 2000] abhängig zu sein. HCK stellt ein Familienmitglied der SRC-Kinasen dar und wird ausschließlich in myeloischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert [ABRAM *et al.*, 2000]. Multiple Domänen im Onkoprotein können mit HCK interagieren und die Kinase aktivieren [DANHAUSER-RIEDL *et al.*, 1996]. Zellen, die eine konstitutiv-aktive HCK-Kinase exprimieren, bilden Podosomen aus. Dabei handelt es sich um zytoplasmatische, aktinreiche Strukturen, die an der Zellwanderung beteiligt sind. Ergänzend zu den Beobachtungen von HARIR *et al.*, konnte auch in diesen Zellen eine verstärkte Lokalisation aktivierter STAT5-Moleküle in podosomal Strukturen gezeigt werden [POINCLOUX *et al.*, 2007], was die Schlussfolgerung nahe legt, dass STAT5 neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor auch redundante Aufgaben außerhalb des Zellkerns erfüllt.

1.2.7 RNA-Interferenz (RNAi) als Werkzeug für die Modulation endogener Zielstrukturen

Der Mechanismus einer genspezifischen, post-transkriptionellen Regulation der Genexpression durch doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) wurde erstmals durch FIRE und MELLO (1998) bei Studien an niederen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Injektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) eine Inhibition der Expression von Genen zur Folge hat, deren mRNA komplementär zur injizierten dsRNA ist. Dieser Mechanismus wurde im Folgenden als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Bereits einige Jahre davor konnte JORGENSEN (1990) einen ähnlichen Mechanismus in Pflanzen beschreiben, wobei durch die Einführung transgener DNA in Petunienzellen, nicht nur die Expression des Transgens, sondern auch die Expression der endogenen Gen-Loci durch eine Methylierung der entsprechenden DNA-Bereiche inhibitorisch affektiert wurde. Dieses als Co-Suppression bezeichnete Phänomen kann sowohl durch hoch-exprimierte *single-copy* Transgene als auch durch Transgene, die mehrfach in das Pflanzengenom integriert haben, induziert werden [JORGENSEN *et al.*, 1996].

Die Degradation viraler RNAs nach einer Infektion von Pflanzenzellen mit RNA-Viren und die Induktion einer Suppression endogener Gene bei der viralen Expression ihrer homologen Sequenzen stärkten die Vermutung, dass es sich bei der Co-Suppression um einen RNA-vermittelten Prozess handeln müsse [RUIZ *et al.*, 1998; ANGELL *et al.*, 1997]. Analog zu der in Nematoden, Fruchtfliegen, Zebrafischen und Säugetieren beobachteten RNAi, geht man daher auch bei der Co-Suppression in Pflanzen von einem post-transkriptional regulierten, dsRNA-abhängigen Mechanismus aus [MONTGOMERY und FIRE, 1998].

Ein spezieübergreifendes Vorkommen von *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) lässt hierbei einen uralten Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Integrität

gegenüber viralen Infektionen und der Akkumulation mobiler DNA-Elemente, wie z.B. Transposons, vermuten. Tatsächlich konnte in RNAi-defizienten Nematoden von *C. elegans* eine erhöhte Mobilität von endogenen Transposons beobachtet werden [TABARA *et al.*, 1999; KETTING *et al.*, 1999]. Ferner spielt das PTGS eine bedeutende Rolle bei der transkriptionellen Regulation endogener Gene durch mikroRNAs (miRNAs). Mutationen in RNAi-relevanten Proteinen, wie z.B. den Argonaut-Proteinen, können daher schwere und mitunter tödliche Defekte bei dem Wachstum und der Entwicklung von Zellen zur Folge haben [STEFANI und SLACK, 2008].

In Zellen niederer Organismen wie *C. elegans* ermöglicht der Mechanismus der RNAi bereits genomweite, funktionelle Genanalysen [KAMATH und AHRINGER, 2003]. Dagegen ist die Expression von dsRNAs (insbesondere langer dsRNAs) in Säugetierzellen durch die Induktion des Interferonsystems und die Aktivierung der Proteinkinase-R (PKR) limitiert. Letztere induziert durch die Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors-2 α (eIF-2 α) die unspezifische Arretierung der mRNA-Translation [GIL und ESTEBAN, 2000]. Diese unspezifische Inhibition der Translation kann jedoch durch die Expression von *small-interfering* RNAs (siRNAs) umgangen werden. Diese 21 - 23 Nukleotide (nt) langen dsRNA-Moleküle können entweder als Intermediate durch die Spaltung längerer dsRNA-Moleküle durch die Ribonuklease „Dicer“ entstehen, oder direkt als siRNA synthetisch hergestellt und appliziert werden. [ELBASHIR *et al.*, 2001] (Abbildung 1.4).

Im Gegensatz zu Nematoden und Pflanzen besitzen Säugetierzellen keinen endogenen Mechanismus für die Amplifizierung von dsRNA, d.h die RNAi bleibt transient und zellständig lokalisiert. Eine stabile Suppression von Zielgenen in Säugetierzellen konnte jedoch erfolgreich durch die virale Expression von *small-hairpin* RNAs (shRNAs) gezeigt werden [BRUMMELKAMP *et al.*, 2002; PADDISON *et al.*, 2002; SCHERR *et al.*, 2003]. In diesen Systemen erfolgt die intrazelluläre Transkription der shRNAs unter der Kontrolle von Polymerase III-Promotoren (wie z.B. U6-, H1-Promotor). Selbstkomplementäre shRNAs bilden dabei über einen Loop verbundene Hairpin-Strukturen aus und werden in funktionell aktive siRNAs prozessiert. Die intrazelluläre sh/siRNA-Expression ermöglicht somit deren stabile Expression durch viralen Gentransfer.

Bei dem RNAi-Mechanismus handelt es sich um einen evolutionär hoch konservierten Mechanismus der sequenzspezifischen, post-transkriptionellen Inhibition der Genexpression durch dsRNA-Moleküle. Wie in Abbildung 1.4 dargestellt, können hierbei dsRNA-Moleküle, shRNAs oder miRNAs eine Aktivierung von RNAi auslösen. MiRNAs werden unter der Kontrolle von Polymerase II-Promotoren als lange polyadenylierte RNAs (pri-miRNAs) transkribiert. Pri-miRNAs formen eine komplexe Sekundärstruktur und Bereiche, welche die „reifen“ miRNA-Sequenzen tragen, bilden doppelsträngige RNA-Haarnadelschleifen aus.

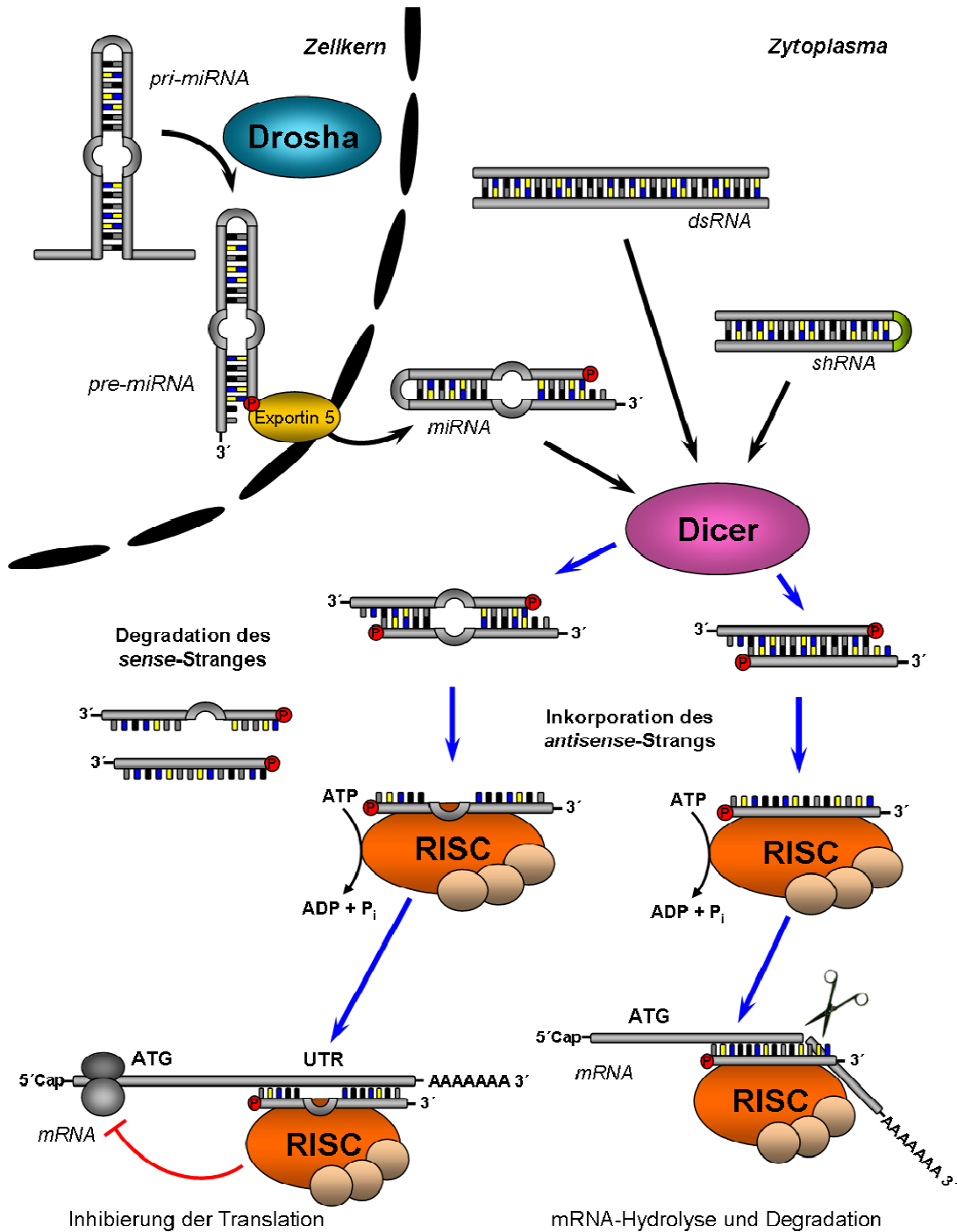


Abb. 1.4: Mechanismus der RNAi. Doppelsträngige RNAs (dsRNAs) sind die Voraussetzung für die Aktivierung der RNA-Interferenz. Endogene miRNAs werden als *pri-miRNA* exprimiert und durch "Drosha" in *pre-miRNAs* prozessiert. Diese werden durch Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert. Alternativ können applizierte siRNAs, transgen-exprimierte shRNAs oder dsRNAs infolge einer viralen Infektion den RNAi-Mechanismus aktivieren. DsRNA wird durch die Ribonuklease "Dicer" in kleine siRNAs prozessiert. Diese siRNAs werden in den RISC-Komplex inkorporiert und durch eine Helikase entwunden. Während der *sense*-Strang den RISC-Komplex verlässt und abgebaut wird, verbleibt der *antisense*-Strang im Proteinkomplex. Kommt es zu einer vollständigen, komplementären Bindung wird das mRNA-Molekül hydrolytisch gespalten und die Spaltprodukte durch Nukleasen abgebaut. Im Gegensatz dazu wird im Falle einer unvollständigen Bindung einer miRNA an die untranslatierten Bereiche (UTR) einer mRNA die Proteintranslation gehemmt.

Im Kern wird die pri-miRNA von einem Komplex, der das RNase III Enzym "Drosha" beinhaltet, in einen 70 - 90 Nukleotide (nt) großen pre-miRNA-Vorläufer mit einem 2 nt 3'-Überhang gespalten. Dieser Überhang und ein ausreichend großer Bereich an doppelsträngiger RNA sind die Voraussetzungen für den nukleären Export der Moleküle durch den Transportfaktor Exportin-5. Pre-miRNA, dsRNAs oder shRNAs werden im Zytoplasma durch "Dicer", eine dsRNA-spezifische RNase, zu siRNAs prozessiert. Diese 21 - 23 Nukleotide langen dsRNA-Moleküle besitzen 2 nt lange 3'-Überhänge und sind am 5'-Ende phosphoryliert. SiRNAs werden von einem Multiproteinkomplex, dem RNA-*induced silencing complex* (RISC), inkorporiert [TOMARI *et al.*, 2004]. Die Entwindung der siRNA erfolgt unter der Hydrolyse von ATP durch eine Helikase [NYKANEN *et al.*, 2001]. Während der thermodynamisch stabilere *antisense*-Strang am RISC-Komplex verbleibt, wird der *sense*-Strang freigegeben und anschließend degradiert [WANG *et al.*, 2008].

Über den *antisense*-Strang sucht der RISC-Komplex nach komplementären Bereichen auf *messengerRNAs* (mRNAs) [KHVOROVA *et al.*, 2003]. Konnte eine vollständige Basenpaarung zwischen dem RISC-Komplex und seiner Ziel-mRNA ausgebildet werden, wird diese an einer einzigen Position (10 nt vom 5'-Ende der siRNA entfernt) gespalten und die Spaltprodukte anschließend durch Nukleasen degradiert [ELBASHIR *et al.*, 2001; MACRAE *et al.*, 2006]. Bei einer unvollständigen Hybridisierung zwischen dem RISC-Komplex und der 3'-UTR der Ziel-mRNA, wie sie im Falle von geladenen miRNAs in den RISC-Komplex beobachtet wird, kommt es hingegen zu einer Inhibition der Translation auf der Ebene der Elongation u/o Termination [HUTVÁGNER und ZAMORE, 2002] (Abbildung 1.4). Die Fähigkeit einer einzelnen miRNA unvollständige Basenpaarungen zu mehreren endogenen Ziel-mRNAs auszubilden, ermöglicht über den RNAi-Mechanismus auch die intrazelluläre Modulation ganzer Signalkaskaden.

1.2.8 p210^{BCR-ABL}-Modellsysteme

In unterschiedlichen experimentellen Modellen ist das p210^{BCR-ABL}-Onkoprotein für die Transformation hämatopoetischer Zellen notwendig und hinreichend [KLUCHER *et al.*, 1998; HUETTNER *et al.*, 2000]. Dementsprechend wurden verschiedene Maus- und Zellkulturmodelle mit einer konstitutiven oder konditionellen p210^{BCR-ABL}-Expression etabliert, um stromabwärts gelegene Signalmoleküle oder für die Transformation essentielle Kofaktoren zu identifizieren.

Während eine konstitutive Expression von p210^{BCR-ABL} embryonal letal ist [HEISTERKAMP *et al.*, 1991], kann eine induzierte oder zelltypspezifische Expression des Onkoproteins im Mausmodell etabliert werden [HONDA *et al.*, 1995 und 1998]. Dabei vermittelt die Expression von p210^{BCR-ABL} in Knochenmarkszellen der Maus bevorzugt B-lymphatische akute Leukämien (B-ALL) und kein myeloproliferatives Syndrom im Sinne der chronischen

Phase einer CML. [CASTELLANOS *et al.*, 1997; HUETTNER *et al.*, 2000]. Die Gründe hierfür sind derzeit nicht vollständig verstanden. Zusätzlich ist die Expression des Onkoproteins für die Aufrechterhaltung der Leukämie erforderlich, da in einem Mausmodell mit induzierbarer Expression von BCR-ABL ein Abschalten der p210^{BCR-ABL}-Expression auch in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung die Reversion des leukämischen Phänotyps vermittelt [HUETTNER *et al.*, 2000].

Auch in Zellkulturmodellen ist eine konditionelle Expression von p210^{BCR-ABL} möglich. So wurden z.B. durch KLUCHER und Kollegen Zytokin-abhängig (IL-3) proliferierende, lymphatische Ba/F3-Zellen mit der p210-Variante von BCR-ABL unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-abhängigen Promotors generiert. In diesen Zellen (TetonBa/F3-p210^{BCR-ABL} = TonB) ermöglicht die Expression von p210^{BCR-ABL} die IL-3-unabhängige Zellproliferation und erlaubt damit eine differentielle Analyse von Zytokin- bzw. Onkoprotein-abhängigen Signalmechanismen im gleichen genetischen Hintergrund [KLUCHER *et al.*, 1998].

Leider sind (lymphatische) TonB-Zellen nur eingeschränkt mit primären, p210^{BCR-ABL}-positiven (myeloischen) CML-Zellen vergleichbar. So lassen sich primäre CML-Zellen trotz konstitutiver p210^{BCR-ABL}-Expression beispielsweise nicht über einen längeren Zeitraum *ex-vivo* kultivieren, bleiben Zytokin-abhängig für Proliferation und Überleben, und sind nicht wesentlich in ihrer Differenzierung blockiert.

Auf der Suche nach Kofaktoren für die p210^{BCR-ABL}-abhängige Transformation wurde in TonB-Zellen die Funktion einer Reihe von Signalmolekülen mittels RNAi in der Anwesenheit von IL-3 (physiologische Proliferation) bzw. BCR-ABL (onkogene Proliferation) analysiert. Unter reduzierter Expression von STAT5 waren p210^{BCR-ABL}-exprimierende TonB-Zellen deutlich stärker in Proliferation und Überleben beeinträchtigt als unter Anwesenheit von IL-3. Da ähnliche Effekte auch in primären, p210^{BCR-ABL}-positiven CD34⁺-CML-Zellen beobachtet wurden, ist zu vermuten, dass STAT5 für die p210^{BCR-ABL}-vermittelte Transformation sowohl im Zellkulturmodell als auch in primären CML-Zellen eine besondere Rolle spielt [SCHERR *et al.*, 2006].

1.3 Zielsetzung

Auf der Grundlage der oben beschriebenen erhöhten Empfindlichkeit p210^{BCR-ABL}-positiver Zellen gegenüber einer RNAi-vermittelten Reduktion des Transkriptionsfaktors STAT5 [SCHERR *et al.*, 2006] sollen im Rahmen dieser Arbeit die diesem Effekt zugrunde liegenden molekularen Mechanismen näher charakterisiert werden. Dazu werden p210^{BCR-ABL}-abhängige Modifikationen von STAT5 und ihre funktionellen Effekte im TonB-Zellkultursystem untersucht [KLUCHER *et al.*, 1998].

Im Einzelnen werden folgende Aspekte bearbeitet:

1. Entwicklung von Isoform-spezifischen shRNAs gegen STAT5A und STAT5B und Untersuchung eines differentiellen Einflusses von STAT5A und STAT5B auf das Wachstum und Überleben von TonB-Zellen in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL.
2. Analyse der Phosphorylierungsmuster von STAT5-Proteinen in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL.
3. Analyse der intrazellulären Lokalisation von STAT5A und STAT5B in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL.
4. Analyse der Funktion differentieller STAT5-Phosphorylierungsmuster durch die Expression geeigneter Mutanten in TonB-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Analysenwaagen | Sartorius, BL150S Sartorius, BL3100 |
| Autoklav | Getinge, Rastatt Systec, V95 |
| Bakterienschüttler | Gerhardt, Thermoshake |
| Blotapparaturen | Bio-Rad, Trans-Blot Cell Invitrogen, XCell II Blot Module |
| Elektrophorese-Apparaturen für DNA | MHH Forschungswerkstätten |
| Elektrophorese-Apparaturen für Protein | Bio-Rad, Mini-Protean II Cell Bio-Rad, Protean II xi Cell Invitrogen, Xcell SureLock Electrophoresis Cell |
| Elektroporator | Bio-Rad, Gene Pulser (prokaryontisch) Bio-Rad, Pulse Controller Fischer, EPI 2500 (eukaryontisch) |
| Durchflusszytometrie | Becton Dickinson, FACSAria Becton Dickinson, FACSCalibur |
| Fluoreszenzmikroskop | Nikon, Nikon Eclipse TE 300 |
| Geldokumentationsystem | Syngen, G:BOX |
| Heizblöcke | ABiMED, Digital Dry Bath Kleinfeld, Blockthermostat BT100 |
| <i>Imaging</i> -System | Bio-Rad, VersaDoc-4000MP |
| Inkubatoren für Bakterien- und Zellkultur | Omnilab, Memmert ICP Heraeus, BBD 6220 Heraeus, 6000 |
| Kühlschränke | Liebherr, Premium Siemens, Kombifrost |
| Kühlzentrifugen | Beckman, J2-MC Centrifuge Beckman, GS-6KR Centrifuge Eppendorf, Centrifuge 5417R Heraeus, Fresco 17 Centrifuge Heraeus, Megafuge 1.0R Heraeus, Multifuge 3SR+ Centrifuge |
| Laserscanning-Mikroskop | Leica, Leica TCS SP2 |
| Laborschüttler | Heidolph, Polymax 2040 IKA, MTS 2 |
| Lichtmikroskope | Carl Zeiss, Axiovert 25 Olympus, CK2 |
| Magnetrührer | Heidolph, MR2002 |

| | |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Netzgeräte | Amersham Pharmacia, EPS 301 Bio-Rad, Power Pac HC Consort, E815 Life Technologies, PS 3002 |
| Neubauer Zellzählkammer | Karl Hecht, Sondheim |
| PCR-Geräte | Biometra, T-Personal Biometra, T1-Thermocycler |
| pH-Messgerät | Sartorius, Basic Meter PB-20 |
| Photometer | Berthold, Mithras LB 940 PEQLab, NanoDrop ND-1000 Pharmacia Biotech, GeneQuant II |
| Pipettierhilfen | Brand, Transferpette-8, 30 – 300µl Gilson, Pipetman 10/20/100/200/1000µl IBS Integra, Pipetboy |
| Quantitative <i>Realtime</i> -PCR | Applied Biosystems, 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems, StepOne-Plus |
| Sequenzierapparat | Applied Biosystems, ABIPrism 310 Genetic Analyzer |
| Sterilwerkbänke | Heraeus, HERAsafe |
| Thermomixer | Eppendorf, Thermomixer comfort |
| Tiefkühltruhen | Liebherr, Premium + Premium no frost Nuaire, –85 Ultralow Freezer NU6514E |
| Tischzentrifugen | Eppendorf, Centrifuge 5415D Heraeus, Biofuge 13 |
| Trockensterilisator | Heraeus, Kelvitron t |
| Ultrazentrifuge | Beckman, Optima LE-80K |
| UV-Tische | UVP Inc., UV-Transilluminator |
| Vakuumentrifuge | Bachofer, Speed Vac Concentrator |
| Vortexer | Scientific Industries, Vortex Genie 2 Heidolph, REAX top |
| Wasseraufbereitung | Seral-Reinstwassersysteme Ransbach-Baumbach |
| Wasserbäder | BLB-Braunschweiger Laborbedarf, Burgwedel |
| X-Ray-Film Entwickler | Protec Medizintechnik, Optimax K72 |
| Zellzähler | Beckman Coulter, Coulter A ^C *T8 |

2.1.2 Chemikalien

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Agarose LE | Biozym, Hess. Oldendorf, D |
| Aluminiumsulfat-18-hydrat | Merck, Darmstadt, D |
| Ammoniumsulfat | Sigma-Aldrich, München, D |
| Ammoniumpersulfat (APS) | GibcoBRL, Eggenstein, D |
| [bis(2-Hydroxyethyl)imino]-tris(hydroxymethyl)methan (bis-Tris) | Calbiochem, La Jolla, CA |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg, D |
| Borsäure | Fluka, Steinheim, D |
| Chloroform | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Chloroquine | Sigma-Aldrich, München, D |

| | |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Coomassie-BrilliantBlue R-250 | Merck, Darmstadt, D |
| Coomassie-BrilliantBlue G-250 | Merck, Darmstadt, D |
| 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) | Roche, Mannheim, D |
| 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)oktan (DABCO) | Roth, Karlsruhe, D |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck, Darmstadt, D |
| Di-Natriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt, D |
| Dithiotreithol (DTT) | Sigma-Aldrich, München, D |
| EDTA (ultra Pure, 500 mM, pH=8,0) | GibcoBRL, Eggenstein, D |
| Essigsäure (Eisessig) | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Ethanol | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg, D |
| Glyzerin | Merck, Darmstadt, D |
| Glykogen | Roche, Mannheim, D |
| HEPES | Sigma-Aldrich, München, D |
| Isopropanol | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt, D |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt, D |
| Kalziumchlorid | Sigma-Aldrich, München, D |
| Magermilchpulver | Merck, Darmstadt, D |
| Methanol | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Morpholinoethansulfonsäure-Natriumsalz (MES) | Sigma-Aldrich, München, D |
| Morpholinopropansulfonsäure-Natriumsalz (MOPS) | Calbiochem, La Jolla, CA |
| Mowiol 4-88 | Roth, Karlsruhe, D |
| Natriumazetat | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumazid | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumbutyrat | Millipore, Molsheim, D |
| Natriumchlorid | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Natriumfluorid | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumorthovanadat | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumdeoxycholat | Sigma-Aldrich, München, D |
| Orange G | Sigma-Aldrich, München, D |
| Propidiumjodid | Vysis, Stuttgart, D |
| Saponin | Fluka, Steinheim, D |
| SDS (10%ige (w/v) Lösung) | GibcoBRL, Eggenstein, D |
| Tetra-Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) | Merck, Darmstadt, D |
| Trypanblau | Merck, Darmstadt, D |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Merck, Darmstadt, D |

| | |
|-----------------------------------------------|---------------------------|
| Tricine Ultrol Grade | Calbiochem, La Jolla, CA |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) | Merck, Darmstadt, D |
| Tris (1M Gebrauchslösung, pH 7,5 bzw. pH 8,0) | GibcoBRL, Eggenstein, D |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, München, D |
| Tween-20 | Merck, Darmstadt, D |

2.1.3 Verbrauchsmaterial

| | |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 96-Loch Optische Reaktionsplatte | Applied Biosystems, Foster city, CA, USA |
| 5ml-Rundboden-FACS-Röhrchen | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| AGFA Cronex 5, Medical X-Ray Film | AGFA, Mortsel, BE |
| Bacillol AF | Bode Chemie, Hamburg, D |
| Bacillol Plus | Bode Chemie, Hamburg, D |
| Baktolin | Bode Chemie, Hamburg, D |
| Deckgläschen | Roth, Karlsruhe, D |
| Einmalpipetten | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Eppendorf Combitip Plus 10 ml | Eppendorf, Hamburg, D |
| Falconröhrchen (15 ml und 50 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen, D |
| Gel-Kassetten und Gel-Kämme 1.0 mm | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Handschuhe | Hartmann, Heidenheim, D und Kimberly-Clark, Zaventem, BE |
| Kanülen | Braun, Melsungen, D |
| Kryoröhrchen | Nunc, Wiesbaden, D |
| Küvetten | Biozym, Hess. Oldendorf, D |
| Mikrozentrifugenröhrchen | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| NuPage 4-12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm x 10 well | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Petrischalen | Sarstedt, Nümbrecht, D |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nümbrecht, D und Greiner Bio-One, Frickenhausen, D |
| Objektträger | Knittel-Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, D |
| Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml) | Sarstedt, Nümbrecht, D und Eppendorf, Hamburg, D |
| Spritzen | Braun, Melsungen, D |
| Sterilfilter Millex-HV, 0,45 µm | Millipore, Carrigtwahill, IE |
| Whatman-3MM-Papier | Whatman, Dassel, D |
| Zellkulturflaschen | Greiner Bio-One, Frickenhausen, D |
| Zellkulturplatten | Nunc, Wiesbaden, D |

2.1.4 Transfermembranen

Optitran BA-S 83, verstärkte Nitrocellulose Whatman, Dassel, D

2.1.5 Molekulargewichts- und Längenstandards

DNA Molecular Weight Marker I-VIII Roche, Mannheim, D

Precision Plus Protein Standards - All Blue Bio-Rad, München, D

Precision Plus Protein Standards - Dual Color Bio-Rad, München, D

2.1.6 Komplexe Reagenzien und Reaktions-Sets ("Kits")

Acrylamide/Bis-Solution, 19:1, 40% Bio-Rad, München, D

Acrylamide/Bis-Solution, 29:1, 30% Bio-Rad, München, D

BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit Applied Biosystems, Foster city, CA, USA

Biocoll Separating Solution, Density 1,077 g/ml Biochrome, Berlin, D

Bio-Rad Bradford Protein Assay Bio-Rad, München, D

Dye Ex 2.0 Spin Kit QIAGEN, Hilden, D

ECL Western Blotting Detection Reagents GE Healthcare, München, D

ECL Advance Western Blotting Detection Kit GE Healthcare, München, D

FuGENE-6 Transfection Reagent Roche, Mannheim, D

Hi-Di Formamide Applied Biosystems, Foster city, CA, USA

NuPage LDS Sample Buffer (4x) Invitrogen, Karlsruhe, D

NuPage MES-SDS Running Buffer (20x) Invitrogen, Karlsruhe, D

NuPage Sample Reducing Agent (10x) Invitrogen, Karlsruhe, D

peqGOLD Plasmid Miniprep Kit peqLab, Erlangen, D

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) Invitrogen, Karlsruhe, D

Power SYBR®Green PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster city, CA, USA

Protein A/G PLUS-Agarose Santa Cruz, Heidelberg, D

QIAamp DNA Blood Mini Kit QIAGEN, Hilden, D

QIAGEN Plasmid Maxi Kit QIAGEN, Hilden, D

QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN, Hilden, D

QIAquick Nucleotide Removal Kit QIAGEN, Hilden, D

QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN, Hilden, D

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Stratagene, La Jolla, CA

Re-Blot Plus Mild Solution (10x) Chemicon, Hofheim, D

SilverSnap Stain Kit II Pierce, Rockford, IL

TaqMAN Universal PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster city, CA, USA

Trizol UltraPure Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.7 Enzyme und Fertigpuffer für enzymatische Reaktionen

| | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| BigDye Sequencing Buffer (5x) | Applied Biosystems, Foster city, CA, USA |
| Bovine Alkalische Phosphatase (1 U/μl) | Roche, Mannheim, D |
| Bovine Serum Albumin (100x) | New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA |
| Desoxy-Nukleotid-Triphosphate (100 mM) | Roche, Mannheim, D |
| DNaseI (10 U/μl) | Roche, Mannheim, D |
| Klenow-Enzym (2 U/μl) | Roche, Mannheim, D |
| M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl) | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Pfu Ultra HF DNA Polymerase (2,5 U/μl) | Stratagene, Waldbronn, D |
| Pfu Ultra HF DNA Polymerase-Puffer (10x) | Stratagene, Waldbronn, D |
| Random Hexamer Primer pd(N) ₆ (100 pmol/μl) | GE Healthcare, München, D |
| Restriktionsendonukleasen | New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA |
| Restriktionspuffer 1 – 4 (10x) | New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA |
| Reverse Transkription First Strand Buffer (5x) | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| RNaseA (50 mg/ml) | Roche, Mannheim, D |
| RNasin (40 U/μl) | Promega, Mannheim, D |
| T4-DNA Ligase (400 U/μl bzw. 2000 U/μl) | New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA |
| T4-DNA Ligase-Puffer | New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA |
| T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl) | New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA |
| T4-Polynukleotidkinase-Puffer (10x) | New England-BioLabs, Ipswich, MA, USA |

2.1.8 Plasmide

| Konstrukt | Abkürzung | Verfügbarkeit / Referenz |
|--------------------------|-------------|---------------------------------|
| pCMVΔR8.91 | pCMV | ZUFFERY <i>et al.</i> |
| pdch1-GL2-SR | pSR-GL2 | SCHERR <i>et al.</i> |
| pdch1-shSTAT5A/B-1151-SR | pSR-shS5A/B | SCHERR <i>et al.</i> |
| pdch1-shSTAT5A-SR | pSR-shS5A | Schaller-Schönitz, diese Arbeit |
| pdch1-shSTAT5B-SR | pSR-shS5B | Schaller-Schönitz, diese Arbeit |
| pHR-SIN-SIEW-SnaBI | pSIEW-SnaBI | SCHERR <i>et al.</i> |
| pHR-SIN-SR-SnaBI | pSR-SnaBI | SCHERR <i>et al.</i> |
| pMD.G | - | ORY <i>et al.</i> |
| pS_STAT5AeGFP | pS_S5AeGFP | Schaller-Schönitz, diese Arbeit |
| pS-STAT5A-IEW | pS-S5A-IEW | Schaller-Schönitz, diese Arbeit |
| pSTAT5AeGFP-N1 | pS5AeGFP | DECKER <i>et al.</i> |
| pSuper | - | BRUMMELKAMP <i>et al.</i> |
| pUC19 | - | YANISH-PERRONG <i>et al.</i> |

2.1.9 Oligonukleotide

Die Synthese von Oligonukleotiden für DNA-Sequenzierung und DNA-Mutagenese erfolgte über die Firma BioSpring, Frankfurt am Main, Deutschland. Modifizierte Oligonukleotide

(Sonden) für die quantitative *Realtime*-PCR wurden über Applied Biosystems, Foster city, CA, USA bezogen.

2.1.10 Primer für die Mutagenese von STAT5A

| Primerbezeichnung | Typ | Sequenz |
|---------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| STAT5A-Y682F | vorwärts | 5'- gaggtctttgccaag tttt acactcctgtacttgcg -3' |
| | rückwärts | 5'- cgcaagtacaggagtgta aaa actggcaaagacctc -3' |
| STAT5A-Y683F | vorwärts | 5'- gaggtctttgccaagta ttc actcctgtacttgcg -3' |
| | rückwärts | 5'- cgcaagtacaggagt gaa atactggcaaagacctc -3' |
| STAT5A-Y682/83F | vorwärts | 5'- gaggtctttgccaag ttttc actcctgtacttgcg -3' |
| | rückwärts | 5'- cgcaagtacaggagt gaaaaa actggcaaagacctc -3' |
| STAT5A-694F | vorwärts | 5'- gcagttgacgg tttc gtgaagccacagatcaagc -3' |
| | rückwärts | 5'- gcttgatctgtggcttcac gaa accgtcaactgc -3' |
| STAT5A-shS5A/Bmut ^{*1} | vorwärts | 5'- gaagctgcagcagaccaaga atattttattattcaatat caggagagcctgcggatccaagc -3' |
| | rückwärts | 5'- gcttgatccgcaggctctcctg atattgaataataaaaat tcttgggtctgctgcagctc -3' |
| STAT5A-shS5Amut ^{*2} | vorwärts | 5'- ggaatctgaagccattcact taccgcgcgacttttcaata cg gtccctggccgaccggc -3' |
| | rückwärts | 5'- gccggtcggccaggaccg tattgaaaagtcgaggta gtaatggcttcagattcc -3' |

*1 Mutagenisierung vermittelt eine RNAi-Resistenz gegenüber der H1-shSTAT5A/B-RNA

*2 Mutagenisierung vermittelt eine RNAi-Resistenz gegenüber der H1-shSTAT5A-RNA

2.1.11 Oligonukleotide für die Herstellung STAT5-spezifischer shRNAs

| Primerbezeichnung | Typ | Sequenz |
|-------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| shSTAT5A/B-RNA | vorwärts | 5'- gatccc <i>gtacttcatcatccagtac</i> <u>ttcaagaga</u> <i>gtactgg</i> <i>atgatgaagtac</i> tttttggaag -3' |
| | rückwärts | 5'- tcgacttcaaaaaa <i>gtacttcatcatccagtac</i> <u>tctcttgaa</u> <i>gtactggatgatgaagtac</i> ggg -3' |
| shSTAT5A-RNA | vorwärts | 5'- gatcccc <i>gacgcgagatttctccatt</i> <u>tcaagaga</u> <i>aatgga</i> <i>gaaatctcgcgtc</i> tttttggaag -3' |
| | rückwärts | 5'- tcgacttcaaaaaa <i>gacgcgagatttctccatt</i> <u>tctcttga</u> <i>aatggagaaatctcgcgtc</i> ggg -3' |
| shSTAT5B-RNA | vorwärts | 5'- gatcccc <i>cactagagacttctctatc</i> <u>ttcaagaga</u> <i>gataga</i> <i>gaagtctctagt</i> tttttggaag-3' |
| | rückwärts | 5'- tcgacttcaaaaaa <i>cactagagacttctctatc</i> <u>tctcttgaa</u> <i>gatagagaagtctctagt</i> ggg -3' |

2.1.12 Primer für die Sequenzierung

| Primerbezeichnung | Typ | Sequenz |
|------------------------|----------|------------------------------------|
| GFP-Sequenzierprimer 1 | vorwärts | 5'- ccacctgctggtctcttcacctccgc -3' |
| GFP-Sequenzierprimer 2 | vorwärts | 5'- ggcgacaccctggtgaaccgcatcg -3' |
| H1-Promotor | vorwärts | 5'- gcatgtcgtatgtgttctggga -3' |

| | | |
|---------------------------|----------|--------------------------------------|
| SFFV-Promotor | vorwärts | 5'- agtcacaacccctcactcgg -3' |
| STAT5A-Sequenzierprimer 1 | vorwärts | 5'- gctggtttagtgaaccgtcagatccgc -3' |
| STAT5A-Sequenzierprimer 2 | vorwärts | 5'- ccatggagctggttcgctgtatccgctc -3' |
| STAT5A-Sequenzierprimer 3 | vorwärts | 5'- gctgctgcggaagcagcagaccatc -3' |
| STAT5A-Sequenzierprimer 4 | vorwärts | 5'- catcatcagcagcagcaggccaag -3' |
| STAT5A-Sequenzierprimer 5 | vorwärts | 5'- cgcagctgtggaagcgcctcaacatg -3' |
| STAT5A-Sequenzierprimer 6 | vorwärts | 5'- cctctggaatctgaagccattcacgac -3' |

2.1.13 Sonden und Primer für die quantitative *Realtime*-PCR (TaqMan)

| Bezeichnung | Typ | Sequenz |
|-------------------------|-----------|--------------------------------------------------|
| qRT-STAT5A/B-wt | vorwärts | 5'- acccaagagtacttcatcatccagtac -3' |
| qRT-STAT5A/B-shS5A/Bmut | vorwärts | 5'- agcagaccaagaatattttattatcaatat -3' |
| qRT-STAT5A/B-reverse | rückwärts | 5'- tgcttctcagccagctcca -3' |
| qRT-STAT5A/B-Sonde | Sonde | 5'- FAM -tccagcagaagcaagt- MGB -3' |

Die oben aufgeführten Primer ermöglichen eine simultane Messung von Stat5A und Stat5B in den analysierten Proben (Stat5A/B-Gesamthaushalt) sowie eine Diskriminierung zwischen endogen- und transgen-exprimierten Stat5A, welches eine Resistenz gegen die shSTAT5A/B-RNA aufweist!

2.1.14 Primer für die quantitative *Realtime*-PCR (CYBR®Green)

| Bezeichnung | Typ | Sequenz |
|---------------------|-----------|--------------------------------------|
| qRT-STAT5A/B-wt | vorwärts | 5'- atgatggggctatcctgggt -3' |
| qRT-STAT5A-wt | rückwärts | 5'- cctaatggagaaatctcgcgctc -3' |
| qRT-STAT5A-shS5Amut | rückwärts | 5'- cgtattgaaaagtcgcgggta -3' |
| qRT-STAT5B-wt | rückwärts | 5'- gaccggatagagaagtctctagtggtaa -3' |

Die oben aufgeführten Primer ermöglichen eine Diskriminierung zwischen endogenem Stat5A und Stat5B sowie eine Diskriminierung zwischen endogen- und transgen-exprimierten Stat5A, welches eine Resistenz gegen die shSTAT5A-RNA aufweist!

2.1.15 Antikörper

| Spezifität (Epitop) | Ursprung | Verdünnung | Hersteller |
|----------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|
| Primärantikörper: | | | |
| alpha-Tubulin | Maus (IgG) | 1:1000 | Cell Signaling |
| beta-Aktin | Kanninchen | 1:1000 | Cell Signaling |
| c-Abl (K-12) | Kanninchen | 1:150 | Santa Cruz |
| GFP (FL) | Kanninchen | 1:500 – 1:1000 | Santa Cruz |
| p-Tyr (PY99) | Maus (IgG _{2b}) | 1:100 | Santa Cruz |
| STAT5 (C-17) | Kanninchen | 1:200 | Santa Cruz |
| STAT5 (N-20) | Kanninchen | 1:200 | Santa Cruz |
| STAT5A (L-20) | Kanninchen | 1:200 | Santa Cruz |
| STAT5A | Maus (IgG ₁) | 1:200 | BD Transduction |
| STAT5B (G-2) | Maus (IgG ₁) | 1:100 | Santa Cruz |
| STAT5B | Kanninchen | 1:250 – 1:500 | BD Pharmingen |
| SUMO-1 (FL-10) | Kanninchen | 1:200 | Santa Cruz |
| SUMO-2/3 (FL-103) | Kanninchen | 1:200 | Santa Cruz |
| Ub (FL-76) | Kanninchen | 1:200 | Santa Cruz |
| Sekundärantikörper: | | | |

| | | | |
|------------------------------|-------|---------------|---------------|
| α -Mensch-NGFR-PE | Esel | 1:20 | BD Pharmingen |
| α -Maus-IgG-HRP | Esel | 1:5.000 | Santa Cruz |
| α -Maus-IgM-HRP | Ziege | 1:5.000 | Santa Cruz |
| α -Kanninchen-IgG-HRP | Esel | 1:15:000 | Santa Cruz |
| α -Kanninchen-FITC | Esel | 1:200 – 1:400 | Dianova |

2.1.16 Medien und Medienzusätze für die Bakterienkultur

| | | |
|---------------|---------------------------------------------|---------------------------|
| Ampicillin | <u>SL</u> : 100 mg/ml in ddH ₂ O | Sigma-Aldrich, München, D |
| Kanamycin | <u>SL</u> : 30 mg/ml in ddH ₂ O | Sigma-Aldrich, München, D |
| LB-Agar | | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| LB-Broth Base | | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| S.O.C-Medium | | Invitrogen, Karlsruhe, D |

(*Super optimal broth with glucose*)

Zur Herstellung von Selektionsmedien wurden dem Flüssig- oder Festmedium 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

2.1.17 Bakterienstämme

| | |
|-------------------------|--------------------------|
| <i>E. coli</i> Top10 | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| <i>E. coli</i> XL1 Blue | Invitrogen, Karlsruhe, D |

2.1.18 Medien und Medienzusätze für die Zell- und Gewebekultur

Dulbecco's MEM

| | | |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| - DMEM + GlutaMAX | GibcoBRL, Eggenstein, D | |
| - RPMI 1640 + GlutaMAX | GibcoBRL, Eggenstein, D | |
| Fötales Rinderserum (FBS) | Biochrome, Berlin, D | |
| DMSO | Merck, Darmstadt, D | |
| Doxyzyklin | <u>SL</u> : 2 mg/ml in ddH ₂ O | Sigma-Aldrich, München, D |
| DPBS (-CaCl ₂ /-MgCl ₂) | GibcoBRL, Eggenstein, D | |
| G418 | <u>SL</u> : 50 mg/ml in ddH ₂ O | GibcoBRL, Eggenstein, D |
| Hygromycin B | <u>SL</u> : 10 mg/ml in ddH ₂ O | Sigma-Aldrich, München, D |
| Penicillin/Streptomycin (100x) | GibcoBRL, Eggenstein, D | |
| Puromycin | <u>SL</u> : 1 mg/ml in ddH ₂ O | Sigma-Aldrich, München, D |
| Trypsin/EDTA (10x) | Biochrome, Berlin, D | |

2.1.19 Medienzusätze für die Herstellung und Verwendung von Lentiviren

| | | |
|-------------|---------------------------------------------|---------------------------|
| Chloroquine | <u>SL</u> : 100 mM in ddH ₂ O | Sigma-Aldrich, München, D |
| Polybrene | <u>SL</u> : 400 µg/ml in ddH ₂ O | Sigma-Aldrich, München, D |

Poly-L-Lysin Sigma-Aldrich, München, D
 Natriumbutyrat SL: 1 M in ddH₂O Upstate, Temecula, CA

2.1.20 Inhibitoren in der Zellkultur und Proteomanalytik

AEBSF SL: 500 mM in DMSO Calbiochem, Schwalbach, D
 ALLN SL: 25 mM in DMSO Calbiochem, Schwalbach, D
 Imatinib mesylate SL: 100 µM in ddH₂O Novartis, München, D
 LY-294,002-hydrochlorid SL: 25 mM in DMSO Sigma-Aldrich, München, D
 MG-132 SL: 40 mM in DMSO Calbiochem, Schwalbach, D
 PMSF SL: 100 mM in Methanol Sigma-Aldrich, München, D
 Protease Inhibitor Cocktail Set III (50x) Calbiochem, Schwalbach, D
 Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor IV Calbiochem, Schwalbach, D
SL: 20 mM in DMSO
 Rapamycin SL: 2 mM in DMSO Sigma-Aldrich, München, D
 U0126 SL: 10 mM in DMSO Promega, Madison, USA

2.1.21 Zelllinien

293 (HEK-293) (DSMZ; ACC 305) [GRAHAM *et al.*, 1977]
 32D (DSMZ; ACC 411) [GREENBERGER *et al.*, 1983]
 Ba/F3 (DSMZ; ACC 300) [PALACIOS *et al.*, 1984]
 K562 (DSMZ; ACC 10) [LOZZIO und LOZZIO, 1975]
 TonB (Tet on Ba/F3-p210^{BCR-ABL-WT}) [KLUCHER *et al.*, 1998]
 WEHI-3B (DSMZ; ACC 26) [WARNER *et al.*, 1969]

2.1.22 Software

| Anwendung | Software |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bildbearbeitung | Adobe: Photoshop 7.0 |
| Densitometrie | Bio-Rad: Quantity One V4.6.5 |
| Durchflusszytometrie | Becton Dickinson: CellQuest Pro 4.0.2 |
| Isoelektrische Fokussierung | Bio-Rad: PDQuest Basic V8.0.1 |
| Laserscanningmikroskopie | Leica: Leica Confocal Software Lite (LCS Lite) V2.61 |
| Literaturverwaltung | Thomson: EndNote X10 |
| Primerdesign für <i>Realtime</i> -PCR | Applied Biosystems: Primer Express 3.0 |
| <i>qRealtime</i> -PCR | Applied Biosystems: StepOne Software V2.0 |
| Sequenzierung | Applied Biosystems: Sequencing Analysis V3.7 Applied Biosystems: Data Collection Software V3.0.0 |
| Sequenzvergleiche | Invitrogen: Vector NTI 10.0 Advance |
| Texte, Graphiken, Tabellen | Microsoft: Word 2003, Excel 2003, Powerpoint 2003 |
| virtuelle Klonierung | Invitrogen: Vector NTI 10.0 Advance |

2.2 Methoden

2.2.1 Gentechnische Arbeitsmethoden

2.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Lösungen:

- LB-Medium
10 g/l Casein (enzymatisch hydrolysiert); 10 g/l NaCl und 5 g/l Hefeextrakt werden in Wasser gelöst und anschließend autoklaviert
- Kalziumchloridlösung (100 mM), autoklaviert
- 86% (v/v) Glycerin, autoklaviert

Materialien:

- Kühlzentrifuge
- Reaktionsgefäße
- Tiefkühlschrank (-80 °C)

Durchführung:

Ausgehend von einer Vorkultur wurden 1 ml Bakteriensuspension zum Animpfen von 150 ml LB-Medium verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln (150 rpm/min) bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,6 bei 578 nm Wellenlänge inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch 15-minütige Zentrifugation bei 10 °C und 3000 rpm pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml Kalziumchloridlösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 3 ml Kalziumchloridlösung und die Zugabe von 1 ml Glycerin. Die Bakteriensuspension wurde zu 100 µl-Portionen auf sterile Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Lösungen:

- LB-Medium
10 g/l Casein (enzymatisch hydrolysiert); 10 g/l NaCl und 5 g/l Hefeextrakt werden in Wasser gelöst und anschließend autoklaviert
- LB-Agarplatten mit Selektionsdruck (Ampicillin oder Kanamycin)
- Plasmid-DNA oder Ligationsansatz

Materialien:

- chemisch-kompetente *E. coli*
- Thermomixer (37 °C)
- Bakterieninkubator (37 °C)

Durchführung:

Chemisch-kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Bakteriensuspension wurden 0,1 – 1,0 µg Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes pipettiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nacheinander folgten eine Inkubation von 5 min bei 37 °C, eine Inkubation von 2 min auf Eis und eine Inkubation von 60 min bei 37 °C, 150 rpm in

350 µl LB-Medium. Danach wurden die Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

In Abhängigkeit der benötigten DNA-Mengen wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA das „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit“ (peqLab, Erlangen, D) oder das „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN, Hilden, D) gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Das Prinzip der DNA-Aufreinigung ist bei beiden Systemen identisch, jedoch unterscheiden sich die Säulen stark hinsichtlich ihrer Größe und Bindungskapazität.

Durchführung:

Nach alkalischer Lyse der Zellen und RNaseA-Behandlung des Lysats wurde dieses zunächst mit Natriumacetat neutralisiert und zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde bei geringer Salzkonzentration an eine Anionenaustausch-Matrix adsorbiert. Auf einem Waschschrift bei mittlerer Salzkonzentration, zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verunreinigungen, folgten die Elution der DNA, die Präzipitation mit Isopropanol zur Konzentrierung der DNA, sowie ein Waschschrift mit 75%igen (v/v) Ethanol zur Entsalzung der präzipitierten DNA.

2.2.1.4 Konzentrationsmessungen von Nukleinsäuren

DNA- oder RNA-Konzentrationen wässriger Lösungen wurden spektralphotometrisch bestimmt. Dafür wurde die Extinktion einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm Wellenlänge, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Spektralphotometer gemessen. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA und 30 µg/ml für einzelsträngige Oligonukleotide. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung und sollte für DNA bei etwa 1,8 und für RNA bei etwa 2,0 liegen (gilt für Lösungen mit pH 8,0). Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm lässt eine Aussage über die Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Kohlenhydraten zu. Optimalerweise sollte dieser Wert größer 2 sein.

Üblicherweise wurden DNA-Proben vor der Konzentrationsmessung 1:50 verdünnt. RNA-Proben wurden am NanoDrop ND-1000 unverdünnt (2 µl) vermessen.

2.2.1.5 Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen

Lösungen/Enzyme:

- Restriktionsendonukleasen, 10x NEB-Puffer 1-4 und BSA (100x)

Materialien:

- Heizblock oder Thermozykler (25 °C, 37 °C)
- Reaktionsgefäße

- DNA-Auftragspuffer (5x)
15% (w/v) Ficoll; 1% (v/v) SDS; 50 mM EDTA,
0,25% (w/v) Bromphenolblau oder Orange G in 1x
TBE-Puffer
- TBE-Puffer (10x)
0,9 M Tris (pH 8,0); 0,9 M Borsäure; 20 mM EDTA

Durchführung:

Für fortführende Klonierungen wurden ≥ 10 μg DNA in 50 μl Gesamtvolumen, für Kontrollspaltungen 1 μg DNA in 20 μl Gesamtvolumen mit spezifischen Restriktionsendonukleasen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verdaut. Pro μg Plasmid-DNA wurden 2 – 5 Units des benötigten Restriktionsenzym eingesetzt. Zur Vermeidung unspezifischer Enzymaktivität wurde dem Ansatz BSA in einfacher Konzentration zugesetzt und darauf geachtet, dass die totale Menge an Glycerin im Restriktionsansatz 5% (v/v) nicht überstieg. Die Inkubationszeit betrug 1 – 3 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die enzymatische Reaktion wurde entweder durch eine Erwärmung des Ansatzes auf 65°C für 20 min (Hitzeinaktivierung) oder durch die Zugabe von DNA-Auftragspuffer beendet.

2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase

Lösungen/Enzyme:

- BAP (1 U/ μl)

Materialien:

- Heizblock oder Thermozykler (37°C)
- Reaktionsgefäße

Durchführung:

Um bei ungerichteten Vektor-Insert-Ligationen oder „blunt-end“ Ligationen die Religation des Vektors zu vermeiden, wurden die freien Enden des geöffneten Vektors vor der Ligation dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung angeschlossen. Dazu wurden dem hitzeinaktivierten Restriktionsansatz 1 Units BAP/ μg Vektor-DNA zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde die DNA über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und anschließend mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden, D) aus dem Gel eluiert.

2.2.1.7 Auffüllung von 5'-DNA-Überhängen mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

Lösungen/Enzyme:

- Klenow-Enzym (2 U/ μ l)
- dNTP-Mix (10 mM)
- $MgCl_2$ (100 mM)

Materialien:

- Heizblock oder Thermozykler (37°C)
- Reaktionsgefäße

Durchführung:

Lässt das Restriktionsmuster der zu klonierenden DNA-Abschnitte keine Ligation von komplementären, klebrigen („sticky“) Enden zu, können diese mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt werden. Nach der Auffüllreaktion können die modifizierten DNA-Fragmente in einer „blunt-end“ Ligation miteinander verknüpft werden. Voraussetzung hierfür ist, dass für die Restriktion geeignete Endonukleasen verwendet werden, die einen 5'-Überhang schneiden. Bei 3'-Überhängen kann der Überhang lediglich von speziellen Endonukleasen, wie z.B. der Mung-Bean Nuklease, abgedaut werden. Durch diese Vorgehensweisen gehen in der Regel die ursprünglichen Restriktionsschnittstellen verloren.

Zum präparativen Restriktionsansatz wurden 4,0 μ l $MgCl_2$, 2,0 μ l dNTP-Mix und 2 U Klenow-Enzym pipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch eine Hitzeinaktivierung (20 min, 65°C) abgestoppt und die DNA-Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.2.1.8 Phosphorylierung und Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden

Lösungen/Enzyme:

- T4-Polynukleotidkinase (PNK, 10 U/ μ l)
- T4-Polynukleotidkinase-Puffer (10x)
- Oligonukleotide (100 μ M)
- dATP (10 mM)

Materialien:

- Heizblock oder Thermozykler (37°C)
- Wasserbad
- Reaktionsgefäße

Durchführung:

Chemisch synthetisierte, einzelsträngige Oligonukleotide wurden vor ihrer Hybridisierung und Klonierung *in-vitro* unter dem Einsatz der T4-Polynukleotidkinase und ATP phosphoryliert. Jeweils 2,0 μ l der zueinander komplementären Oligonukleotide wurden mit 2,0 μ l T4-Polynukleotidkinase-Puffer; 2,0 μ l dATP und 10 Units T4-Polynukleotidkinase versetzt. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 μ l aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Zur nachfolgenden Hybridisierung wurde der Ansatz 3 min bei 95 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die zueinander komplementären Oligonukleotide wurden im Vorfeld so konstruiert, dass aus ihrer Hybridisierung restriktionsspezifische Überhänge resultierten und eine direkte, gerichtete Klonierung in geeignete Zielvektoren möglich war.

2.2.1.9 Fällung von Nukleinsäuren

Lösungen:

- Natriumazetat (3 M, pH 5,2)
- Glykogen (10 µg/µl)
- 96% (v/v) Ethanol
- 75% (v/v) Ethanol

Materialien:

- Kühlzentrifuge (8 °C)
- Reaktionsgefäße
- Gefrierschrank

Durchführung:

DNA-Fragmente, die über Agarose-Gelelektrophorese gewonnen wurden, müssen vor ihrer weiteren Verwendung aufgereinigt und entsalzt werden. Salze können die enzymatische Aktivität von Ligasen beeinträchtigen und wirken sich spätestens bei der Transformation von elektrisch-kompetenten Bakterien störend aus.

DNA aus Restriktionsansätzen wurde auf ein Endvolumen von 90 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Nach Zugabe von 1,0 µl Glykogen und 10,0 µl Natriumazetatlösung wurde der Ansatz gut gemischt. Zum Fälln der DNA wurde 96%iger (v/v) Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 75% (v/v) zugegeben (300 µl Ethanol auf 100 µl DNA-Ansatz) und 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 8 °C pelletiert und einmal mit 75%igen (v/v) Ethanol gewaschen. Nach wiederholter 10-minütiger Zentrifugation unter identischen Bedingungen wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Lösungen/Enzyme:

- T4-DNA Ligase (400 – 2000 U/µl)
- T4-DNA Ligase-Puffer (10x)

Materialien:

- Heizblock oder Thermozykler (16 °C; 25 °C)

Durchführung:

Zur Ligation wurden dephosphorylierte Vektor-DNA und Insert-DNA in verschiedenen molaren Verhältnissen (1:3 bis 1:10) eingesetzt. Zum Ligationsansatz wurden 2,0 µl Ligase-Puffer und 400 – 2000 Units Ligase pipettiert und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Bei „blunt-end“-Ligationen erfolgte die Ligation bei 25 °C über Nacht. Bei DNA-Fragmenten mit klebrigen Enden wurde die Ligation bei 16 °C über Nacht oder alternativ

bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei der Klonierung von großen DNA-Fragmenten wurden dem Ligationsansatz 5% (w/v) PEG-8000 beigelegt.

2.2.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

- TBE-Puffer (10x)
0,9 M Tris (pH 8,0); 0,9 M Borsäure; 20 mM EDTA
- Agarose LE
1 – 2% (w/v) TBE-gepufferte Agarosegele
- Ethidiumbromid (10 mg/ml)
- DNA-Größenmarker

Materialien:

- Elektrophoreseapparat mit Netzteil
- Geldokumentationssystem
- UV-Tisch
- Skalpell
- QIAquick Gel Extraction Kit

Durchführung:

In Abhängigkeit ihrer Größe wurden DNA-Fragmente oder PCR-Produkte in 1 – 2%igen (w/v) TBE-gepufferten Agarosegelen aufgetrennt. Bei diesem Verfahren wandern negativ geladene Nukleinsäuren mit einer Geschwindigkeit zur Anode, die dem Logarithmus ihrer Molmasse umgekehrt proportional ist. Die Auftrennung erfolgte bei 8 V/cm Gel-Länge (100 – 120 V) im einfach konzentrierten TBE-Puffer. Zur Visualisierung der DNA-Produkte wurde dem Gel im Vorfeld Ethidiumbromid zugesetzt. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der mit DNA interkaliert und bei 365 nm Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden kann. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente wurden neben den Proben auch verschiedene Größenmarker im Gel aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden am UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und über das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden, D) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.1.12 Isolation von RNA mit Trizol-Reagenz

Lösungen:

- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- Trizol-Reagenz
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% (v/v) Ethanol
- Wasser (HPLC-grade)

Materialien:

- Kühlzentrifuge (8 °C)
- Heizblock
- NanoDrop ND-1000
- Reaktionsgefäße

Durchführung:

Gesamt-RNA wurde aus Zellen unter dem Einsatz von Trizol isoliert. Vor der Isolation wurden die Zellen der jeweiligen Ansätze mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu ent-

fernen. Im Anschluss daran wurden zu 10^6 - 10^7 Zellen 1 ml Trizol-Reagenz pipettiert und die Ansätze gründlich gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu den lysierten Zellen 200 µl Chloroform zugegeben und die Ansätze erneut für 15 sec gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 15 min bei 10.000 g und 8°C zentrifugiert. Die oberen, farblosen Phasen wurden vorsichtig in frische Reaktionsgefäße überführt und die darin gelöste RNA durch die Zugabe von 250 - 300 µl Isopropanol gefällt. Die RNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 10.000 g und 8°C pelletiert und zweimal mit 75%igen (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei 37°C im Heizblock wurde die RNA in 10 - 20 µl hochreinem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop ND-1000 photometrisch ermittelt. Ein Teil der isolierten RNA wurde zur reversen Transkription eingesetzt. Der Rest bei -80°C gelagert.

2.2.1.13 Reverse Transkription

Lösungen/Enzyme:

- M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
- Reverse Transcription First Strand Buffer (5x)
- Random Hexamer Primer pd(N)₆ (100 pmol/µl)
- dNTP-Mix (10 mM)
- DTT (100 mM)
- RNA (0,5 – 1,0 µg)

Materialien:

- Heizblock oder Thermozykler (37°C)
- Reaktionsgefäße

Durchführung:

Pro Ansatz wurden 0,5 – 1,0 µg Gesamt-RNA mit hochreinem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C denaturiert. Daran anschließend wurde die RNA schnell auf Eis abgekühlt und mit 4,0 µl 5x Puffer; 2,0 µl dNTP-Mix; 2,0 µl DTT; 1,0 µl pd(N)₆-Primer und 200 Units der reversen M-MLV Transkriptase in Form eines Master-Mixes ergänzt. Die reverse Transkription erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Abschließend wurden die Ansätze mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt und entweder direkt in der quantitativen *Realtime*-PCR eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

2.2.1.14 Quantitative *Realtime*-Polymerasekettenreaktion (q*Realtime*-PCR)

Lösungen/Enzyme:

- TaqMAN Universal PCR Master Mix (2x)
- Power SYBR®Green PCR Master Mix (2x)
- TaqMan-**Primer-Mix** (30 µM)
- TaqMAN-Sonde (2 µM)
- SYBR®Green-**Primer-Mix** (5 µM)

Materialien:

- optische 96-Lochplatten
- q*Realtime*-PCR System
- Reaktionsgefäße

3,2x Master-Mix für ein Triplikat (TaqMan):

32,0 µl TaqMAN Universal Master Mix (2x)

1,9 µl TaqMan-**Primer-Mix** (30 µM)

6,4 µl TaqMAN-Sonde (2 µM)

23,7 µl cDNA aus reverser Transkription

64,0 µl → 3x 20 µl auf optische 96-Lochplatte

3,2x Master-Mix für ein Triplikat (SYBR®Green):

32,0 µl Power SYBR®Green PCR Master Mix (2x)

3,2 µl SYBR®Green-**Primer-Mix** (5 µM)

28,8 µl cDNA aus reverser Transkription

64,0 µl → 3x 20 µl auf optische 96-Lochplatte

Der **Primer-Mix** repräsentiert die jeweiligen Primer in der vorwärtigen und rückwärtigen Orientierung zu gleichen Anteilen in der gewünschten Endkonzentration.

qRT-PCR-Programm: (TaqMan / SYBR®Green)

1. 1 Zyklus – 2 min bei 50 °C

2. 1 Zyklus – 10 min bei 95 °C

3. 40 Zyklen – 15 sec bei 95 °C/ 60 sec bei 60 °C

Durchführung:

Die quantitative *Realtime*-PCR (*qRealtime*-PCR) ermöglicht mit speziellen fluorochrommarkierten Sonden und 5'- sowie 3'-flankierenden Primern die sehr empfindliche Detektion und Quantifizierung von RNA- und DNA-Proben. In der vorliegenden Arbeit wurden durch diese Methode die zellulären Gehalte an STAT5-mRNA (endogen und transgen) bestimmt. Für die Kalkulation der Molekülanzahl wurde auf STAT5-Verdünnungsreihen, basierend auf vektorieller DNA, als interne Kalibrierung zurückgegriffen. Für die Normalisierung der unterschiedlichen Ansätze kamen Primer gegen die murinen *Housekeeping*-Gene β 2-Mikroglobulin (B2M) oder P β GD in der PCR-Reaktion zum Einsatz.

Sämtliche Pipettierschritte wurden auf Eis ausgeführt. Um Pipettierschwankungen auszuschließen, wurden pro Ansatz stets Triplikate pipettiert und geeignete Master-Mixe verwendet. Die benötigten Primer wurden auf eine Stockkonzentration von 300 µM, die der Sonde auf 20 µM, eingestellt. Vor ihrem Einsatz in der PCR wurden die Primer nochmals in eine Arbeitskonzentration von 30 µM bzw. 5 µM, die der Sonde auf 2 µM, mit ddH₂O verdünnt.

Gemäß der Probenanzahl wurden Master-Mixe hergestellt und diese mit cDNA aus der reversen Transkription ergänzt. Die Proben wurden anschließend gründlich gemischt und 30 sec bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurden pro Ansatz dreimal 20 µl in optische 96-Lochplatten vorgelegt und die *qRealtime*-PCR Messung durchgeführt.

2.2.1.15 Auswertung der quantitativen *Realtime*-PCR Ergebnisse

Üblicherweise werden die gesammelten Daten der q*Realtime*-PCR mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode ausgewertet [LIVAK und SCHMITTGEN, 2001]. Hierfür werden der erhaltene CT-Wert des regulierten Gens (GOI = STAT5) mit dem CT-Wert des unregulierten Gens (HKG = B2M, P β GD) nach folgender Formel berechnet, um die relative Expressionsregulation zu erhalten:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

ΔCT : Differenz der CT-Werte von reguliertem Gen (GOI) zu unreguliertem Gen (HKG) \rightarrow (GOI CT) – (HKG CT)

$\Delta\Delta CT - C\Delta CT$: Differenz zwischen den regulierten Proben ΔCT ($\Delta\Delta CT$) und der Kontrollprobe ΔCT ($C\Delta CT$) \rightarrow entspricht dem $\Delta\Delta CT$ -Wert!

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Berechnung von Expressionsunterschieden durch die Ermittlung absoluter Molekülzahlen, die prozentual zueinander ins Verhältnis gesetzt wurden. Als Basis für die Berechnung dienten STAT5-Verdünnungsreihen aus vektorieller DNA.

2.2.1.16 Ortsspezifische Mutagenese

Lösungen/Enzyme:

- Pfu Ultra HF DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)
- Pfu Ultra HF DNA Polymerase-Puffer (10x)
- Primer-Mix, vorwärts & rückwärts (100 ng/ μ l)
- Matrizen-DNA (10 ng/ μ l)
- dNTP-Mix (10 mM)
- QuikSolution
- *DpnI* (10 U/ μ l)

Materialien:

- Thermozykler
- Reaktionsgefäße

PCR-Programm:

1. 50 sec bei 95°C
 2. 50 sec bei 95°C
 2. 2 min bei 55°C
 2. 20 min bei 68°C
 3. 10 min bei 68°C
 4. ∞ bei 8°C
- 18 Zyklen

Durchführung:

Ortsspezifische Mutagenesen von Tyrosin-Phosphorylierungsstellen oder shRNA-Erkennungssequenzen in STAT5A erfolgten mittels PCR unter Verwendung des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, CA) gemäß den Angaben des Herstellers.

Im Vorfeld erfolgte die virtuelle Konstruktion geeigneter Primer-Paare. Besonderes Augenmerk musste dabei auf die Schmelztemperatur der Primer ($\geq 78^\circ\text{C}$) und die Lage der auszutauschenden Nukleotide in den Primern (möglichst zentral) gelegt werden.

Für die PCR-Reaktion wurden die Mutageneseprimer in einer Arbeitskonzentration von $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ und die STAT5A-Matrizen-DNA von $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt. Pro Mutagenese wurden jeweils 125 ng der Primer (vorwärts & rückwärts) und $10 - 20\text{ ng}$ Matrizen-DNA mit $5,0\ \mu\text{l}$ $10\times$ Polymerase-Puffer; $3,0\ \mu\text{l}$ QuikSolution; $2,0\ \mu\text{l}$ dNTP-Mix und $2,5$ Units Pfu Ultra HF DNA Polymerase versetzt und mit ddH_2O auf ein Endvolumen von $50\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Nach der Amplifikation der Matrizen-DNA konnte die methylierte, nicht mutierte Parental-DNA durch *DpnI* hydrolysiert (10 Units, 1 h bei 37°C) und das Mutagenese-Produkt in *E. coli* Bakterien transformiert werden. Die Mutagenesen wurden durch anschließende Sequenzierung bestätigt.

2.2.1.17 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Lösungen/Enzyme:

- BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit
- BigDye Sequencing Buffer (5x)
- Sequenzierprimer ($10\ \mu\text{M}$)
- Plasmid-DNA ($0,1 - 1,0\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- Hi-Di Formamide

Materialien:

- Thermozykler
- Sequenziergerät
- Gelfiltrationssäulen (Dye Ex 2.0 Spin Kit)
- Tischzentrifuge

PCR-Programm:

1. 30 sec bei 95°C
 2. 30 sec bei 95°C
 2. 4 min bei 60°C
 3. ∞ bei 8°C
- } 25 Zyklen

Durchführung:

Durchgeführte Mutagenesen oder Klonierungen wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Dies erfolgte unter Verwendung geeigneter Sequenzierprimer und dem „BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) in einer PCR-Reaktion. Maximal $1\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA wurde mit $1,5\ \mu\text{l}$ Sequenzierprimer; $4,0\ \mu\text{l}$ $5\times$ Sequenzierpuffer sowie $3,0\ \mu\text{l}$ BigDye Terminator Sequenzier-Mix vermischt und mit ddH_2O auf ein Endvolumen von $20\ \mu\text{l}$ aufgefüllt.

Nach der PCR-Reaktion wurden Salze, überschüssige Desoxynukleotide (dNTPs) und Didesoxynukleotide (ddNTPs) durch eine Gelfiltration mit dem „Dye Ex 2.0 Spin Kit“ (QIAGEN, Hilden, D) entfernt (Zentrifugation für 3 min bei 2700 rpm). Die Proben wurden in Hi-Di Formamidlösung stabilisiert und am ABIPrism 310 Genetic Analyzer sequenziert.

2.2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.2.2.1 Kultivierung und Induktion eukaryotischer Zelllinien

Lösungen/Enzyme:

- Standardmedien
 - DMEM + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S
 - RPMI + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S
- Zusätze in der Endkonzentration
 - 20% (v/v) WEHI-3BCM¹
 - Doxyzyklin (2 µg/ml)
- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- Doxyzyklin (2 mg/ml)

Materialien:

- Zellkulturflaschen
- Zellkulturplatten
- Zellkulturinkubator
- Zentrifuge

¹WEHI-3BCM = WEHI-3B konditioniertes Medium als Quelle für murines IL-3

Durchführung:

Alle verwendeten Zelllinien wurden in den Standardmedien RPMI (Suspensionszellen) oder DMEM (adhärente Zellen) kultiviert und mindestens alle 72 Stunden subkultiviert. Vor ihrer Verwendung wurden die Standardmedien mit 10% (v/v) FBS und 1x P/S ergänzt. Zellen der TonB-Zelllinie proliferieren faktorabhängig. Der Faktor (IL-3) wurde der Kultur in Form von WEHI-3B konditioniertem Medium (WEHI-3BCM) zugeführt.

In regelmäßigen Abständen wurde überprüft, ob sich im Kultivierungszeitraum faktorunabhängig wachsende Zellen in der Zellkultur etabliert haben. Dazu wurden TonB-Zellen dreimal im großen Volumen mit PBS gewaschen und in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen pro ml Medium (-IL-3/-BCR-ABL) ausgesät. Nach 3 Tagen in Kultur wurde mittels Trypanblau-Ausschluss der Anteil toter Zellen ermittelt. Dieser musste bei >95% liegen, um die Zellen weiter verwenden zu können.

Bei TonB-Zellen kann durch die Zugabe von 1 – 2 µg/ml Doxyzyklin (Dox) in das Nährmedium die Expression von p210^{BCR-ABL} induziert werden. Um Effekte von BCR-ABL in der Abwesenheit von IL-3 untersuchen zu können, wurden die Zellen dreimal im großen Volumen mit PBS gewaschen und in einer Zelldichte von 3 – 5×10^4 Zellen pro ml Dox-haltigem Medium ausgesät.

2.2.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Lösungen/Enzyme:

- Einfriermedium
 - 20% (v/v) FBS; 10% (v/v) DMSO; 70% RPMI
 - bzw. DMEM ohne FBS und Penicillin/Streptomycin (P/S)
- Standardmedien

Materialien:

- Zentrifuge
- Kryoröhrchen
- Tiefkühlschrank (-80 °C)
- Stickstofftank
- Zellkulturinkubator

DMEM + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S

RPMI + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S

- Zusätze in der Endkonzentration

20% (v/v) WEHI-3BCM¹

¹WEHI-3BCM = WEHI-3B konditioniertes Medium als Quelle für murines IL-3

Durchführung:

Adhäsions- oder Suspensionszellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Nach einer PBS-Behandlung wurden Adhäsionszellen (HEK-293 oder WEHI-3B) vom Zellkulturboden abgelöst und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Suspensionszellen (K562, TonB, 32D) wurden in ein 50ml-Falcon Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (5 min, 300 g, RT) sedimentiert. Zu $10^6 - 10^7$ Zellen wurde 1 ml Einfriermedium gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf Kryoröhrchen verteilt, die Zellen langsam (-1 °C/min) in Einfrierboxen auf -80 °C abgekühlt und am nächsten Tag zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37 °C im Wasserbad. Zur Entfernung des toxischen DMSO wurden die Zellen in 10 ml Standardmedium aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 300 g, RT), im frischen Standardmedium resuspendiert und in geeignete Zellkulturflaschen überführt. In der Regel erfolgte nach 24 Stunden ein Medienwechsel.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Lösungen/Enzyme:

- Trypanblau-Stammlösung (10x)
0,5% (w/v) Trypanblau; 0,9% (w/v) NaCl
- Trypanblau-Gebrauchslösung
3% (v/v) konz. Essigsäure in 1x Trypanblau-Lösung; vor Verwendung den Ansatz filtrieren!

Materialien:

- Neubauer-Zählkammer
- Lichtmikroskop (invers)
- Zellzähler (automatisch)

Durchführung:

Die Zellzahl wurde unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bei hohen Zelldichten konnte alternativ die Zellzahl auch mit einem automatischen Zellzähler bestimmt werden. Zur Ermittlung des Anteils toter und lebender Zellen in der Kultur wurde der negativ geladene Farbstoff Trypanblau verwendet. Da der Farbstoff keine Zellen mit einem intakten Membranpotential penetrieren kann, färben sich unter dem Mikroskop lediglich beschädigte oder bereits tote Zellen blau ein.

In der Regel wurden 50 µl einer gut homogenisierten Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Gebrauchslösung vermischt, was einer 1:1 Verdünnung der Zellsuspension entsprach. Mit 10 µl dieser Verdünnung wurde die Neubauer-Zählkammer ($0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1$

mm) beladen und die Anzahl an farblosen und blau-gefärbten Zellen bestimmt. Je 4 Großquadrate wurden ausgezählt und der Durchschnitt errechnet. Die Verhältnisse aus farblosen Zellen zur Gesamtzellzahl bzw. blau-gefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl ergab den Anteil an lebenden und toten Zellen in der Kultur.

Zur Errechnung der Zellzahl in der untersuchten Kultur wurde nachfolgende Formel herangezogen:

$$\text{Anzahl der Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000 = \text{Zellen pro ml}$$

2.2.2.4 Isolation von PBMC-Zellen aus dem Vollblut durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Lösungen/Enzyme:

- Biocoll Separating Solution
- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- Vollblut (Heparin-behandelt)

Materialien:

- Zentrifuge
- 50ml-Falcon Röhrchen

Durchführung:

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden über eine Dichtegradientenzentrifugation an frischem Vollblut von Spendern isoliert. Als Trennmedium kam Ficoll-Paque (*Biocoll Separating Solution*), ein leicht wasserlösliches Kopolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$, zur Anwendung.

In 50ml-Falcon Röhrchen wurden 15 ml Trennmedium vorsichtig mit 25 – 30 ml verdünntem Vollblut überschichtet (Vollblut wurde 1:4 mit PBS verdünnt). Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich die beiden Phasen nicht miteinander vermischten. Der Ficoll-Gradient wurde zentrifugiert (20 min, 1500 rpm, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation stellten sich vier Phasen dar: als oberste Schicht eine gelbliche Phase (Plasma mit Thrombozyten), eine schmale weißliche Bande (mononukleäre Zellen = Monozyten und Lymphozyten), eine farblose viskose Bande (Ficoll-Trennmedium) und als unterste Phase im Konus des Zentrifugenröhrchens eine rote Schicht, bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten. Das Blutplasma wurde verworfen, die PBMC-Zellen vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in frische 50ml-Falcon Röhrchen überführt. Um die Zellen von Ficoll-Resten zu reinigen, erfolgten zwei Wäschen im großen Volumen mit PBS. Die gereinigten mononukleären Zellen konnten nun eingefroren, zur Proteinextraktion oder zur weiteren Isolation von CD34⁺-Zellen herangezogen werden.

2.2.2.5 Herstellung von Einzelklonen durch serielle Verdünnung

Lösungen/Enzyme:

- Trypanblau-Gebrauchslösung
3% (v/v) konz. Essigsäure in 1x Trypanblau-Lösung; vor Verwendung den Ansatz filtrieren!
- Standardmedium
RPMI + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S + 20% (v/v) WEHI-3BCM¹

Materialien:

- Neubauer-Zählkammer
- Lichtmikroskop (invers)
- Multikanalpipette
- 96-Lochplatten (flacher Boden)
- Zellkulturinkubator

¹WEHI-3BCM = WEHI-3B konditioniertes Medium als Quelle für murines IL-3

Durchführung:

Einzelklone von lentiviral-transduzierten Zellen wurden aus seriellen Verdünnungen der verschiedenen Zellpools gewonnen. Hierfür wurde zunächst über den Trypanblau-Ausschluss die Anzahl lebender Zellen in der Suspension ermittelt. Die Zellpools wurden soweit verdünnt, bis ein repräsentatives Volumen von 100 Zellen (minimales Entnahmenvolumen aus der Verdünnung betrug 10 µl) der Suspension entnommen werden konnte. Dieses Volumen wurde in 40 ml Standardmedium resuspendiert und gründlich vermischt. Mit einer Multikanalpipette wurden anschließend in die Löcher von 96-Lochplatten 175 µl des Zell-Standardmediums vorgelegt. Statistisch sollte sich bei dieser Herangehensweise nun in jedem 2. bis 3. Loch der 96-Lochplatte ein Einzelzellklon befinden. Die Platten wurden eine Woche im Brutschrank inkubiert. Geeignete Einzelklone (Wachstum, Form, Fluoreszenz) wurden weiterkultiviert und nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl im FACS vermessen, kryokonserviert oder in weiteren Versuchen eingesetzt.

2.2.2.6 Kotransfektionsassay durch transiente Transfektion mit FuGENE-6

Lösungen/Enzyme:

- Standardmedium
DMEM + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S
- DMEM (-FBS/-P/S)
- Trypsin/EDTA (1x)
- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- FuGENE-6 *Transfection Reagent*
- PE-anti-human NFGR

Materialien:

- 24-Lochplatten
- Reaktionsgefäße
- Zellkulturinkubator
- FACSCalibur
- Fluoreszenzmikroskop

Hintergrund:

Die Funktionalität und Effizienz von konstruierten shRNAs gegen zelluläre Zielgene wurden im Kotransfektionsassay getestet. Dazu wurden adhärent wachsende HEK-293-Zellen mit drei unterschiedlichen Konstrukten transfiziert. Das erste Konstrukt kodierte dabei für das Zielgen, das durch die shRNA herunterreguliert werden sollte. Der hierfür

verwendete Vektor, pMSCV-Zielgen-IRES-EGFP, war so konstruiert, dass neben der Expression des jeweiligen Zielgens auch eine unabhängige Expression von GFP über die interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) möglich war. Das zweite Konstrukt kodierte die zu untersuchende shRNA, die sich entweder im Klonierungsvektor, pSuper-H1-shRNA, oder bereits im lentiviralen Vektor befand. Das dritte Konstrukt kodierte für das zelluläre Oberflächenmolekül LNGFR (*Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor*) und diente der Normalisierung der einzelnen Kotransfektionen untereinander.

Das grundlegende Prinzip dieser Methode liegt in der polycistronischen Transkription einer Zielgen-IRES-EGFP-mRNA sowie der Expression von Zielgen-shRNAs begründet. Bei einer effizienten Wirkungsweise der zu testenden shRNA, sollte die Zielgen-IRES-EGFP-mRNA erheblich durch das RNAi-System der Zelle degradiert werden. Obwohl durch die shRNA lediglich das Zielgen angegriffen wird, kommt es durch die Funktionsweise des RNAi-Systems und dem polycistronischen Charakter des Transkripts ebenfalls zu einer Degradation der GFP-mRNA in den Zellen. Die Abnahme der GFP-Fluoreszenz gegenüber einer unspezifischen Kontroll-shRNA ist im FACS messbar und ein Maß für die Effizienz der Zielgen-shRNA.

Durchführung:

Einen Tag vor der Transfektion wurden $1 - 2 \times 10^5$ Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte im Standardmedium ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde die DNA der verschiedenen Ansätze zusammen gegeben. Zu 0,5 – 1,0 µg pMSCV-Zielgen-IRES-EGFP wurden 0,5 – 1,0 µg Zielgen-shRNA oder unspezifische Kontroll-shRNA pipettiert. Die Ansätze wurden mit 0,05 – 0,1 µg LNGFR-DNA ergänzt und mit DMEM (-FBS/-P/S) auf 50 µl aufgefüllt. Pro 1 µg eingesetzter DNA wurden 3 µl FuGENE-6 Lösung in separate Reaktionsgefäße vorgelegt, mit DMEM (-FBS/-P/S) auf 50 µl aufgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Volumina vorsichtig miteinander vermischt und weitere 20 min zur Ausbildung der DNA-Lipid-Komplexe inkubiert.

Während dieser Inkubationszeit wurde das Medium auf den Zellen entfernt und durch 400 µl Standardmedium pro Loch erneuert. Abschließend wurden tropfenweise die DNA-Lipid-Komplexe auf die Zellen pipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgten ein Mediumwechsel und die Abschätzung des Transfektionserfolgs am Fluoreszenzmikroskop. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen vorsichtig von der Kulturplatte abgelöst (1x Trypsin/EDTA), ausgiebig mit PBS gewaschen und nach einer Zentrifugation (5 min, 300 g, RT) im Rücklauf (ca. 50 µl) resuspendiert. Ein PE-gekoppelter α -NGFR-Antikörper wurde 1:10 mit PBS verdünnt. Jeweils 50 µl der verdünnten Antikörperlösung wurden zu den resuspendierten Zellen pipettiert (finale Antikörperverdünnung 1:20) und die Ansätze 30 min bei Dunkelheit inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch eine PBS-

Wäsche im großen Volumen entfernt und die Zellen nach einer Zentrifugation (5 min, 300 g, RT) in 200 – 300 µl PBS resuspendiert. Abschließend erfolgten die Messung der Rot- und Grünfluoreszenz am FACS sowie die Kalkulation der GFP-Expressionsunterschiede gegenüber der Kontroll-shRNA.

2.2.2.7 Herstellung, Konzentrierung und Titration von Lentiviren

Lösungen/Enzyme:

- Standardmedien
 - DMEM + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S
 - RPMI + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S
- Zusätze in der Endkonzentration
 - 20% (v/v) WEHI-3BCM¹
 - Polybrene (1x)
- RPMI (-FBS/+P/S)
- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- HBS-Puffer (2x)
 - 50 mM HEPES; 1,5 mM Na₂HP0₄; 280 mM NaCl; pH 7,0 – 7,1
- Poly-L-Lysin
- Kalziumchlorid (2 M)
- Chloroquine (100 mM)
- Natriumbutyrat (1 M)
- Polybrene (100x = 400 µg/ml)

Materialien:

- 175cm²-Zellkulturflaschen
- 96-Lochplatten (flacher Boden)
- 12-Lochplatten
- Reaktionsgefäße
- 15ml- und 50ml-Falcon Rörchen
- 0,45µm-Sterilfilter
- Zellkulturinkubator
- FACSCalibur
- Lichtmikroskop (invers)
- Fluoreszenzmikroskop
- Zentrifuge
- Tiefkühlschrank (-80°C)

¹WEHI-3BCM = WEHI-3B konditioniertes Medium als Quelle für murines IL-3

Hintergrund:

Zur effizienten und stabilen Expression von Zielgenen oder shRNAs wurden replikationsinkompetente Lentiviren hergestellt. Dazu wurden die cis-aktiven-Sequenzen, die für den Gentransfer in die Zielzelle benötigt werden und die trans-aktiven-Sequenzen, die virale Strukturelemente kodieren, auf 2 Vektoren verteilt. Da nur cis-aktive Sequenzen in neu generierte Viruspartikel eingebaut werden, wurden die Zielgene zwischen die 5'- und 3'-LTRs (*long terminal repeats*) und die shRNAs direkt in die 3'-LTR des lentiviralen Vektors kloniert. Zusätzlich waren die lentiviralen Transgen-Vektoren mit Markergenen (GFP oder RFP) ausgestattet, was für ihr späteres *Screening* (z.B. Transduktionseffizienz) notwendig war. Die Spezifität eines Virus für bestimmte Zelltypen wird ferner durch die Interaktion seiner Hüllproteine mit den Rezeptoren der Zellmembran determiniert. Die Modifikation der Hülle viraler Partikel durch den Einbau verschiedener Glykoproteine wird auch Pseudotypisierung genannt. Ein drittes Plasmid, das für das Vesikuläre-Stomatitis-Virus-Glykoprotein (VSV.G) kodierte, ermöglichte dabei die Transduktion einer breiten Palette

von Zelltypen. Lentivirale Überstände wurden durch Kalziumphosphat-Kotransfektion von HEK-293-Zellen mit den 3 hier beschriebenen Vektoren (Transgen-, Verpackungs-, Hüll-Plasmid) hergestellt.

Durchführung der Virusherstellung:

Drei Tage vor der Kalziumphosphat-Präzipitation wurden 5×10^6 HEK-293-Zellen in 30 ml DMEM-Standardmedium auf Poly-L-Lysin beschichtete 175cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Pro Virusvariante wurden 2 bis 3 Flaschen vorbereitet. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen auf Konfluenz (70 – 80%) überprüft. Pro Zellkulturflasche wurden die Volumina von 40 µg Transgen-Plasmid, 30 µg pCMV-Verpackungsplasmid und 20 µg pMD.G-Hüllplasmid miteinander vermischt und zu 1,8 ml ddH₂O pipettiert. Anschließend wurden 122 µl Kalziumchloridlösung zugegeben und der Ansatz (Endvolumen = 2 ml) gründlich gemischt. In ein zweites 15ml-Falcon Röhrchen wurden 2,0 ml 2x HBS-Puffer vorgelegt. Unter ständigem Lufteinstrom wurde nun die Kalzium-DNA-Lösung tropfenweise in den HBS-Puffer überführt und anschließend 15 min zur Ausbildung des DNA-Präzipitats bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das verbrauchte Medium von den HEK-293-Zellen entfernt und durch 12 ml Chloroquine-haltiges DMEM-Standardmedium ersetzt (4,0 µl Chloroquine/12 ml Medium). Vorsichtig wurde das DNA-Präzipitat (4 ml) auf die Zellen pipettiert und die Zellen für 5 – 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Präzipitat wieder abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 16 ml Butyrate-haltigem DMEM-Standardmedium (160 µl Butyrate/16 ml Medium) gefüttert. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 20 ml RPMI (-FBS/+P/S) ersetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde das Medium gesammelt und durch 16 ml frisches RPMI (-FBS/+P/S) ersetzt. Das gesammelte, virushaltige Medium wurde 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend durch einen 0,45µm-Sterilfilter filtriert. Nach weiteren 6 – 7 Stunden wurde der zweite Virusüberstand gesammelt, sterilfiltriert und mit dem ersten Virusüberstand vereinigt.

Durchführung der Viruskonzentrierung:

Um höhere Transduktionseffizienzen zu erhalten, wurden die viralen Überstände auf 50ml-Falcon Röhrchen aufgeteilt und über Nacht bei 7000 rpm und 8°C zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen und die viralen Pellets größenabhängig in 100 – 200 µl RPMI (-FBS/+P/S) resuspendiert. Die Virussuspension wurde anschließend aliquotiert und bei -80°C zur Lagerung eingefroren.

Durchführung der Virustitration:

Viren, die mindestens 3 h bei -80 °C eingefroren waren, konnten zur Titration der Transduktionseffizienz herangezogen werden. Dazu wurde ein Aliquot (20 µl) langsam auf Eis aufgetaut. Je 1×10^5 TonB-Zellen wurden mit 10; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 und 0,06 µl viralem Überstand in 200 µl RPMI-Standardmedium (+WEHI-3BCM/+Polybrene) in die Löcher einer 96-Lochplatte vorgelegt und 90 min bei 2500 rpm und 32 °C zentrifugiert. Bei dieser Vorgehensweise wurde der Virus zusammen mit den Suspensionszellen auf den Boden der Zellkulturplatte positioniert, wobei die räumliche Nähe und das Polybrene die virale Transduktion begünstigte. Die Zellen wurden in der 96-Lochplatte über Nacht inkubiert und danach vollständig in 3 ml RPMI-Standardmedium (+WEHI-3BCM) auf 12-Lochplatten überführt. Nach 3 bis 4 Tagen in Kultur erfolgte die Messung der RFP- bzw. GFP-Fluoreszenz im FACS. Der virale Titer wurde aus dem prozentualen Anteil transduzierter Zellen pro 1 ml Viruskonzentrat errechnet.

2.2.2.8 Messung von transgenen Expressionsstärken und Zellsortierung mittels FACS

Lösungen/Enzyme:

- Standardmedium
RPMI + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S
- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- Zusätze in der Endkonzentration
20% (v/v) WEHI-3BCM¹
0,1% (w/v) Saponin
- FACS-Puffer
2% (v/v) FBS in DPBS optional: 2% (v/v) WEHI-3BCM¹
- Färbelösung
1 mg/ml RNaseA; 20 µg/ml Propidiumjodid;
0,1% (w/v) Saponin in DPBS
- 80% (v/v) Methanol
- 10% (w/v) Saponin
- Propidiumjodid (2 mg/ml)
- RNaseA (50 mg/ml)

Materialien:

- 6-Lochplatten
- 12-Lochplatten
- 15ml-Falcon Röhrchen
- 5ml-Rundboden-FACS-Röhrchen
- 5ml-Rundbodenröhrchen + Cell-Strainer Cap
- Vortexer
- Zellkulturinkubator
- FACSCalibur
- FACS Aria
- Zentrifuge
- Tiefkühlschrank (-20 °C)
- Kühlschrank (8 °C)

¹WEHI-3BCM = WEHI-3B konditioniertes Medium als Quelle für murines IL-3

Hintergrund:

Die FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Methodik ermöglicht die Zählung, Charakterisierung und Sortierung mikroskopischer Partikel in einem Flüssigkeitsstrom. Simultan können dabei mehrere Parameter, wie z.B. die Zelloberflächenstruktur oder das Maß der

Fluorochromexpression in einer Zelle analysiert werden. Das prinzipielle Messverfahren beruht dabei auf der Emission von optischen Signalen seitens einer Zelle, nachdem diese monochromatisches Licht einer bestimmten Anregungswellenlänge ausgesetzt wurde. Neben der Messung intrazellulär exprimierter Fluorochrome, wie z.B. GFP oder RFP, können Zellen, die mit Farbstoffen, wie z.B. DAPI und Propidiumjodid, oder fluorochrom-markierten Antikörpern behandelt wurden, im FACS untersucht werden. Mit speziellen Zellsortern können ferner aus heterogenen Zellpools Fraktionen unterschiedlich stark fluorochrom-exprimierender Zellen oder sogar Einzelzellen isoliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Bestimmung viraler Titer, im Kotransfektionsassay, bei der Herstellung lentiviral-transduzierter Einzelzellklone und bei Zellzyklusanalysen verwendet.

Durchführung einer Analyse am FACSCalibur:

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 5ml-Rundboden-FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g und Raumtemperatur sedimentiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 200 – 300 µl FACS-Puffer aufgenommen, gründlich resuspendiert und am FACS vermessen.

Durchführung einer Zellsortierung am FACSaria:

Wie bei einer normalen Analyse erfolgte zunächst eine Wäsche der Zellen mit PBS, gefolgt von einer Zentrifugation. Das Pellet wurde im FACS-Puffer (+WEHI-3BCM) resuspendiert. Um die Zellen komplett zu vereinzeln, erfolgte vor der Sortierung eine Filtration durch 5ml-Rundbodenröhrchen mit einem *Cell-Strainer Cap*. Ferner wurden die gewünschten Fenster (*Gates*) eingestellt. Zwischen 10^5 – 10^6 Zellen wurden pro Variante im Standardmedium (+WEHI-3BCM) gesammelt. Nach der Sortierung wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 300 g für 5 min pelletiert und im frischen Standardmedium (+WEHI-3BCM) aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte Zellzahl-abhängig auf 12- oder 6-Lochplatten. Alternativ wurden serielle Verdünnungen zur Einzelzellklon-Gewinnung angefertigt. Nach dem Erreichen geeigneter Zellzahlen wurden die gesorteten Poolzellen kryokonserviert oder für weitere Versuche eingesetzt.

Durchführung einer Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid:

Während einer Zellteilungsrunde verdoppelt die Zelle ihren Chromosomensatz. Dieser Effekt kann durch Anfärbung der DNA mit Propidiumjodid im FACS sichtbar gemacht werden. Dabei werden die Zellen gemäß ihrem DNA-Gehalt sortiert und die statistische Verteilung im Histogramm dargestellt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 15ml-Falcon Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g und Raumtemperatur sedimentiert. Das Pellet wurde einmal mit FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 1 ml Methanol (-20°C) unter kontinuierlichem Schütteln resuspendiert und die Zellsuspension zur Fixierung über Nacht bei 8°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zu den fixierten Zellen PBS (+Saponin) gegeben, der Ansatz gut gemischt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und der Waschschrift einmal wiederholt. Danach wurden die Zellen durch die Zugabe von 150 µl Färbelösung für 30 – 45 min bei Dunkelheit angefärbt. Im Anschluss daran wurden die Zellen weitere zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 200 – 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer vermessen.

2.2.2.9 Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von STAT5-Molekülen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM)

Lösungen/Enzyme:

- Standardmedium
RPMI + GlutaMAX + 10% (v/v) FBS + 1x P/S
- Zusätze in ihrer Endkonzentration
20% (v/v) WEHI-3BCM¹
Doxyzyklin (2 µg/ml)
- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- Poly-L-Lysin
- Doxyzyklin (2 mg/ml)
- 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS
- 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS
- 80% (v/v) Methanol in ddH₂O
- Mowiol 4-88
- DABCO
- DAPI (5 mg/ml)
- Wasch- und Blockmedium
10% (v/v) FBS in PBS-T (0,05% Tween-20)
- Einbettungsmedium
6,0 g Glycerin werden mit 2,4 g Mowiol 4-88 gemischt; unter Rühren werden 6,0 ml ddH₂O zugegeben; nach 1 h unter Rühren werden 12,0 ml Tris-HCL (0,2 M; pH 8.5) zugegeben und der Ansatz 2 h bei 50°C inkubiert; nicht gelöste Bestandteile werden durch eine Zentrifugation (15 min; 5000 g) abgetrennt; abschließend werden zu jeweils 1 ml Mowiol-Lösung 25 mg DABCO zuge-

Materialien:

- Zellkulturplatten
- 15ml-Falcon Röhrchen
- Deckgläschen (Poly-L-Lysin beschichtet)
- Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet)
- Zellkulturinkubator
- Zentrifuge
- Reaktionsgefäße
- Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM)

geben und gelöst, die Lösung wird aliquotiert und bei -25°C eingefroren

¹WEHI-3BCM = WEHI-3B konditioniertes Medium als Quelle für murines IL-3

Hintergrund:

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (*confocal laser scanning microscope*, cLSM oder LSM) stellen eine besondere Klasse von Lichtmikroskopen dar. Sie ermöglichen eine zweidimensionale sowie dreidimensionale Abbildung von Strukturen, da sie in der Lage sind, optische Schnitte von Proben aufzunehmen. Spezielle Programme errechnen dabei aus den einzelnen Bildstapeln ein dreidimensionales Abbild des gescannten Objekts. Voraussetzung für die Bildentstehung am LSM ist die Anfärbung des Präparates mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen oder die intrazelluläre Expression selbiger. Als Lichtmikroskop hat das LSM zwar ein deutlich geringeres Auflösungsvermögen als z.B. ein Elektronenmikroskop, jedoch zeichnet es sich dadurch aus, dass Untersuchungen oder quantitative Messungen von Prozessen zerstörungsfrei im Inneren von Objekten und damit auch an lebenden Objekten möglich sind. Die optischen Komponenten eines LSMs (Laserdioden, Fluoreszenzfilter, Photonenvervielfältiger, dichromatische Spiegel u.a.) ermöglichen eine definierte, wellenlängenabhängige Anregung des jeweiligen Fluorochroms, die unabhängige Messung unterschiedlicher Fluorochrome in einem Scann, die Ausblendung störenden Streulichtes und Außerfokuslichts, eine rauschreduzierte zweidimensionale Darstellung von Scannebenen und letztendlich optische Auflösungsgrenzen von <200 Nanometern.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf diese Methode zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von STAT5A und STAT5B (endogen und transgen) in TonB-Zellen unter An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL zurückgegriffen.

Parameter:

Die Untersuchungen wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP2 mit einem Argon/Krypton-Gaslaser bei 630-facher Vergrößerung (63 x 10, Ölobjektiv) und einem Zoom von 1,6 (Übersichtaufnahme) und 3 – 6 (Einzelzellaufnahme) durchgeführt. Die Anregung von GFP erfolgte über die Laserlinie 488 (nm). Die Laserleistung betrug zwischen 20 – 50%. Der Messbereich des emittierten Lichts wurde auf 495 – 535 nm Wellenlänge eingestellt. Als Kontrollfärbung wurden fixierte Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Anregung von DAPI erfolgte über die Laserlinie 405 (nm), bei einer Laserleistung von 20 – 25%. Der Messbereich des emittierten UV-Lichts wurde auf 420 – 480 nm Wellenlänge eingestellt.

Alle Bildausschnitte wurden 4 – 8mal gescannt und daraus das Endbild errechnet. Gegebenfalls wurden einzelne Bilder mit Adobe Photoshop 7.0 oder Leica LCS Lite nachbearbeitet.

Durchführung:

Die Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von STAT5-Molekülen wurden an lebenden und fixierten (PFA u/o Methanol) Zellen durchgeführt.

Analytik lebender Zellen:

TonB-Zellen, die **Fusionsproteine** von STAT5A-Wildtyp oder diversen STAT5A-Tyrosinmutanten exprimierten, wurden im Standardmedium in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder Doxyzyklin, zur Induktion der p210^{BCR-ABL}-Expression, kultiviert. Um die Effekte von BCR-ABL auf STAT5A in einer stabil p210^{BCR-ABL}-exprimierenden Population untersuchen zu können, wurde die Expression des Onkoproteins mindestens 3 – 7 Tage vor der Analytik angeschaltet. Die Zellen wurden ferner bis unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung im Brutschrank inkubiert. Ein Aliquot von Zellen einer Variante wurde in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und 2 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Rücklauf (20 – 50 µl) resuspendiert. Ein Teil der Zellen (15 µl) wurde auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger pipettiert und mit einem ebenfalls Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen abgedeckt. Danach wurden die Ränder mit einem silikonhaltigen Klebstoff luftdicht abgedichtet, um ein Austrocknen des Präparates zu vermeiden. Bedingt durch die ungünstigen Lebensbedingungen erfolgte die sofortige Vermessung der Probe am cLSM. Die Analysendauer pro Präparat betrug unter diesen Bedingungen maximal 30 Minuten. Gegebenenfalls wurde der oben beschriebene Vorgang mit einem frischen Aliquot wiederholt.

Bei der konfokalen Analytik wurden Bilder von typischen STAT5A-Verteilungszuständen in den Zellen angefertigt. Zusätzlich wurden je Variante mindestens 250 Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und die intrazelluläre Verteilung von STAT5AeGFP nach überwiegend nuklear oder überwiegend diffus unterschieden. Letzteres sollte eine statistische Untersuchung der Verteilungszustände in den Zellen ermöglichen.

Analytik fixierter Zellen:

1. Zellfixierung und Permeabilisierung:

Die Lokalisationsstudien von endogen- oder lentiviral-exprimierten Stat5-Molekülen (**Nicht-Fusionsproteine**) mittels Immunofluoreszenz erfolgten an fixierten TonB-Zellen. Dabei kamen unterschiedliche Fixierungstechniken zum Einsatz.

Bei der Fixierung mit Paraformaldehyd wurde das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert und zu den Zellen 200 µl PFA-Lösung zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das PFA durch die Zugabe von PBS verdünnt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Zum Pellet wurden 200 µl Tritonlösung (0,2%ig) pipettiert, wobei das Triton X-100 zur Permeabilisierung der Zellmembranen diente. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurde das Triton X-100 durch die Zugabe von PBS verdünnt und die Zellen durch eine weitere Zentrifugation pelletiert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen konnten nun für die Antikörperfärbung eingesetzt werden.

Bei der alternativ durchgeführten Methanolfixierung wurde das Zellpellet zunächst im Rücklauf resuspendiert. Anschließend wurden tröpfchenweise und unter kontinuierlichem Schütteln (Vortexen) 1 ml Methanollösung (80%ig) zu den Zellen pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis konnten die Zellen für die Antikörperfärbung verwendet werden. Da Methanol sowohl fixierende (Zellen werden dehydriert und Proteine dadurch präzipitiert) als auch permeabilisierende Eigenschaften (Lipide werden aus der Membran herausgelöst) besitzt, konnte auf weitere Schritte verzichtet werden. Auf die Methanolfixierung musste insbesondere zurückgegriffen werden, um lentiviral-exprimiertes GFP (bei nicht Fusionsproteinen) zu zerstören. In diesen Fällen erfolgte die Methanolfixierung über mindestens 72 Stunden. Der Zerfall des GFPs wurde am Fluoreszenzmikroskop und am FACS kontrolliert.

2. Antikörperfärbung:

Unspezifische Bindungsstellen in fixierten TonB-Zellen wurden über eine mehrstündige Inkubation im Wasch- und Blockmedium abgesättigt. Der Erst-Antikörper wurde auf eine Arbeitskonzentration von 1:25 bis 1:50 in Wasch- und Blockmedium verdünnt, auf die Zellen pipettiert und über Nacht unter Rotation bei 8°C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch zwei Wäschen mit Wasch- und Blockmedium entfernt.

Der FITC-gekoppelte sekundäre Antikörper wurde auf eine Arbeitskonzentration von 1:200 bis 1:250 verdünnt, auf die Zellen pipettiert und für 2 – 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch zwei Wäschen mit Wasch- und Blockmedium entfernt. In einer dritten Wäsche wurde zum Wasch- und Blockmedium DAPI in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die Inkubationszeit der DAPI-haltigen Waschlösung betrug 15 Minuten. Danach wurden die Zellen pelletiert und einmal im großen Volumen in ddH₂O gewaschen, was der Entfernung störender Salze diente. Abschließend wurden die Zellen aufkonzentriert und Aliquots (15 µl) der Zellsuspension auf Objektträgern gespottet. Nach dem vollständigen Trocknen der Zellen bei Raumtemperatur erfolgte deren Konservierung im Einbettungsmedium.

2.2.3 Proteinchemische Arbeiten

2.2.3.1 Isolation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten

Lösungen/Enzyme:

- DPBS + 100 μM Na_3VO_4
- RIPA-Puffer
 - 50 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat; 0,1% (v/v) SDS in ddH₂O
- Inhibitor-Mix
 - 25 mM NaF; 5 mM Na_3VO_4 ; 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$;
 - 10 mM AEBSF, 2 mM PMSF, 25 μM ALLN;
 - 40 μM MG-132; 20 μM Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor Set IV; 1/50 Volumen Protease Inhibitor Cocktail Set III in RIPA-Puffer

Materialien:

- 15ml- bzw. 50ml-Falcon Röhrrchen
- Reaktionsgefäße
- Zentrifuge
- Tiefkühlschrank (-80°C)

Durchführung:

Proteine aus Gesamtzellextrakten wurden unter Verwendung eines RIPA-Puffers gewonnen. Zum Schutz der Proteine vor Degradation durch Proteasen und das Proteasom oder einer Dephosphorylierung durch Phosphatasen wurde eine Komposition aus geeigneten Inhibitoren dem Puffer zugesetzt. Die durchschnittliche Wirkungsdauer der Inhibitoren betrug bei 8°C circa 24 Stunden.

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen in 15ml- bzw. 50ml-Falcon Röhrrchen überführt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und durch 5 ml eiskaltes PBS (+ Na_3VO_4) ersetzt. Die Zellen wurden im PBS resuspendiert und durch eine erneute Zentrifugation pelletiert. Das PBS wurde vollständig von den Zellen entfernt, die Pellets größenabhängig in 50 – 500 μl RIPA-Puffer resuspendiert und anschließend in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden die Zellen 15 min auf Eis im RIPA-Puffer inkubiert und in regelmäßigen Abständen gründlich gemischt. Beim Sichtbarwerden eines DNA-Schmiere im Puffer war die Zelllyse abgeschlossen. Nun konnten die Lysate für 15 min bei 13.000 rpm und 8°C zentrifugiert werden, um unerwünschte DNA und unlösliche Zellfragmente aus dem Lysat zu entfernen. Abschließend wurden die geklärten, proteinhaltigen Lysate in frische Reaktionsgefäße überführt, ein Teil (10 – 20 μl) für die Proteinbestimmung entnommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.3.2 Isolation von Proteinen aus zellulären Subfraktionen

Lösungen/Enzyme:

- DPBS + 100 μM Na_3VO_4
- hypotoner Puffer
20 mM HEPES (pH 7,5); 10 mM KCl; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 20% (v/v) Glycerin; 0,1% (v/v) Triton X-100 in ddH₂O
- hypertoner Puffer
20 mM HEPES (pH 7,5); 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 20% (v/v) Glycerin; 0,1% (v/v) Triton X-100 in ddH₂O
- Inhibitor-Mix
25 mM NaF; 5 mM Na_3VO_4 ; 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 10 mM AEBSF, 2 mM PMSF, 25 μM ALLN; 40 μM MG-132; 20 μM Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor Set IV; 1/50 Volumen Protease Inhibitor Cocktail Set III in hypo- oder hypertonischem Puffer

Materialien:

- 15ml- bzw. 50ml-Falcon Röhrchen
- Reaktionsgefäße
- Zentrifuge
- 27G-Kanüle + Spritze
- Neubauer-Zählkammer
- Lichtmikroskop (invers)
- Tiefkühlschrank (-80°C)

Durchführung:

Proteine aus zytoplasmatischen und nuklearen Subfraktionen wurden durch die Verwendung spezieller Niedrig- und Hochsalzpuffer in der Anwesenheit geeigneter Inhibitoren gewonnen.

Für die Proteinsubfraktionierung wurden die Zellen in 15ml- bzw. 50ml-Falcon Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und durch 15 ml eiskaltes PBS (+ Na_3VO_4) ersetzt. Die Zellen wurden zweimal in PBS resuspendiert und durch anschließende Zentrifugationen pelletiert. Das PBS wurde vollständig von den Zellen entfernt, die Pellets größenunabhängig in 1 ml hypotonem Puffer resuspendiert und anschließend in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden für die osmotische Lyse 15 min auf Eis inkubiert und anschließend fünfmal vorsichtig durch eine 27G-Kanüle gesaugt. Um die Qualität und Quantität der osmotischen Lyse abschätzen zu können, wurden 20 μl der Zellsuspension mit etwas Trypanblau-Lösung vermischt und am Lichtmikroskop in der Neubauer-Zählkammer der Anteil toter Zellen bestimmt. Dieser sollte mindestens >95% betragen. War der Anteil lebender, nicht blau-gefärbter Zellen höher, wurden die Zellsuspensionen erneut dreimal durch eine 27G-Kanüle gesaugt und der Trypanblau-Test wiederholt. Betrug der Anteil lebender Zellen <5%, konnten die Zellsuspensionen für 10 min bei 8°C und 2000 rpm zentrifugiert werden. Die Überstände, die *zytoplasmatische Fraktion*, wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und ein weiteres Mal zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile für 15 min bei 13.000 rpm und 8°C zentri-

fugiert. Die geklärten, zytoplasmatischen Fraktionen wurden in frische Reaktionsgefäße überführt, ein Teil (10 – 20 µl) für die Proteinbestimmung entnommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Die nach der Abtrennung der zytoplasmatischen Überstände verbliebenen Pellets, Zellkerne und unlösliche Zellbestandteile, wurden zweimal gründlich in 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Resuspendierung der Pellets in 300 – 500 µl hypertonem Puffer. Die Pellets wurden gründlich gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach dem Sichtbarwerden eines DNA-Schmiers war die nukleäre Lyse beendet und die Extrakte konnten für 15 min bei 13.000 rpm und 8°C zentrifugiert werden. Die Überstände, die *nukleäre Fraktion*, wurden in frische Reaktionsgefäße überführt, ein Teil (10 – 20 µl) für die Proteinbestimmung entnommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Lösungen/Enzyme:

- Bio-Rad Bradford Protein Assay
- BSA (3 mg/ml)
- Extraktionspuffer (Blindwert)
- Proteinextrakte

Materialien:

- 96-Lochplatten (flacher Boden)
- Multikanalpipette
- Photometer (Berthold, Mithras LB 940)

Durchführung:

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten erfolgte in modifizierter Form nach Bradford auf 96-Lochplatten [BRADFORD, 1976]. Dabei handelt es sich um ein photometrisches Verfahren, welches im sauren Milieu auf einer durch Proteininteraktion vermittelten Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliantblue G-250 von 465 nm zu 595 nm Wellenlänge basiert.

In Abhängigkeit der Probenanzahl wurden in die Reihe A einer 96-Lochplatte jeweils 200 µl und in die Reihen B bis H jeweils 100 µl ddH₂O vorgelegt. In die Reihe A wurden nun nacheinander in das 1. Loch 5 µl des verwendeten Extraktionspuffers, in das 2. Loch 5 µl BSA und in die übrigen Löcher jeweils 5 µl der zu analysierenden Proteinextrakte pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wurde das Volumen der Reihe A gründlich gemischt und davon 100 µl in Reihe B überführt. Diese Misch- und Verdünnungsschritte wurden bis Reihe H der 96-Lochplatte fortgesetzt. Abschließend wurden aus der Reihe H 100 µl der Proteinverdünnung abgenommen und verworfen. In jedem Loch der Platte waren somit 100 µl Restvolumen verblieben. Anschließend wurden 2 Teile Bradford-Reagenz mit 3 Teilen ddH₂O vermischt und in jedes Loch der Platte 100 µl der Färbelösung zugegeben. Im Anschluss daran erfolgte die sofortige Messung der Proben am Photometer bei 590 nm Messwellenlänge. Die Extinktionen des Blindwerts (Extraktionspuffer) wurden von den

Extinktionen des Standards (BSA) bzw. der Proben subtrahiert. Die Erstellung einer Standardkurve ermöglichte die Kalkulation der Proteingehalte in den Extrakten.

2.2.3.4 Immunologische Fällungen von Proteinen

Lösungen/Enzyme:

- RIPA-Puffer
50 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat; 0,1% (v/v) SDS in ddH₂O
- IP-Puffer
50 mM Tris (pH 7,5); 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% (v/v) Tween-20; 5% (v/v) Glycerin in ddH₂O
- Inhibitor-Mix
25 mM NaF; 5 mM Na₃VO₄; 5 mM Na₄P₂O₇; 10 mM AEBSF, 2 mM PMSF, 25 µM ALLN; 40 µM MG-132; 20 µM Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor Set IV; 1/50 Volumen Protease Inhibitor Cocktail Set III in RIPA- oder IP-Puffer
- Protein-Ladepuffer
10% (v/v) NuPage Sample Reducing Agent + 90% (v/v) NuPage LDS Sample Buffer
- Protein A/G Plus-Agarose
- NuPage Sample Reducing Agent (10x)
- NuPage LDS Sample Buffer (4x)
- Antikörper (200 µg/ml)
- Proteinextrakte

Materialien:

- Reaktionsgefäße
- Drehrad
- Zentrifuge
- 27G-Kanüle + Spritze
- Tiefkühlschrank (-80 °C)

Durchführung:

Die spezifische Anreicherung von Proteinen, z.B. für *WesternBlot*- und MS-Analytik, aus Proteingemischen erfolgte über Immunopräzipitation unter dem Einsatz von Antikörpern. Dabei wurden alle Schritte auf Eis oder unter Kühlung bei 8 °C durchgeführt. In Abhängigkeit des Bedarfs wurden zwischen 2 – 100 mg Gesamtprotein zur Proteinanreicherung eingesetzt. Um optimale Fällungsbedingungen gewährleisten zu können, wurden die Präzipitationen in 1,5ml-Reaktionsgefäßen zu maximal 7 mg Gesamtprotein durchgeführt. Zur Fällung wurden ferner nur Proteinextrakte verwendet, die unter der Verwendung von RIPA-Puffern hergestellt wurden.

Zur Präzipitation wurde das Volumen von 2 – 7 mg Gesamtprotein in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Pro 1 mg eingesetzten Gesamtproteins wurden 2 µg des spezifischen

Antikörpers und 15 µl Protein A/G Plus-Agarose hinzugefügt und die Ansätze auf ein Endvolumen von 750 – 1000 µl mit RIPA-Puffer oder IP-Puffer aufgefüllt. Daraufhin wurden die Ansätze über Nacht bei 8°C unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Agarose-Kügelchen, an denen die gewünschten Proteine gebunden waren, durch eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 1 min und 8°C pelletiert. Mit einer 27G-Kanüle wurde der Überstand vollständig abgesaugt und die Kügelchen dreimal mit je 500 µl frischem RIPA-Puffer gewaschen. Zum Ablösen der präzipitierten Proteine von den Agarose-Kügelchen wurden jeweils 50 µl Protein-Ladepuffer zu den Pellets pipettiert und diese 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben schnell auf Eis abgekühlt. Sie konnten nun im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösungen/Enzyme:

- Sammelgelpuffer für Lämmli-Gele
0,5 M Tris (pH 6,8); 0,1% (v/v) SDS
- Trenngelpuffer für Lämmli-Gele
1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1% (v/v) SDS
- Elektrophoresepuffer für Lämmli-Gele (10x)
0,25 M Tris (pH 8,9); 1,92 M Glycin; 1% (v/v) SDS
- Sammel- und Trenngelpuffer für Tricine-Gele
3 M Tris (pH 8,45); 0,3% (v/v) SDS
- Kathodenpuffer für Tricine-Gele (5x)
0,5 M Tris (pH 8,3); 0,5 M Tricine; 0,5% (v/v) SDS
- Anodenpuffer für Tricine-Gele (5x)
1 M Tris (pH 8,9)
- Sammel- und Trenngelpuffer für bis-Tris-Gele
1,25 M bis-Tris (pH 6,5 – 6,8)
- Elektrophoresepuffer für bis-Tris-Gele (5x)
0,25 M MES bzw. 0,25 M MOPS; 0,25 M Tris (pH 7,5) ; 5 mM EDTA ; 0,5% (v/v) SDS
- Protein-Ladepuffer
10% (v/v) NuPage Sample Reducing Agent +
90% (v/v) NuPage LDS Sample Buffer
- NuPage Sample Reducing Agent (10x)
- NuPage LDS Sample Buffer (4x)
- Acrylamide/Bis-Solution, 19:1, 40%
- Acrylamide/Bis-Solution, 29:1, 30%

Materialien:

- Elektrophoreseapparatur mit Netzteil
- Glasplatten und Abstandshalter
- Gel-Kassetten (1 mm)
- Reaktionsgefäße

Zusammensetzung von Lämmli-Gelen:

| Trenngel | 6% | 8% | 10% |
|---------------------|--------|--------|--------|
| Acrylamide: | 2,3 ml | 3,0 ml | 3,7 ml |
| Trenngel-P.: | 5,6 ml | 5,6 ml | 5,6 ml |
| ddH ₂ O: | 7,0 ml | 6,3 ml | 5,6 ml |
| APS | 150 µl | | |
| TEMED | 15 µl | | |

ausreichend für 2 Minigele

| Sammelgel | 4% | 5% | 6% |
|---------------------|--------|--------|--------|
| Acrylamide: | 0,5 ml | 0,6 ml | 0,7 ml |
| Sammelgel-P.: | 0,6 ml | 0,6 ml | 0,6 ml |
| ddH ₂ O: | 3,9 ml | 3,8 ml | 3,7 ml |
| APS | 50 µl | | |
| TEMED | 5 µl | | |

Zusammensetzung von Tricine-Gelen:

| Trenngel | 6% | 8% | 10% |
|---------------------|--------|--------|--------|
| Acrylamide: | 2,3 ml | 3,0 ml | 3,8 ml |
| Trenngel-P.: | 5,0 ml | 5,0 ml | 5,0 ml |
| Glyzerin | 2,0 ml | 2,0 ml | 2,0 ml |
| ddH ₂ O: | 5,7 ml | 5,0 ml | 4,2 ml |
| APS | 150 µl | | |
| TEMED | 15 µl | | |

ausreichend für 2 Minigele

- 86% (v/v) Glycerin
- 10% (w/v) APS
- TEMED

| Sammelgel | 4% | 5% | 6% |
|---------------------|--------|--------|--------|
| Acrylamide: | 1,0 ml | 1,3 ml | 1,5 ml |
| Sammelgel-P.: | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| ddH ₂ O: | 6,5 ml | 6,2 ml | 6,0 ml |
| APS | 100 µl | | |
| TEMED | 10 µl | | |

Zusammensetzung von bis-Tris-Gelen:

| Gel | 4% | 8% | 12% |
|---------------------|--------|--------|--------|
| Acrylamide: | 1,0 ml | 2,0 ml | 3,0 ml |
| bis-Tris-Puffer: | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| ddH ₂ O: | 4,0 ml | 3,0 ml | 2,0 ml |
| APS | 75 µl | | |
| TEMED | 7,5 µl | | |

Durchführung:

Proteinextrakte wurden in 6 – 12%-igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Dabei wandern durch das SDS negativ geladene und linearisierte Proteine in einer Geschwindigkeit zur Anode, die dem Logarithmus ihrer Molmasse umgekehrt proportional ist. In Abhängigkeit der Proteingröße kamen drei verschiedene Auftrennungsverfahren (LÄMMLI, 1970; die Tricine-SDS-Page nach SCHÄGGER und VON JAGOW, 1987 und die bis-Tris-SDS-Page) zur Anwendung, die sich hauptsächlich in der Zusammensetzung des Puffersystems und des pH-Wertes, nicht aber im Auftrennungsprinzip unterscheiden. Bei allen Methoden werden die Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach ihrer Molmasse aufgetrennt.

Eingesetzt wurden vorwiegend Minigele mit einer Dimension von 6 x 9 cm. Neben uniformen Trenngelen kamen auch industriell gefertigte bis-Tris-Gradientengele (4 – 12%) zum Einsatz. Bei selbst gegossenen Gelen wurde das Trenngel (6 – 12%) mit einem circa 1 cm hohen Sammelgel (4 – 6%) überschichtet. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug dabei 19:1 oder 29:1 (w/w). Die Trenn- und Sammelgele wurden gemäß den obigen Rezepten zusammen pipettiert. Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch die Zugabe von APS und TEMED initiiert. Zwischen zwei Glasplatten mit Abstandshaltern (0,75 – 1,0 mm) oder industriell angefertigten Gelkassetten (1 mm) wurde zunächst die Trenngel-Lösung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol vollständig entfernt, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und ein Kamm zum Aussparen der Geltaschen eingesetzt. Nach dem Polymerisieren konnte das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingebaut und die Kammern mit den jeweiligen Elektrophoresepuffern (Lämmli-Gele: 1x Elektrodenpuffer; Tricine-Gele: 1x SDS-Anodenpuffer und 1x SDS-Kathodenpuffer; bis-

Tris-Gele: 1x MES-SDS Puffer bei Proteinen <20 kDa und 1x MOPS-SDS Puffer bei Proteinen >20 kDa) befüllt werden. Der Kamm wurde entfernt und die Geltaschen gründlich mit Elektrophoresepuffer ausgespült. In die Geltaschen wurden nun die im Protein-Ladepuffer aufgenommenen und für 5 min bei 95°C denaturierten und reduzierten Proteinextrakte geladen. Das Fassungsvermögen pro Geltasche lag dabei bei 35 – 40 µl. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 – 20 V/cm. Als Größenkontrolle wurde in eine Geltasche ein Proteinmarker aufgetragen. Die Elektrophorese war beendet, nachdem das Protein von Interesse mindestens 2 – 3 cm in das Trenngel hineingewandert war. Nach der Elektrophorese konnten die Proteine im Gel entweder angefärbt oder auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden.

2.2.3.6 Anfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Lösungen/Enzyme:

- Coomassie-Färbelösung (klassisch)
 - 0,2% (w/v) Coomassie-BrilliantBlue R-250; 0,2% (w/v) Coomassie-BrilliantBlue G-250; 50% (v/v) Methanol in ddH₂O lösen; danach Zugabe von 10% (v/v) konz. Essigsäure → vor Gebrauch filtrieren!
- Coomassie-Entfärbelösung (klassisch)
 - 30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) konz. Essigsäure in ddH₂O
- Coomassie-Färbelösung (kolloidal)
 - 0,04% (w/v) Coomassie-BrilliantBlue R-250; 0,04% (w/v) Coomassie-BrilliantBlue G-250; 5% (w/v) ortho-H₃PO₄; 5% (w/v) Al₂(SO₄)₃·x(H₂O)₁₈; 10% (v/v) Ethanol in ddH₂O
- Coomassie-Entfärbelösung (kolloidal)
 - 10% (v/v) Ethanol; 2% (v/v) ortho-H₃PO₄ in ddH₂O

Materialien:

- Laborschüttler
- Färbegefäße
- SilverSnap Stain Kit II

Durchführung:

Zum Sichtbarmachen von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen kamen die beiden Farbstoffe Coomassie-BrilliantBlue G-250 und R-250 zur Anwendung. Diese lagern sich unspezifisch vor allem an die basischen Seitenketten der Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin an und führen zu einer reversiblen Blau-Violett-Färbung der Proteine. Die Nachweisgrenzen der klassischen Coomassie-Färbung liegen bei etwa 0,1 µg (R-250) und 0,5 µg (G-250) Protein pro Bande bzw. Spot. Mit der kolloidalen Coomassie-Färbung können

hingegen Nachweisgrenzen von 5 ng Protein pro Bande bzw. Spot erreicht werden. Noch empfindlicher können Proteine über eine Silberfärbung <1 ng im Gel detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Polyacrylamid-Gele vorwiegend mit Coomassie-Färbelösungen behandelt, um STAT5-Immunopräzipitate für anschließende massenspektroskopische Analysen im Gel anfärben und ausschneiden zu können.

Nach der SDS-Page wurden die Gele zweimal 10 min in ddH₂O gewaschen, um überschüssiges und störendes SDS zu entfernen und mehrere Stunden bzw. über Nacht in den Färbelösungen (klassisch oder kolloidal) unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Entfärbung der Gele mit den entsprechenden Entfärbelösungen.

Silberfärbungen wurden mit dem „SilverSnap Stain Kit II“ (Pierce, Rockford, IL) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.7 Die massenspektroskopische Identifizierung von Phosphorylierungsstellen (MIDAS)

Hintergrund:

Bei der massenspektroskopischen (MS) Analytik von Proteinen und Proteingemischen kommt bevorzugt die MALDI-TOF-MS und die Triple-Quadrupol-MS zum Einsatz. Beide Methoden ermöglichen die Identifizierung von angereicherten Proteinen oder komplexer Proteingemische, nach einer fraktionierten Aufreinigung über gas- (GC) bzw. flüssigkeitschromatographischer (LC) Systeme

Relativ kontaminationsfreie Proteinproben für die MALDI-TOF-MS-Analytik können durch Immunopräzipitation mit anschließender SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels gewonnen werden. In der Regel wird für die MS-Analyse eine Coomassie-gefärbte Proteinbande benötigt. Vor dem Einsatz in der MS müssen die Proteine proteolytisch verdaut werden. Die resultierenden Peptide werden in einer Matrix auf spezielle *Trays* gespottet und nach deren Kristallisation mit einem gepulsten Laserlicht beschossen. Dabei werden die Peptide verdampft und ionisiert. In der Gasphase werden die ionisierten Peptide im elektrischen Feld beschleunigt und dem TOF-Analysator (*time-of-flight*) übergeben. Im TOF bewegen sich die ionisierten Peptide mit einer Geschwindigkeit, die zu ihrer Molmasse umgekehrt proportional ist. Am Ende treffen sie auf einen Detektor. Aus der Verweildauer im TOF wird die Molmasse des Peptids errechnet. Aus der Summe aller Molmassen einer Proteinprobe und dem Spaltungsmuster der verwendeten Protease kann über Datenbanken die Identität des Proteins ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurde die MS-Analytik zur Identifizierung multipler Phosphorylierungsstellen an STAT5 in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL eingesetzt.

Die nicht erschöpfende Phosphorylierung aller Zielproteine in einer Zelle limitiert die Leistungsfähigkeit der klassischen MALDI-TOF-MS. Aus diesem Grund wurde für die Analytik

von STAT5-Phosphorylierungsstellen auf ein spezielles LC/MS/MS-MIDAS-Verfahren (*Multiple Reaction Monitoring-Initiated Detection and Sequencing*) zurückgegriffen. Der Vorteil dieses Systems liegt in der niedrigen Nachweisgrenze von <200 fmol für phosphorylierte Peptide. Erreicht wird diese Empfindlichkeit durch ein zweistufiges Messverfahren. Im ersten Schritt erfolgt die Identifizierung des Zielproteins in der Probe (STAT5A/B). Eine Software generiert daraufhin eine Übersicht potentieller Phosphopeptide des Zielproteins. Überschreitet eines dieser potentiellen Phosphopeptide in einem empfindlichen Triple-Quadrupol-MS-Scann einen definierten Schwellenwert, wird dieses Peptid selektioniert und einer weiteren MS/MS-Analyse unterzogen. In dieser Stufe der MIDAS-Analyse unterliegt das isolierte Peptid einer weiteren Fragmentierung. Anschließend werden die einzelnen Fragment-Ionen über eine lineare Ionenfalle gesammelt, massengetrennt einem Detektor zugeführt und gescannt. Das ermöglicht sowohl die Identifikation des Peptids als auch der Phosphorylierungsstelle.

Die MS-Analytik zu diesem Projekt erfolgte in Zusammenarbeit mit JOHN R. GRIFFITHS und ANTHONY D. WHETTON vom „Paterson Institute for Cancer Research“, Manchester, UK.

Durchführung:

Proteinextrakte aus TonB-Zellen kultiviert unter IL-3, Dox/IL-3 und Dox, K562-Zellen und PBMC-Zellen von p210^{BCR-ABL}-positiven, CML-erstdiagnostizierten Spendern oder von gesunden Spendern wurden mit STAT5-spezifischen Antikörpern inkubiert. Das immunopräzipitierte STAT5 wurde in 7%-igen Lämmli-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung (klassisch) angefärbt. STAT5-Proteinbanden wurden aus den Gelen ausgeschnitten, die Gelstücke in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C eingefroren. Auf Trockeneis gelagert wurden die Proben zur MIDAS-Analyse dem Paterson Institute, Manchester, UK übersendet. Dort erfolgte die Aufarbeitung und Vermessung der Proben in Anlehnung an UNWIN *et al.* (2005).

2.2.3.8 Nachweis spezifischer Proteine im *WesternBlot*

Lösungen/Enzyme:

- Transferpuffer für Lämmli- und Tricine-Gele
25 mM Tris (pH 8,4); 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol
- Transferpuffer für bis-Tris-Gele
50 mM Tris; 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS; 20% (v/v) Methanol
- TBS (10x)
0,5 M Tris (pH 7,6); 1,35 M NaCl
- TBS-T

Materialien:

- Blotapparatur mit Netzteil
- Nitrocellulosemembran
- Whatman-3MM-Papier
- Inkubationsgefäße für Membranen
- 15ml-Falcon Röhrchen
(zur Antikörperverdünnung)
- Laborschüttler
- Imaging-System
- Autoradiographiefilme

- 0,05% (v/v) Tween-20 in 1x TBS
- Magermilch
- 3% (w/v) Magermilchpulver; 0,02% (w/v) Na-Azid in 1x TBS-T oder DPBS
- DPBS (-CaCl₂/-MgCl₂)
- ECL Western Blotting Detection Reagents
- ECL Advance Western Blotting Detection Kit
- Re-Blot Plus Mild Solution (10x)
- Antikörper (200 µg/ml)
- X-Ray-Film Entwickler

Durchführung:

Vor dem immunologischen Nachweis spezifischer Proteine im *WesternBlot* erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine (SDS-PAGE) auf Nitrocellulose-Membranen. Dafür wurden vor dem Transfer die Membran und das Polyacrylamid-Gel 10 min im methanolhaltigen Transferpuffer äquilibriert. Über eine Elektrophorese im Nassblotverfahren erfolgte der anschließende Transfer auf die Membran. Dazu wurde das Nassblotmodul wie folgt zusammengebaut: Kathode – 2x Schwämme – 2x Whatman-3MM – Gel – Membran - 2x Whatman-3MM – 3x Schwämme – Anode. Alle Komponenten wurden vor dem Zusammenbau des Moduls gründlich mit Transferpuffer getränkt. Ferner musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen oder Lufteinschlüsse im System befanden, da diese im erheblichen Maße den Transfer behindert hätten. Die Elektrophorese erfolgte in Abhängigkeit der Molmasse des zu untersuchenden Proteins für 1 – 2 Stunden bei 35 V (8 Watt) im Transferpuffer. Nach dem Transfer wurde die Membran zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur in Magermilch geschwenkt. Danach wurde die Magermilch entfernt und durch eine geeignete Verdünnung des Primärantikörpers in Magermilch ersetzt. Für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur, besser aber über Nacht bei 8°C, wurde der Primärantikörper unter Schwenken auf der Membran belassen. Ungebundener Antikörper wurde durch drei 10-minütige Wäschen mit TBS-T entfernt. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten und Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper unter Schwenken inkubiert. Eine unspezifische Antikörperbindung wurde abermals durch mehrmalige Wäsche mit TBS-T entfernt.

Im Anschluss an diese Behandlung wurde die Membran für 5 min in einer Chemilumineszenz-Lösung inkubiert, die Proteinbanden durch ein *Imaging*-System detektiert und digitalisiert. Für eine analoge Darstellung der Proteinbanden erfolgten die Exposition der Membran mit Blaulicht-sensitiven Autoradiographiefilmen und die anschließende Entwicklung der belichteten Filme im analogen Entwicklersystem. Alte Antikörper konnten durch eine 15-minütige Inkubation in 1x „Re-Blot Plus Mild Solution“ von der Membran entfernt wer-

den. Nach einer 1-stündigen Inkubation in Magermilch konnte die Membran für den nächsten immunologischen Proteinnachweis verwendet werden.

2.2.3.9 Die Analyse der STAT5A-Proteinstabilität im Degradationsassay

Lösungen/Enzyme:

- DPBS
- RIPA-Puffer (modifiziert)
 - 50 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat; 1 mM DTT in ddH₂O
- Protein-Ladepuffer
 - 10% (v/v) NuPage Sample Reducing Agent
 - + 90% (v/v) NuPage LDS Sample Buffer
- NuPage LDS Sample Buffer (4x)
- NuPage Sample Reducing Agent (10x)

Materialien:

- 15ml- bzw. 50ml-Falcon Röhrchen
- Reaktionsgefäße (gekühlt)
- Pipettenspitzen (gekühlt)
- Thermoblock (25°C, 37°C)
- Kühlzentrifuge

Durchführung:

In diesem Assay wurde die Stabilität von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten (exprimiert in TonB-Zellen in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL) bei der Co-Inkubation mit Extrakten von Ton32D-Zellen (ein zu TonB-Zellen analoges System mit einem myeloischen Hintergrund) oder PBMCs von p210^{BCR-ABL}-positiven und p210^{BCR-ABL}-negativen Spendern unter definierten Bedingungen analysiert.

TonB-Zellen wurden lentiviral mit den Konstrukten von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten transduziert und in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL kultiviert. Unmittelbar vor dem Assay erfolgte die Lyse der Zellen ($1 \cdot 10^7$ Zellen/200 μ l) im modifizierten RIPA-Puffer (-SDS, -EDTA, -Proteaseinhibitor, -Proteasominhibitor, -Phosphataseinhibitor, + 1mM DTT).

Analog dazu wurden Ton32D-Zellen ($1 \cdot 10^7$ Zellen/200 μ l) oder PBMCs ($4 \cdot 10^8$ Zellen/5 ml) aus primären Material im modifizierten RIPA-Puffer lysiert. Nach dem Klären der Proteinextrakte folgte deren Einsatz im Degradationsassay. Dazu wurden unter Verwendung gekühlter Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen jeweils 10 μ l der Proteinextrakte von TonB-Zellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen/10 μ l) mit 10 μ l der Proteinextrakte von Ton32D-Zellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen/10 μ l) bzw. 10 μ l der Proteinextrakte von PBMC-Zellen ($3 \cdot 10^4$ PBMC/10 μ l) gemischt und unter definierten Bedingungen (Temperatur, Zeit, AEBSF, MG-132) inkubiert. Nach Beendigung des Assays erfolgten die rasche Zugabe des Protein-Ladepuffers und eine 5-minütige Denaturierung der Proben bei 95°C. Abschließend wurden die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Gehalte an STAT5A und ERK-2 immunologisch detektiert.

3. Ergebnisse

3.1 Überprüfung der Funktionalität des TonB-Zellkultursystems

Das in dieser Arbeit verwendete TonB-Zellkultursystem (**TetonBa/F3**) wurde von KLUCHER *et al.* etabliert und 1998 publiziert. Bei diesen Zellen handelt es sich um murine, B-lymphatische und stringent IL-3-abhängig wachsende (Interleukin-3) Vorläuferzellen. Die Zugabe des Antibiotikums Doxyzyklin in das Nährmedium induziert die zeit- und dosisabhängige Expression von BCR-ABL (Abbildung 3.1_A).

Begleitend zu den Arbeiten von KLUCHER *et. al/* wurde das TonB-Zellkultursystem für diese Arbeit näher charakterisiert.

TonB-Zellen einer laufenden IL-3-Kultur, wurden für die Entfernung des Zytokins mehrmals in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Medien mit unterschiedlichen Stimuli (+IL-3; +IL-3/+BCR-ABL; +BCR-ABL; +BCR-ABL/+STI; -IL-3/-BCR-ABL) neu ausgesät und nach 0, 24, 48 und 72 Stunden die Lebendzellzahl und der Anteil toter Zellen bestimmt.

Während TonB-Zellen in der Gegenwart von IL-3 uneingeschränkt proliferieren können, weisen die Zellen bei einer simultanen Aktivierung der p210^{BCR-ABL}-Expression (+IL-3/+BCR-ABL) ein deutlich reduziertes Wachstum auf. Verfünfachen sich innerhalb von 24 Stunden die Zellen unter IL-3, kann bei der Variante +IL-3/+BCR-ABL nur noch eine Ver vierfachung der Zellzahl beobachtet werden. Die beeinträchtigte Zellproliferation nach Aktivierung der p210^{BCR-ABL}-Expression wirkt sich hingegen nicht negativ auf das Überleben der Zellen aus. Unter beiden Bedingungen liegt der Anteil vitaler Zellen im Beobachtungszeitraum bei mindestens 98%. TonB-Zellen, die ausschließlich in der Anwesenheit von BCR-ABL kultiviert werden, sind am stärksten in der Zellproliferation beeinträchtigt. Innerhalb von 24 Stunden kommt es lediglich zu einer Verdoppelung bis Verdreifachung der Zellzahl. Ebenso steigt der Anteil toter Zellen in der Population auf 10% – 15% an. TonB-Zellen, die in der Abwesenheit beider Stimuli (-IL-3/-BCR-ABL) oder in der Anwesenheit von BCR-ABL und dessen spezifischen Inhibitor (+BCR-ABL/+STI) kultiviert werden, weisen keine Zellproliferation mehr auf. Nach 72 Stunden liegt der Anteil toter Zellen bei mindestens 90% (Abbildung 3.1_B-C).

Der Versuch zeigt das stringent Zytokin- oder Onkoprotein-abhängige Proliferationsverhalten von TonB-Zellen. Dabei scheint bereits die Induktion der p210^{BCR-ABL}-Expression, auch in der Anwesenheit von IL-3, die Proliferationsfähigkeit der Zellen erheblich zu beeinflussen.

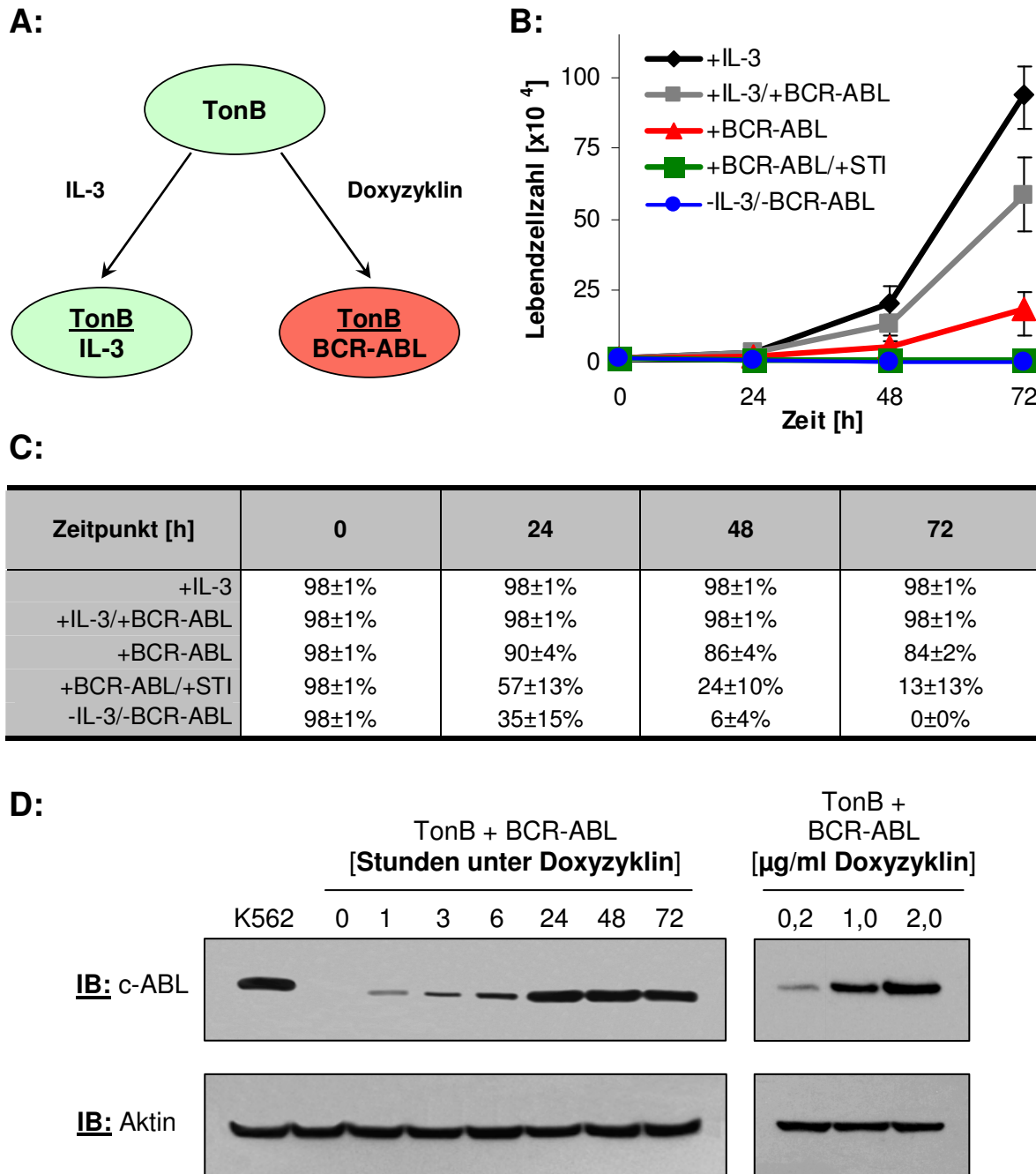


Abb. 3.1: Die Induktion von p210^{BCR-ABL} im TonB-Zellkultursystem (A) Schema vom TonB-Zellkultursystem. TonB-Zellen proliferieren faktorabhängig in der Anwesenheit von murinen IL-3. Die Zugabe von Doxyzyklin vermittelt die Expression von p210^{BCR-ABL}. (B) Analyse des Proliferationsverhaltens von TonB-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Je 1x10⁴ Zellen wurden in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL ausgesät. Im Intervall von 24 Stunden wurde die Lebendzellzahl in der Kultur bestimmt und graphisch dargestellt. Gezeigt sind die durchschnittlichen Lebendzellzahlen aus 5 unabhängigen Versuchen und ihre absoluten Schwankungsbreiten. (C) Tabellarische Zusammenfassung des Anteils lebender Zellen in der Kultur in Abhängigkeit des Stimulus. Die Zuordnung *lebend/tot* erfolgte über den Trypan-Blau-Ausschluss. (D) Analysen zur Induzierbarkeit der p210^{BCR-ABL}-Expression. TonB-Zellen wurden zeitabhängig mit 2,0 µg/ml Doxyzyklin stimuliert oder dosisabhängig mit den angegebenen Antibiotikakonzentrationen über 24 Stunden kultiviert. Im *WesternBlot* wurde die Expression von BCR-ABL und Aktin (Ladekontrolle) analysiert. Als Positivkontrolle kam die konstitutiv p210^{BCR-ABL}-exprimierende Zelllinie K562 zum Einsatz.

Die Induktion der Proliferation in der Gegenwart des Onkoproteins kann auf die Tyrosinkinaseaktivität von BCR-ABL zurückgeführt werden, da die Proliferationsfähigkeit der Zellen bei gleichzeitiger Anwesenheit von STI (Imatinib) vollständig verloren geht. Um eine mögliche Anreicherung von faktorunabhängig- oder Imatinib-resistent-wachsender Zellen in der Population frühzeitig zu erkennen, wurden die Wachstumstests in regelmäßigen Abständen wiederholt.

Eine zeit- und dosisabhängige Induktion von BCR-ABL im TonB-Zellkultursystem wurde im *WesternBlot* überprüft. Die Expression des Onkoproteins wurde durch die Zugabe von 2,0 µg/ml Doxyzyklin in das Nährmedium von TonB-Zellen über einen Zeitraum von 0 bis 72 Stunden aktiviert. Alternativ wurden TonB-Zellen 24 Stunden mit unterschiedlichen Doxyzyklinkonzentrationen (0,2 – 2,0 µg/ml) im Nährmedium inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Mengen an BCR-ABL und Aktin untersucht. Als Positivkontrolle kam die humane und konstitutiv p210^{BCR-ABL}-exprimierende Zelllinie K562 zum Einsatz (Abbildung 3.1_D).

TonB-Zellen ohne Doxyzyklin-Beigabe weisen lediglich eine marginale Expression des Onkoproteins auf. Zeitabhängig wird die Expression des Onkoproteins induziert und erreicht nach 24 Stunden ihr Maximum. Zwischen 24 und 72 Stunden bleibt die Menge an exprimierten Protein auf hohem Niveau konstant und ist vergleichbar mit der konstitutiven p210^{BCR-ABL}-Expression in K562-Zellen. Ferner ist die Expression von BCR-ABL über einen breiten Doxyzyklin-Konzentrationsbereich in TonB-Zellen induzierbar.

Der Versuch zeigt die Induzierbarkeit von p210^{BCR-ABL} im TonB-Zellkultursystem. Eine eventuelle Durchlässigkeit des Doxyzyklin-abhängigen Promotors in der Abwesenheit von Doxyzyklin scheint keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen unter Zytokinentzug (-IL-3/-BCR-ABL) zu nehmen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde BCR-ABL in TonB-Zellen durch die Zugabe von 1,0 – 2,0 µg Doxyzyklin pro ml Kulturmedium über einen Zeitraum von mindestens 72 Stunden induziert. Alle 48 Stunden wurde das Antibiotikum erneut zugegeben.

3.2 Der Einfluss von STAT5 auf die Proliferation und das Überleben von TonB-Zellen in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL

Die Bedeutung von STAT5 in der p210^{BCR-ABL}-vermittelten Proliferation hämatopoetischer Zellen wurde bereits intensiv erforscht. SCHERR *et al.* (2006) konnte durch den Einsatz einer STAT5A/B-shRNA, die gleichermaßen beide STAT5-Isoformen erkennt, eine deutlich beeinträchtigte Proliferation von p210^{BCR-ABL}-exprimierenden TonB-Zellen beobachten. Dabei wurde die verminderte Zellproliferation von einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen in der Kultur begleitet. Ausgehend von diesen Arbeiten wurde nun ein diffe-

rentieller Einfluss von STAT5A und STAT5B auf die oben beschriebenen Effekte untersucht.

Basierend auf einem Nukleinsäurevergleich der codierenden Sequenzen von STAT5A (NM_011488) und STAT5B (NM_001113563) wurden gegen stark heterogene Bereiche beider Gene Isoform-spezifische shRNAs generiert und diese im Kotransfektionsassay (siehe auch Kapitel 2.2.2.6) auf ihre Funktion hin untersucht. Von 10 getesteten shRNAs konnte jeweils eine shRNA gegen STAT5A und eine shRNA gegen STAT5B identifiziert werden, die beide in der Lage sind, die endogenen Gehalte ihrer Ziel-mRNAs um über 90% zu senken (Abbildung 3.2_A-C). Diese beiden shRNAs kamen, neben der bereits durch SCHERR *et al.* (2006) publizierten Isoform-unspezifischen STAT5A/B-shRNA, für alle hier vorgestellten Ergebnisse zum Einsatz. Die Konstruktion und Klonierung der H1-shRNA-Kassetten in den lentiviralen Expressionsvektor (pSR-SnaBI) erfolgte gemäß SCHERR *et al.* (2003).

Für die Analyse eines differentiellen Einflusses von STAT5A und STAT5B auf die Proliferation von TonB-Zellen unter IL-3 u/o BCR-ABL erfolgte die Transduktion der Zellen mit verschiedenen shRNAs (shGL2-ctrl-, shSTAT5A/B-, shSTAT5A-, shSTAT5B-RNA und als Mix: shSTAT5A-RNA + shSTAT5B-RNA). Am Tag 4 nach der Transduktion wurden die Zellen aufgearbeitet und in einem Proliferationsassay eingesetzt. Zeitgleich wurden aus den Zellen Proteine und RNA isoliert.

Bei einer Transduktion von TonB-Zellen mit Isoform-spezifischen shRNAs gegen STAT5A oder STAT5B, nimmt unter Anwesenheit von IL-3 das Proliferationsvermögen der Zellen um 40% – 50% gegenüber shGL2-ctrl-RNA-transduzierten Zellen ab. Dabei lässt sich die verminderte Proliferationsfähigkeit nicht auf einen Anstieg toter Zellen in der Population zurückführen. Sowohl unter STAT5A-, als auch STAT5B-Reduktion bleibt der Anteil vitaler Zellen gegenüber shGL2-ctrl-RNA-transduzierten TonB-Zellen unverändert hoch. Wird hingegen eine shRNA verwendet, die gegen beide STAT5-Isoformen gerichtet ist, steigt das Defizit in der Zellproliferation in der Anwesenheit von IL-3 auf über 80% an. Ebenso ist der Anteil toter Zellen unter diesen Bedingungen mit durchschnittlich 15% – 20% gegenüber 2% – 3% bei der Reduktion einzelner STAT5-Isoformen deutlich erhöht (Abbildung 3.3_A-B).

Im Gegensatz dazu weisen TonB-Zellen bei einer Reduktion von STAT5A oder STAT5B in der Anwesenheit von p210^{BCR-ABL} Unterschiede in der Proliferation und dem Überleben auf. Wie bereits in der Anwesenheit von IL-3 beobachtet wurde, proliferieren auch in der Gegenwart von BCR-ABL die Zellen mit einer Isoform-spezifischen STAT5-Reduktion deutlich schlechter, als shGL2-ctrl-RNA-transduzierte TonB-Zellen. Das Defizit in der Proliferation und dem Überleben ist jedoch bei Zellen mit einer spezifischen Reduktion von STAT5B beträchtlich größer, als bei Zellen mit einer STAT5A-Reduktion.

A: shS5A/B
 Proteinsequenz Glu Tyr Phe Ile Ile Gln Tyr
 murin STAT5A 800- gag tac ttc atc atc cag tac -820
 murin STAT5B 705- gag tac ttc atc atc cag tac -725
 STAT5A-shS5A/Bmut 800- **gaa tat ttt att att caa tat** -820

shS5A bzw. shS5B
 Proteinsequenz Thr Thr Arg Asp Phe Ser Ile
 murin STAT5A 2231- acg acg cga gat ttc tcc att -2251
 murin STAT5B 2136- acc act aga gac ttc tct atc -2156
 STAT5A-shS5Amut 2231- **act acc cgc gac ttt tca ata** -2251

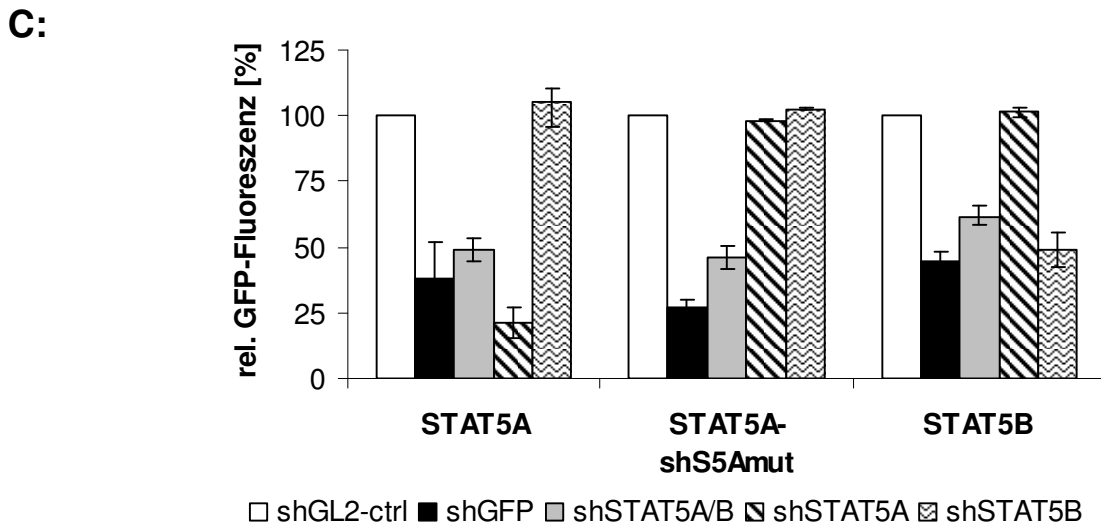
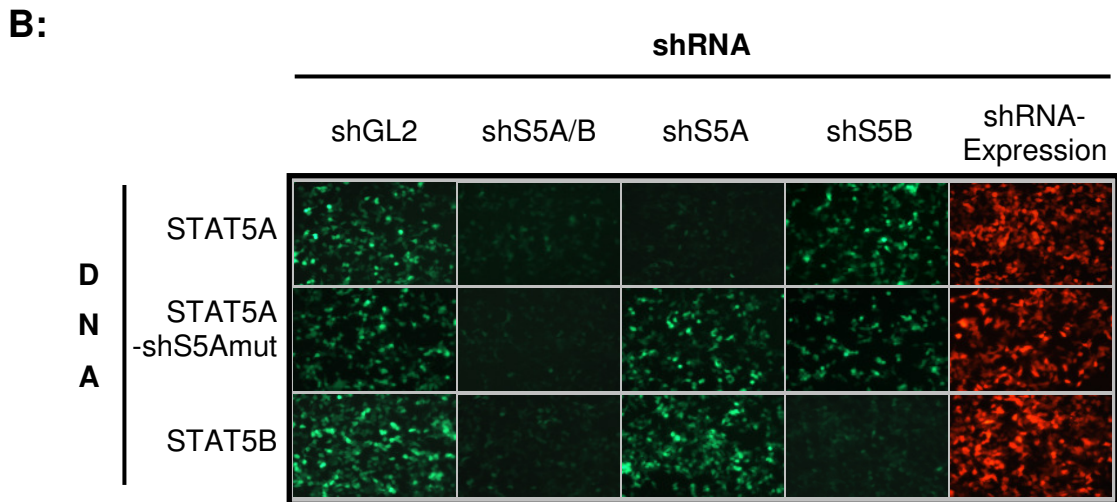


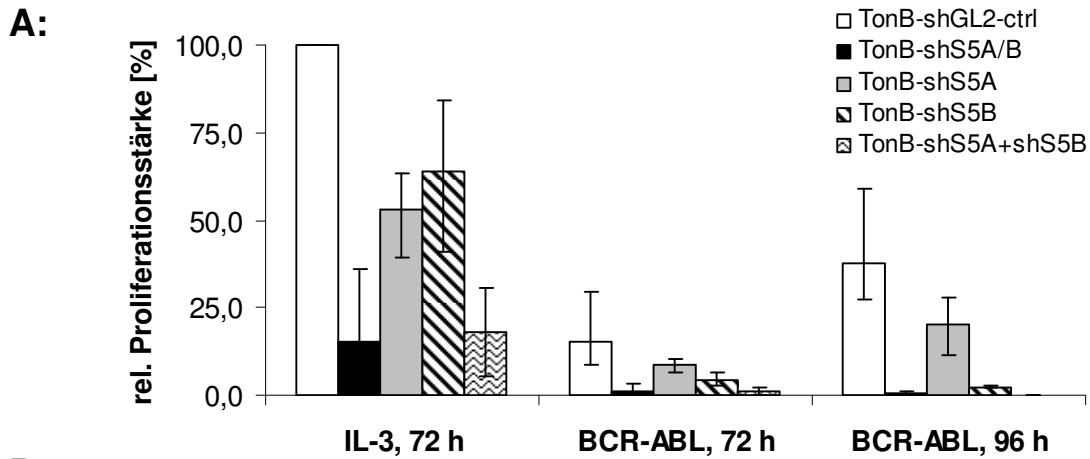
Abb. 3.2: Etablierung und Testung von STAT5-spezifischen shRNAs. (A) Erkennungssequenz (unterstrichen) von Isoform-unspezifischen (shS5A/B) und Isoform-spezifischen (shS5A, shS5B) *small-hairpin*-(sh)RNAs im jeweiligen STAT5-Gen. Die stumme Mutagenese dieser Erkennungssequenzen (fett markierte Nukleotide) resultiert in RNAi-resistenten Mutanten. (B) Qualitativer Nachweis der Funktion von shRNAs in HEK-293-Zellen nach transienter Expression von STAT5 in Kombination mit verschiedenen shRNAs. Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der GFP-Expression einen Tag nach Lipofektion. (C) Quantitativer Nachweis der Funktion von shRNAs in HEK-293-Zellen durch eine durchflusszytometrische Messung der GFP- und RFP-Expression zwei Tage nach Lipofektion. Darstellung der relativen Expression von STAT5 (GFP-Signal) nach Normalisierung auf die Expression der jeweiligen shRNA (RFP-Signal). Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen. In beiden Herangehensweisen ist die Selektivität der Isoform-spezifischen shRNAs und die RNAi-Resistenz nach stummer Mutagenese der shRNA-Erkennungssequenz gut erkennbar.

Nach 72-stündiger Anwesenheit von BCR-ABL ist das Proliferationsvermögen von TonB-Zellen unter STAT5B-Reduktion nur noch halb so groß, wie bei Zellen unter STAT5A-Reduktion. Zusätzlich fällt der Anteil toter Zellen mit durchschnittlich 50% bei STAT5B und 25% bei STAT5A doppelt so hoch aus. Nach weiteren 24 Stunden Anwesenheit von BCR-ABL (96 h) zeigt sich, dass lediglich Zellen, die mit shGL2-ctrl-RNAs und shSTAT5A-RNAs transduziert wurden, zur Proliferation fähig sind. Dagegen zeigen TonB-Zellen, die mit STAT5B-spezifischen shRNAs transduziert wurden, keine Proliferation und weisen rückläufige Zellzahlen im Proliferationsassay auf. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch eine weitere Zunahme toter Zellen unter Stat5B-Reduktion von 50% (72 h) auf 75% (96 h). Demgegenüber kann sich der Anteil toter Zellen bei Zellen mit einer spezifischen STAT5A-Reduktion von 26% (72 h) auf 23% (96 h) leicht erholen.

Deutlich stärker sind die Effekte in der Anwesenheit von BCR-ABL in TonB-Zellen, die mit einer Isoform-unspezifischen shSTAT5A/B-RNA oder einem Mix aus Isoform-spezifischen shRNAs transduziert wurden. Diese Zellen besitzen keinerlei Proliferationsvermögen mehr und sind durch einen sehr hohen Anteil toter Zellen in der Population gekennzeichnet (Abbildung 3.3_A-B).

Die RNAi-vermittelte STAT5-Reduktion wurde mittels *qRealtime*-PCR und *WesternBlot* Analyse verifiziert. Dabei zeigte sich, dass die relative Reduktion von STAT5-mRNA sehr gut mit der Reduktion von STAT5-Protein korreliert. Bei ähnlichen Transduktionsstärken (MFI) wurde für die Isoform-spezifischen STAT5-shRNAs eine durchschnittliche Reduktion um mindestens 90% gegenüber shGL2-ctrl-RNA-transduzierten Zellen erreicht. Bei der Isoform-unspezifischen shSTAT5A/B-RNA oder dem shRNA-Mix konnte eine durchschnittliche Reduktion um 70% für beide Isoformen erzielt werden, was auf einen erhöhten Selektionsdruck bei der simultanen Reduktion von STAT5A und STAT5B in TonB-Zellen zurückgeführt werden kann (Abbildung 3.3_B-C).

Diese Ergebnisse lassen einen differentiellen Einfluss von STAT5A und STAT5B in der $p210^{BCR-ABL}$ -vermittelten Signaltransduktion von lymphatischen Zellen vermuten. Dabei scheint die Funktion von STAT5A und STAT5B in der Anwesenheit von IL-3 weitestgehend redundant zu sein und eher die Proliferation, als das Überleben von TonB-Zellen in der Gegenwart des Zytokins zu beeinflussen. Erst nach Unterschreitung eines unbekanntes Schwellenwertes an STAT5-Molekülen kommt es zu einer signifikanten Beeinträchtigung in der Proliferation und dem Überleben der Zellen. Dagegen konnte in der Anwesenheit von $p210^{BCR-ABL}$ eine spezifische, nicht-redundante Abhängigkeit gegenüber STAT5B beobachtet werden, wobei unter diesen Bedingungen das Molekül besonders für das Überleben von TonB-Zellen notwendig zu sein scheint.



B:

| Probenbezeichnung | TonB-shGL2-ctrl | TonB-shS5A/B | TonB-shS5A | TonB-shS5B | TonB-shS5A + shS5B |
|-----------------------------------------|-----------------|--------------|------------|------------|--------------------|
| Transduktionsintensität: X-Mean [MFI] | 1620±400 | 1190±650 | 1328±750 | 1743±700 | 1913±750 |
| Transduktionseffizienz: RFP-positiv [%] | 99,3±0,5 | 97,9±1,5 | 98,8±1,0 | 99,4±0,5 | 99,3±0,8 |
| Zellviabilität unter IL-3 [%], 72 h | 98±1 | 80±10 | 98±1 | 97±2 | 84±9 |
| Zellviabilität unter BCR-ABL [%], 72 h | 79±4 | 29±18 | 74±4 | 49±12 | 22±13 |
| Zellviabilität unter BCR-ABL [%], 96 h | 79±1 | 17±12 | 77±7 | 27±5 | 7±1 |
| Switch von IL-3 auf BCR-ABL, 72 h | 6 : 1 | 12 : 1 | 6 : 1 | 15 : 1 | 22 : 1 |
| rel. Expressionslevel S5A-Protein* [%] | 6±2 | -65±9 | -88±6 | 6±10 | -80±10 |
| rel. Expressionslevel S5B-Protein* [%] | 3±5 | -76±8 | -5±2 | -87±5 | -85±8 |

*kalkuliert auf TonB-Zellen als Kontrolle

C:

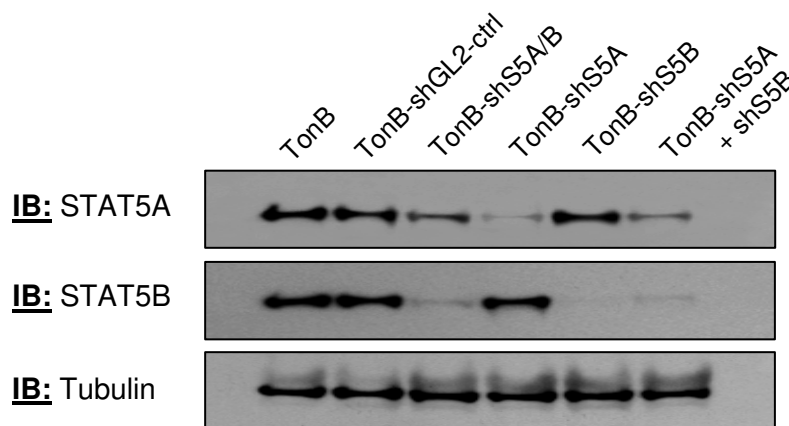


Abb. 3.3: Der differentielle Einfluss von STAT5-Molekülen bei der Proliferation und dem Überleben von TonB-Zellen. (A) Analyse des Proliferationsverhaltens von TonB-Zellen unter endogener Reduktion von STAT5. TonB-Zellen wurden mit STAT5-shRNAs oder Kontroll-shRNAs transduziert. Je 1×10^4 TonB-Zellen wurden in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL ausgesät, die Anzahl lebender Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt und auf die Proliferationsfähigkeit von Kontroll-shRNA-transduzierten Zellen (IL-3) normalisiert. Gezeigt sind die durchschnittliche relative Proliferationsstärke aus 5 unabhängigen Versuchen und deren Schwankungsbreiten. (B) Tabellarische Zusammenfassung der analysierten Parameter bei der Expression von STAT5- und Kontroll-shRNAs im TonB-Zellkultursystem. Densitometrische Analysen erfolgten mit der Software *QuantityOne* am VersaDoc-4000MP. (C) Analyse der spezifischen STAT5-Reduktion im *WesternBlot*. Inkubation der Membranen mit Antikörpern gegen beide STAT5-Isoformen. Als Ladungskontrolle wurden die Membranen mit einem Tubulin-Antikörper reinkubiert. – Sehr gut erkennbar ist die Isoformspezifität der verwendeten shRNAs gegenüber STAT5A oder STAT5B. Gezeigt ist ein repräsentativer *WesternBlot* von 4 unabhängigen Versuchen.

3.3 Analyse der intrazellulären Lokalisation von STAT5 im TonB-Zellkultursystem

In Anlehnung an die Arbeiten von HARIR *et al.* (2007), die zeigen konnten, dass STAT5-Moleküle mit konstitutiver Aktivität (cS5^F) verstärkt im Zytoplasma von Knochenmarkszellen cS5^F-transplantierter Mäuse sowie im Primärmaterial von Patienten mit diagnostizierter AML oder CML anzutreffen sind, wurde die intrazelluläre Lokalisation beider STAT5-Isoformen im TonB-Zellkultursystem näher untersucht.

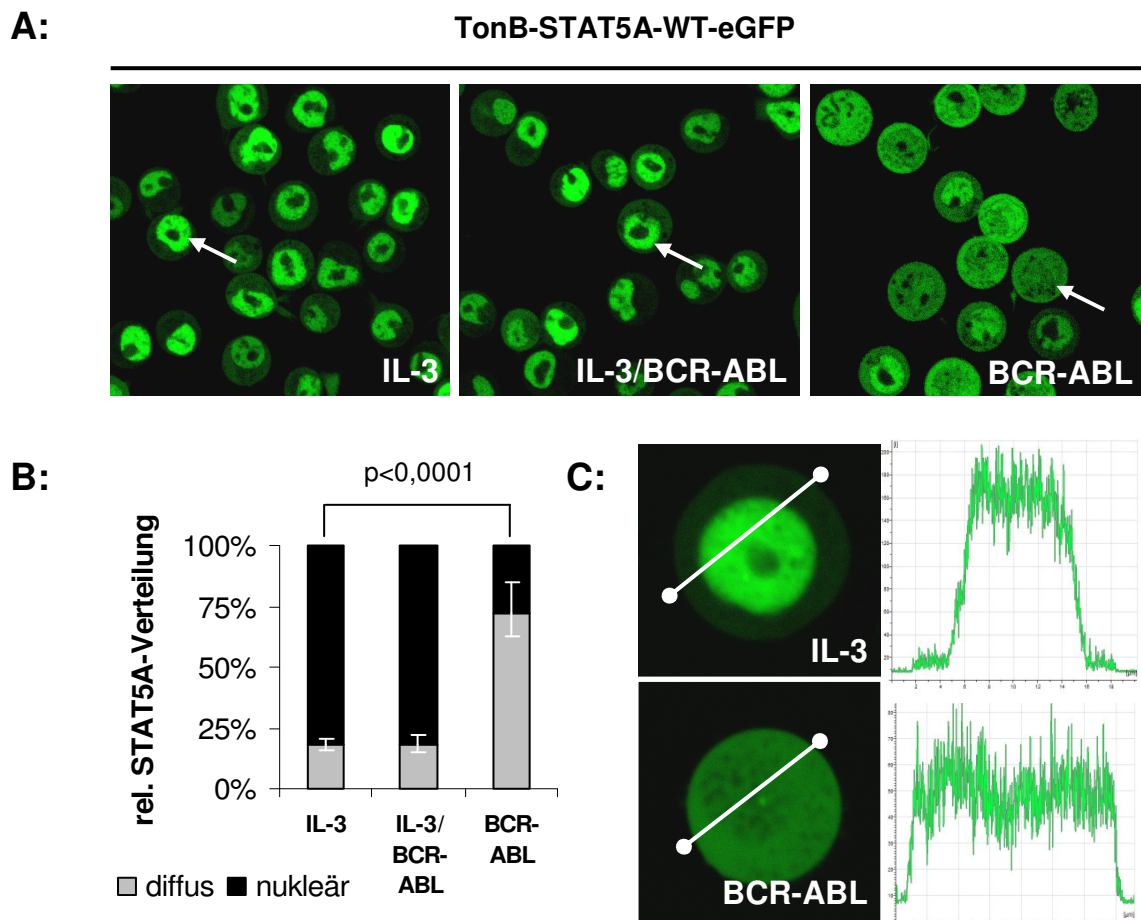


Abb. 3.4: Die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A im TonB-Zellkulturmodell. (A) Lokalisation von STAT5A unter verschiedenen Stimuli. TonB-Zellen wurden mit einem STAT5A-eGFP-Konstrukt transduziert und in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL kultiviert. An lebenden TonB-Zellen erfolgte die konfokale Analyse der intrazellulären STAT5A-Lokalisation. (B) Statistische Auswertung der intrazellulären STAT5A-Lokalisation in TonB-Zellen. In 3 unabhängigen Versuchen wurden je Stimulus >250 Zellen ausgezählt und die Lokalisation des Fusionsproteins nach nukleär und diffus (gleichmäßige Verteilung im Zellkern und Zytoplasma) unterschieden. (C) Intrazelluläre STAT5A-Verteilungsmuster im Histogramm. Von typischen Zuständen (nukleär, diffus) ist eine Zelle im Detail gezeigt. Die weiße Linie kennzeichnet die Schnittebene für die Darstellung der Fluoreszenzsignalstärke im Histogramm.

Hierfür wurden TonB-Zellen in der An- und Abwesenheit einer STAT5A-shRNA mit einem RNAi-resistenten STAT5A-eGFP-Fusionsgen transduziert. Am Tag 4 nach Transduktion wurde die Expression von BCR-ABL durch die Zugabe von Doxyzyklin in das Nährmedium stimuliert. Nach weiteren 3 Tagen unter diesen Bedingungen wurde die intrazelluläre Lokalisation des STAT5A-Fusionsproteins unter IL-3, IL-3/BCR-ABL und BCR-ABL Bedingungen am konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM) analysiert.

Unter IL-3 und IL-3/BCR-ABL Bedingungen lokalisiert STAT5A zu 85% im Zellkern von TonB-Zellen. Dagegen nimmt unter alleiniger Anwesenheit von BCR-ABL der Anteil von Zellen mit nukleärer Lokalisation deutlich ab, während Zellen mit einer diffusen (gleichmäßigen Verteilung von STAT5A in Zytoplasma und Zellkern) Lokalisation von STAT5A vorherrschend sind. Die Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von STAT5A in der Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL zeigen mit $p < 0,0001$ statistische Relevanz (Abbildung 3.4_A-C).

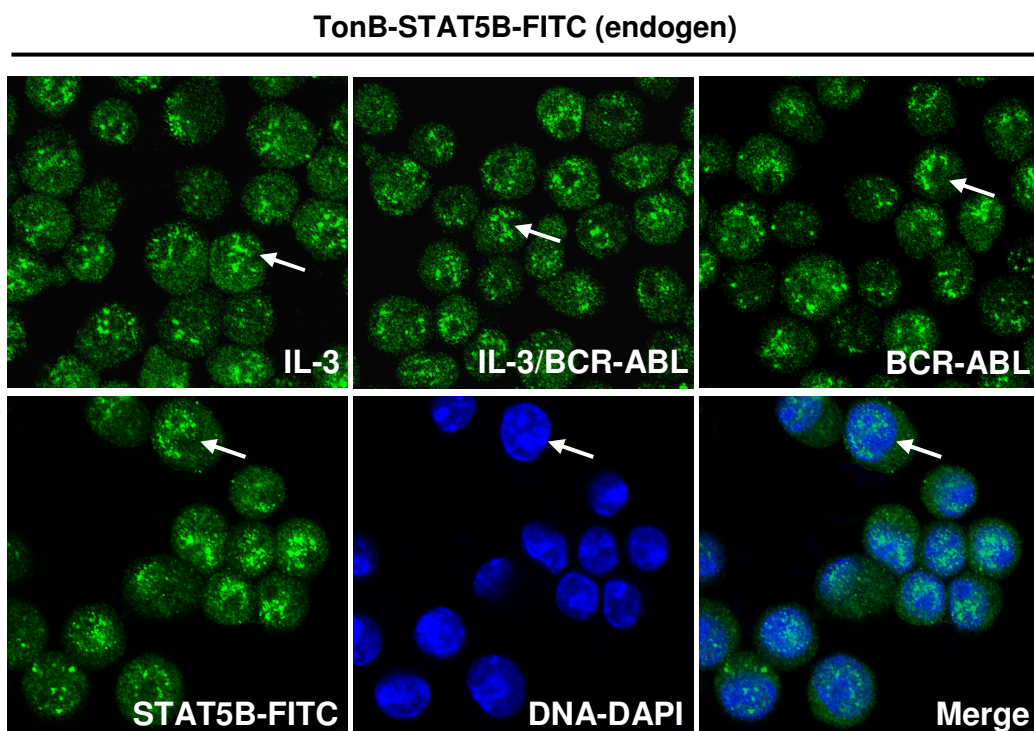


Abb. 3.5: Die intrazelluläre Lokalisation von STAT5B im TonB-Zellkulturmodell. TonB-Zellen wurden in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL kultiviert. Die Lokalisation von endogenem STAT5B wurde an fixierten Zellen über indirekte Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Mikroskop analysiert. Durch niedrige Signalstärken mussten für die Analysen die Laserleistung und Detektionsparameter deutlich erhöht werden, was zu einer verstärkten Autofluoreszenz und Hintergrundfärbung der Zellen führte. Zur Bestätigung einer verstärkten Akkumulation von STAT5B im Zellkern wurden die Zellen zusätzlich mit DAPI gefärbt. Die nukleäre Lokalisation ist exemplarisch an einem Ausschnitt in den Einzelaufnahmen und im *Merge* gezeigt.

Da die Expression eines STAT5B-RFP_{Express}-Fusionsproteins in TonB-Zellen leider nicht realisierbar war, erfolgte die Analyse der intrazellulären STAT5B-Lokalisation auf endogener Ebene über indirekte Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines STAT5B-spezifischen Antikörpers. Auf diesem Weg konnte gezeigt werden, dass STAT5B unabhängig vom Stimulus (IL-3 u/o BCR-ABL) in speziellen Kompartimenten des Zellkerns lokalisiert (Abbildung 3.5).

Um eine artifizielle Lokalisation von transgen-exprimierten STAT5A ausschließen zu können, wurde die intrazelluläre Lokalisationsstudie an endogenem STAT5A mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung wiederholt. Auch unter Verwendung dieser alternativen Methode konnten die Veränderungen in der intrazellulären Lokalisation des Proteins unter Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

STAT5A- und STAT5B-Moleküle weisen in TonB-Zellen in Abhängigkeit des gegenwärtigen Stimulus eine differentielle Lokalisation auf. Während STAT5B in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL seine nukleäre Lokalisation nicht verändert, kann bei STAT5A eine Veränderung in der intrazellulären Lokalisation von nukleär (IL-3) zu diffus (BCR-ABL) beobachtet werden. Dabei scheint die Zytokin-vermittelte Lokalisation dominant über die induzierten Effekte des Onkoproteins zu sein, da unter simultaner Anwesenheit beider Stimuli ebenfalls die nukleäre Lokalisation von STAT5A in TonB-Zellen vorherrschend ist.

3.4 Die Untersuchung von p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsmustern an STAT5-Molekülen

Veränderungen in der intrazellulären Lokalisation eines Signalmoleküls können durch spezifische Phosphorylierungsereignisse am Protein verursacht werden. In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass STAT5 ein Substrat der p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinase darstellt [CARLESSO *et al.*, 1996; SHUAI *et al.*, 1996; JACOBBERGER *et al.*, 2003]. Üblicherweise wird in diesen Veröffentlichungen eine p210^{BCR-ABL}-abhängige Zunahme in der Tyrosinphosphorylierung von STAT5-Molekülen unter Verwendung von unspezifischen phospho-Tyrosin-Antikörpern oder spezifischen phospho-STAT5-Antikörpern, die eine Phosphorylierung der kritischen Tyrosinreste detektieren, im Immunoblot gezeigt. Neben diesen bereits annotierten Tyrosinresten könnten zusätzliche Phosphorylierungsereignisse an Tyrosin- oder Serinresten für die Delokalisation von STAT5A in TonB-Zellen unter alleiniger Anwesenheit von BCR-ABL verantwortlich sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden TonB-Zellen in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL kultiviert und aus Gesamtzellextrakten STAT5A- und STAT5B-Moleküle präzipitiert. Nach einer SDS-PAGE wurden Proteinbanden, korrespondierend zu den Molmassen von STAT5A (94 kDa) und STAT5B (92 kDa), aus den Gelen ausgeschnitten und die isolierten Proteine massenspektroskopisch analysiert.

Die Qualität der STAT5-Präzipitation wurde im Immunoblot analysiert. Aliquots der einzelnen Präzipitationen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Membran transferiert und diese mit Antikörpern gegen phospho-Tyrosin, STAT5A und STAT5B inkubiert. Beide STAT5-Isoformen weisen in der Anwesenheit von IL-3 eine basale Phosphorylierung an Tyrosinresten auf. Dagegen erhöht sich der Anteil an Tyrosin-phosphorylierten STAT5-Protein in der Gegenwart von BCR-ABL deutlich. Zusätzlich fällt die p210^{BCR-ABL}-vermittelte Phosphorylierung an Tyrosinresten in STAT5A gegenüber der an STAT5B spürbar stärker aus (Abbildung 3.6, IB: p-Tyrosin).

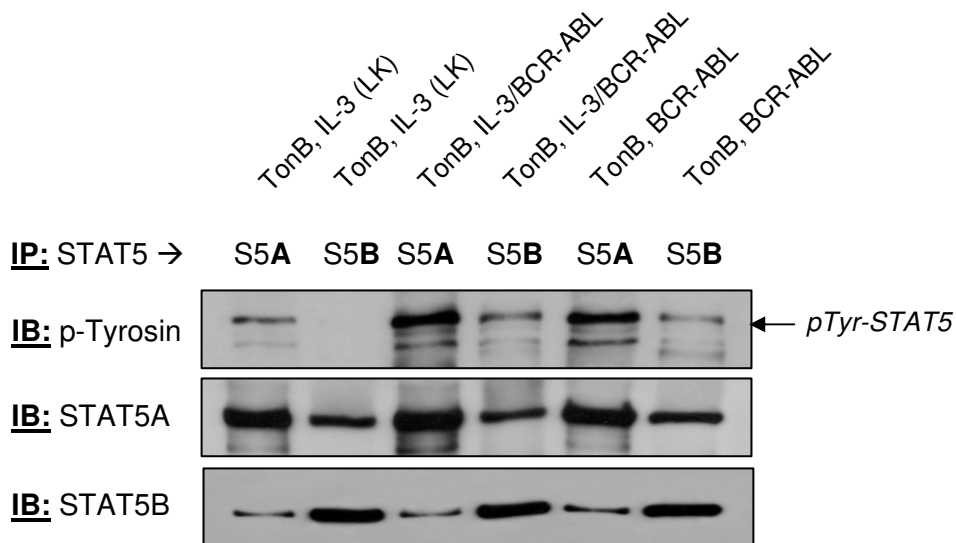


Abb. 3.6: Die Anreicherung von STAT5-Molekülen für die massenspektroskopische Untersuchung. TonB-Zellen wurden in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL kultiviert. Beide STAT5-Isoformen wurden separat aus den Proteinextrakten präzipitiert und die Qualität der Präzipitation im *WesternBlot* analysiert. Gut erkennbar sind die Kreuzkontaminationen beider STAT5-Isoformen bei den verschiedenen Präzipitationen.

Ferner wurde eine Detektion von STAT5B in STAT5A-Immunpräzipitaten und eine Detektion von STAT5A in STAT5B-Immunpräzipitaten beobachtet. Diese Kreuzreaktivität könnte in einer unspezifischen Antikörper – Antigenbindung von zwei hoch konservierten Proteinen oder in einer Co-Präzipitation von STAT5A- und STAT5B-Molekülen begründet sein (Abbildung 3.6).

Aus dem Gel isolierte Proteine wurden mit Trypsin verdaut und einem LC/MS/MS-MIDAS Verfahren [UNWIN *et al.*, 2005] zur Identifizierung spezifischer Phosphorylierungsstellen unterzogen. Die massenspektroskopische Analyse erbrachte zwei STAT5A-Peptide und ein STAT5B-Peptid mit einer nachweisbaren Tyrosinphosphorylierung. Dabei repräsentieren die phosphorylierten Tyrosinreste in den Peptiden N⁶⁹⁰-AVDGPYVKPQIK-C⁷⁰⁰ (STAT5A-pY694) und N⁶⁹⁵-AADGPYVKPQIK-C⁷⁰⁵ (STAT5B-pY699) die kritischen Tyrosin-

reste des jeweiligen STAT5-Moleküls. Die Phosphorylierung des kritischen Tyrosinrests konnte sowohl in der Anwesenheit von IL-3 als auch BCR-ABL beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde an dem Peptid N⁶⁸²-YYTPVLAK-C⁶⁸⁹ (STAT5A-YY682/83) eine exklusive Phosphorylierung an einem der beiden benachbarten Tyrosinreste in der Anwesenheit von BCR-ABL gemessen. Diese Phosphorylierung konnte ebenfalls unter simultaner Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL, aber nicht in alleiniger Gegenwart von IL-3 detektiert werden (Abbildung 3.7_A-B und 3.7_C-D).

Die hier verwendete LC/MS/MS – MIDAS Methode macht durch die besondere N-terminale Lage und die unmittelbare Nachbarschaft der Tyrosinreste im Peptid eine direkte Zuordnung der gemessenen Phosphatgruppe zu einem der beiden Tyrosinreste unmöglich. Während eine duale Phosphorylierung beider Tyrosinreste im Molekül massenspezifisch ausgeschlossen werden kann, wäre eine alternierende p210^{BCR-ABL}-abhängige Phosphorylierung einzelner Tyrosinreste im Doppeltirosin theoretisch vorstellbar.

Ebenfalls ist durch die weiter oben beschriebene Kreuzreaktivität, einhergehend mit der Anwesenheit beider STAT5-Isoformen in den Präzipitaten, eine Quantifizierung der Phosphorylierungssignale nicht realisierbar. Es kann daher nicht gesagt werden, ob unter Anwesenheit von BCR-ABL 5%, 50% oder 100% der STAT5A-Moleküle an den identifizierten Tyrosinresten phosphoryliert vorliegen.

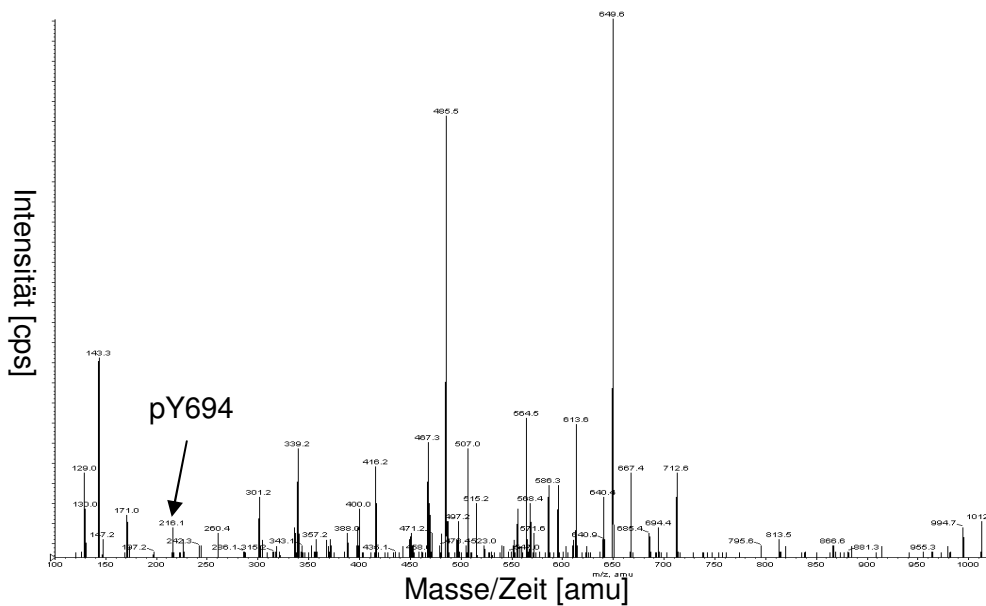
Gegenüber einer veränderten Tyrosinphosphorylierung konnten keine Auffälligkeiten in der Serinphosphorylierung von STAT5A in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL detektiert werden. Unter allen analysierten Stimuli (IL-3, IL-3/BCR-ABL, BCR-ABL) konnte lediglich eine Phosphorylierung am Serinrest S779 nachgewiesen werden.

Zur Verifizierung des p210^{BCR-ABL}-vermittelten Tyrosinphosphorylierungsmusters in murinen TonB-Zellen wurde STAT5A aus Zellen der humanen, p210^{BCR-ABL}-positiven Zelllinie K562 präzipitiert und massenspektroskopisch analysiert. Auch an STAT5A humanen Ursprungs konnte in der konstitutiven Anwesenheit von BCR-ABL eine Phosphorylierung an Y682 oder Y683 gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Überraschenderweise war es nicht möglich, aus PBMC-Zellen von CML-erstdiagnostizierten Patienten STAT5A in massenspektroskopisch ausreichenden Mengen anzureichern. Vertiefend wird auf diese Problematik in der Diskussion (Kapitel 4.3) eingegangen.

Unter Zuhilfenahme eines sehr sensitiven massenspektroskopischen Verfahrens konnten in verschiedenen Zelllinien spezifische Phosphorylierungsereignisse an Tyrosinresten in STAT5A in der Anwesenheit von BCR-ABL identifiziert werden.

A: Peptid: 690-AVDGpYVKPQIK-700 (STAT5A-pY694)
Zustand: IL-3, IL-3/BCR-ABL, BCR-ABL



B: Peptid: 695-AADGpYVKPQIK-705 (STAT5B-pY699)
Zustand: IL-3, IL-3/BCR-ABL, BCR-ABL

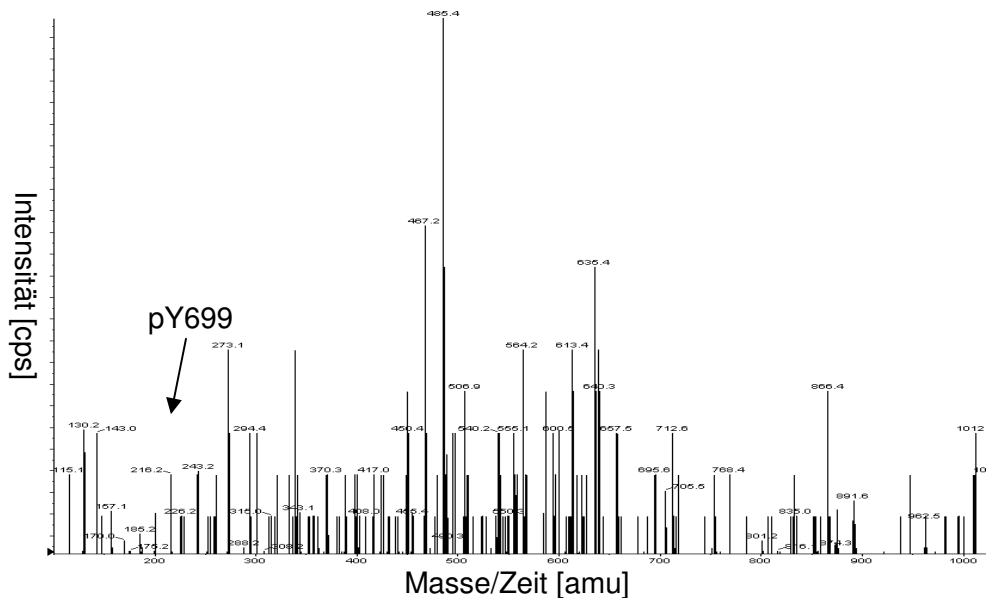
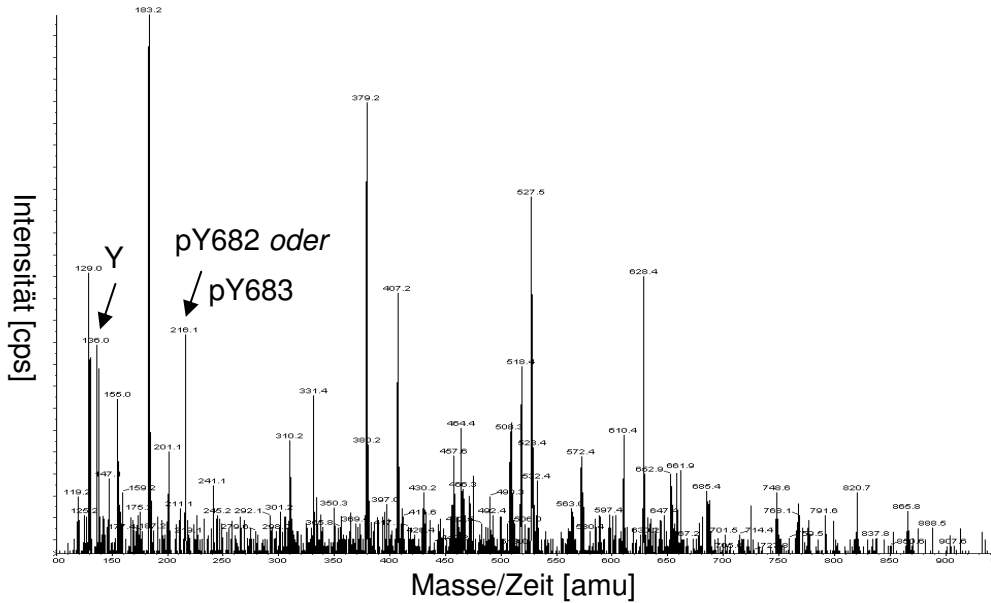


Abb. 3.7: Die massenspektroskopische Analyse aberranter STAT5-Phosphorylierungsmuster im TonB-Zellkultursystem. STAT5-Moleküle wurden aus unterschiedlich stimulierten TonB-Zellen präzipitiert und das Tyrosinphosphorylierungsmuster massenspektroskopisch analysiert. **(A)** Identifiziertes Peptid aus STAT5A mit einer Phosphorylierung am kritischen Tyrosinrest Y694. Die Phosphorylierung konnte in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL gemessen werden. **(B)** Identifiziertes Peptid aus STAT5B mit einer Phosphorylierung am kritischen Tyrosinrest Y699. Die Phosphorylierung konnte in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL gemessen werden

C: **Peptid:** 682-p(YY)TPVLAK-689 (STAT5A-pY682 oder -pY683)
Zustand: IL-3/BCR-ABL, BCR-ABL



D: **Peptid:** 682-YYTPVLAK-689 (STAT5A)
Zustand: IL-3

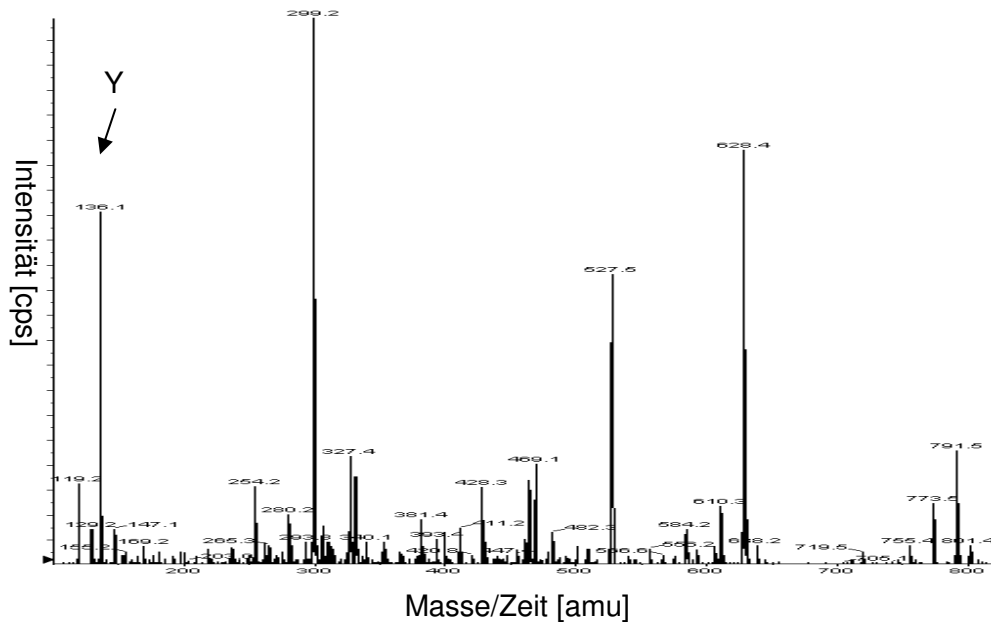


Abb. 3.7 – fortgesetzt: Die massenspektroskopische Analyse aberranter STAT5-Phosphorylierungsmuster in TonB-Zellen. **(C)** Identifiziertes Peptid aus STAT5A mit einer Phosphorylierung am Tyrosinrest Y682 oder Y683. Die Phosphorylierung konnte exklusiv in der Anwesenheit von BCR-ABL gemessen werden. **(D)** Das identische Peptid von STAT5A aus TonB-Zellen, die in der Gegenwart von IL-3 kultiviert wurden. Hier konnte eine Phosphorylierung an Y682 oder Y683 nicht gemessen werden. – Die Masse eines unphosphorylierten Tyrosinrests (Y) beträgt 136 Da, die eines phosphorylierten Tyrosinrests (pY) 216 Da. Damit ergibt sich für eine Phosphorylierung ein Masseunterschied von 80 Da.

3.5 Identifizierung der STAT5A-Tyrosinphosphorylierungsstelle

Da eine genaue Zuordnung der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierungsstelle in STAT5A durch die LC/MS/MS – MIDAS Analyse nicht gegeben war, wurde im Folgenden eine alternative Vorgehensweise zur Lösung dieser Fragestellung entwickelt.

Die MIDAS-gestützte Analyse des STAT5A-Tyrosinphosphorylierungsmusters ergab unter Anwesenheit von BCR-ABL drei mögliche Tyrosinphosphorylierungsstellen (Tyr-682, Tyr-683 und Tyr-694) im Protein. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich beim Tyrosinrest Y694 um die primäre, bei den Tyrosinresten Y682 bzw. Y683 um sekundäre Phosphorylierungsstellen im STAT5A-Protein handelt. Eine sequentielle Mutagenese dieser Tyrosinreste zu Phenylalanin, verbunden mit einer transgenen Expression der Mutanten in TonB-Zellen, einer immunologischen Fällung von STAT5A aus Extrakten dieser Zellen und ein immunologischer Nachweis phosphorylierter Tyrosinreste im *WesternBlot* sollte für die Identifizierung der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstelle hinreichend sein. Um eine Verunreinigung der Immunopräzipitate mit endogenem STAT5A zu vermeiden, wurde für die Versuche auf einen Zellklon (TonB-shS5A_Klon1) zurückgegriffen, der durch den Einsatz von RNAi nur noch im geringen Maße (4% ggü. nativen TonB-Zellen) endogenes STAT5A exprimieren konnte (Abbildung 3.14_A).

Zellen von TonB-shS5A_Klon1 wurden mit den Konstrukten von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten (Y694F, YY682/94FF, YY683/94FF, YYY682/83/94FFF) lentiviral transduziert. Da die Proliferation und das Überleben von TonB-Zellen bei der Expression von STAT5A-Y694F deutlich eingeschränkt sind (Abbildung 3.10_A), wurden am Tag 4 nach Transduktion serielle Verdünnungen hergestellt. Nach 7 – 14 Tagen wurden GFP-positive Einzelklone am FACS vermessen und Zellen mit einer ähnlich starken Fluorochromexpression vereinigt. Diese Bulkpopulationen wurden bis zur Extraktherstellung in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL kultiviert. Die anschließenden Immunopräzipitationen erfolgten unter limitierenden Bedingungen, was eine homogene Präzipitation von STAT5A aus Extrakten mit einer unterschiedlich starken Expression der Transgene gewährleisten sollte.

Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass STAT5A-Wildtyp in der Anwesenheit von IL-3 an Tyrosinresten phosphoryliert vorliegt. Wie erwartet geht das Niveau in der Phosphorylierung von STAT5A bei der Mutagenese des kritischen Tyrosinrestes (Y694F) stark zurück. Neben der STAT5A-Y694F-Mutante konnte eine verbleibende basale Tyrosinphosphorylierung in gleicher Weise an allen anderen STAT5A-Mutanten (YY682/94FF, YY683/94FF, YYY682/83/94FFF), die in der Gegenwart von IL-3 exprimiert wurden, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wird STAT5A-Wildtyp in der Anwesenheit von BCR-ABL deutlich stärker an Tyrosinresten phosphoryliert, als in der Gegenwart von IL-3. In TonB-Zellen, die mit der STAT5A-Y694F-Variante transduziert sind, geht auch unter An-

wesenheit von BCR-ABL das Niveau in der Tyrosinphosphorylierung deutlich zurück. Die verbleibende Phosphorylierung ist aber unter dieser Bedingung um ein Vielfaches höher, als die beobachtete basale Tyrosinphosphorylierung in der Gegenwart von IL-3. Während die Expression der STAT5A-YY682/94FF-Variante in der Anwesenheit von BCR-ABL nur eine marginale Reduktion in der verbleibenden Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-Y694F-transduzierten Zellen zur Folge hat, nimmt diese bei der Expression der STAT5A-Mutanten YY683/94FF und YYY682/83/94FFF deutlich ab und gleicht sich dem Niveau der basalen Tyrosinphosphorylierung analoger STAT5A-Mutanten in der Gegenwart von IL-3 an (Abbildung 3.8).

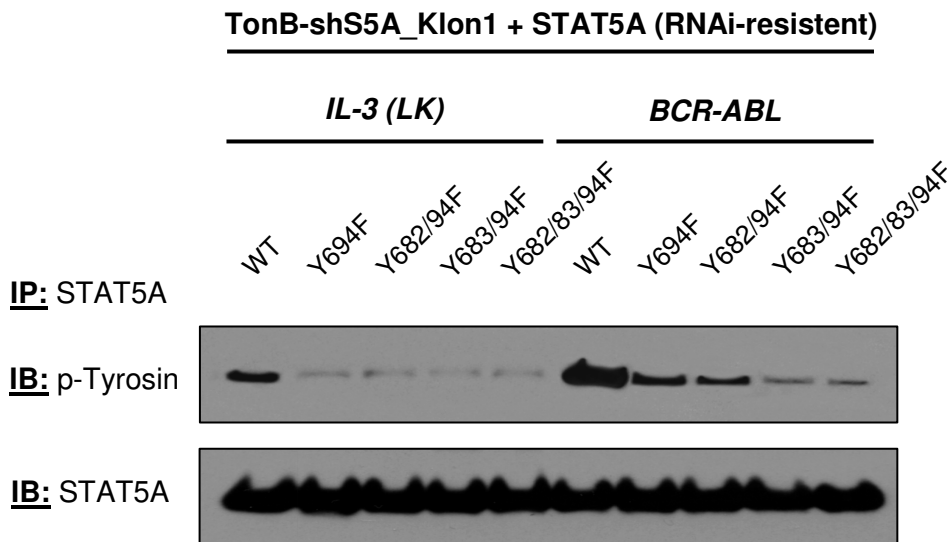


Abb. 3.8: Die Identifizierung der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstelle in STAT5A durch eine serielle Mutagenese von Tyrosinresten. Mutagenese des kritischen Tyrosinrests Y694 in Kombination mit den neu identifizierten Tyrosinresten Y682 und Y683 zu Phenylalanin. TonB-Zellen mit einer shRNA-vermittelten, endogenen STAT5A-Reduktion (TonB-shS5A_Klon1, siehe auch unter Abb. 3.14) wurden mit verschiedenen RNAi-resistenten STAT5A-Y→F-Varianten transduziert und in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL kultiviert. STAT5A wurde in großen Mengen über eine Immunopräzipitation angereichert und der Anteil an Tyrosin-phosphorylierten STAT5A im *WesternBlot* analysiert. Als Ladungskontrolle wurde die Membran mit einem STAT5A-Antikörper reinkubiert.

Durch diese Herangehensweise konnte gezeigt werden, dass beide Tyrosinreste in STAT5A durch die p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinase post-translational modifiziert werden können. Allerdings scheint unter den gewählten Bedingungen der Tyrosinrest Y683 im Vergleich zum Tyrosinrest Y682 deutlich stärker in lymphatischen Zellen p210^{BCR-ABL}-abhängig phosphoryliert zu werden.

3.6 Die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von STAT5A-Tyrosinmutanten in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL

Die massenspektroskopische Untersuchung der Phosphorylierungsmuster von STAT5-Molekülen führte zu der Identifizierung eines verstärkten p210^{BCR-ABL}-abhängigen Phosphorylierungsereignisses an Tyr-683 in STAT5A. Zusätzlich konnte eine veränderte intrazelluläre Lokalisation von STAT5A, jedoch nicht von STAT5B, in alleiniger Gegenwart von BCR-ABL in TonB-Zellen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der identifizierten Phosphorylierungsstelle auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A in TonB-Zellen näher untersucht.

Über eine gerichtete Mutagenese wurde der identifizierte Tyrosinrest (Y) in STAT5A in einen Phenylalaninrest (F) mutiert. Zusätzlich kam als Kontrolle ein dominant-negatives STAT5A-Molekül zum Einsatz, wobei durch die Mutagenese des kritischen Tyrosinrests (Y694F) die Dimerisierung und DNA-Bindung des Moleküls verhindert wurde.

TonB-Zellen wurden lentiviral mit den Konstrukten von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten (Y683F, Y694F) in Fusion mit einem eGFP-Gen transduziert. Am Tag 4 nach Transduktion wurde die Expression von BCR-ABL durch die Zugabe von Doxzyklin in das Nährmedium induziert. Nach weiteren 3 Tagen unter diesen Bedingungen wurde die intrazelluläre Lokalisation der STAT5A-Fusionsproteine am konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM) untersucht.

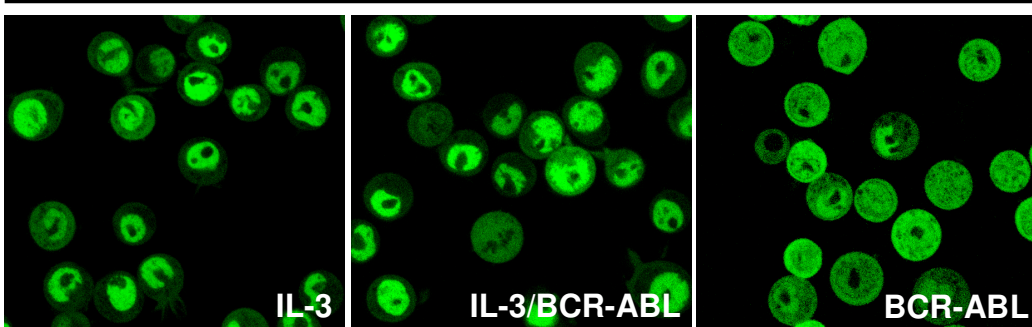
Bei alleiniger Anwesenheit von IL-3 oder unter IL-3/BCR-ABL Bedingungen konnte bei der STAT5A-Y683F-Mutante eine bevorzugt nukleäre Lokalisation (ca. 80% der Zellen zeigten eine nukleäre Lokalisation) beobachtet werden. Demgegenüber war unter alleiniger Anwesenheit von BCR-ABL die diffuse Verteilung der STAT5A-Mutante (ca. 80% der Zellen zeigten eine diffuse Lokalisation) in den Zellen vorherrschend. Die intrazelluläre Verteilung der STAT5A-Y683F-Mutante korreliert demnach mit der bereits beschriebenen Lokalisation des Wildtyp-Proteins (Abbildung 3.9_A-B)

Im Gegensatz dazu weist dominant-negatives STAT5A-Y694F ein verändertes Lokalisationsmuster in TonB-Zellen auf. Unter allen analysierten Bedingungen konnte eine stringent diffuse Verteilung (>95% der Zellen zeigten eine diffuse Lokalisation) des Fusionsproteins beobachtet werden.

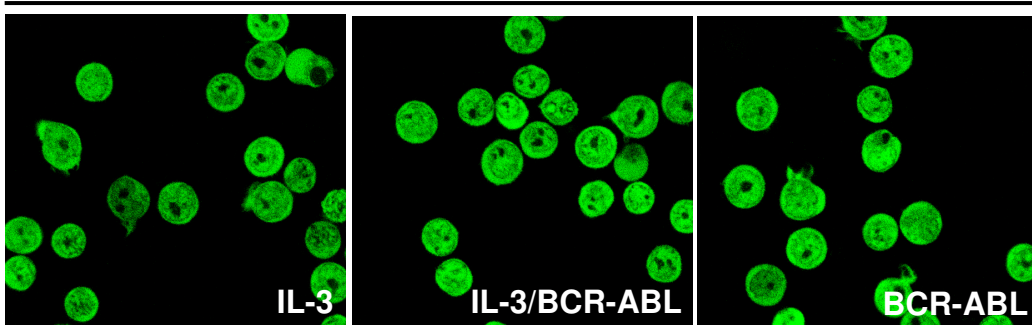
Die konfokale Analytik der intrazellulären Lokalisation von STAT5A-Tyrosinmutanten erfolgte sowohl an nativen TonB-Zellen als auch an TonB-Zellen, die mit shSTAT5A-RNAs transduziert waren. Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit einer unerwünschten Heterodimerisierung zwischen endogen- und transgen-exprimierten STAT5A reduziert werden. Signifikante Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation wurden bei beiden Methoden jedoch nicht beobachtet.

A:

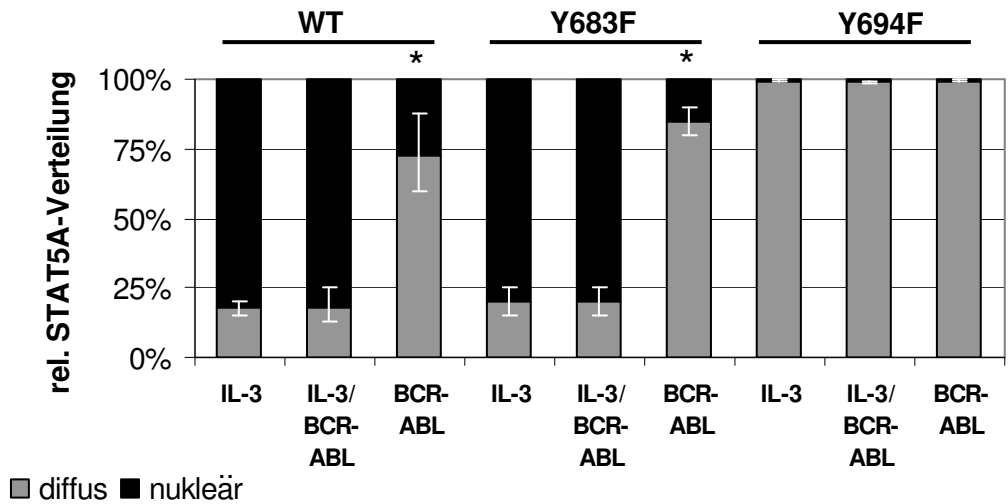
TonB-STAT5A-Y683F-eGFP



TonB-STAT5A-Y694F-eGFP



B:



* p=0,35

Abb. 3.9: Die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A-Tyrosinmutanten im TonB-Zellkulturmodell. (A) Lokalisation von STAT5A-Tyrosinmutanten unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. TonB-Zellen wurden mit Konstrukten von STAT5A-eGFP-Tyrosinmutanten transduziert und in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL kultiviert. An lebenden TonB-Zellen erfolgte die konfokale Analyse der intrazellulären Lokalisation von STAT5A. **(B)** Statistische Auswertung der intrazellulären Verteilung von STAT5A-Tyrosinmutanten in TonB-Zellen. In 3 unabhängigen Versuchen wurden je Stimulus >250 Zellen ausgezählt und die Lokalisation des Fusionsproteins nach diffus und nukleär unterschieden.

Um eine artifizielle Lokalisation durch die Expression eines rekombinanten Fusionsproteins ausschließen zu können, wurden STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten ohne eGFP-Fusion in TonB-Zellen exprimiert und die Lokalisation von STAT5A mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Auch in diesem alternativen Ansatz konnten die oben beschriebenen Verteilungsmuster beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Durch die Analyse der intrazellulären Lokalisation von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten konnte eine Beteiligung der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstelle bei der intrazellulären Verteilung von STAT5A in TonB-Zellen ausgeschlossen werden. Unter Verwendung einer dominant-negativen STAT5A-Mutante (Y694F), die weder zur Dimerisierung noch zur DNA-Bindung befähigt ist, konnte durch die diffusen Verteilungsmuster der Mutante in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL zusätzlich gezeigt werden, dass am kritischen Tyrosinrest nicht phosphorylierbare STAT5A-Monomere zu einer Translokation (*Shuttling*) zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern in der Lage sind.

3.7 Fortführende Charakterisierung der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung an STAT5A

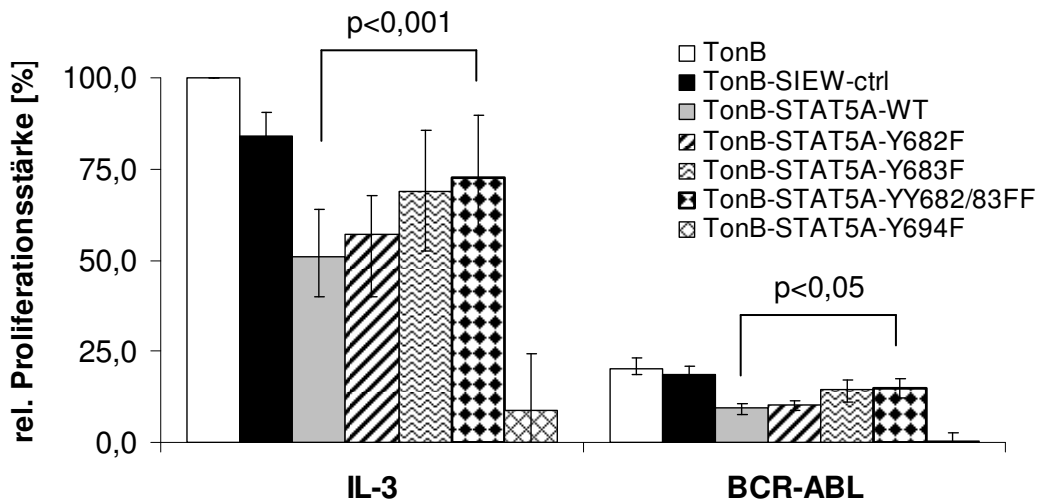
Weil die p210^{BCR-ABL}-spezifische Phosphorylierungsstelle in STAT5A keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des Proteins unter alleiniger Anwesenheit des Onkoproteins zu haben scheint, wurden anhand der Beobachtungen aus primären Material von CML-erstdiagnostizierten Patienten (siehe auch Kapitel 4.3) und der Lage der Phosphorylierungsstelle im STAT5A-Protein alternative Möglichkeiten für eine Funktion der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstelle untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf einen möglichen Einfluss auf die Proliferation, die Proteinstabilität, post-translationale Modifikationen und die Heterodimerisierung mit STAT5B gelegt.

3.7.1 Die Proliferation von TonB-Zellen bei transgener Expression von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten

Für die Analyse des Proliferationsverhaltens wurden TonB-Zellen mit den lentiviralen Konstrukten von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten transduziert. Am Tag 4 nach Transduktion wurden die Zellen im Proliferationsassay eingesetzt. Hierfür wurden pro Variante $1 \cdot 10^4$ Zellen pro ml Medium in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL ausgesät und nach 72 Stunden der Anteil toter und lebender Zellen bestimmt. In diesem Assay zeigte sich, dass TonB-Zellen, die in der Anwesenheit von IL-3 mit einem lentiviralen Leervektor (SIEW) transduziert wurden, bereits deutlich in ihrem Proliferationsvermögen (ca. -15%) gegenüber nicht-transduzierten TonB-Zellen eingeschränkt sind. Noch deutlicher fällt jedoch der Rückgang im Proliferationsvermögen von TonB-Zellen aus,

werden diese mit den lentiviralen Konstrukten von STAT5A-Wildtyp (ca. -40% ggü. SIEW-ctrl-transduzierten TonB-Zellen) oder STAT5A-Y682F (ca. -35% ggü. SIEW-ctrl-transduzierten TonB-Zellen) transduziert. Demgegenüber weisen TonB-Zellen, die mit den Varianten Y683F (ca. -18% ggü. SIEW-ctrl-transduzierten TonB-Zellen) oder YY682/83FF (ca. -13% ggü. SIEW-ctrl-transduzierten TonB-Zellen) transduziert sind, einen signifikant ($p < 0,001$) geringeren Rückgang im Proliferationsvermögen auf. Etwas stärker fallen die Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zellen in der Anwesenheit von BCR-ABL (WT: -55%; Y682F: -45%; Y683F: -22%; YY682/83FF: -20% ggü. SIEW-ctrl-transduzierten TonB-Zellen) aus. Dennoch ist auch unter diesen Bedingungen das Wachstum von Y683F- und YY682/83FF-transduzierten TonB-Zellen gegenüber Wildtyp-transduzierten Zellen signifikant ($p < 0,05$) erhöht (Abbildung 3.10_A-B).

A:



B:

| Probenbezeichnung | TonB | TonB-SIEW-ctrl | TonB-S5A-WT | TonB-S5A-Y682F | TonB-S5A-Y683F | TonB-S5A-YY682/83FF | TonB-S5A-Y694F |
|-----------------------------------------|-------|----------------|-------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|
| Transduktionsintensität: X-Mean [MFI] | - | 1950 | 2050 | 2125 | 2550 | 2250 | 1625 |
| Transduktionseffizienz: GFP-positiv [%] | - | 99,4 | 91,6 | 93,1 | 98,4 | 97,5 | 87,6 |
| Zellviabilität unter IL-3 [%], 72 h | 97 | 96 | 98 | 98 | 99 | 98 | 42 |
| Zellviabilität unter BCR-ABL [%], 72 h | 80 | 81 | 86 | 88 | 85 | 83 | 5 |
| Switch von IL-3 auf BCR-ABL, 72 h | 5 : 1 | 4,5 : 1 | 5 : 1 | 5 : 1 | 4,5 : 1 | 5 : 1 | 65 : 1 |

Abb. 3.10: Das Proliferationsverhalten von TonB-Zellen bei transgener Expression von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten. (A) TonB-Zellen wurden mit den Vektoren von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten lentiviral transduziert. Je 1×10^4 TonB-Zellen wurden in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL ausgesät, die Anzahl lebender Zellen nach 72 Stunden unter den angegebenen Bedingungen bestimmt und auf die Proliferationsfähigkeit von nativen TonB-Zellen (IL-3) normalisiert. Gezeigt sind die durchschnittliche relative Proliferationsstärke aus 7 unabhängigen Versuchen und ihre relativen Schwankungsbreiten. **(B)** Tabellarische Zusammenfassung aller analysierten Parameter bei der transgener Expression von STAT5A im TonB-Zellkultursystem.

Begleitet werden die Veränderungen im Proliferationsvermögen transduzierter Zellen von morphologischen Veränderungen. Weisen TonB-Zellen in der Gegenwart von IL-3 eine ovale, kartoffelförmige Morphologie auf, kugeln sich die Zellen bei der Expression von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Y682F ab und vergrößern ihr Volumen. Bei der Expression der STAT5A-Varianten Y683F und YY682/83FF werden derartige morphologische Veränderungen jedoch nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich können die STAT5A-Mutanten Y683F und YY682/83FF über mehrere Wochen stabil in TonB-Zellen exprimiert werden, während die transgenen Expressionsstärken [MFI, X-Mean] und der Anteil transduzierter Zellen bei der transgenen Expression von STAT5A-WT und STAT5A-Y682F stark zurückgehen (Daten nicht gezeigt).

Vollkommen unerwartet ist das simultane Auftreten der beobachteten Effekte in der Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL. Da eine Phosphorylierung von Tyr-683 ausschließlich in der Gegenwart von BCR-ABL gemessen werden konnte, die Effekte in der Proliferation aber in gleicher Art und Weise auch unter IL-3 sichtbar werden, kann hier von einem unspezifischen Effekt bei der transgenen Expression von STAT5A ausgegangen werden.

Während eine Isoform-spezifische, endogene Reduktion von STAT5A in der Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL nahezu problemlos möglich ist (siehe Abbildung 3.3_A-C), wird die Expression einer dominant-negativen (dn) STAT5A-Y694F-Variante in TonB-Zellen nicht toleriert. Diese Zellen weisen unter IL-3 nur eine sehr geringe Proliferationsfähigkeit auf (ca. -90% ggü. SIEW-ctrl-transduzierten TonB-Zellen), die in der Anwesenheit von BCR-ABL vollständig verloren geht. Begleitet wird die Expression von dn-STAT5A von einem stark erhöhten Anteil toter Zellen.

3.7.2 Untersuchungen zur STAT5A-Proteinstabilität

Eine stark erhöhte, surrogate, proteolytische Aktivität in Extrakten myeloischer Zellen unter konditioneller Expression von BCR-ABL sowie in PBMCs von CML-erstdiagnostizierten Spendern, die in diesem Umfang in lymphatischen Zellen oder in PBMCs von p210^{BCR-ABL}-negativen Spendern nicht beobachtet werden konnte, erforderte die Etablierung eines speziell angepassten Degradationsassays (siehe auch Diskussion Kapitel 4.3). In diesem Assay dienten TonB-Zellen als Quelle für intakte STAT5A-Moleküle (Wildtyp *versus* Tyrosinmutanten). Die Kultivierung der Zellen unter IL-3 oder BCR-ABL sollte dabei die Onkoprotein-abhängige Phosphorylierung an Tyr-683 vermitteln.

Analog zum TonB/F3-Zellkultursystem (TonB) wurde in unserem Labor ein myeloisches Ton32D-Zellkultursystem entwickelt. Ton32D-Zellen wurden ebenfalls unter IL-3 oder BCR-ABL kultiviert und dienten als Quelle für p210^{BCR-ABL}-induzierte Proteasen. Zusätzlich wurden PBMCs von CML-erstdiagnostizierten Patienten oder von Gesundspendern als

Quelle für p210^{BCR-ABL}-induzierte Proteasen analog zu den Extrakten von Ton32D-Zellen im Degradationsassay eingesetzt.

Aus definierten Zellzahlen beider Zelllinien oder aus PBMCs wurden Proteinextrakte mit modifizierten RIPA-Puffern ohne den Zusatz von SDS, EDTA, Proteasominhibitoren, Proteaseinhibitoren oder Phosphataseinhibitoren hergestellt und die Extrakte zeitnah im Degradationsassay unter definierten Bedingungen (Zeit, Temperatur, Inhibitoren) eingesetzt.

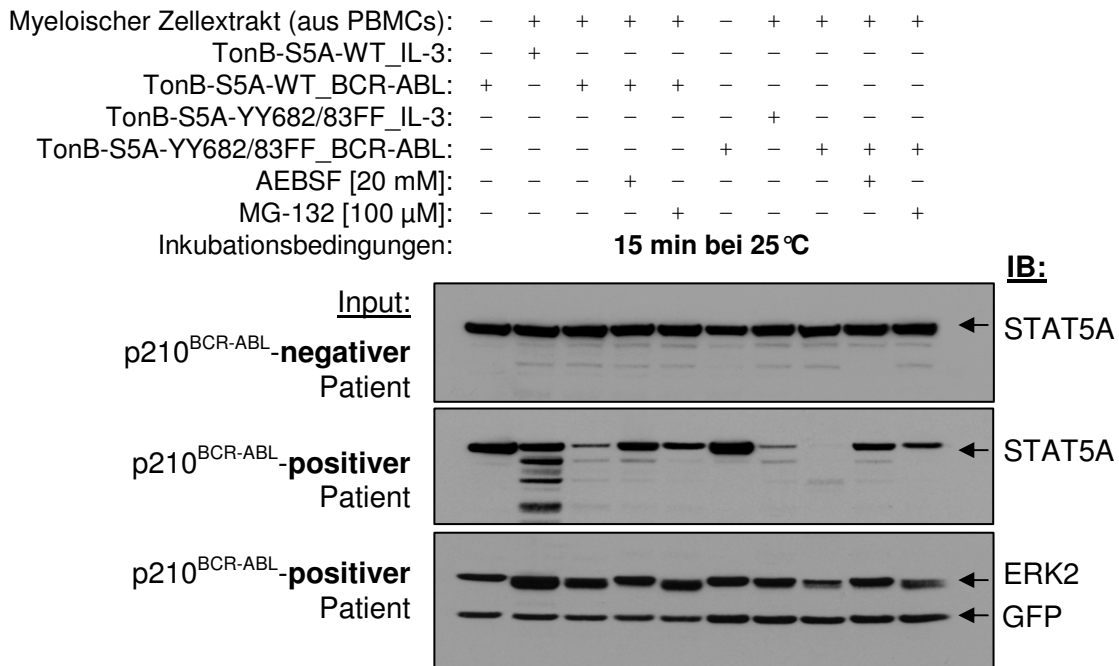


Abb. 3.11: Untersuchung des Einflusses der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung an STAT5A auf die Stabilität des Proteins. TonB-Zellen mit einer endogenen STAT5A-Reduktion (TonB-shS5A_Klon1) wurden mit RNAi-sensitiven Varianten von STAT5A-WT oder STAT5A-YY682/83FF transduziert und in der Gegenwart von IL-3 oder BCR-ABL kultiviert. Je Variante wurden 1*10⁷ Zellen in 200 µl RIPA-Puffer (modifiziert) lysiert und der Proteinextrakt von 5*10⁵ Zellen pro Ansatz im Degradationsassay eingesetzt. STAT5A aus TonB-Zellen wurde mit Extrakten aus PBMCs (p210^{BCR-ABL}-positiv; p210^{BCR-ABL}-negativ), als Quelle für p210^{BCR-ABL}-induzierte Proteasen co-inkubiert. Aus einer Stocklösung (4*10⁸ PBMCs/5 ml modifizierten RIPA) wurde pro Ansatz ein Extraktvolumen, welches 4*10⁴ PBMCs entsprach, im Degradationsassay eingesetzt. Spezifische Inhibitoren wurden in den Endkonzentrationen von AEBSF [20 mM] und MG-132 [100 µM] zugegeben. Analyse der Proteinmengen an STAT5A, ERK2 und GFP im *Western Blot*. Gut erkennbar ist die Degradation von STAT5A-WT und STAT5A-YY682/83FF durch Proteasen aus Extrakten von p210^{BCR-ABL}-positiven PBMCs. Demgegenüber wird STAT5A bei der Inkubation mit Extrakten von p210^{BCR-ABL}-negativen PBMCs unter den gewählten Bedingungen kaum degradiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Degradationsassay von 5 unabhängigen Versuchen.

Dabei zeigte sich, dass STAT5A-Wildtyp, welches in der Anwesenheit von IL-3 in TonB-Zellen exprimiert wurde (nicht phosphoryliert an Y683) eine höhere Stabilität gegenüber p210^{BCR-ABL}-induzierte Proteasen und das Proteasom aufweist, als STAT5A-Wildtyp, welches in der Gegenwart von BCR-ABL in TonB-Zellen exprimiert wurde (phosphoryliert an Y683). Eine erhöhte Proteininstabilität von STAT5A-Wildtyp, das in der Anwesenheit

von BCR-ABL exprimiert wurde, kann in diesem Umfang aber nicht bei der Inkubation mit Extrakten aus Ton32D-Zellen (kultiviert unter IL-3) oder PBMCs p210^{BCR-ABL}-negativer Spender beobachtet werden. Zusätzlich kann die Degradation des Wildtyp-Proteins durch spezifische Inhibitoren gegen Serinproteasen (AEBSF) oder das Proteasom (MG-132) deutlich reduziert werden. Demgegenüber weisen die beiden STAT5A-Mutanten Y683F und YY682/83FF unabhängig vom Stimulus ihrer Expression (IL-3 *versus* BCR-ABL) in TonB-Zellen eine erhöhte Proteininstabilität auf, die durch die Anwesenheit von AEBSF und MG-132 etwas stabilisiert werden kann (Abbildung 3.11).

Ferner wurde die Stabilität von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Y683F, die in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL in TonB-Zellen exprimiert wurden, in einem zeitabhängigen Degradationsassay untersucht (Abbildung 3.12_A). Auch in diesem alternativen Ansatz konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-STAT5A, wenn es in der Anwesenheit von IL-3 exprimiert wurde, eine höhere Stabilität gegenüber p210^{BCR-ABL}-induzierter Degradation aufweist, als sein korrespondierendes Gegenstück, das in der Anwesenheit von BCR-ABL exprimiert wurde. Ebenso zeigt die in diesen Versuchen verwendete STAT5A-Y683F-Mutante, unabhängig vom Stimulus ihrer Expression in TonB-Zellen (IL-3 *versus* BCR-ABL), eine vergleichbare Dynamik in der Degradation des Proteins, wie die unter p210^{BCR-ABL}-exprimierte Wildtypform (Abbildung 3.12_B).

Als Kontrolle für einen gleichmäßigen Proteineinsatz im Degradationsassay wurden die Membranen zusätzlich mit Antikörpern gegen ERK2 und GFP inkubiert. Dabei diente ERK2 als Ladekontrolle für ein endogen exprimiertes Protein in TonB- oder Ton32D-Zellen und GFP als Markerprotein für die äquivalente Zugabe von transgen-exprimierten STAT5A zum Assay. Dabei ist anzumerken, dass ERK2, analog zu STAT5A, einer zeitabhängigen, p210^{BCR-ABL}-induzierten Degradation ausgesetzt ist. Ähnliche Degradationsmuster konnten bei der Inkubation der Membranen mit einem c-ABL-Antikörper (sichtbare Degradation von BCR-ABL, Daten nicht gezeigt), jedoch nicht beim artifiziell-exprimierten GFP-Protein, beobachtet werden. Damit scheint es sich bei der beobachteten Degradation von STAT5A um ein unspezifisches Phänomen, bedingt durch die Anwesenheit von BCR-ABL in myeloischen Zellen, zu handeln.

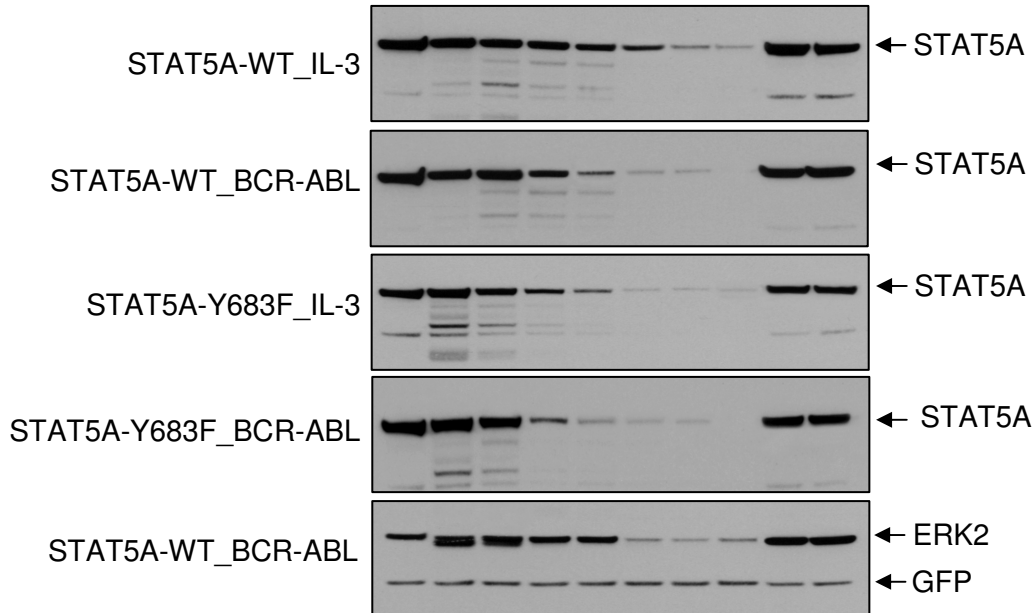
Durch diesen einfachen Surrogat-Assay konnten Unterschiede in der Proteininstabilität von STAT5A-Wildtyp, das in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL in TonB-Zellen transgen exprimiert wurde, gezeigt werden. Allerdings scheint die p210^{BCR-ABL}-spezifische Phosphorylierungsstelle in STAT5A nicht für diesen Effekt verantwortlich zu sein, da eine Mutagenisierung des Tyrosinrests zu Phenylalanin keinen stabilisierenden Einfluss auf das Protein zu haben scheint.

A:

p210^{BCR-ABL}-**negativer** Extrakt: - - - - - - - - + +
 p210^{BCR-ABL}-**positiver** Extrakt: - + + + + + + + - -
 Inkubationszeit [min] bei 25°C: 30 0 5 10 15 20 25 30 15 30

Input: transgen-exprimiertes STAT5A aus TonB

IB:



B:

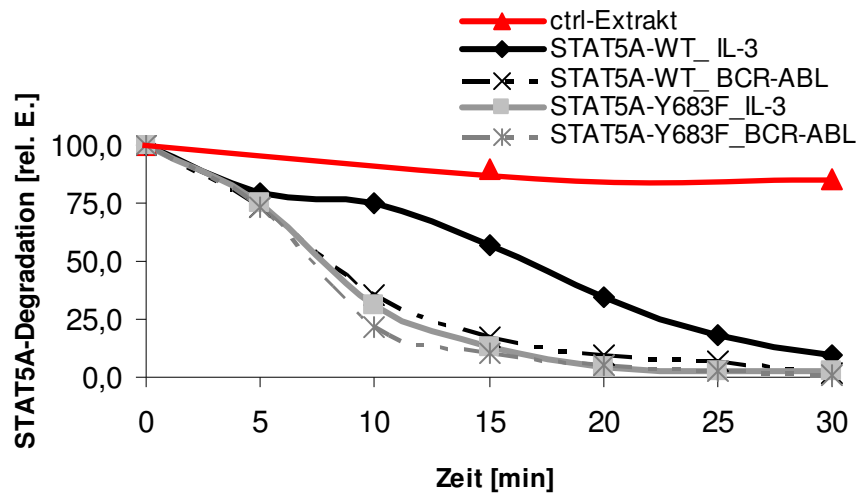


Abb. 3.12: Die Untersuchung der Proteinstabilität von STAT5A-WT und STAT5A-Y683F in der Gegenwart p210^{BCR-ABL}-induzierter Proteasen. (A) Analyse der zeitabhängigen Degradation von STAT5A unter Co-Inkubation mit Extrakten von PBMCs aus CML-erstdiagnostizierten Patienten. Die Vorbereitung der Proben für den zeitabhängigen Degradationsassay erfolgte unter den gleichen Bedingungen und Extraktkonzentrationen wie unter Abb. 3.11 beschrieben. Die Restgehalte an STAT5A wurden im *WesternBlot* analysiert. Als Kontrolle für den gleichmäßigen Proteineinsatz zu Beginn des Assays wurden die Membranen mit Antikörpern gegen ERK2 (endogen exprimiertes Protein) und GFP (artifizell exprimiertes Protein) inkubiert. **(B)** Die Signalstärken von STAT5A wurden am VersaDoc-4000MP mit der Software *QuantityOne* densitometrisch ausgewertet und graphisch dargestellt. – Gezeigt ist ein repräsentativer Degradationsassay aus 3 unabhängigen Versuchen. Die graphische Darstellung unter (B) entspricht dem Durchschnitt aller Versuche.

Stattdessen werden die STAT5A-Tyrosinmutanten Y683F und YY682/83FF, wenn diese in der Anwesenheit von IL-3 in TonB-Zellen exprimiert wurden, ebenfalls in einem erhöhten Maße degradiert, was eine erleichterte proteolytische Spaltung dieser Moleküle vermuten lässt.

3.7.3 Die Analyse von post-translationellen Modifikationen an STAT5A

Diverse post-translationelle Modifikationen, wie z.B. eine Sumoylierung oder Ubiquitinierung, können einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität oder die Funktion eines Proteins haben. Ebenso sind Phosphorylierungsereignisse eng mit einer kovalenten Anlagerung von Ubiquitin oder SUMO an Lysinreste im Protein verknüpft. So vermittelt zum Beispiel die Phosphorylierung des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} an Thr-187 die Poly-Ubiquitinierung und proteasomale Degradation des Proteins (LEE *et al.*, 2008; und eigene Daten). Zusätzlich konnte bereits eine Sumoylierung von STAT1 in unmittelbarer Nähe zum kritischen Tyrosinrest gezeigt werden [UNGUREANU *et al.*, 2003]. Aus diesem Grund wurde ein möglicher Einfluss der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung an STAT5A bei der post-translationellen Modifikation des Proteins näher untersucht.

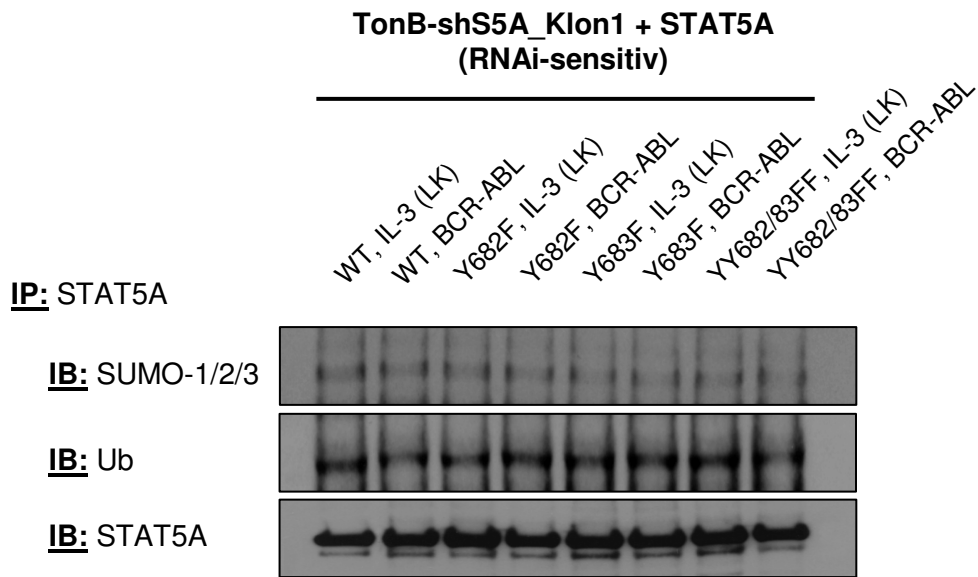
TonB-Zellen mit einer shRNA-vermittelten, endogenen STAT5A-Reduktion (TonB-shS5A_Klon1; Abbildung 3.14) wurden mit den lentiviralen Konstrukten von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten transduziert und in der Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL kultiviert. Aus Proteinextrakten wurde STAT5A präzipitiert und die Präzipitate anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf einen Nitrocellulosefilter erfolgte die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen SUMO-1/2/3, Ubiquitin und STAT5A.

Unabhängig vom Stimulus (IL-3 *versus* BCR-ABL) oder vom verwendeten lentiviralen Konstrukt (Wildtyp *versus* Tyrosinmutanten) weist STAT5A lediglich eine basale, post-translationelle Modifikation durch SUMO oder Ubiquitin auf (Abbildung 3.13_A).

Aufgrund der schwachen Signalstärken wurde an ausgewählten Extrakten von STAT5A-Wildtyp- und STAT5A-Y683F-transduzierten TonB-shS5A_Klon1-Zellen eine Gegenpräzipitation durchgeführt. Unter dem Einsatz hoher Extraktmengen erfolgte die Präzipitation von SUMO-1/2/3 oder Ubiquitin, gefolgt von einem immunologischen Nachweis von STAT5A im *WesternBlot* (Abbildung 3.13_B).

Durch diese Herangehensweise war es möglich, STAT5A in SUMO-1/2/3- und Ubiquitin-Immunopräzipitaten mit hohen Signalstärken zu detektieren. Wie aber bereits in Abbildung 3.13_A gezeigt wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen sumoylierter oder ubiquitiniertes STAT5A-Moleküle zwischen den verschiedenen Zuständen beobachtet werden.

A:



B:

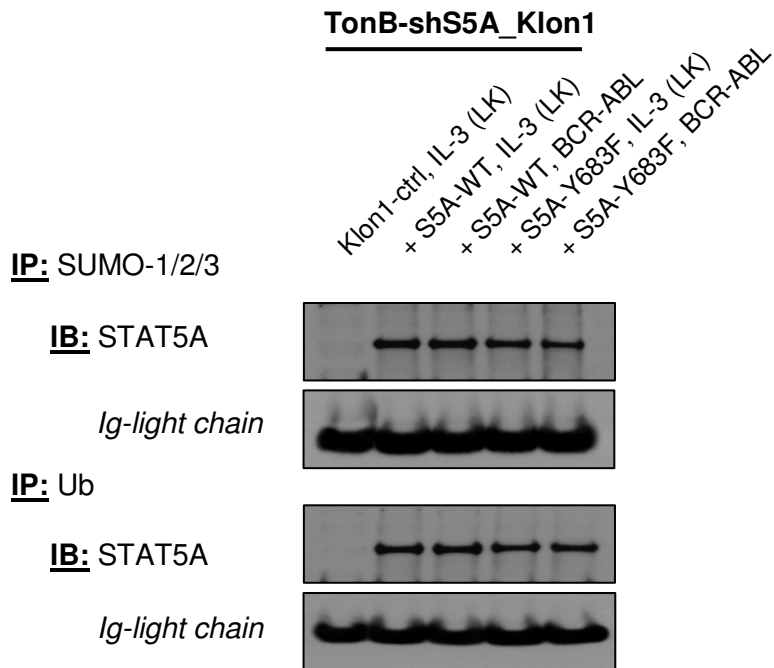


Abb. 3.13: Untersuchung des Einflusses der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung an STAT5A auf post-translationelle Modifikationen am Protein. (A) shSTAT5A-RNA-exprimierende TonB-Zellen (Klon1) wurden mit den Vektoren von STAT5A-WT oder STAT5A-Tyrosinmutanten transduziert und in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL kultiviert. STAT5A wurde aus Proteinextrakten präzipitiert und die Anteile an sumoylierten (SUMO-1/2/3) und ubiquitinierten (Ub) STAT5A im *WesternBlot* analysiert. Als Maß für die gleichmäßige STAT5A-Präzipitation wurde die Membran mit einem STAT5A-Antikörper reinkubiert. **(B)** Analog zu (A) wurde aus ausgewählten Proteinextrakten SUMO-1/2/3 oder Ub unter limitierenden Bedingungen präzipitiert und die Anteile an co-präzipitierten STAT5A im *WesternBlot* analysiert. Als Maß für die gleichmäßige Präzipitation von SUMO oder Ubiquitin wird das Signal der leichten Antikörperkette gezeigt. Abkürzungen: LK = laufende Kultur

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand kann ein Einfluss der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierung an STAT5A bei den hier gezeigten post-translationalen Modifikationen des Proteins ausgeschlossen werden.

3.7.4 Untersuchungen zur STAT5A/B-Heterodimerisierung im TonB-Zellkultursystem

Die Phosphorylierung eines Tyrosins in unmittelbarer Nähe zum kritischen Tyrosinrest von STAT5A könnte die Dimerisierung des Proteins mit anderen Vertretern der STAT-Familie, besonders aber mit STAT5B, beeinflussen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Co-Immunopräzipitationsstudien an nativen TonB-Zellen und artifiziell STAT5A-exprimierenden Zellen (Wildtyp *versus* Tyrosinmutanten) von TonB-shS5A_Klon1 durchgeführt.

Native TonB-Zellen oder artifiziell STAT5A-Wildtyp-exprimierende Zellen von TonB-shS5A_Klon1 wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Aus Proteinextrakten wurde STAT5A präzipitiert und die Präzipitate anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulosefilter erfolgte die Inkubation der Membranen mit Antikörpern gegen phospho-Tyrosin, STAT5B und STAT5A.

Erstmals konnte im TonB-Zellkultursystem gezeigt werden, dass beide STAT5-Isoformen in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL Heterodimere ausbilden können. Dabei ist die Heterodimerisierung unter IL-3 (laufende Kultur = LK) höher, als unter alleiniger Anwesenheit des Onkoproteins. Zusätzlich ist die detektierbare Heterodimerisierung von STAT5-Isoformen bei der simultanen Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit des Onkoproteins in TonB-Zellen deutlich erhöht, was kooperative Effekte von Zytokin- und Onkoprotein-abhängigen Signalwegen bei der Heterodimerisierung von STAT5-Isoformen vermuten lässt (Abbildung 3.15_A, IB: STAT5B).

Ferner scheint die beobachtete Heterodimerisierung vom Tyrosinphosphorylierungsstatus des STAT5A-Proteins abzuhängen, da unter Abwesenheit von IL-3 (*Starvation*) oder unter Inhibition der p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinase mit Imatinib mesylate (BCR-ABL + STI) neben der Tyrosinphosphorylierung in STAT5A auch die Heterodimerisierung zwischen beiden STAT5-Isoformen vollständig verloren geht. Begleitend dazu ist die beobachtete Tyrosinphosphorylierung und Heterodimerisierung nach einer Restimulation von gehungerten TonB-Zellen mit IL-3 überdurchschnittlich hoch (Abbildung 3.15_A, IB: p-Tyrosin).

Überraschenderweise sind die Beobachtungen in der STAT5A/B-Heterodimerisierung von nativen TonB-Zellen nicht uneingeschränkt auf artifiziell STAT5A-exprimierende Zellen (Wildtyp *versus* Tyrosinmutanten) des Einzelklons TonB-shS5A_Klon1 übertragbar.

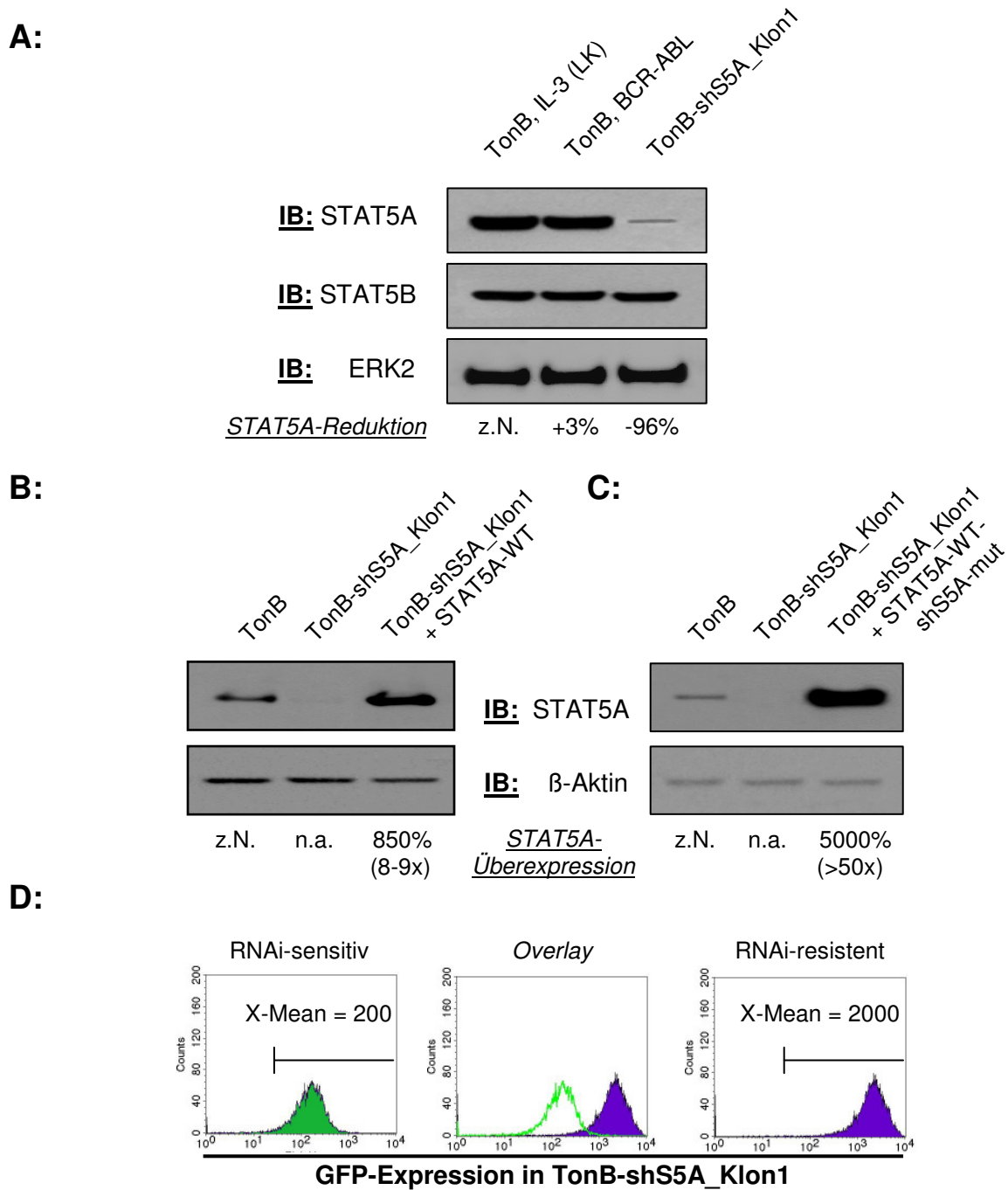


Abb. 3.14: Strategien zur transgenen Expression von STAT5A im TonB-Zellkultursystem. (A) Die shRNA-vermittelte Reduktion von endogenem STAT5A. TonB-Zellen wurden mit einer Isoform-spezifischen shSTAT5A-RNA transduziert (hier repräsentativ an einem Einzelklon gezeigt) und im *WesternBlot* die Expression von STAT5A und STAT5B analysiert. Als Ladungskontrolle wurde die Membran mit einem ERK2-Antikörper reinkubiert. **(B)** Expression von RNAi-sensitiven STAT5A in TonB-Zellen. Ein Einzelklon mit sehr hoher endogener STAT5A-Reduktion wurde mit einem STAT5A-WT-Plasmid transduziert und im *WesternBlot* die Expression von STAT5A und β -Aktin analysiert. **(C)** Expression von RNAi-resistenten STAT5A in TonB-Zellen. Der identische Einzelklon wurde mit einem RNAi-resistenten (shS5A-mut) STAT5A-WT-Plasmid transduziert und im *WesternBlot* die Expression von STAT5A und β -Aktin analysiert. **(D)** Messung von transgenen STAT5A-Expressionsstärken im FACS. Zellen von TonB-shS5A_Klon1 wurden mit gleich hohen MOIs von RNAi-sensitiven und RNAi-resistenten STAT5A-Lentiviren transduziert und im FACS die Expression von GFP als Surrogat-Marker für die Expression von STAT5A analysiert. Beide Methoden gewährleisteten eine unterschiedlich starke transgene Expression von STAT5A in shS5A-RNA-transduzierten TonB-Zellen. Densitometrische Analysen zur Bestimmung der Proteinverhältnisse erfolgten mit der Software *QuantityOne* am VersaDoc-4000MP. Abk.: z.N. = zur Normalisierung, n.a. = nicht analysiert, LK = laufende Kultur

Um die Veränderungen in den Verhältnissen von transgenen STAT5A- zu endogenen STAT5B-Molekülen möglichst gering zu halten, wurde lediglich eine schwache transgene STAT5A-Expression in diesem Zellklon angestrebt. Dies wurde durch die Verwendung RNAi-sensitiver STAT5A-Varianten realisiert. Gegenüber dem Gebrauch von RNAi-resistenten Varianten kann bei vergleichbar hohen viralen MOIs, die transgene Expression von STAT5A leicht um den Faktor 5 - 10 gesenkt werden. (Abbildung 3.14_B-D).

Zwar konnte auch in diesen Zellen eine phospho-Tyrosin-abhängige Heterodimerisierung detektiert werden, die co-präzipitierten Anteile von STAT5B unter IL-3 (LK) und BCR-ABL unterschieden sich aber deutlich gegenüber denen von nativen TonB-Zellen (Abbildung 3.15_B). Die unter diesen Bedingungen 5 – 15fach erhöhte transgene STAT5A-Expression in Zellen von TonB-shS5A_Klon1 gegenüber nativen Zellen (Daten nicht gezeigt), scheint allein durch das Überangebot an STAT5A die Verhältnisse in der Heterodimerisierung beider STAT5-Isoformen deutlich zu beeinflussen.

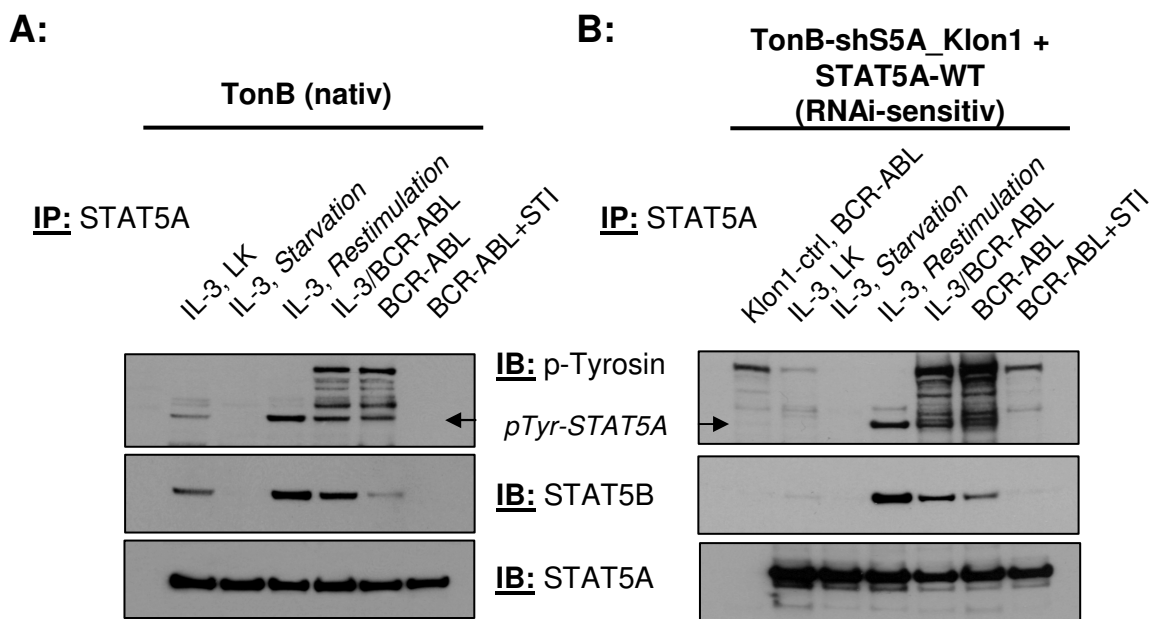
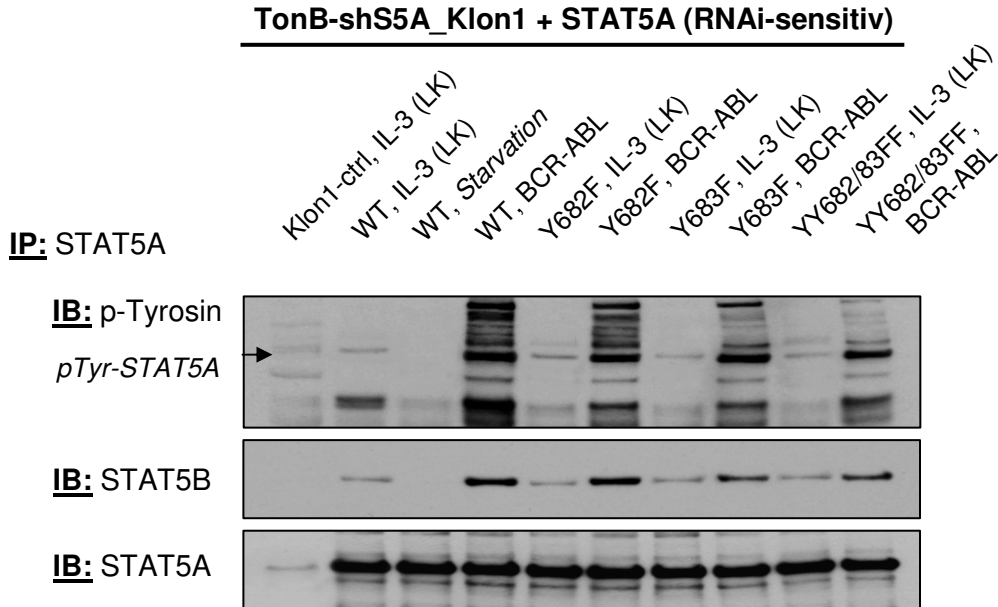


Abb. 3.15: Analyse der STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung im TonB-Zellkultursystem. (A) Analyse der STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung in nativen TonB-Zellen. TonB-Zellen wurden in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL kultiviert. Zellen einer laufenden Kultur (IL-3) wurde 16 Stunden vor der Extrakterstellung entweder das Zytokin entzogen (*Starvation*) oder gehungerten Zellen 30 Minuten vor der Extrakterstellung Zytokin frisch zugeführt (*Restimulation*). Analog dazu wurde zu TonB-Zellen einer laufenden p210^{BCR-ABL}-Kultur 16 Stunden vor der Extrakterstellung entweder IL-3 oder Imatinib in einer Konzentration von 20% (v/v) WEHI-3BCM oder 1 mM STI zugegeben. – Aus Extrakten nativer TonB-Zellen wurde STAT5A präzipitiert und im *WesternBlot* die Anteile an co-präzipitierten STAT5B analysiert. In weiteren Immunoblots wurden der Tyrosinphosphorylierungsstatus und die gleichmäßige Präzipitation von STAT5A untersucht. **(B)** Analyse der STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung in Zellen von TonB-shS5A_Klon1, bei der Expression einer RNAi-sensitiven STAT5A-Wildtyp-Variante. Analog zu den Analysen an nativen TonB-Zellen erfolgten die unterschiedlichen Stimulierungen, Präzipitationen und Nachweise von STAT5B, p-Tyrosin und STAT5A im *WesternBlot*. – **(A + B)** Gezeigt sind repräsentative *Western Blots* aus 5 unabhängigen Versuchen.

Dennoch wurde ein Einfluss der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierung an Tyr-683 bei der Heterodimerisierung beider STAT5-Isoformen untersucht.

A:



B:

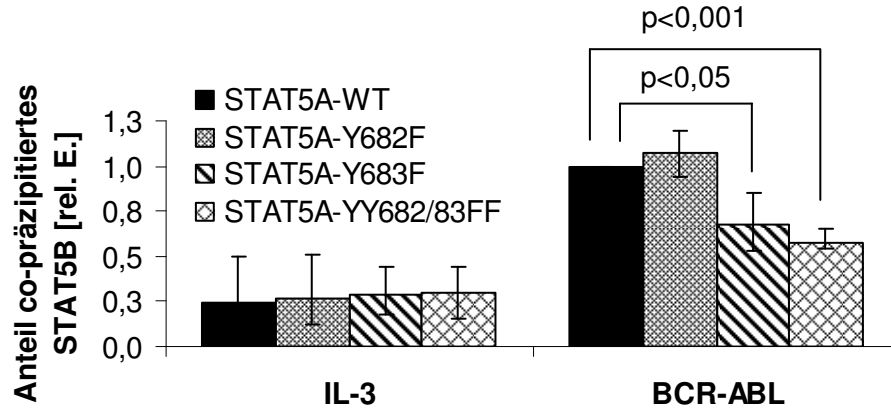


Abb. 3.16: Analyse des Einflusses der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung an STAT5A auf die Heterodimerisierung mit STAT5B. (A) Analyse der STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung in Zellen von TonB-shS5A_Klon1, bei der Expression von RNAi-sensitiven STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten. Die Zellen wurden mit Lentiviren transduziert und in der An- und Abwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL kultiviert. Aus Proteinextrakten wurde STAT5A präzipitiert und im *WesternBlot* die Anteile an co-präzipitierten STAT5B analysiert. Gezeigt ist ein repräsentativer *WesternBlot* von 4 unabhängigen Versuchen. **(B)** Densitometrische Auswertung der STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung mit der Software *QuantityOne* am VersaDoc-4000MP. Gezeigt sind die durchschnittliche relative Co-Präzipitation von STAT5B an STAT5A nach Normalisierung auf STAT5A-WT (BCR-ABL) von 4 unabhängigen Versuchen und ihre relativen Schwankungsbreiten.

Hierfür wurden Zellen von TonB-shS5A_Klon1 mit RNAi-sensitiven Varianten von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten (Y682F, Y683F, YY682/83FF) transduziert. Am Tag 4 nach Transduktion wurde die Expression von BCR-ABL induziert. Nach weiteren 7 – 10 Tagen in der Anwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL wurden die Zellen für die Co-Immunopräzipitation aufgearbeitet.

Wie bereits in Abbildung 3.15_B gezeigt, ist unter BCR-ABL deutlich mehr STAT5B an STAT5A-Wildtyp gebunden als in der Anwesenheit von IL-3. Während bei allen STAT5A-Tyrosinmutanten die Menge an co-präzipitierten STAT5B in der Gegenwart von IL-3 auf einem niedrigen Niveau unverändert bleibt, variieren die Anteile an co-präzipitierten STAT5B in der Anwesenheit von BCR-ABL beträchtlich.

Kann zwischen STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Y682F kein signifikanter Unterschied in der Heterodimerisierung mit STAT5B beobachtet werden, geht der Anteil an co-präzipitierten STAT5B bei den STAT5A-Tyrosinmutanten Y683F und YY682/83FF um mindestens 40% zurück. Dabei ist der beobachtete Rückgang mit $p < 0,05$ (WT:Y683F) und $p < 0,001$ (WT:YY682/83FF) statistisch signifikant (Abbildung 3.16_A-B) und konnte in ähnlicher Art und Weise auch unter simultaner Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL oder in TonB-shS5A-Bulkpopulationen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Auch wenn die transgene Expression von verschiedenen STAT5A-Varianten in einem speziellen Einzelzellklon im Hinblick auf die Analyse einer Heterodimerisierung mit endogenem STAT5B artifiziell erscheinen mag und nicht mit den Ergebnissen von nativen TonB-Zellen korreliert, so konnte unter den gewählten Bedingungen doch ein reproduzierbarer und vor allem p210^{BCR-ABL}-spezifischer Phänotyp beobachtet werden.

4. Diskussion

Die t(9;22) (q34;q11) – Translokation mit dem daraus resultierenden Philadelphia- (Ph) Chromosom und der Expression der konstitutiv-aktiven p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinase ist für die Entwicklung der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) ausschlaggebend. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren (Imatinib mesylate, Gleevec®) ist die Erkrankung zwar gut therapierbar, jedoch muss durch die Persistenz Ph-positiver, hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen im Patienten eine lebenslange medikamentöse Behandlung erfolgen. Zusätzlich spricht ein Teil von Patienten nicht auf den Wirkstoff Imatinib an, was eine ständige Neuentwicklung von p210^{BCR-ABL}-Inhibitoren für den klinischen Einsatz erforderlich macht.

Neben einer direkten Inhibition der p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinase bieten sich aber auch alternative Therapieansätze, zum Beispiel in der Modulation stromabwärts gelegener Zielproteine von BCR-ABL, an.

Die Vertreter der *Signal Transducer and Activator of Transcription*- (STAT) Familie repräsentieren dabei eine vielversprechende Klasse von Zielproteinen. Die konstitutive Aktivierung von STAT5 in der Gegenwart von BCR-ABL wurde in zahlreichen Publikationen gezeigt [ILARIA und VAN ETEN, 1996; CHAI *et al.*, 1997] und STAT5 stellt das Schlüsselprotein für die Aufrechterhaltung der CML im Mausmodell dar [YE *et al.*, 2006]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von BCR-ABL auf STAT5 näher untersucht.

4.1 Der Einfluss von BCR-ABL auf STAT5 im TonB-Zellkultursystem

Möchte man den Einfluss eines Onkoproteins auf seine „downstream“ Modulatoren in dessen An- und Abwesenheit untersuchen, bedarf es eines etablierten und induzierbaren Zellkultursystems. Nur ein solches System ermöglicht die differentielle Betrachtung onkogener Effekte im gleichen genetischen Hintergrund.

Da gegenwärtig kein hämatopoetisches Zellkultursystem mit einem Isoform-spezifischen STAT5-*knockout* in Verbindung mit einer induzierbaren Expression von p210^{BCR-ABL} existiert, wurde für die hier vorgestellten Arbeiten auf das etablierte, p210^{BCR-ABL}-induzierbare TonB-Zellkultursystem zurückgegriffen. Eine Isoform-spezifische Reduktion von STAT5A oder STAT5B wurde in diesen Zellen durch den Einsatz von RNAi realisiert.

Können TonB-Zellen in der Anwesenheit von IL-3 uneingeschränkt proliferieren, stellt die Aktivierung des Onkoproteins ein kritisches Ereignis dar. Das wird bereits bei einer simultanen Kultivierung der Zellen in der Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL deutlich. So wird bei der Aktivierung des Onkoproteins in der Anwesenheit von IL-3 die Proliferationsfähig-

keit der Zellen nicht stimuliert, sondern spürbar reduziert. Bei alleiniger Anwesenheit von p210^{BCR-ABL} werden die Zellen zusätzlich gestresst, was sich in einem deutlichen Rückgang der Zellproliferation und einer signifikanten Zunahme toter Zellen in der Population niederschlägt. Die Anwesenheit von BCR-ABL verleiht den Zellen zwar ein Zytokin-unabhängiges Wachstum, dieses ist jedoch im Vergleich zur Zytokin-induzierten Proliferation deutlich vermindert. Zusätzlich vermittelt die Aktivierung von p210^{BCR-ABL} die Phosphorylierung zahlreicher Proteine [KLUCHER *et al.*, 1998], was eine sehr flexible katalytische Domäne und niedrig-affine Enzym-Substrat-Komplexbindungen vermuten lässt [TILL *et al.*, 1999; NAGAR *et al.*, 2003]. Neben einer direkten Phosphorylierung durch das Onkoprotein ist aber auch eine indirekte Phosphorylierung dieser Proteine durch p210^{BCR-ABL}-induzierte Kinasen denkbar.

Eine differentielle Betrachtung von STAT5-Molekülen im TonB-Zellkultursystem erbrachte vor dem Hintergrund einer Isoform-spezifischen Reduktion von STAT5A oder STAT5B eine weitestgehend redundante Funktion beider Isoformen bei der Zytokin-vermittelten Proliferation der Zellen. Im Gegensatz dazu sind die Proliferation und das Überleben von TonB-Zellen in der alleinigen Anwesenheit von BCR-ABL strikt an STAT5B gekoppelt. Der redundante Phänotyp unter IL-3 und die Proliferation von Zellen mit einer STAT5A-Reduktion unter BCR-ABL können jedoch durch die Expression einer Isoform-unspezifischen STAT5A/B-shRNA oder einem Mix aus beiden Isoform-spezifischen shRNAs vollständig dereguliert werden.

Bei einer vergleichbar hohen Expression von STAT5A- und STAT5B-mRNA in nativen TonB-Zellen (Daten nicht gezeigt), ist nach einer Applikation Isoform-spezifischer shRNAs der verbleibende STAT5-mRNA-Gesamthaushalt (nicht durch RNAi affiziertes STAT5) in den Zellen höher als unter Verwendung Isoform-unspezifischer STAT5A/B-shRNAs. Somit scheint ein Mindestgehalt an STAT5-Molekülen für die Proliferation und das Überleben der Zellen zwingend erforderlich zu sein.

In der STAT5-*knockout*-Maus konnten sowohl redundante als auch distinkte Eigenschaften von STAT5A- und STAT5B-Molekülen beobachtet werden [LEONARD UND LIN, 2000; AKIRA, 1999]. Während STAT5A für die Entwicklung der Milchdrüse und bei der Laktation erforderlich ist, vermittelt STAT5B die *growth hormone* (GH) induzierten Effekte im Sexualdimorphismus [LIU *et al.*, 1997; TEGLUND *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 1999; UDY *et al.*, 1997]. Dagegen sind beide Moleküle im Immunsystem für die Expression der IL-2 Rezeptorketten (IL-2R α/β) maßgebend [TEGLUND *et al.*, 1998; IMADA *et al.*, 1998; NAKAJIMA *et al.*, 1997].

Für eine transkriptionelle Induktion von STAT5-Zielgenen sind aktive Dimere erforderlich. Dabei sind sowohl Homodimere (STAT5A:STAT5A; STAT5B:STAT5B) als auch Heterodimere (STAT5A:STAT5B) möglich. Neben Dimeren werden auch STAT5-Tetramere disku-

tiert, da das Protein als Dimer lediglich schwache transaktivatorische Eigenschaften besitzt. In der Tat wurden in vielen Promotorregionen von STAT5-Zielgenen mehrere nah beieinander liegende proximale STAT5-Bindungsstellen (*STAT5 tandem binding sites*) identifiziert, die eine kooperative Bindung von zwei benachbarten STAT5-Dimeren zulassen. Die Tetramerisierung von STAT5-Dimeren ist dabei zwingend von der Integrität der N-terminalen Domäne des Proteins abhängig [JOHN *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1996].

Beide STAT5-Moleküle werden in Ba/F3-Zellen nach Stimulation mit IL-3 im ähnlichen Umfang aktiviert [NELSON *et al.*, 2004; und eigene Daten]. Eine ChIP-basierende Analyse im Hinblick auf eine unterschiedliche Beteiligung von STAT5A- und STAT5B-Molekülen bei der Aktivierung STAT5-spezifischer Gene, führte zu dem Ergebnis, dass ein Drittel dieser Gene für ihre transkriptionelle Induktion zwingend beide STAT5-Isoformen benötigen. Lediglich bei einem weiteren Drittel der Gene konnte ein redundanter Phänotyp zwischen STAT5A und STAT5B beobachtet werden [BASHAM *et al.*, 2008]. Inwieweit bei der nicht-redundanten Induktion STAT5-spezifischer Gene wirklich STAT5A:STAT5B-Heterodimere eine Rolle spielen oder ob es zu einer unabhängigen Anlagerung von STAT5A- und STAT5B-Homodimeren an die *STAT5 tandem binding sites* kommt, wurde von den Autoren nicht untersucht.

Beide STAT5-Moleküle sind hoch konserviert und weisen eine 91%ige Homologie in der Aminosäuresequenz auf. Lediglich marginale Unterschiede in einzelnen Aminosäuren innerhalb der DNA-Bindungs-Domäne sowie Unterschiede in der DNA-Bindungskinetik und DNA-Bindungsdynamik vermitteln Unterschiede in der Bindung von STAT5A- und STAT5B-Molekülen an ihren Zielpromotor [NELSON *et al.*, 2004; BOUCHERON *et al.*, 1998]. Die höchste Divergenz zwischen beiden STAT5-Molekülen ist in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) vorzufinden. Diese Unterschiede machen eine differenzierte Rekrutierung transkriptioneller Co-Aktivatoren und damit die nicht-redundante Aktivierung spezifischer Zielgene wahrscheinlich. In Übereinstimmung mit der in TonB-Zellen beobachteten Abhängigkeit gegenüber STAT5B-Molekülen bei der konditionellen Expression von BCR-ABL, konnten in einer Reihe von humanen Tumoren nicht-redundante Eigenschaften von STAT5A und STAT5B aufgezeigt werden. Während aktivierte STAT5A-Moleküle mit der Entstehung von Brustkrebs in Verbindung gebracht werden [REN *et al.*, 2002], scheinen aktivierte STAT5B-Moleküle verstärkt für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms sowie des Kopf- und Nackenkarzinoms verantwortlich zu sein [LEONG *et al.*, 2002; XI *et al.*, 2003].

Die Anlagerung als Homodimer, Heterodimer oder Tetramer an die für beide Moleküle sehr ähnlichen DNA-Erkennungsstellen (TTC N₃₋₄ GAA) und eine differentielle Rekrutierung von Aktivatoren oder Repressoren repräsentieren das Repertoire von STAT5A und

STAT5B in der transkriptionellen Regulation ihrer Zielgene. Dabei ist noch nicht geklärt, inwieweit eine Heterodimerisierung von STAT5 mit anderen Vertretern der STAT-Familie, wie sie bereits in der durch Klasse I Interferone (IFN- α/β) vermittelten Formation von STAT1:STAT2- oder STAT1:STAT3-Komplexen gezeigt werden konnte [SCHABER *et al.*, 1998], möglich ist.

Ferner ist zu berücksichtigen, dass durch die RNAi-vermittelte endogene Reduktion einer STAT5-Isoform die komplementäre Isoform, gegenüber dem Zustand in Wildtypzellen, im Überschuss vorliegt. Dieser Umstand kann einen Einfluss auf die Fließgleichgewichte beider Proteine haben und die endogenen Verhältnisse an Homodimeren, Heterodimeren und Tetrameren dramatisch beeinflussen.

Ebenso ist es denkbar, dass bei Verlust eines STAT-Mitglieds, die entstandene Lücke durch ein anderes Mitglied der STAT-Familie ausgefüllt wird. Scheinen Zytokinrezeptoren bevorzugt ein bestimmtes STAT-Molekül zu aktivieren, so sind sie bei dessen Abwesenheit zum Teil in der Lage, andere STAT-Moleküle in einem deutlich geringeren Umfang zu induzieren [CUI *et al.*, 2007]. Diese aberrante Aktivierung von STAT-Molekülen resultiert in einer differentiellen Induktion von Zielgenen und ermöglicht es der Zelle, den Mangel des Rezeptor-spezifischen STAT-Moleküls zumindest teilweise zu kompensieren [MURRAY, 2007].

Während TonB-Zellen in der Anwesenheit von IL-3 eine Isoform-spezifische Reduktion von STAT5 relativ gut tolerieren können, scheinen p210^{BCR-ABL}-exprimierende TonB-Zellen, insbesondere gegenüber STAT5B, deutlich anfälliger auf Veränderungen im STAT5-Haushalt zu reagieren.

4.2 Der Einfluss von BCR-ABL auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT5-Proteinen

Das klassische Modell für die Signaltransduktion von STAT5-Proteinen stützt sich auf das Vorhandensein inaktiver STAT5-Monomere im Zytoplasma einer Zelle. Durch die Bindung von extrazellulären Signalmolekülen an den passenden Zelloberflächenrezeptor werden STAT-Moleküle am kritischen Tyrosinrest phosphoryliert. Es folgen die reziproke Dimerisierung und der aktive Transport von STAT-Dimeren in den Zellkern, wo sie an spezifische Erkennungsstellen binden und die Gentranskription initiieren. Dass diese einfache Darstellung nicht als universeller Zustand zu verstehen ist, konnte spätestens mit dem Nachweis von nicht am kritischen Tyrosinrest phosphorylierten STAT-Molekülen im Zellkern gezeigt werden [ZENG *et al.*, 2002; diese Arbeit]. Der gegenwärtige Wissensstand geht daher von einem ständigen Fließgleichgewicht von STAT5-Monomeren und STAT5-Dimeren zwischen Zytoplasma und Zellkern aus. Dabei wird die nukleäre Akkumulation von aktivierten STAT5-Dimeren, wie sie z.B. nach einer Restimulation von Zellen nach

einem Zytokinentzug beobachtet wird, durch eine längere nukleäre Verweilzeit nach Bindung an die DNA vermittelt. Aufgrund der Molmasse von STAT5-Molekülen (>90 kDa) werden für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Fließgleichgewichte eine intakte Kernimport- und Kernexportmaschinerie sowie vorhandene Kernimport- (NLS) und Kernexportsequenzen (NES) im STAT5-Protein [ZENG *et al.*, 2002; IYER UND REICH, 2008] benötigt. Dabei unterscheiden sich die nukleären Translokationsvorgänge zwischen phosphorylierten (Dimer) und nicht-phosphorylierten (Monomer) STAT-Molekülen beträchtlich. Handelt es sich bei der Translokation von STAT-Dimeren um einen Energie- (Gradient von RanGTP – RanGDP) und Träger- (Importin α/β , CRM1) abhängigen Prozess [MELÉN *et al.*, 2001; SEKIMOTO *et al.*, 1996], wird die Translokation von STAT-Monomeren durch eine direkte Bindung an die Nukleopore des Kernporenkomplexes (NPC) realisiert und bedarf keiner weiteren Trägerproteine oder metabolischer Energie [MARG *et al.*, 2004].

In zahlreichen soliden Tumoren, Leukämien und myeloproliferativen Erkrankungen (MPDs) konnte eine konstitutive Aktivierung von STAT-Molekülen, vor allem STAT3 und STAT5, beobachtet werden. In ihrer natürlichen Funktion als Transkriptionsfaktoren vermitteln sie das Überleben und die Proliferation der entarteten Zellen durch die transkriptionelle Induktion von STAT-regulierten Genen im Zellkern. Eine konstitutive Aktivierung und nukleäre Lokalisation von STAT5A konnte zum Beispiel in einem hohen Anteil maligner Brustepithelzellen beobachtet werden [COTARLA *et al.*, 2004], während aktive STAT3-Moleküle im Zellkern von ErbB-2-transformierten Lungenepithelzellen detektiert wurden [FERNANDES *et al.*, 1999]. Neben einer verstärkten Lokalisation aktivierter STAT-Moleküle im Zellkern von soliden Tumoren, konnte in hämatopoetischen Zellen und in malignen Epithelzellen des Kolonadenoms eine Akkumulation von konstitutiv-aktiven STAT5-Molekülen im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden [HARIR *et al.*, 2007; XIONG *et al.*, 2009].

In Anlehnung an die Arbeiten von HARIR *et al.* wurde die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A und STAT5B im TonB-Zellkultursystem analysiert. Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass sich die intrazelluläre Lokalisation von STAT5-Isoformen in lymphatischen Zellen in der Anwesenheit von BCR-ABL unterscheidet. Während STAT5B eine stringent nukleäre Lokalisation in der Gegenwart von IL-3 u/o BCR-ABL aufweist, translozieren STAT5A-Moleküle bei alleiniger Anwesenheit des Onkoproteins verstärkt in das Zytoplasma und nehmen eine diffuse Verteilung in den Zellen ein. Zusätzlich konnten durch ein massenspektroskopisches (MS) Verfahren exklusiv an STAT5A p210^{BCR-ABL}-spezifische Tyrosinphosphorylierungsereignisse identifiziert werden. Das ließ uns vermuten, dass die p210^{BCR-ABL}-induzierte Phosphorylierung an STAT5A die intrazelluläre Lokalisation des Proteins beeinflussen könnte.

Ein spezifisches Phosphorylierungsereignis könnte somit eine intramolekulare Strukturveränderung am Protein und die Entstehung einer funktionalen Kernexportsequenz zur Folge haben [SCHWOBEL UND MOORE, 2000]. Überraschenderweise konnte aber ein Einfluss der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A in TonB-Zellen ausgeschlossen werden. Gestützt werden diese Daten durch die Beobachtung, dass eine vorherrschende nukleäre Lokalisation, wie sie in der Anwesenheit von IL-3 zu beobachten ist, allein durch die Zugabe von IL-3 zu p210^{BCR-ABL}-exprimierenden TonB-Zellen induziert werden kann, eine Phosphorylierung der identifizierten Tyrosinreste aber auch unter simultaner Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL nachgewiesen wurde. Demnach dominiert die Zytokin-vermittelte Signaltransduktion über die Onkoprotein-vermittelte Delokalisation von STAT5A.

Da in dieser Arbeit ein direkter Einfluss der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A ausgeschlossen werden konnte, stellt sich die Frage, wie die Onkoprotein-vermittelte, zytoplasmatische Lokalisation des Transkriptionsfaktors in TonB-Zellen induziert wird. Physiologische Bindungen von STAT5 mit den zytoplasmatischen Proteinen GAB2, p44/42-MAPK, SAPK/JNK und p85, der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase, konnten bereits gezeigt werden [HARIR *et al.*, 2007; NYGA *et al.*, 2005; XIONG *et al.*, 2009; ROSA SANTOS *et al.*, 2000]. Dabei lässt allein der Umstand, dass ein Transkriptionsfaktor an Schlüsselproteine zytoplasmatischer Signalkaskaden (PI3-Kinase – Akt; Ras – MAPK – Myc) bindet und diese in unbekannter Art und Weise beeinflusst, auf aberrante Funktionen von STAT-Molekülen in transformierten Zellen schließen. Gestützt werden diese Daten durch die Entdeckung einer zytoplasmatischen Akkumulation von aktivierten STAT5-Molekülen an aktinreiche, podosomale Strukturen in HCK-transformierten Zellen [POINCLoux *et al.*, 2007] sowie einer STAT3-vermittelten Modulation der Zellwanderung infolge einer direkten Interaktion mit Fokalkontakten und einer Inhibition von Stathmin [NG *et al.*, 2006; SILVER *et al.*, 2004].

Die zytoplasmatische Lokalisation von STAT5A in p210^{BCR-ABL}-exprimierenden TonB-Zellen könnte ferner die indirekte Folge einer p210^{BCR-ABL}-vermittelten Phosphorylierung eines zytoplasmatischen Proteins und die hoch-affine Bindung von STAT5A an dieses Protein darstellen. Inwieweit es sich bei diesem hypothetischen Protein um GAB2, p85 oder die MAPK handeln könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Ebenso könnte die Art und Weise, wie STAT-Moleküle in TonB-Zellen aktiviert werden, zu den hier beschriebenen Effekten beitragen. Werden STAT5-Moleküle in der Anwesenheit von IL-3 am dimerisierten IL-3-Rezeptor durch JAK-Proteine aktivierend phosphoryliert, sind diese aufgrund der gegebenen, räumlichen Nähe beider Rezeptorketten zu einer effizienten Ausbildung von STAT5-Dimeren befähigt. Diese Dimere könnten in der Anwesenheit von IL-3 an STAT5-Erkennungsstellen im Zellkern binden und eine erhöhte nuk-

leäre Verweilzeit besitzen. Demgegenüber erfolgt die Aktivierung von STAT5 in der Anwesenheit von BCR-ABL durch das Onkoprotein selbst oder durch stromabwärts gelegene Vertreter der Src-Kinasen (wie z.B. HCK). Bei dieser Art der STAT5-Aktivierung könnte die benötigte, räumliche Nähe für die effiziente Ausbildung von Dimeren nicht gegeben und das Gleichgewicht auf die Seite der Monomere verschoben sein. Phosphorylierte Monomere wären zwar zur intrazellulären Translokation jedoch nicht zur Bindung an DNA-Elemente oder zur Induktion der Gentranskription in der Lage. Allerdings könnten sie potente Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen darstellen und durch diese Proteine im Zytoplasma verstärkt zurückgehalten werden. Dieses theoretische Modell wird gegenwärtig in unserem Labor untersucht.

Interessant ist in diesem Kontext die stringent nukleäre Lokalisation von STAT5B zu bewerten. Wie bereits an den Versuchen zur Proliferation gezeigt werden konnte, ist das Vorhandensein von STAT5B essentiell für die Proliferation und das Überleben von TonB-Zellen in der Anwesenheit des p210^{BCR-ABL}-Onkoproteins.

Zusätzlich unterscheidet sich die Art und Weise der nukleären Lokalisation beider STAT5-Proteine beträchtlich. Sind STAT5A-Moleküle im gesamten Zellkern detektierbar, akkumuliert STAT5B an sehr isolierten, nukleären Sub-Strukturen. Dabei könnte es sich um Cajal-Körperchen, PML-Körperchen (*promyelocytic leukemia*) aber auch um transkriptionelle *Hot-Spots* handeln. PML-Körperchen treten hierbei in den Vordergrund, da ihre Entstehung von einer post-translationellen Modifikation (Sumoylierung von PML) abhängt [SHEN *et al.*, 2006] und sie nach ihrer Formation im Zellkern zahlreiche regulatorische Funktionen wahrnehmen können. PML-Körperchen werden mit einer temporären Sequestrierung und Freigabe von Transkriptionsfaktoren in Verbindung gebracht. Sie sind aber auch an grundlegenden Vorgängen wie der Proteindegradation, der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Seneszenz, der Apoptose und der Stressantwort beteiligt [DELLAIRE *et al.*, 2004; BERNARDI *et al.*, 2007]. Zudem konnten ähnliche nukleäre Lokalisationsmuster von STAT5B in Fusion mit dem Retinolsäurerezeptor- α (RARA) in einem Patienten mit Akuter Promyelozytisch-ähnlicher Leukämie (APL-L) beobachtet werden [ARNOULD *et al.*, 1999].

Co-Lokalisationsstudien von STAT5B mit typischen Markerproteinen für PML- oder Cajal-Körperchen, zur genauen Zuordnung der nukleären Sub-Struktur, wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiterverfolgt.

4.3 Die Identifizierung p210^{BCR-ABL}-spezifischer Phosphorylierungsstellen in STAT5-Molekülen und die Problematik mit primären Patientenmaterial

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit stellte die Identifizierung p210^{BCR-ABL}-spezifischer Phosphorylierungsereignisse an STAT5-Molekülen dar. Konnte nach einer Optimierung der Präzipitationsbedingungen STAT5 in massenspektroskopisch ausreichenden Mengen aus unterschiedlich stimulierten TonB-Zellen oder faktorunabhängig wachsenden K562-Zellen angereichert werden, war das Übertragen der gewonnenen Erkenntnisse auf primäres Probenmaterial nur begrenzt möglich. Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von p210^{BCR-ABL}-negativen Spendern (n = 5) und CML-erstdiagnostizierten Spendern (n = 13) wurden unter identischen Bedingungen aufgearbeitet, und STAT5A aus den Proteinextrakten präzipitiert. Überraschenderweise konnte STAT5A jedoch nur aus Extrakten von p210^{BCR-ABL}-negativen Spendern angereichert und massenspektroskopisch analysiert werden.

Zur Verifizierung dieses Sachverhaltes wurde ein immunologischer Nachweis von STAT5A im *WesternBlot* durchgeführt. Auch unter Verwendung dieser sehr sensitiven Nachweismethode war STAT5A lediglich in den Extrakten von p210^{BCR-ABL}-negativen Spendern detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Die gewonnenen Erkenntnisse ließen zwei Arbeitshypothesen vermuten. (I) STAT5A wird unspezifisch durch Proteasen, die nach der Lyse der Zellen freigesetzt werden, degradiert. (II) Die identifizierten p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstellen in STAT5A vermitteln einen spezifischen Abbau des Proteins.

Tatsächlich stellen mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) von CML-erstdiagnostizierten Spendern eine Besonderheit dar. Im Gegensatz zu PBMCs von gesunden Spendern sind PBMCs aus dem CML-Patienten mit Granulozyten, Myeloblasten und Promyelozyten angereichert und man spricht von einer Linksverschiebung des Blutbildes. Hierbei treten vor allem die Promyelozyten durch ihre hohe Anzahl an Granula in den Fokus, die unter anderem als Reservoir für Proteasen dienen können. Unterschiede in der Degradation von Proteinen aus primären Zellen und etablierten Zelllinien wurden bereits beschrieben [SCHMIDT-MENDE *et al.*, 2000]. Dabei scheinen nicht allein der Zelltyp, sondern ebenso die Bedingungen während und nach der Proteinextraktion für die Stabilität der Proteine entscheidend zu sein. Fortlaufendes Arbeiten unter gekühlten Bedingungen und die Verwendung von Protease- und Proteasominhibitoren im mindestens zweifachen Überschuss (gemäß den Empfehlungen der Hersteller) machen einen unspezifischen Abbau der Proteine möglich, die vollständige Degradation von STAT5A aber relativ unwahrscheinlich.

Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes wurden PBMCs direkt im Probenpuffer lysiert und denaturiert. Das darin enthaltene Detergenz (SDS) sollte die sofortige Inhibierung sämtlicher enzymatischer Aktivität zur Folge haben. In der Tat konnte in derart aufgearbeiteten PBMCs von CML-erstdiagnostizierten Spendern STAT5A auf niedrigem Niveau immunologisch im *WesternBlot* detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Neben der erwarteten Bande von STAT5A konnten aber auch zahlreiche weitere immunoreaktive Banden beobachtet werden. Dabei deutete das Bandenmuster stark auf eine endogene Degradation von STAT5A in diesen Zellen hin. Durch die Art und Weise der Probenaufbereitung, bei der die Lyse der Zellen und die biologische Inaktivierung der Proteine zeitgleich erfolgen, sollte es sich hier um das reale STAT5A-Muster in PBMCs von CML-erstdiagnostizierten Patienten handeln.

Unterstützt werden diese Beobachtungen durch den Vergleich von PBMCs zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit PBMCs nach einer Behandlung mit dem p210^{BCR-ABL}-Inhibitor Imatinib mesylate. Allein durch die Inhibierung der p210^{BCR-ABL}-Tyrosinkinase kann sich der STAT5A-Haushalt in den Zellen stabilisieren und die Anzahl an Degradationsbanden nimmt sichtbar ab (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich scheint ein kontrolliertes Einfrieren von PBMCs bei -196 °C in DMSO (10%) und FBS (20%) eine signifikante Stabilisierung von STAT5A zu vermitteln. Inwieweit sich das Lösungsmittel DMSO oder der Einfrierprozess selbst stabilisierend auf das Protein auswirken können, ist unbekannt. Allerdings konnte ein inhibierender Einfluss einer DMSO-abhängigen Kryokonservierung auf die Aktivität von Cathepsin-Proteasen in Zebrafisch-Oozyten bereits gezeigt werden (ZHANG *et al.*, 2008).

Nach unserem gegenwärtigen Kenntnisstand scheint STAT5A in PBMCs von CML-erstdiagnostizierten Patienten einer verstärkten, endogenen, p210^{BCR-ABL}-abhängigen Degradation unterworfen zu sein. Ein positiver Nachweis von STAT5A in Extrakten aus SDS-Ladepuffer gegenüber dem Fehlen von STAT5A in Extrakten für die Immunopräzipitation, könnte aus einer unzureichenden Inhibition der durch die Zell-Lyse freigesetzten Proteasen herrühren.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Etablierung eines konditionell p210^{BCR-ABL}-induzierbaren, myeloischen Zellsystems (**Tet on 32D** = Ton32D) in unserem Labor erzielt werden. Basierend auf der Etablierung von TonB-Zellen wurden 32D-Zellen mit den identischen DNA-Konstrukten transformiert. Alle selektierten Klone wiesen eine Zytokin- oder Onkoprotein-abhängige Proliferation auf, die durch einen Zytokinenzug oder eine Kultivierung unter Imatinib vollständig revertiert werden konnte. Bei der Analyse der p210^{BCR-ABL}-Expression im *WesternBlot*, konnte aber lediglich in den Kontrollen (TonB_+BCR-ABL, K562) das Onkoprotein detektiert werden. Dagegen wiesen alle Klone der Ton32D-Zelllinie unter Verwendung eines c-ABL-spezifischen Antikörpers nach der Applikation des

Antibiotikums immunoreaktive Banden mit Molmassen <210 kDa auf (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber konnte unter Verwendung der identischen DNA-Konstrukte in adherenten Zelllinien eine transiente Expression von BCR-ABL nachgewiesen werden. Wie bereits an STAT5A in CML-Patientenproben beobachtet wurde, deutete das Bandenmuster von BCR-ABL bei seiner induzierten Expression in Ton32D-Zellen auf eine spezifische Degradation des Proteins hin. Die erstmalige Expression von BCR-ABL in myeloischen Zellen könnte demnach ein kritisches Ereignis darstellen. Durch das zum Teil unspezifische Phosphorylierungsverhalten von BCR-ABL könnten verschiedene Proteasen, das Proteasom oder Komponenten der Ubiquitinsignalkaskade aktiviert und die Degradation des Onkoproteins indirekt stimuliert werden.

Das Nichtvorhandensein eines vergleichbaren Abbaus von STAT5A oder BCR-ABL in etablierten Zelllinien (TonB, K562) könnte zum einen auf den Zelltyp (myeloisch *versus* lymphatisch) oder zum anderen auf Selektionsereignisse während der langjährigen Kultivierung zurückgeführt werden. Somit wäre die Anreicherung von Zellen mit einer endogenen Abreicherung von Proteinen (in diesem Fall Proteasen), die einen negativen Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von p210^{BCR-ABL} oder anderen endogenen Proteinen ausüben, theoretisch vorstellbar.

Trotz der beschriebenen Probleme mit primärem Probenmaterial konnte in etablierten Zelllinien (TonB, K562) in der Anwesenheit von BCR-ABL eine spezifische Tyrosinphosphorylierung an Tyr-682 oder Tyr-683 gemessen werden. Eine genaue Zuordnung des phosphorylierten Tyrosins (Tyr/Y) war infolge der Peptidsequenz (N-YYTPVLAK-C) leider nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine alternative Strategie zur Identifizierung der Phosphorylierungsstelle entwickelt und es konnte der Tyrosinrest Y683 gegenüber dem Tyrosinrest Y682 als bevorzugtes Substrat von BCR-ABL in TonB-Zellen identifiziert werden.

4.4 Auf der Suche nach der Funktion

Da die intrazelluläre Lokalisation von STAT5A nicht von der neu identifizierten Phosphorylierung an Tyr-683 beeinflusst wird, wurden weitere mögliche Funktionen der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung an STAT5A untersucht.

Hierfür wurde zunächst ein möglicher Einfluss auf die Proliferation von TonB-Zellen näher analysiert und es konnte beobachtet werden, dass TonB-Zellen, die mit der Wildtyp- oder Y682F-Variante von STAT5A transduziert sind, ein deutlich geringeres Proliferationspotenzial aufweisen, als TonB-Zellen, welche die STAT5A-Varianten Y683F, YY682/83FF oder den Leervektor exprimieren. Das unabhängige Auftreten dieser Effekte sowohl unter IL-3 als auch unter BCR-ABL, ließ zunächst einen unspezifischen Phänotyp bei der erhöhten Expression von STAT5A (Wildtyp *versus* Tyrosinmutanten) in TonB-Zellen vermu-

ten. Erst im weiteren Verlauf dieser Arbeit und nach Fertigstellung einer konstitutiv-aktiven STAT5A-Variante (cS5^{S710F} = cS5^F), die bei ihrer Expression den Phänotyp von STAT5A-Wildtyp-transduzierten TonB-Zellen imitiert und zusätzlich verstärkt, konnte demonstriert werden, dass eine sehr hohe Expression von STAT5A die Proliferation von TonB-Zellen negativ beeinflussen kann. Gestützt werden diese Ergebnisse aus Beobachtungen bei der dosisabhängigen Expression von STAT5A in humanen CD34⁺-Zellen [WIERENGA *et al.*, 2008]. Diese Zellen verfügen über ein maximales Proliferationsvermögen bei mittleren Gehalten aktiver STAT5A-Moleküle, während stark erhöhte STAT5A-Gehalte die Differenzierung der Zellen zu Erythrozyten induziert. Begründet werden diese Unterschiede im Schicksal der Zellen durch eine veränderte Transkription STAT5-regulierter Gene.

Als eine weitere mögliche Ursache für die hier beobachteten Effekte könnte auch eine erhöhte Sequestrierung von transkriptionellen Co-Faktoren durch STAT5A-Wildtyp-Moleküle angesehen werden. Diese Co-Faktoren könnten in anderen funktionalen Transkriptionskomplexen fehlen und auf diesem Weg die Integrität wichtiger zellulärer Vorgänge stören. Liegt STAT5A am Tyrosinrest Y683 zu Phenylalanin mutiert vor (Y683F), könnten durch unbekannte, hypothetische Strukturveränderungen am gefalteten Protein, die exprimierten Moleküle in der Sequestrierung von Co-Faktoren beeinträchtigt sein. Folglich würde sich die Expression dieser Mutante nicht mehr störend auf die Proliferation von TonB-Zellen auswirken. Gestützt wird diese Vermutung aus Beobachtungen bei der Immunopräzipitation von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten aus TonB-Zellen in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL. Werden diese Präzipitate mit phospho-Tyrosin-Antikörpern im *WesternBlot* inkubiert, zeigen sich hauptsächlich in der Anwesenheit von BCR-ABL zahlreiche immunoreaktive Banden, die auf co-präzipitierte und Tyrosin-phosphorylierte Proteine hinweisen könnten (Abbildung 3.16_A, IB: p-Tyrosin). Überraschenderweise nehmen bei den beiden STAT5A-Tyrosinmutanten Y683F und YY682/83FF sowohl die Anzahl als auch die Intensität dieser Banden spürbar ab, was auf eine verminderte Sequestrierung von Proteinen hindeuten könnte.

Weil die Daten zur Proliferation von TonB-Zellen keine klare Aussage über eine Funktion der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstellen in STAT5A zulassen, wurden anhand der Beobachtungen bei der Präzipitation von STAT5A aus primären Patientenmaterial und der Lage der identifizierten Tyrosinphosphorylierungsstellen im STAT5A-Protein weitere mögliche Funktionen untersucht.

Wie eingangs bereits erwähnt, scheint STAT5A in PBMCs von CML-erstdiagnostizierten Patienten einer erhöhten Degradation ausgesetzt zu sein. Im Gegensatz dazu könnten Selektionsprozesse in etablierten Zelllinien ein Grund für die Abwesenheit eines vergleichbaren Abbaus von STAT5A in diesen Zellen darstellen. In der Tat könnte die spezifische Phosphorylierung eines Proteins dessen proteolytischen oder proteasomalen Abbau steu-

ern und wurde im Kontext einer p210^{BCR-ABL}-abhängigen Phosphorylierung und Degradation von SHIP1 bereits publiziert [RUSCHMANN *et al.*, 2010].

Durch den in dieser Arbeit etablierten STAT5A-Degradationsassay konnte gezeigt werden, dass STAT5A-Wildtyp, welches transgen in der Gegenwart von BCR-ABL in TonB-Zellen exprimiert wurde (phosphoryliert an Tyr-683), einer stärkeren Degradation durch p210^{BCR-ABL}-induzierbare Proteasen oder das Proteasom ausgesetzt ist, als STAT5A-Wildtyp, welches transgen in der Gegenwart von IL-3 exprimiert wurde (nicht phosphoryliert an Tyr-683). Dagegen zeigen die STAT5A-Mutanten Y683F und YY682/83FF unabhängig vom Stimulus ihrer transgenen Expression in TonB-Zellen (IL-3 *versus* BCR-ABL) eine deutlich erhöhte Proteininstabilität. Eine direkte Beteiligung von Tyr-683 an der Stabilität von STAT5A in der Gegenwart von BCR-ABL scheint nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand aber nicht gegeben zu sein, da beide Tyrosinmutanten (Y683F und YY682/83FF) nicht zu einer signifikanten Stabilisierung der Proteinmenge beitragen können. Stattdessen werden beide STAT5A-Tyrosinmutanten, selbst wenn sie in der Anwesenheit von IL-3 in TonB-Zellen exprimiert wurden (nicht phosphoryliert an Tyr-683), im hohen Maße durch p210^{BCR-ABL}-induzierbare Proteasen oder das Proteasom abgebaut. Infolge einer verminderten Fähigkeit in der Sequestrierung akzessorischer Proteine (weiter oben beschrieben) könnten STAT5A-Y683F und STAT5A-YY682/83FF weniger gut geschützt und damit besser zugänglich für eine proteolytische Prozessierung sein. Wäre das der Fall, würde es sich bei der Degradation von STAT5A-Tyrosinmutanten um einen unspezifischen Abbau handeln und ließe die Beobachtungen im Abbau des Wildtyp-Proteins in einem anderen Licht erscheinen.

Verschiedene C-terminal verkürzte Varianten von STAT-Molekülen sind in der Literatur beschrieben und insbesondere Serinproteasen (z.B. Cathepsin G) werden für die proteolytische Prozessierung von STAT5-Proteinen in myeloischen Zellen verantwortlich gemacht [LEE *et al.*, 1999; SCHUSTER *et al.*, 2007]. Aus diesem Grund überrascht es nicht, dass die beobachtete proteolytische Aktivität in PBMCs von CML-erstdiagnostizierten Patienten oder Extrakten von p210^{BCR-ABL}-exprimierenden Ton32D-Zellen durch einen potenten Inhibitor von Serinproteasen (AEBSF) sichtbar reduziert werden kann. Zusätzlich kann die STAT5A-Proteininstabilität durch eine Inhibition des Proteasoms (MG-132) deutlich erhöht werden. Das ist konform mit den Beobachtungen einer verstärkten proteasomalen Aktivität in p210^{BCR-ABL}-positiven Zellen [CRAWFORD *et al.*, 2009].

Neben einem durch Phosphorylierung induzierten proteolytischen Abbau können weitere post-translationelle Modifikationen (Sumoylierung, Ubiquitinierung, Azetylierung, Methylierung) die physiologischen Eigenschaften und das Schicksal eines Proteins dramatisch beeinflussen. Während eine Poly-Ubiquitinierung in der Regel die Voraussetzung für den Abbau eines Proteins durch das 26S-Proteasom darstellt, kann eine Sumoylierung ver-

schiedenste Auswirkungen auf ein Protein haben. Dabei werden Veränderungen in der Stabilität, der intrazellulären und sub-nukleären Lokalisation, der DNA-Bindung, der Genregulation und der Aktivität von Proteinen im Kontext einer Sumoylierung diskutiert [GILL, 2004]. Ferner korreliert eine Sumoylierung von Transkriptionsfaktoren und Histonen häufig mit einer transkriptionellen Repression der entsprechenden Zielgene [OUYANG *et al.*, 2009], was auf Protein-Protein-Interaktionen mit Co-Repressoren beruhen dürfte. Demgegenüber wird eine Mono-Ubiquitinierung von Transkriptionsfaktoren und Histonen mit einer Genaktivierung in Verbindung gebracht, und es verwundert nicht, dass beide Modifikationen um die gleichen Lysinreste (Lys) am Zielprotein konkurrieren. Eine Sumoylierung von STAT1 an Lys-703 wurde bereits gezeigt [UNGUREANU *et al.*, 2003 und 2005] und befindet sich damit in unmittelbarer Nachbarschaft zum kritischen Tyrosinrest (Tyr-701) von STAT1.

Das Vorhandensein eines potentiellen SUMO-Konsensusmotivs Ψ KXE (Ψ = hydrophobe Aminosäure) [RODRIGUEZ *et al.*, 2001] in unmittelbarer Nähe zu den p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstellen machte eine Untersuchung des Ubiquitinierungs- und Sumoylierungsmusters von STAT5A in TonB-Zellen in der An- und Abwesenheit von IL-3 u/o BCR-ABL interessant. Allerdings konnten weder in der Sumoylierung noch in der Ubiquitinierung von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten signifikante Veränderungen gefunden werden.

Die Position der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierung im STAT5A-Molekül lieferte einen weiteren prominenten Ansatzpunkt in der funktionellen Charakterisierung der identifizierten Phosphorylierungsstellen. Wie in der Einleitung beschrieben, weisen alle Proteine der STAT-Familie eine homologe Domänenstruktur (ND, LD, CCD, DBD, SH2-D, TAD – siehe auch Einleitung Abbildung 1.2) auf. Weil STAT-Moleküle ausschließlich als Dimer an die Promotoren ihrer Zielgene binden können, bedarf es zur Aufrechterhaltung ihrer Eigenschaft als Transkriptionsfaktor der Phosphorylierung eines kritischen Tyrosinrests (Aktivierung) und einer reziproken Dimerisierung. Letztere wird durch die Erkennung eines phosphorylierten STAT-Moleküls durch die SH2-Domäne eines zweiten STAT-Moleküls realisiert. Dabei scheint eine kritische Phosphorylierung beider STAT-Moleküle für eine erfolgreiche Dimerisierung nicht zwingend erforderlich zu sein [ZHANG *et al.*, 1995; GUPTA *et al.*, 1996]. Bezogen auf STAT5A wurden die Aminosäurebereiche 691-VDGYVKP-697 mit dem Tyrosinrest Y694 als Bereich für die kritische Phosphorylierung und Bindungsspezifität zur SH2-Domäne und 613-GTFLLRFSDS-622 mit dem Argininrest R618 als Bereich für die phospho-Tyrosinerkennung in der SH2-Domäne von STAT5A identifiziert [MCMURRAY, 2008].

Die p210^{BCR-ABL}-spezifische Tyrosinphosphorylierung in der unmittelbaren Nähe zum kritischen Tyrosinrest in STAT5A könnte daher die Homo- oder Heterodimerisierung des

Proteins beeinflussen. In der Tat konnte in dieser Arbeit eine Heterodimerisierung zwischen STAT5A- und STAT5B-Molekülen gezeigt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Heterodimerisierung von einer Phosphorylierung an Tyrosinresten in STAT5A abhängt und bei Kultivierung der Zellen unter Zytokinentzug oder in der Anwesenheit von Imatinib vollständig verloren geht. Um einen möglichen Einfluss der neu identifizierten Phosphorylierungsstellen in STAT5A auf die Heterodimerisierung mit STAT5B untersuchen zu können, wurde auf einen TonB-Zellklon zurückgegriffen, der durch den Einsatz von RNAi nahezu kein endogenes STAT5A mehr exprimieren konnte.

Um die Menge an transgen-exprimierten Protein möglichst gering zu halten, wurden ausschließlich RNAi-sensitive STAT5A-Varianten in den Versuchen eingesetzt. Wohl wissend, dass bereits eine moderate Überexpression (durchschnittlich um Faktor 10 ggü. endogenem STAT5A in nativen TonB-Zellen erhöht) die Dimerisierungsverhältnisse bei der STAT5-Isoformen in der Zelle erheblich beeinflussen kann, wurden Co-Präzipitationsstudien durchgeführt.

Eine verstärkte p210^{BCR-ABL}-abhängige STAT5A/B-Heterodimerisierung, die beim Wildtyp-Protein, jedoch nicht bei den Tyrosinmutanten Y683F und YY682/83FF beobachtet werden konnte, lässt auf einen Einfluss der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstelle in STAT5A bei der STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung in TonB-Zellen schließen.

Kontroverse Heterodimerisierungsmuster, wie sie in transgen-exprimierenden Zellen im Vergleich zu nativen TonB-Zellen beobachtet wurden (unter IL-3 und IL-3/BCR-ABL ist die STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung stärker ausgeprägt als unter BCR-ABL), könnten eine indirekte Folge der transgenen Expression von STAT5A in diesen Zellen sein, wobei einer konstanten Menge an endogenen STAT5B-Molekülen ein artifizielles Überangebot an STAT5A-Molekülen dargeboten wurde.

Dennoch konnte unter den gewählten Bedingungen eine quantitative Veränderung in der Heterodimerisierung von STAT5A-Wildtyp und STAT5A-Tyrosinmutanten mit STAT5B-Molekülen in der Anwesenheit von BCR-ABL reproduzierbar gezeigt werden, welche in dieser Art und Weise unter alleiniger Anwesenheit des Zytokins nicht beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Proliferations- und Proteindegradationsstudien, wo unabhängig vom Stimulus beobachtete Effekte sowohl unter IL-3 als auch BCR-ABL detektiert wurden, handelt es sich bei der Heterodimerisierung um einen p210^{BCR-ABL}-spezifischen Effekt, der auch unter simultaner Anwesenheit von IL-3 und BCR-ABL vorherrschend war [Daten nicht gezeigt].

Bezug nehmend auf die bereits hier vorgestellten Ergebnisse, die anschaulich zeigen konnten, dass nur STAT5A und nicht STAT5B an zusätzlichen Tyrosinresten p210^{BCR-ABL}-spezifisch phosphoryliert wird und nur STAT5A und nicht STAT5B unter alleiniger Anwesenheit von BCR-ABL die intrazelluläre Lokalisation verändert, stellt sich damit die Frage,

warum durch eine Phosphorylierung an Tyr-683 die Heterodimerisierung zwischen beiden STAT5-Isoformen in TonB-Zellen moduliert wird. Meines Erachtens kommen hierfür drei plausible Möglichkeiten in Betracht.

(I) Wie bereits im Kapitel 4.2 angesprochen wurde, ist die p210^{BCR-ABL}-spezifische Phosphorylierung eines zytoplasmatischen Proteins vorstellbar, an das STAT5A z.B. über seine SH2-Domäne binden und auf diesem Weg von seiner nukleären Lokalisation zurück gehalten werden könnte. Eine phospho-Y683-induzierte Heterodimerisierung könnte dagegen eine partielle Sequestrierung von STAT5A im Zellkern und eine basale STAT5A-abhängige Induktion von Zielgenen ermöglichen.

(II) Neben Homodimeren könnten Heterodimere das transkriptionelle Repertoire bei der Induktion von STAT5-Zielgenen beträchtlich bereichern. Über ihre Transaktivierungsdomänen (TAD) rekrutieren STAT5A- und STAT5B-Moleküle sowohl identische als auch individuelle transkriptionelle Co-Aktivatoren. Eine Beteiligung von CBP/p300 [PFITZNER *et al.*, 1998] und NCoA-1/SRC-1 [LITTERST *et al.*, 2005] an der STAT5-vermittelten Transaktivierung konnte bereits gezeigt werden. Zusätzlich werden auch DNA-restrukturierende Proteine, wie z.B. Histon-Deazetylasen (HDAC1), benötigt [RASCLE *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003] und die Vielfalt an transkriptionellen STAT5-Modulatoren ist längst noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Aufrechterhaltung von Proliferation und Überleben von TonB-Zellen in der Anwesenheit von BCR-ABL in Kombination mit einer effizienten RNAi-vermittelten Reduktion von STAT5A lassen hierbei auf eine Aktivierung von Genen schließen, die BCR-ABL einen Vorteil verschaffen könnten, jedoch nicht für die Tumorgenese des Onkoproteins zwingend notwendig erscheinen.

(III) Anhand der beobachteten Widersprüche in der Heterodimerisierung von STAT5-Isoformen bei der transgenen Überexpression gegenüber dem Zustand in nativen Zellen, könnte es sich hier auch um ein unspezifisches Artefakt handeln, welches durch die artifizielle Expression von STAT5A im TonB-Zellkultursystem induziert wird. Ebenso wäre ein klonaler Effekt bei dem für diese Versuche hauptsächlich verwendeten Zellklon *TonB-shS5A_Klon1* möglich.

4.5 Ein hypothetisches Modell für die Effekte von BCR-ABL auf STAT5 im TonB-Zellkulturmodell

Unter transgener Expression von STAT5A (Wildtyp *versus* Tyrosinmutanten) konnten Veränderungen im Proliferationsverhalten von TonB-Zellen oder in der Stabilität des Proteins sowohl in der Anwesenheit von IL-3 (unphosphoryliert = unerwartet) als auch BCR-ABL (phosphoryliert = erwartet) wahrgenommen werden. Während die genetische Integrität der verwendeten STAT5A-Wildtyp-DNA durch eine vollständige Sequenzierung bestätigt wur-

de, unterschieden sich die verwendeten Konstrukte der STAT5A-Tyrosinmutanten lediglich in einem standardisierten Austausch von Tyrosin zu Phenylalanin (Y→F).

Können bei STAT5A-Tyrosinmutanten etwaige Phänotypen sowohl unter BCR-ABL als auch IL-3 beobachtet werden, kommen dafür zwei plausible Möglichkeiten in Betracht. (I) Die Mutagenese eines Tyrosinrests könnte die Faltung des Proteins modulieren und ein Protein mit veränderten chemischen oder physikalischen Eigenschaften entstehen lassen. (II) Alternative post-translationelle Modifikationen am Tyrosinrest in der Anwesenheit von IL-3, die mit der p210^{BCR-ABL}-vermittelten Phosphorylierung in Konkurrenz stehen, gehen durch die Y→F-Mutagenisierung verloren und könnten für das unerwartete Auftreten eines p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phänotyps unter IL-3 mit verantwortlich sein (Abbildung 4.1).

Neben der kovalenten Anlagerung von Phosphatgruppen können Tyrosinreste im Protein auch andersartig post-translational modifiziert werden. Die intrazelluläre Anlagerung eines einzelnen GlcNAc-Moleküls (N-Azetylglukosamin) [CHOU UND HART, 2001] an Serin- oder Threoninreste (*O*-Glykosylierung), im Einzelfall des Glykogenins an einem Tyrosinrest [SMYTHE UND COHEN, 1991], wurde bereits beschrieben. Interessanterweise steht dieser Prozess oft in Wechselwirkung mit der Phosphorylierung am gleichen oder einem benachbarten Aminosäurerest, wodurch dynamische und funktionale Modifikationen von Proteinen möglich werden. Zwar wurde bis heute eine *O*-Glykosylierung an einem Tyrosinrest nur bei einem Protein (Glykogenin) nachgewiesen, dass schließt aber das Vorhandensein weiterer potentieller Proteine mit einer ähnlichen post-translationellen Modifikation nicht aus.

Ebenso konnte eine kovalente Anlagerung von Sulfat-Ionen (Sulfatierung) oder zyklischen Porphyrin- und Flavin-Gruppen an Tyrosinreste gezeigt werden.

Damit ist eine alternative, post-translationelle Modifikation eines Tyrosinrests in der Anwesenheit von IL-3, die mit der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierung in Wechselwirkung steht, theoretisch vorstellbar. Der Austausch dieses Tyrosinrests in einen Phenylalaninrest ließe zum einen keine Onkoprotein-induzierte Phosphorylierung, zum anderen aber auch keine alternative, post-translationelle Modifikation unter IL-3 mehr zu und würde eine mögliche Erklärung für die simultan beobachteten Phänotypen in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL bieten.

Unabhängig davon zeichnet sich die phenolische Gruppe im Tyrosinrest als Donor für Wasserstoffradikale aus. Diese Fähigkeit verleiht der Aminosäure anti-oxidative Eigenschaften und spielt eine wichtige Rolle bei der Lipidperoxidation von integralen Membranproteinen. Demgegenüber besitzen Phenylalaninreste nicht die Möglichkeit zur Wasserstoffabgabe. Die Rereduktion der Tyrosinylradikale kann durch zytosolische Reduktanten

(Ascorbat) oder über eine intra- oder intermolekulare Dimerisierungs- oder Umlagerungsreaktion, die oxidative Tyrosin-Dimerisierung, erfolgen [BARTESAGHI *et al.*, 2010].

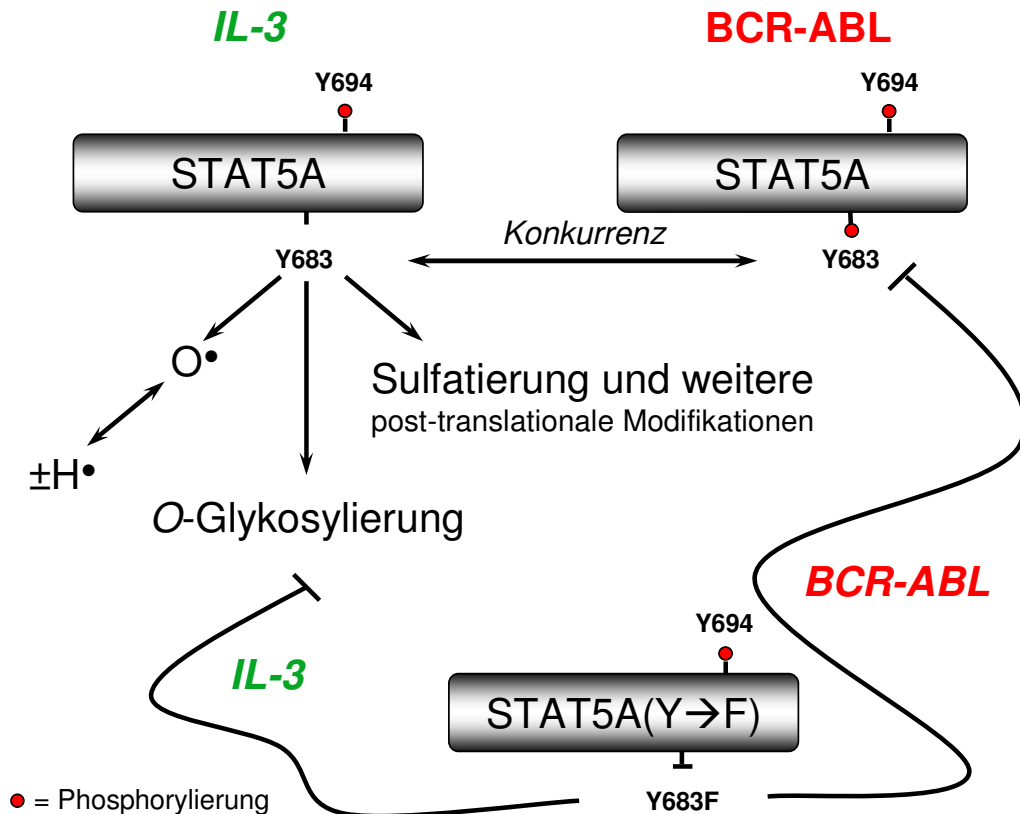


Abb. 4.1: Ein hypothetisches Modell für die Effekte von BCR-ABL auf STAT5A im TonB-Zellkultursystem. STAT5A wird in der Anwesenheit von IL-3 oder BCR-ABL am kritischen Tyrosinrest Y694 aktivierend phosphoryliert. Eine zusätzliche Phosphorylierung von Y683 konnte in der Anwesenheit von BCR-ABL, jedoch nicht von IL-3, identifiziert werden. Für die funktionelle Analyse dieser Phosphorylierungsstelle wurde dieser Tyrosinrest in einen Phenylalaninrest mutiert. In verschiedenen Experimenten (Proliferation, Proteolyse) konnten bei der Expression von STAT5A-Wildtyp oder STAT5A-Tyrosinmutanten beobachtete Effekte, die lediglich in der Anwesenheit von BCR-ABL erwartet wurden, auch unter IL-3 wahrgenommen werden. Das lässt eine aberrante Funktion des analysierten Tyrosinrests unter IL-3 vermuten. Diverse post-translationelle Modifikationen von Tyrosinresten im Protein sind beschrieben. Neben der klassischen Phosphorylierung können Tyrosinreste durch die Anlagerung von Zuckerresten (O-Glykosylierung) oder Sulfat-Ionen (Sulfatierung) modifiziert werden. Ebenso besitzt die phenolische Gruppe im Tyrosinrest reaktive Eigenschaften und kann als Donor von Wasserstoffradikalen dienen.

Neben einer postulierten veränderten chemischen Natur von STAT5A-Tyrosinmutanten, könnten weitere Umstände zu den schwer interpretierbaren Ergebnissen bei der funktionellen Charakterisierung der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierungsstellen beigetragen haben. Alle hier vorgestellten Versuche wurden in einer lymphatischen Zelllinie durchgeführt. Zwar kann p210^{BCR-ABL} bei ca. 30% – 40% aller Patienten mit einer ALL zytogene-

tisch detektiert werden, in weit höherer Frequenz (ca. 90%) ist das Onkoprotein aber in myeloischen Leukämien anzutreffen. Obwohl in beiden Zelltypen (TonB = lymphatisch, K562 = myeloisch) eine Phosphorylierung an Tyr-683 in der Anwesenheit von BCR-ABL nachgewiesen werden konnte, muss das nicht zwingend bedeuten, dass nach Mutagenese dieses Tyrosinrests ein erwarteter Phänotyp gleichermaßen in beiden Zelltypen sichtbar wird. Somit könnte die Funktion der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierung an STAT5A auf myeloische Zellen limitiert sein und nicht oder deutlich schwächer in lymphatischen Zellen auftreten.

Ferner konnten in den MS-basierenden Messungen keine Aussagen zu den Anteilen an Tyr-683-phosphorylierten STAT5A-Molekülen getroffen werden. Bei einer hypothetischen Phosphorylierung von 5% – 20% der endogenen STAT5A-Moleküle drängt sich damit die Frage auf, inwieweit bei der Expression von STAT5A-Tyrosinmutanten potentielle Phänotypen messbar sind, ohne als natürliche Schwankungsbreite vernachlässigt zu werden.

5. Ausblick und offene Fragestellungen

5.1 Fortführende Analysen in der intrazellulären Lokalisation von STAT5A in der Anwesenheit von BCR-ABL

Das in dieser Arbeit verwendete TonB-Zellkultursystem bietet, durch die konditionelle Expression von BCR-ABL, die Möglichkeit einer differentiellen Analyse von Zytokin- und Onkoprotein-abhängigen Phosphorylierungsereignissen an Zielproteinen im identischen genetischen Hintergrund an.

Die Unabhängigkeit der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Tyrosinphosphorylierung an STAT5A bei der intrazellulären Lokalisation des Transkriptionsfaktors konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Eine postulierte p210^{BCR-ABL}-spezifische Phosphorylierung eines zytoplasmatischen Proteins und die Assoziation von STAT5A an dieses phosphorylierte Protein, könnte für die veränderte Lokalisation von STAT5A in der alleinigen Anwesenheit von BCR-ABL verantwortlich sein.

Eine auf Massenspektroskopie gestützte Analyse von p210^{BCR-ABL}-induzierten Phosphorylierungsereignissen an zytoplasmatischen Proteinen, die mit einer physiologischen Bindung von STAT5 in Zusammenhang gebracht werden konnten (wie z.B. GAB2, MAPK, p85), könnte Aufklärung bei den beobachteten Effekten in der Lokalisation von STAT5A bringen. Durch diese Herangehensweise könnte zwar ein möglicher Mechanismus aufgezeigt werden, jedoch würde dies noch keine Anhaltspunkte über die Funktion einer möglichen Interaktion eines zytoplasmatischen Proteins mit dem Transkriptionsfaktor liefern.

5.2 Die Identifizierung von STAT5A-co-präzipitierbaren Proteinen

Werden STAT5A-Moleküle aus Doxyzyklin-stimulierten Extrakten von TonB-Zellen präzipitiert und im *WesternBlot* mit einem phospho-Tyrosin-Antikörper inkubiert, zeigen sich zahlreiche Tyrosin-phosphorylierte Banden von co-präzipitierten Proteinen, die unter IL-3 Bedingungen nicht detektiert werden können. Eine auf Massenspektroskopie gestützte Identifizierung von STAT5A-Co-Präzipitaten könnte für zwei wesentliche Aspekte sinnvoll erscheinen: (I) Die Identifizierung von zytoplasmatischen Proteinen, die mit STAT5A eine physiologische Bindung eingehen können. (II) Die Charakterisierung der Komplexität des STAT5A-Interaktoms bei der transkriptionellen Induktion von Genen in unterschiedlich stimulierten TonB-Zellen.

5.3 Fortführende Analysen in der Funktion der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierung an STAT5A

Verschiedene Möglichkeiten (Proliferation, Degradation, post-translationelle Modifikation, Heterodimerisierung) in der Funktion der p210^{BCR-ABL}-abhängigen Phosphorylierung an STAT5A wurden in dieser Arbeit intensiv untersucht. Allerdings konnten bei vielen Versuchen etwaige Effekte im TonB-Zellkultursystem sowohl in der Anwesenheit von IL-3 als auch BCR-ABL beobachtet werden.

Einzig die STAT5A:STAT5B-Heterodimerisierung stellte die vielversprechendste Möglichkeit in der funktionellen Charakterisierung dar, denn die hier beobachteten Effekte waren exklusiv in der Anwesenheit von BCR-ABL anzutreffen. Eine Heterodimerisierung zwischen STAT5-Molekülen, verbunden mit einer differentiellen Sequestrierung von transkriptionellen Co-Aktivatoren und einer Induktion von STAT5A/B-spezifischen Genen, macht einen Einfluss der p210^{BCR-ABL}-spezifischen Phosphorylierung auf die DNA-Bindungsspezifität oder die Aktivierung der Gentranskription wahrscheinlich. Beide Möglichkeiten könnten in *Gelshiftassays* (EMSA) oder Luziferase-Assays näher untersucht werden. Um Falschaussagen zu vermeiden, müsste im *Gelshiftassay* ausschließlich auf Promotoren (bzw. den darin enthaltenen STAT-Bindungsstellen) von Genen zurückgegriffen werden, die nur durch STAT5A/B-Heterodimere induziert werden können. Die sichere Identifizierung derartiger Gene stellt dabei die größte Herausforderung dar.

Das Vorhandensein eines β -Kasein (Promotor) – Luziferase-Konstrukts in unserem Labor lässt die Durchführung von Luziferase-Assays an transduzierten TonB-Zellen (STAT5A-Wildtyp *versus* STAT5A-Tyrosinmutanten) einfach erscheinen. Jedoch zeigen bereits native TonB-Zellen, die mit diesem Reporterkonstrukt stabil transformiert und selektiert sind, schlecht reproduzierbare Ergebnisse in der transkriptionellen Induktion des β -Kasein-Promotors. Das könnte in der fehlenden internen Kontrolle bei diesem System begründet sein, weil ein Abgleich der gemessenen Luziferase-Einheiten lediglich über die Zellzahl erfolgen kann. Auf Grund dieser Problematik wurde bisher auf diesen Assay in der funktionellen Charakterisierung verzichtet.

Literaturverzeichnis

- ABRAM, C. L. UND S. A. COURTNEIDGE** (2000). "Src family tyrosine kinases and growth factor signaling." *Exp Cell Res* 254(1): 1-13.
- ANGELL, S. M. UND D. C. BAULCOMBE** (1997). "Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA." *Embo J* 16(12): 3675-84.
- AKIRA, S.** (1999). "Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice." *Stem Cells* 17(3): 138-46.
- ALEXANDER, W. S. UND D. J. HILTON** (2004). "The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response." *Annu Rev Immunol* 22: 503-29.
- ARNOULD, C., C. PHILIPPE, et al.** (1999). "The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia." *Hum Mol Genet* 8(9): 1741-9.
- AZAM, M., H. ERDJUMENT-BROMAGE, et al.** (1995). "Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5." *Embo J* 14(7): 1402-11.
- AZAM, M., C. LEE, et al.** (1997). "Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing." *Immunity* 6(6): 691-701.
- BARAHMAND-POUR, F., A. MEINKE, et al.** (1998). "Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast." *J Biol Chem* 273(20): 12567-75.
- BARTESAGHI, S., J. WENZEL, et al.** "Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes." *Chem Res Toxicol* 23(4): 821-35.
- BARTON, B. E., J. G. KARRAS, et al.** (2004). "Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines." *Mol Cancer Ther* 3(1): 11-20.
- BASHAM, B., M. SATHE, et al.** (2008). "In vivo identification of novel STAT5 target genes." *Nucleic Acids Res* 36(11): 3802-18.
- BERNARDI, R. UND P. P. PANDOLFI** (2007). "Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 1006-16.
- BEUVINK, I., D. HESS, et al.** (2000). "Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity." *J Biol Chem* 275(14): 10247-55.

BLUYSSSEN, A. R., J. E. DURBIN, et al. (1996). "ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors." *Cytokine Growth Factor Rev* 7(1): 11-7.

BONIFAZI, F., A. DE VIVO, et al. (2001). "Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders." *Blood* 98(10): 3074-81.

BOVOLENTA, C., S. GASPERINI, et al. (1998). "High affinity receptor for IgG (Fc gamma RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN-gamma response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10." *J Immunol* 160(2): 911-9.

BOWMAN, T., R. GARCIA, et al. (2000). "STATs in oncogenesis." *Oncogene* 19(21): 2474-88.

BOUCHERON, C., S. DUMON, et al. (1998). "A single amino acid in the DNA binding regions of STAT5A and STAT5B confers distinct DNA binding specificities." *J Biol Chem* 273(51): 33936-41.

BRADFORD, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.

BRAUN, B. S., D. A. TUVESON, et al. (2004). "Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(2): 597-602.

BRIERLEY, M. M. UND E. N. FISH (2005). "Stats: multifaceted regulators of transcription." *J Interferon Cytokine Res* 25(12): 733-44.

BRUMMELKAMP, T. R., R. BERNARDS, et al. (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* 296(5567): 550-3.

BUCHDUNGER, E., C. L. CIOFFI, et al. (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(1): 139-45.

CALO, V., M. MIGLIAVACCA, et al. (2003). "STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis." *J Cell Physiol* 197(2): 157-68.

CARLESSO, N., D. A. FRANK, et al. (1996). "Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl." *J Exp Med* 183(3): 811-20.

CASTELLANOS, A., B. PINTADO, et al. (1997). "A BCR-ABL(p190) fusion gene made by homologous recombination causes B-cell acute lymphoblastic leukemias in chimeric mice with independence of the endogenous bcr product." *Blood* 90(6): 2168-74.

CHAI, S. K., G. L. NICHOLS, et al. (1997). "Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients." *J Immunol* 159(10): 4720-8.

- CHAN, I. T. UND D. G. GILLILAND** (2004). "Oncogenic K-ras in mouse models of myeloproliferative disease and acute myeloid leukemia." *Cell Cycle* 3(5): 536-7.
- CHAN, I. T., J. L. KUTOK, et al.** (2004). "Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease." *J Clin Invest* 113(4): 528-38.
- CHATTERJEE-KISHORE, M., F. VAN DEN AKKER, et al.** (2000). "Association of STATs with relatives and friends." *Trends Cell Biol* 10(3): 106-11.
- CHATURVEDI, P., S. SHARMA, et al.** (1997). "Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of STATs." *Mol Cell Biol* 17(6): 3295-304.
- CHEN, W., M. O. DAINES, et al.** (2004). "Turning off signal transducer and activator of transcription (STAT): the negative regulation of STAT signaling." *J Allergy Clin Immunol* 114(3): 476-89; quiz 490.
- CHEN, X., U. VINKEMEIER, et al.** (1998). "Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA." *Cell* 93(5): 827-39.
- CHOU, T. Y. UND G. W. HART** (2001). "O-linked N-acetylglucosamine and cancer: messages from the glycosylation of c-Myc." *Adv Exp Med Biol* 491: 413-8.
- CLEVELAND, J. L., M. DEAN, et al.** (1989). "Tyrosine kinase oncogenes abrogate interleukin-3 dependence of murine myeloid cells through signaling pathways involving c-myc: conditional regulation of c-myc transcription by temperature-sensitive v-abl." *Mol Cell Biol* 9(12): 5685-95.
- CLEVINGER, C. V.** (2004). "Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer." *Am J Pathol* 165(5): 1449-60.
- CORBIN, A. S., P. LA ROSEE, et al.** (2003). "Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib." *Blood* 101(11): 4611-4.
- CORTEZ, D., G. STOICA, et al.** (1996). "The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway." *Oncogene* 13(12): 2589-94.
- COTARLA, I., S. REN, et al.** (2004). "Stat5a is tyrosine phosphorylated and nuclear localized in a high proportion of human breast cancers." *Int J Cancer* 108(5): 665-71.
- CRAWFORD, L. J., P. WINDRUM, et al.** (2009). "Proteasome proteolytic profile is linked to Bcr-Abl expression." *Exp Hematol* 37(3): 357-66.
- CUENCO, G. M. UND R. REN** (2001). "Cooperation of BCR-ABL and AML1/MDS1/EVI1 in blocking myeloid differentiation and rapid induction of an acute myelogenous leukemia." *Oncogene* 20(57): 8236-48.

CUI, Y., A. HOSUI, et al. (2007). "Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration." *Hepatology* 46(2): 504-13.

DALEY, G. Q., R. A. VAN ETTEN, et al. (1990). "Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome." *Science* 247(4944): 824-30.

DANHAUSER-RIEDL, S., M. WARMUTH, et al. (1996). "Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells." *Cancer Res* 56(15): 3589-96.

DANIAL, N. N., J. A. LOSMAN, et al. (1998). "Direct interaction of Jak1 and v-Abl is required for v-Abl-induced activation of STATs and proliferation." *Mol Cell Biol* 18(11): 6795-804.

DANIAL, N. N., A. PERNIS, et al. (1995). "Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene." *Science* 269(5232): 1875-7.

DARNELL, J. E., JR. (1997). "STATs and gene regulation." *Science* 277(5332): 1630-5.

DARNELL, J. E., JR., I. M. KERR, et al. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science* 264(5164): 1415-21.

DE GROOT, R. P., J. A. RAAIJMAKERS, et al. (1999). "STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells." *Blood* 94(3): 1108-12.

DEININGER, M. W. (2004). "Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia." *J Cancer Res Clin Oncol* 130(2): 59-72.

DELLAIRE, G. UND D. P. BAZETT-JONES (2004). "PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress." *Bioessays* 26(9): 963-77.

DUMON, S., S. C. SANTOS, et al. (1999). "IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line." *Oncogene* 18(29): 4191-9.

DURBIN, J. E., R. HACKENMILLER, et al. (1996). "Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease." *Cell* 84(3): 443-50.

ELBASHIR, S. M., J. HARBORTH, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411(6836): 494-8.

ELBASHIR, S. M., W. LENDECKEL, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* 15(2): 188-200.

ELBASHIR, S. M., J. MARTINEZ, et al. (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." *Embo J* 20(23): 6877-88.

ELEFANTY, A. G., I. K. HARIHARAN, et al. (1990). "bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice." *Embo J* 9(4): 1069-78.

- EPLING-BURNETTE, P. K., J. H. LIU, et al.** (2001). "Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression." *J Clin Invest* 107(3): 351-62.
- FADERL, S., M. TALPAZ, et al.** (1999). "Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy." *Ann Intern Med* 131(3): 207-19.
- FERNANDES, A., A. W. HAMBURGER, et al.** (1999). "ErbB-2 kinase is required for constitutive stat 3 activation in malignant human lung epithelial cells." *Int J Cancer* 83(4): 564-70.
- FIRE, A., S. XU, et al.** (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-11.
- FUKADA, T., T. OHTANI, et al.** (1998). "STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition." *Embo J* 17(22): 6670-7.
- GARCIA, R., C. L. YU, et al.** (1997). "Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells." *Cell Growth Differ* 8(12): 1267-76.
- GESBERT, F., W. R. SELLERS, et al.** (2000). "BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway." *J Biol Chem* 275(50): 39223-30.
- GILL, G.** (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" *Genes Dev* 18(17): 2046-59.
- GIL, J. UND M. ESTEBAN** (2000). "Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action." *Apoptosis* 5(2): 107-14.
- GOGA, A., J. McLAUGHLIN, et al.** (1995). "Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene." *Cell* 82(6): 981-8.
- GOLDMAN, J. M. UND J. V. MELO** (2003). "Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment." *N Engl J Med* 349(15): 1451-64.
- GORRE, M. E., M. MOHAMMED, et al.** (2001). "Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification." *Science* 293(5531): 876-80.
- GOUILLEUX, F., D. MORITZ, et al.** (1995). "Prolactin and interleukin-2 receptors in T lymphocytes signal through a MGF-STAT5-like transcription factor." *Endocrinology* 136(12): 5700-8.
- GRAHAM, F. L., J. SMILEY, et al.** (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.

GREENBERGER, J. S., R. J. ECKNER, et al. (1983). "Interleukin 3-dependent hematopoietic progenitor cell lines." *Fed Proc* 42(10): 2762-71.

GRIMLEY, P. M., F. DONG, et al. (1999). "Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation." *Cytokine Growth Factor Rev* 10(2): 131-57.

GUPTA, S., H. YAN, et al. (1996). "The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals." *Embo J* 15(5): 1075-84.

HABIB, A. A., S. J. CHUN, et al. (2003). "Increased expression of epidermal growth factor receptor induces sequestration of extracellular signal-related kinases and selective attenuation of specific epidermal growth factor-mediated signal transduction pathways." *Mol Cancer Res* 1(3): 219-33.

HARIR, N., C. PECQUET, et al. (2007). "Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias." *Blood* 109(4): 1678-86.

HEISTERKAMP, N. UND J. GROFFEN (1991). "Molecular insights into the Philadelphia translocation." *Hematol Pathol* 5(1): 1-10.

HENDRY, L. UND S. JOHN (2004). "Regulation of STAT signalling by proteolytic processing." *Eur J Biochem* 271(23-24): 4613-20.

HOCHHAUS, A., U. BERGER, et al. (2004). "Therapy of chronic myelogenous leukemia in 2004." *Dtsch Med Wochenschr* 129(40): 2122-7.

HOCHHAUS, A., S. KREIL, et al. (2002). "Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy." *Leukemia* 16(11): 2190-6.

HOEY, T., S. ZHANG, et al. (2003). "Distinct requirements for the naturally occurring splice forms Stat4 α and Stat4 β in IL-12 responses." *Embo J* 22(16): 4237-48.

HONDA, H., T. FUJII, et al. (1995). "Expression of p210bcr/abl by metallothionein promoter induced T-cell leukemia in transgenic mice." *Blood* 85(10): 2853-61.

HONDA, H., H. ODA, et al. (1998). "Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias." *Blood* 91(6): 2067-75.

HORVATH, C. M. (2000). "STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals." *Trends Biochem Sci* 25(10): 496-502.

HUETTNER, C. S., P. ZHANG, et al. (2000). "Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1." *Nat Genet* 24(1): 57-60.

- HURON, D. R., M. E. GORRE, et al.** (2003). "A novel pyridopyrimidine inhibitor of abl kinase is a picomolar inhibitor of Bcr-abl-driven K562 cells and is effective against STI571-resistant Bcr-abl mutants." *Clin Cancer Res* 9(4): 1267-73.
- HUTVAGNER, G. UND P. D. ZAMORE** (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." *Science* 297(5589): 2056-60.
- IHLE, J. N.** (1995). "The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling." *Adv Immunol* 60: 1-35.
- IHLE, J. N.** (1996). "Janus kinases in cytokine signalling." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351(1336): 159-66.
- IHLE, J. N.** (2001). "The Stat family in cytokine signaling." *Curr Opin Cell Biol* 13(2): 211-7.
- ILARIA, R. L., JR., R. G. HAWLEY, et al.** (1999). "Dominant negative mutants implicate STAT5 in myeloid cell proliferation and neutrophil differentiation." *Blood* 93(12): 4154-66.
- ILARIA, R. L., JR. UND R. A. VAN ETTEN** (1996). "P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members." *J Biol Chem* 271(49): 31704-10.
- IMADA, K., E. T. BLOOM, et al.** (1998). "Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity." *J Exp Med* 188(11): 2067-74.
- IMADA, K. UND W. J. LEONARD** (2000). "The Jak-STAT pathway." *Mol Immunol* 37(1-2): 1-11.
- IYER, J. UND N. C. REICH** (2008). "Constitutive nuclear import of latent and activated STAT5a by its coiled coil domain." *Faseb J* 22(2): 391-400.
- JACOBBERGER, J. W., R. M. SRAMKOSKI, et al.** (2003). "Immunoreactivity of Stat5 phosphorylated on tyrosine as a cell-based measure of Bcr/Abl kinase activity." *Cytometry A* 54(2): 75-88.
- JOHN, S., U. VINKEMEIER, et al.** (1999). "The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5." *Mol Cell Biol* 19(3): 1910-8.
- JONES, F. E., T. WELTE, et al.** (1999). "ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation." *J Cell Biol* 147(1): 77-88.
- JORGENSEN, R.** (1990). "Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes." *Trends Biotechnol* 8(12): 340-4.
- JORGENSEN, R. A., P. D. CLUSTER, et al.** (1996). "Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences." *Plant Mol Biol* 31(5): 957-73.

KAMATH, R. S. UND J. AHRINGER (2003). "Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*." *Methods* 30(4): 313-21.

KANDA, N., H. SENO, et al. (2004). "STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells." *Oncogene* 23(28): 4921-9.

KELLIHER, M. A., J. McLAUGHLIN, et al. (1990). "Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17): 6649-53.

KELLY, J. A., R. SPOLSKI, et al. (2003). "Stat5 synergizes with T cell receptor/antigen stimulation in the development of lymphoblastic lymphoma." *J Exp Med* 198(1): 79-89.

KETTING, R. F., T. H. HAVERKAMP, et al. (1999). "Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD." *Cell* 99(2): 133-41.

KHVOROVA, A., A. REYNOLDS, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell* 115(2): 209-16.

KISSELEVA, T., S. BHATTACHARYA, et al. (2002). "Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges." *Gene* 285(1-2): 1-24.

KLEJMAN, A., S. J. SCHREINER, et al. (2002). "The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells." *Embo J* 21(21): 5766-74.

KLOTH, M. T., A. D. CATLING, et al. (2002). "Novel activation of STAT5b in response to epidermal growth factor." *J Biol Chem* 277(10): 8693-701.

KLUCHER, K. M., D. V. LOPEZ, et al. (1998). "Secondary mutation maintains the transformed state in BaF3 cells with inducible BCR/ABL expression." *Blood* 91(10): 3927-34.

KOSAKI, K., T. SUZUKI, et al. (2002). "PTPN11 (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 87(8): 3529-33.

LAEMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.

LEE, J. G. UND E. P. KAY (2008). "Involvement of two distinct ubiquitin E3 ligase systems for p27 degradation in corneal endothelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(1): 189-96.

LEE, C., F. PIAZZA, et al. (1999). "Characterization of the Stat5 protease." *J Biol Chem* 274(38): 26767-75.

LEONARD, W. J. UND J. X. LIN (2000). "Cytokine receptor signaling pathways." *J Allergy Clin Immunol* 105(5): 877-88.

- LEONG, P. L., S. XI, et al.** (2002). "Differential function of STAT5 isoforms in head and neck cancer growth control." *Oncogene* 21(18): 2846-53.
- LIN, J. X., T. S. MIGONE, et al.** (1995). "The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15." *Immunity* 2(4): 331-9.
- LIONBERGER, J. M., M. B. WILSON, et al.** (2000). "Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck." *J Biol Chem* 275(24): 18581-5.
- LITTERST, C. M., S. KLIEM, et al.** (2005). "Coactivators in gene regulation by STAT5." *Vitam Horm* 70: 359-86.
- LIU, X., G. W. ROBINSON, et al.** (1997). "Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis." *Genes Dev* 11(2): 179-86.
- LIVAK, K. J. UND T. D. SCHMITTGEN** (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-8.
- LORD, J. D., B. C. McINTOSH, et al.** (2000). "The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5." *J Immunol* 164(5): 2533-41.
- LOZZIO, C. B. UND B. B. LOZZIO** (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood* 45(3): 321-34.
- LUGO, T. G., A. M. PENDERGAST, et al.** (1990). "Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products." *Science* 247(4946): 1079-82.
- LUND, T. C., R. GARCIA, et al.** (1997). "Activation of STAT transcription factors by herpesvirus Saimiri Tip-484 requires p56lck." *J Virol* 71(9): 6677-82.
- LUNDBERG, A. S. UND R. A. WEINBERG** (1999). "Control of the cell cycle and apoptosis." *Eur J Cancer* 35(14): 1886-94.
- MACRAE, I. J., F. LI, et al.** (2006). "Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 73-80.
- MAHON, F. X., M. W. DEININGER, et al.** (2000). "Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance." *Blood* 96(3): 1070-9.
- MANDANAS, R. A., D. S. LEIBOWITZ, et al.** (1993). "Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells." *Blood* 82(6): 1838-47.

- MARG, A., Y. SHAN, et al.** (2004). "Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1." *J Cell Biol* 165(6): 823-33#
- MARITANO, D., M. L. SUGRUE, et al.** (2004). "The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions." *Nat Immunol* 5(4): 401-9.
- MARTINO, A., J. H. T. HOLMES, et al.** (2001). "Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2." *J Immunol* 166(3): 1723-9.
- MATSUMURA, I., T. KITAMURA, et al.** (1999). "Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells." *Embo J* 18(5): 1367-77.
- McMURRAY, J. S.** (2008). "Structural basis for the binding of high affinity phosphopeptides to Stat3." *Biopolymers* 90(1): 69-79.
- MELEN, K., L. KINNUNEN, et al.** (2001). "Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs." *J Biol Chem* 276(19): 16447-55.
- MEYER, T., L. HENDRY, et al.** (2004). "A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors." *J Biol Chem* 279(18): 18998-9007.
- MEYER, J., M. JUCKER, et al.** (1998). "Carboxyl-truncated STAT5beta is generated by a nucleus-associated serine protease in early hematopoietic progenitors." *Blood* 91(6): 1901-8.
- MEYER, W. K., P. REICHENBACH, et al.** (1997). "Interaction of STAT5 dimers on two low affinity binding sites mediates interleukin 2 (IL-2) stimulation of IL-2 receptor alpha gene transcription." *J Biol Chem* 272(50): 31821-8.
- MITCHELL, T. J. UND S. JOHN** (2005). "Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas." *Immunology* 114(3): 301-12.
- MONTGOMERY, M. K. UND A. FIRE** (1998). "Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression." *Trends Genet* 14(7): 255-8.
- MORIGGL, R., V. GOUILLEUX-GRUART, et al.** (1996). "Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype." *Mol Cell Biol* 16(10): 5691-700.
- MORIGGL, R., V. SEXL, et al.** (2005). "Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis." *Cancer Cell* 7(1): 87-99.

- MUI, A. L., H. WAKAO, et al.** (1995). "Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs." *Embo J* 14(6): 1166-75.
- MURRAY, P. J.** (2007). "The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration." *J Immunol* 178(5): 2623-9.
- NAGAR, B., O. HANTSCH, et al.** (2003). "Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase." *Cell* 112(6): 859-71.
- NAKAJIMA, H., X. W. LIU, et al.** (1997). "An indirect effect of Stat5a in IL-2-induced proliferation: a critical role for Stat5a in IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain induction." *Immunity* 7(5): 691-701.
- NELSON, K. L., J. A. ROGERS, et al.** (1998). "Activation of STAT3 by the c-Fes protein-tyrosine kinase." *J Biol Chem* 273(12): 7072-7.
- NELSON, E. A., S. R. WALKER, et al.** (2004). "Isolation of unique STAT5 targets by chromatin immunoprecipitation-based gene identification." *J Biol Chem* 279(52): 54724-30.
- NESHAT, M. S., A. B. RAITANO, et al.** (2000). "The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf." *Mol Cell Biol* 20(4): 1179-86.
- NG, D. C., B. H. LIN, et al.** (2006). "Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin." *J Cell Biol* 172(2): 245-57.
- NIEBOROWSKA-SKORSKA, M., M. A. WASIK, et al.** (1999). "Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis." *J Exp Med* 189(8): 1229-42.
- NOWELL, P. C. UND D. A. HUNGERFORD** (1960). "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes." *J Natl Cancer Inst* 25: 85-109.
- NYGA, R., C. PECQUET, et al.** (2005). "Activated STAT5 proteins induce activation of the PI 3-kinase/Akt and Ras/MAPK pathways via the Gab2 scaffolding adapter." *Biochem J* 390(Pt 1): 359-66.
- NYKANEN, A., B. HALEY, et al.** (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* 107(3): 309-21.
- ODA, A., H. WAKAO, et al.** (2002). "Calpain is a signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 and STAT5 protease." *Blood* 99(5): 1850-2.
- O'HARE, T., D. K. WALTERS, et al.** (2005). "In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants." *Cancer Res* 65(11): 4500-5.

OKUDA, K., U. MATULONIS, et al. (1994). "Factor independence of human myeloid leukemia cell lines is associated with increased phosphorylation of the proto-oncogene Raf-1." *Exp Hematol* 22(11): 1111-7.

ONISHI, M., T. NOSAKA, et al. (1998). "Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation." *Mol Cell Biol* 18(7): 3871-9.

OUYANG, J., A. VALIN, et al. (2009). "Regulation of transcription factor activity by SUMO modification." *Methods Mol Biol* 497: 141-52.

PADDISON, P. J., A. A. CAUDY, et al. (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." *Genes Dev* 16(8): 948-58.

PALACIOS, R., G. HENSON, et al. (1984). "Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro." *Nature* 309(5964): 126-31.

PALLARD, C., F. GOUILLEUX, et al. (1995). "Thrombopoietin activates a STAT5-like factor in hematopoietic cells." *Embo J* 14(12): 2847-56.

PARK, S. H., X. LIU, et al. (1999). "Distinctive roles of STAT5a and STAT5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of STAT5a gene disruption." *J Biol Chem* 274(11): 7421-30.

PARK, S. H., H. YAMASHITA, et al. (2001). "Serine phosphorylation of GH-activated signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) and STAT5b: impact on STAT5 transcriptional activity." *Mol Endocrinol* 15(12): 2157-71.

PASTERNAK, G., A. HOCHHAUS, et al. (1998). "Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects." *J Cancer Res Clin Oncol* 124(12): 643-60.

PAUKKU, K., S. VALGEIRSDOTTIR, et al. (2000). "Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 is mediated by PDGF beta-receptor and is not dependent on c-src, fyn, jak1 or jak2 kinases." *Biochem J* 345 Pt 3: 759-66.

PAULSON, M., S. PISHARODY, et al. (1999). "Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences." *J Biol Chem* 274(36): 25343-9.

PENDERGAST, A. M., M. L. GISHIZKY, et al. (1993). "SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence." *Mol Cell Biol* 13(3): 1728-36.

PENDERGAST, A. M., L. A. QUILLIAM, et al. (1993). "BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein." *Cell* 75(1): 175-85.

PENSERGA, E. T. UND T. SKORSKI (2007). "Fusion tyrosine kinases: a result and cause of genomic instability." *Oncogene* 26(1): 11-20.

- PFITZNER, E., R. JAHNE, et al.** (1998). "p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response." *Mol Endocrinol* 12(10): 1582-93.
- PIAZZA, F., J. VALENS, et al.** (2000). "Myeloid differentiation of FdCP1 cells is dependent on Stat5 processing." *Blood* 96(4): 1358-65.
- PIRCHER, T. J., H. PETERSEN, et al.** (1999). "Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a." *Mol Endocrinol* 13(4): 555-65.
- POINCLOUX, R., C. COUGOULE, et al.** (2007). "Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells." *J Cell Physiol* 213(1): 212-20.
- PUIL, L., J. LIU, et al.** (1994). "Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway." *Embo J* 13(4): 764-73.
- RAITANO, A. B., J. R. HALPERN, et al.** (1995). "The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11746-50.
- RAMARAJ, P., H. SINGH, et al.** (2004). "Effect of mutational inactivation of tyrosine kinase activity on BCR/ABL-induced abnormalities in cell growth and adhesion in human hematopoietic progenitors." *Cancer Res* 64(15): 5322-31.
- RASCLE, A., J. A. JOHNSTON, et al.** (2003). "Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5." *Mol Cell Biol* 23(12): 4162-73.
- REN, R.** (2002). "The molecular mechanism of chronic myelogenous leukemia and its therapeutic implications: studies in a murine model." *Oncogene* 21(56): 8629-42.
- REN, S., H. R. CAI, et al.** (2002). "Loss of Stat5a delays mammary cancer progression in a mouse model." *Oncogene* 21(27): 4335-9.
- REUTHER, J. Y., G. W. REUTHER, et al.** (1998). "A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation." *Genes Dev* 12(7): 968-81.
- RODRIGUEZ, M. S., C. DARGEMONT, et al.** (2001). "SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting." *J Biol Chem* 276(16): 12654-9.
- ROSA SANTOS, S. C., S. DUMON, et al.** (2000). "Cooperation between STAT5 and phosphatidylinositol 3-kinase in the IL-3-dependent survival of a bone marrow derived cell line." *Oncogene* 19(9): 1164-72.

ROUMIANTSEV, S., I. E. DE AOS, et al. (2001). "The src homology 2 domain of Bcr/Abl is required for efficient induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice but not for lymphoid leukemogenesis or activation of phosphatidylinositol 3-kinase." *Blood* 97(1): 4-13.

ROWLEY, J. D. (1973). "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* 243(5405): 290-3.

RUIZ, M. T., O. VOINNET, et al. (1998). "Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing." *Plant Cell* 10(6): 937-46.

RUFF-JAMISON, S., K. CHEN, et al. (1995). "Epidermal growth factor induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat 5 in mouse liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4215-8.

RUSCHMANN, J., V. HO, et al. "Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation." *Exp Hematol* 38(5): 392-402, 402 e1.

SACCHI, S., H. M. KANTARJIAN, et al. (1999). "Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients." *Cancer* 86(12): 2632-41.

SANTOS, S. C., V. LACRONIQUE, et al. (2001). "Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway." *Oncogene* 20(17): 2080-90.

SATTLER, M., M. G. MOHI, et al. (2002). "Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL." *Cancer Cell* 1(5): 479-92.

SAUSSELE, S., M. LAUSEKER, et al. "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo SCT) for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV." *Blood* 115(10): 1880-5.

SAVONA, M. UND M. TALPAZ (2006). "Chronic myeloid leukemia: changing the treatment paradigms." *Oncology (Williston Park)* 20(7): 707-11; discussion 712-4, 719, 724.

SAWYERS, C. L. (1999). "Chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med* 340(17): 1330-40.

SAWYERS, C. L. (2002). "Disabling Abl-perspectives on Abl kinase regulation and cancer therapeutics." *Cancer Cell* 1(1): 13-5.

SAWYERS, C. L., W. CALLAHAN, et al. (1992). "Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes." *Cell* 70(6): 901-10.

SCHABER, J. D., H. FANG, et al. (1998). "Prolactin activates Stat1 but does not antagonize Stat1 activation and growth inhibition by type I interferons in human breast cancer cells." *Cancer Res* 58(9): 1914-9.

- SCHAGGER, H. UND G. VON JAGOW** (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal Biochem* 166(2): 368-79.
- SCHERR, M., A. CHATURVEDI, et al.** (2006). "Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML)." *Blood* 107(8): 3279-87.
- SCHERR, M., K. BATTMER, et al.** (2003). "Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA." *Cell Cycle* 2(3): 251-7.
- SCHERR, M., M. A. MORGAN, et al.** (2003). "Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells." *Curr Med Chem* 10(3): 245-56.
- SCHINDLER, C. W.** (2002). "Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease." *J Clin Invest* 109(9): 1133-7.
- SCHMIDT-MENDE, J., E. HELLSTROM-LINDBERG, et al.** (2000). "Freezing induces artificial cleavage of apoptosis-related proteins in human bone marrow cells." *J Immunol Methods* 245(1-2): 91-4.
- SCHUSTER, B., L. HENDRY, et al.** (2007). "Purification and identification of the STAT5 protease in myeloid cells." *Biochem J* 404(1): 81-7.
- SCHWALLER, J., J. FRANTSVE, et al.** (1998). "Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes." *Embo J* 17(18): 5321-33.
- SCHWOEBEL, E. D. UND M. S. MOORE** (2000). "The control of gene expression by regulated nuclear transport." *Essays Biochem* 36: 105-13.
- SEIDEL, H. M., L. H. MILOCCO, et al.** (1995). "Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 3041-5.
- SEKIMOTO, T., K. NAKAJIMA, et al.** (1996). "Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4." *J Biol Chem* 271(49): 31017-20.
- SHAH, N. P., J. M. NICOLL, et al.** (2002). "Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia." *Cancer Cell* 2(2): 117-25.
- SHAH, N. P., C. TRAN, et al.** (2004). "Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor." *Science* 305(5682): 399-401.
- SHEN, T. H., H. K. LIN, et al.** (2006). "The mechanisms of PML-nuclear body formation." *Mol Cell* 24(3): 331-9.

SHERR, C. J. UND J. M. ROBERTS (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* 13(12): 1501-12.

SHTIVELMAN, E., B. LIFSHITZ, et al. (1985). "Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia." *Nature* 315(6020): 550-4.

SHUAI, K. (1999). "The STAT family of proteins in cytokine signaling." *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4): 405-22.

SHUAI, K., J. HALPERN, et al. (1996). "Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia." *Oncogene* 13(2): 247-54.

SHUAI, K. UND B. LIU (2005). "Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system." *Nat Rev Immunol* 5(8): 593-605.

SILVER, D. L., H. NAORA, et al. (2004). "Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility." *Cancer Res* 64(10): 3550-8.

SKORSKI, T., A. BELLACOSA, et al. (1997). "Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway." *Embo J* 16(20): 6151-61.

SKORSKI, T., P. KANAKARAJ, et al. (1994). "Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth." *J Exp Med* 179(6): 1855-65.

SKORSKI, T., P. KANAKARAJ, et al. (1995). "Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells." *Blood* 86(2): 726-36.

SKORSKI, T., M. NIEBOROWSKA-SKORSKA, et al. (1995). "C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal hematopoiesis." *Cancer Res* 55(11): 2275-8.

SMYTHE, C. UND P. COHEN (1991). "The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis." *Eur J Biochem* 200(3): 625-31.

SOKAL, J. E., J. P. GOCKERMAN, et al. (1988). "Evidence for a selective antileukemic effect of cytosine arabinoside in chronic granulocytic leukemia." *Leuk Res* 12(6): 453-8.

SONG, L., J. TURKSON, et al. (2003). "Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells." *Oncogene* 22(27): 4150-65.

STEFANI, G. UND F. J. SLACK (2008). "Small non-coding RNAs in animal development." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 219-30.

- STERNBERG, D. W. UND D. G. GILLILAND** (2004). "The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis." *J Clin Oncol* 22(2): 361-71.
- SUZUKI, K., H. NAKAJIMA, et al.** (2003). "Stat6-protease but not Stat5-protease is inhibited by an elastase inhibitor ONO-5046." *Biochem Biophys Res Commun* 309(4): 768-73.
- TABARA, H., M. SARKISSIAN, et al.** (1999). "The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." *Cell* 99(2): 123-32.
- TAKEDA, K. UND S. AKIRA** (2000). "STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses." *Cytokine Growth Factor Rev* 11(3): 199-207.
- TARTAGLIA, M., P. D. COTTER, et al.** (2003). "Exclusion of PTPN11 mutations in Costello syndrome: further evidence for distinct genetic etiologies for Noonan, cardio-facio-cutaneous and Costello syndromes." *Clin Genet* 63(5): 423-6.
- TARTAGLIA, M., E. L. MEHLER, et al.** (2001). "Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome." *Nat Genet* 29(4): 465-8.
- TEGLUND, S., C. MCKAY, et al.** (1998). "Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses." *Cell* 93(5): 841-50.
- TEN HOEVE, J., R. B. ARLINGHAUS, et al.** (1994). "Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia." *Blood* 84(6): 1731-6.
- TEN HOEVE, J., V. KAARTINEN, et al.** (1994). "Cellular interactions of CRKL, and SH2-SH3 adaptor protein." *Cancer Res* 54(10): 2563-7.
- TILL, J. H., P. M. CHAN, et al.** (1999). "Engineering the substrate specificity of the Abl tyrosine kinase." *J Biol Chem* 274(8): 4995-5003.
- TOMARI, Y., C. MATRANGA, et al.** (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." *Science* 306(5700): 1377-80.
- UDY, G. B., R. P. TOWERS, et al.** (1997). "Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14): 7239-44.
- UNGUREANU, D. UND O. SILVENNOINEN** (2005). "SLIM trims STATs: ubiquitin E3 ligases provide insights for specificity in the regulation of cytokine signaling." *Sci STKE* 2005(304): pe49.
- UNGUREANU, D., S. VANHATUPA, et al.** (2005). "SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses." *Blood* 106(1): 224-6.
- UNGUREANU, D., S. VANHATUPA, et al.** (2003). "PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1." *Blood* 102(9): 3311-3.

- UNWIN, R. D., J. R. GRIFFITHS, et al.** (2005). "Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high sensitivity." *Mol Cell Proteomics* 4(8): 1134-44.
- VALENTINO, L. UND J. PIERRE** (2006). "JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies." *Biochem Pharmacol* 71(6): 713-21.
- VINKEMEIER, U., I. MOAREFI, et al.** (1998). "Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4." *Science* 279(5353): 1048-52.
- VIVANCO, I. UND C. L. SAWYERS** (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
- VON BUBNOFF, N., C. PESCHEL, et al.** (2003). "Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back." *Leukemia* 17(5): 829-38.
- VONCKEN, J. W., V. KAARTINEN, et al.** (1995). "BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice." *Blood* 86(12): 4603-11.
- WANG, Y., Y. E. WANG, et al.** (2008). "A random shRNA-encoding library for phenotypic selection and hit-optimization." *PLoS One* 3(9): e3171.
- WANG, Y. Z., W. WHARTON, et al.** (2000). "Activation of Stat3 preassembled with platelet-derived growth factor beta receptors requires Src kinase activity." *Oncogene* 19(17): 2075-85.
- WARNER, N. L., M. A. MOORE, et al.** (1969). "A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content." *J Natl Cancer Inst* 43(4): 963-82.
- WEAVER, A. M. UND C. M. SILVA** (2006). "Modulation of signal transducer and activator of transcription 5b activity in breast cancer cells by mutation of tyrosines within the transactivation domain." *Mol Endocrinol* 20(10): 2392-405.
- WEISBERG, E., L. CATLEY, et al.** (2007). "Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL+ leukemias." *Blood* 109(5): 2112-20.
- WEISBERG, E., P. W. MANLEY, et al.** (2005). "Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl." *Cancer Cell* 7(2): 129-41.
- WIERENGA, A. T., E. VELLENGA, et al.** (2008). "Maximal STAT5-induced proliferation and self-renewal at intermediate STAT5 activity levels." *Mol Cell Biol* 28(21): 6668-80.
- WILLIAMS, C. C., J. G. ALLISON, et al.** (2004). "The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone." *J Cell Biol* 167(3): 469-78.

- WILSON-RAWLS, J., S. XIE, et al.** (1996). "P210 Bcr-Abl interacts with the interleukin 3 receptor beta(c) subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation." *Cancer Res* 56(15): 3426-30.
- WITTIG, I. UND B. GRONER** (2005). "Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), a crucial regulator of immune and cancer cells." *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5(4): 449-63.
- XI, S., Q. ZHANG, et al.** (2003). "Constitutive activation of Stat5b contributes to carcinogenesis in vivo." *Cancer Res* 63(20): 6763-71.
- XI, S., Q. ZHANG, et al.** (2003). "Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck." *J Biol Chem* 278(34): 31574-83.
- XIA, Z., M. R. BAER, et al.** (1998). "Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts." *Cancer Res* 58(14): 3173-80.
- XIONG, H., W. Y. SU, et al.** (2009). "Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells." *Lab Invest* 89(6): 717-25.
- XU, B. C., X. WANG, et al.** (1996). "Growth hormone promotes the association of transcription factor STAT5 with the growth hormone receptor." *J Biol Chem* 271(33): 19768-73.
- XU, M., L. NIE, et al.** (2003). "STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta." *Embo J* 22(4): 893-904.
- YAMASHITA, H., J. XU, et al.** (1998). "Differential control of the phosphorylation state of proline-juxtaposed serine residues Ser725 of Stat5a and Ser730 of Stat5b in prolactin-sensitive cells." *J Biol Chem* 273(46): 30218-24.
- YANG, E., Z. WEN, et al.** (1999). "The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription." *Mol Cell Biol* 19(7): 5106-12.
- YE, D., N. WOLFF, et al.** (2006). "STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice." *Blood* 107(12): 4917-25.
- YU, C. L., R. JOVE, et al.** (1997). "Constitutive activation of the Janus kinase-STAT pathway in T lymphoma overexpressing the Lck protein tyrosine kinase." *J Immunol* 159(11): 5206-10.
- YUNIS, J. J., A. J. BOOT, et al.** (1989). "Mechanisms of ras mutation in myelodysplastic syndrome." *Oncogene* 4(5): 609-14.
- ZENG, R., Y. AOKI, et al.** (2002). "Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner." *J Immunol* 168(9): 4567-75.

ZHANG, T., W. H. KEE, et al. (2000). "The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6." *Mol Cell Biol* 20(19): 7132-9.

ZHANG, T., D. M. RAWSON, et al. (2008). "Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to -196 degrees C using controlled slow cooling." *Cryobiology* 56(2): 138-43.

ZHANG, X., J. BLENIS, et al. (1995). "Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes." *Science* 267(5206): 1990-4.

ZHANG, X. UND R. REN (1998). "Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia." *Blood* 92(10): 3829-40.

ZHANG, X., R. WONG, et al. (2001). "The SH2 domain of bcr-Abl is not required to induce a murine myeloproliferative disease; however, SH2 signaling influences disease latency and phenotype." *Blood* 97(1): 277-87.

ZHAO, R. C., Y. JIANG, et al. (2001). "A model of human p210(bcr/ABL)-mediated chronic myelogenous leukemia by transduction of primary normal human CD34(+) cells with a BCR/ABL-containing retroviral vector." *Blood* 97(8): 2406-12.

Lebenslauf

Name: Michael Schaller-Schönitz, geb. Schaller
geboren in: Gera, Deutschland
geboren am: 26. Januar 1978
Schulabschluss: Abitur, Abschlussjahrgang 1996 am
Gymnasium „Alexander-von-Humboldt“ in Werdau,
Studium: Carolo-Wilhelmina Universität zu Braunschweig
Fachrichtung: Biologie, 2002 - 2007
Abschluss: Diplom-Biologe
Diplomarbeit: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, 2007
in der Abteilung: Molekulare Biotechnologie - Genregulation und
Differenzierung
Titel: „Der Einfluss des *Interferon Regulatory Factor-1* (IRF-1) auf den
ZyklusE/CDK2-Inhibitor p27^{Kip1}“
Promotion: Medizinische Hochschule Hannover (MHH), 2007 - 2010 in der
Abteilung: Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie & Stamm-
zelltransplantation

Danksagungen

Nach über 3 Jahren zum Teil harter Arbeit im Labor, gilt es nun den Personen Dank auszusprechen, die mich in dieser Zeit mit Ihren Ideen, konstruktiver Kritik oder geistreicher Konversation begleitet, unterstützt und inspiriert haben.

Besonderen Dank möchte ich meinen beiden Betreuern Michaela Scherr und Matthias Eder für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung, für Denkanstöße im Projekt und die Korrektur dieser Arbeit aussprechen.

Einen herzlichen Dank gebührt den Kolaboratoren dieses Projekts – John Griffiths und Antony Whetton für die massenspektroskopische Analyse der STAT5-Phosphorylierungsmuster in Manchester, Andreas Pich für fortführende massenspektroskopische Analysen an der Medizinischen Hochschule sowie Johann Meyer für die tatkräftige Unterstützung mit STAT5-DNA-Konstrukten, Primern und in technischen Fragestellungen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen zahlreichen Kollegen – **Birgit Krausse-Opatz**, **Daniel Schäfer**, **Ewa Surdziel**; **Iris Dallmann**; **Johanna Orlik**; **Karin Battmer**; **Letizia Venturini**, **Michael Morgan**, **Yildirim Dogan** und selbstverständlich bei **Stephanie Brundiers** – bedanken, ohne die die Zeit im Labor ziemlich schnell, ziemlich langweilig geworden wäre.

Dabei hat mich Stephanie auf meinem steinigen Weg zur Promotion, wie eine Seelenverwandte begleitet und ich konnte viele schöne Gespräche abseits von Laboralltag mit ihr führen – dafür noch einmal ein besonderes Dankeschön!

Von ganzen Herzen möchte ich mich bei meiner lieben Ehefrau Andrea bedanken, die in den letzten drei Jahren – wegen limitierter Freizeit – viel Verzicht üben oder nach gescheiterten Experimenten moralische Aufbauarbeit leisten musste.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Vanessa bedanken, die im letzten Jahr meiner Promotion in mein Leben gepurzelt kam und mir vom Tag ihrer Geburt an viele schöne und unerwartete Momente und Kraft geschenkt hat.

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

**„Der Einfluss von BCR-ABL auf STAT5 in BCR-ABL-positiven
Leukämiezellen“**

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation fand weder als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit Verwendung.

Hannover, den 15.09.2010

(Michael Schaller-Schönitz)