

„Kinasen der Src-Familie vermitteln die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A in BCR-ABL positiven Leukämiezellen“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
genemigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Nicolas Chatain
aus Rheinbach

Berichter:

Professor Dr. Gerhard Müller-Newen

Universitätsprofessor Dipl. Ing. Dr. Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Veröffentlichungen

Wesentliche Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht:

Chatain N., Ziegler P., Jost E., Moriggl R., Schmitz-Van de Leur H., Müller-Newen G.

Src family kinases Src and Hck mediate cytoplasmic retention of activated STAT5A in BCR-ABL positive cells.

Manuskript in Vorbereitung

Weitere Veröffentlichungen:

Papadopoulos C., Arato K., Lilienthal E., Zerweck J., Schutkowski M., Chatain N., Müller-Newen G., Becker W., de la Luna S. (2011)

Splice variants of the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 4 (DYRK4) differ in their subcellular localization and catalytic activity.

J Biol Chem. 286, 5494-505.

Mohr A., Chatain N., Domszalai T., Rinis N., Sommerauer M., Vogt M., Müller-Newen G. (2011)

Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling.

Eur J Cell Biol. Oct. 20 (Epub ahead of print).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Signaltransduktion	1
1.2	Die Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren	2
1.3	Regulation des JAK/STAT-Signalweges	6
1.4	Signal Transducer and Activator of Transkription 5 A/B	8
1.4.1	Allgemein	8
1.4.2	Struktur und Funktion	10
1.4.3	Aktivierung von STAT5 und nukleozytoplasmatisches shuttling	13
1.5	Tyrosinkinase der Src-Familie (SFKs)	15
1.5.1	Struktur und Funktion	17
1.5.2	STAT-Aktivierung durch SFKs	20
1.6	Dysregulation von STAT5 in Tumoren	21
1.6.1	Abelson-induzierte CML	22
1.6.2	AML (Akute Myeloische Leukämie)	24
1.7	Ziel der Arbeit	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Verbrauchsmaterial	28
2.1.1	Chemikalien	28
2.1.2	Antikörper	28
2.1.3	Plasmide	31
2.1.4	Oligonukleotide	34
2.1.5	Zytokine	34
2.2	Allgemeine zellbiologische Methoden	35
2.2.1	Kultivierung von prokaryotischen Zellen	35
2.2.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen	36
2.2.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	38
2.2.4	Stabile Transfektion (<i>Flp-In</i> TM System [®])	39
2.3	Allgemeine molekularbiologische Methoden	40
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (<i>PCR</i>)	40
2.3.2	Transformation kompetenter Bakterien	41

2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNS	42
2.3.4	Konzentrationsbestimmung isolierter DNS	42
2.3.5	Restriktionsverdau von DNS	42
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.3.7	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	44
2.3.8	DNS-Ligation	44
2.3.9	DNS-Sequenzierung	44
2.3.10	RNS-Isolation	44
2.3.11	Synthese von copy-DNS (cDNS) aus RNS	45
2.3.12	Quantitative <i>Real-Time PCR</i> (qRT-PCR)	45
2.3.13	Klonierung verwendeter Expressionsvektoren	47
2.3.14	Zielgerichtete Mutagenese	48
2.3.15	Reportergen-Assay	49
2.4	Proteinchemische und immunologische Methoden	51
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	51
2.4.2	Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung	52
2.4.3	Immunpräzipitation (IP)	53
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>SDS-PAGE</i>)	53
2.4.5	<i>Western Blot</i> und Immundetektion	54
2.4.6	<i>Blue Native</i> Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>BN-PAGE</i>)	56
2.5	Konfokale <i>Laser Scanning</i> Mikroskopie	57
2.5.1	Grundlagen	57
2.5.2	Fixierung von Zellen für die Fluoreszenz-Mikroskopie	58
2.5.3	Immunfluoreszenzen	59
2.5.4	<i>Live cell imaging</i>	60
2.5.5	Mikroskopeinstellungen	60
3	<i>Ergebnisse</i>	62
3.1	Charakterisierung der STAT5A-Fusionsproteine	62
3.2	Zytoplasmatische Lokalisation von aktiviertem STAT5A in myeloproliferativen Erkrankungen	66
3.3	Ektopische Expression von BCR-ABL führt zur nukleären Akkumulation von STAT5A	70
3.4	Aktivierung von STAT5A durch Src-Kinasen führt zur zytoplasmatischen Retention des Transkriptionsfaktors	74
3.5	Rekonstitution eines CML-ähnlichen Status in HEK-Zellen	80

3.6	Die Kinaseaktivität der SFKs ist notwendig für die zytoplasmatische Retention von STAT5A in BCR-ABL positiven Zellen	86
3.7	Keine Reduktion der STAT5A-Dimerisierung nach Aktivierung durch Src-Kinasen in T-Rex-293-Zellen	92
3.8	Dysregulation der Lokalisation von v-Src beeinflusst die subzelluläre Verteilung von STAT5A	95
3.9	Die SH2-Domäne von STAT5A vermittelt die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit v-Src	99
4	Diskussion	104
4.1	Fluoreszenzmarkierte STAT5-Fusionsproteine: Ein probates Mittel für die Untersuchung der Proteinfunktionen und subzellulären Verteilung	105
4.2	BCR-ABL positive CML-Zellen zeichnen sich durch persistent aktives, zytoplasmatisch lokalisiertes STAT5A aus	107
4.3	Src-Kinasen bestimmen die zytoplasmatische Retention von STAT5A in BCR-ABL positiven zellulären Modellsystemen und einer CML-Zelllinie	108
4.4	Die Interaktion der SH2-Domäne von STAT5A mit SFKs ist Bestandteil des Mechanismus der zytoplasmatischen Retention	116
5	Zusammenfassung	122
6	Ausblick	126
7	Abkürzungsverzeichnis	129
8	Literaturverzeichnis	135
	Anhang	150

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Der erwachsene Mensch setzt sich aus zehn bis 100 Billionen Körperzellen zusammen, wobei zwischen zehn und 50 Millionen Zellen pro Sekunde vom menschlichen Körper abgebaut und durch neue Zellen ersetzt werden. Die Regulation und Aufrechterhaltung der Körperfunktionen ist eine Mammutaufgabe, der sich bis zu 220 Zell- und Gewebetypen widmen. Als essenzielle Aufgabe kann die Kommunikation von Zellen untereinander und die Aufnahme und Verarbeitung von Informationen beschrieben werden. Die Aufnahme von extrazellulären Signalen und deren Weiterleitung ins Zellinnere wird als Signaltransduktion bezeichnet. Signale können auf unterschiedliche Art und Weise übertragen werden, wie z.B. durch die parakrine und autokrine Signalübertragung. In der parakrinen Signalübertragung wird ein Mediator durch eine Zelle gebildet, welcher dann sekretiert wird und auf eine Nachbarzelle wirkt. Wenn die produzierende Zelle auch gleichzeitig die Zielzelle des Signalmoleküls ist, wird die Signalübertragung als autokrin bezeichnet.

Die Fehlregulation eines Signals bzw. der Signalweiterleitung kann zur Störung der Homöostase führen und so schwerwiegende Krankheiten verursachen. Umso wichtiger erscheint es, Ablauf und Wirkung der Signalkaskaden und ihrer Mediatoren zu verstehen, um so in diesem Bereich therapeutisch einwirken zu können. Zu entscheidenden Proteinen der Signalweiterleitung gehört die Gruppe der Transkriptionsfaktoren. Diese Gruppe beinhaltet eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine. Klassische Transkriptionsfaktoren translozieren nach Aktivierung, z.B. als Resultat eines externen Signals, in den Zellkern und induzieren hier die Expression spezifischer Gene.

1.2 Die Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren

Die STAT-Proteine gehören zu den Transkriptionsfaktoren und sind entscheidende Mediatoren der Signaltransduktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen. Bis heute konnten in Säugetieren sieben Vertreter der Familie der *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-Proteine (STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B und 6) und deren Gene identifiziert werden. Durch alternatives Spleißen können bis zu 11 weitere STAT-Paraloge entstehen [1,2]. Allein für STAT3 sind vier Isoformen, nämlich α , β , γ und δ , beschrieben worden [3]. Ob diese Isoformen eine physiologische Relevanz haben, wird jedoch z.T. kontrovers diskutiert [4].

Im Jahr 1990 wurden zum ersten Mal Faktoren beschrieben, die zu diesem Zeitpunkt noch keiner Proteinfamilie zugeordnet werden konnten [5]. Nach IFN-Stimulation formierte sich ein Transkriptionsfaktorkomplex, auch bekannt als ISGF-3, bestehend aus drei unterschiedlich großen Komponenten [6–8]. Zwei der beschriebenen Untereinheiten wurden im Folgenden als STAT1 (91 kDa, 84 kDa) und STAT2 (113 kDa) charakterisiert [9]. In niederen Organismen wie z.B. *Drosophila* und *C. elegans* existiert jeweils nur ein Gen, das für ein STAT-Protein kodiert [10,11]. Es wird daher vermutet, dass die verschiedenen Paraloge durch Duplikation eines ursprünglichen STAT-Gens entstanden sind.

Ihre Aufgabe ist es, nach Aktivierung in den Nukleus zu translozieren, wo sie die Zielgenexpression beeinflussen können.

Für die Weiterleitung eines extrazellulären Signals bedarf es unterschiedlichster Membranrezeptoren, an denen wiederum STAT-Faktoren aktiviert werden können. Hierzu gehören u. a. Zytokinrezeptoren (z.B. EpoR, OSMR), Rezeptortyrosinkinasen (z.B. EGFR, Kit-Rezeptor) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor) [12–16]. Eine der prominentesten Signalkaskaden ist der JAK/STAT-Signalweg. Die Familie der Janus Kinasen (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) kann mit Klasse-I-, als auch mit Klasse-II-Zytokinrezeptoren assoziiert sein, an die die STAT-Proteine rekrutiert und im Anschluß durch die JAKs phosphoryliert werden [17]. Als Folge der Aktivierung der STAT-Monomere kommt es zu ihrer Dimerisierung und Translokation in den Zellkern.

Durch das Studium von *knockout*-Mäusen war es möglich nachzuweisen, dass STAT-Transkriptionsfaktoren in grundlegende zelluläre Prozesse, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Hämatopoese, Embryonalentwicklung und Immunantworten involviert sind [18] (Tab. 1).

Tab. 1: STAT-Faktoren, Liganden und Phänotypen STAT-defizienter Mäuse. Aufgeführt sind Liganden, die zu einer STAT-Aktivierung führen und die Folgen einer STAT-Defizienz im Mausmodell. Tabelle ist modifiziert nach [3,18].

STAT	Ligand	Phänotyp STAT-defizienter Mäuse
STAT1	IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, EGF	<ul style="list-style-type: none"> Defekte IFN-abhängige Immunantwort Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber bakterieller bzw. viraler Infektion
STAT2	IFN- α/β	<ul style="list-style-type: none"> Defekte IFN-Typ 1-abhängige Immunantwort
STAT3	IL-2, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-15, IL-21, IL-31, EGF, OSM, CNTF, CT-1, Leptin, G-CSF, TPO, LIF, GH, FLT3L	<ul style="list-style-type: none"> Letal noch vor Beginn der Gastrulation Störung der Akut-Phase-Reaktion Defekte Wundheilung Gestörte T-Zell-Proliferation und T_H17-Zell-Entwicklung Verspätete Involution des Brustgewebes nach dem Stillen
STAT4	IL-12	<ul style="list-style-type: none"> Beeinträchtigte Differenzierung von T_H1-Zellen aufgrund fehlender Sensitivität für IL-12
STAT5A und STAT5B	IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, G-CSF, GM-CSF, EPO, TPO, GH, PRL, OSM, SCF, Prolaktin	<ul style="list-style-type: none"> Beeinträchtigte Brustdrüsenentwicklung aufgrund fehlender Antwort auf Prolaktin; gestörte Laktogenese Beeinträchtigt Wachstum aufgrund fehlender Antwort auf GH Vermindertes Zellwachstum nach IL-2-Stimulation Defekte NK-Zellentwicklung und zytolytische Funktion Defekte T-Zell-Proliferation Störung der gesamten Hämatopoese
STAT6	IL-4, IL-13	<ul style="list-style-type: none"> Beeinträchtigte Differenzierung von T_H2-Zellen

Die Größe der STAT-Transkriptionsfaktoren liegt zwischen 90 und 115 kDa (749-851 As) (Abb. 1), jedoch können verkürzte Isoformen gebildet werden.

Aufgrund ihrer sechs konservierten Domänen wurden die STAT-Faktoren in eine Proteinfamilie zusammengefasst. Die Abfolge beginnt mit der N-terminalen Domäne. Es folgt die *coiled-coil*-Domäne, die DNS-Bindedomäne, die SH2-Domäne, eine kurze *linker*-Region und zuletzt die Transaktivierungsdomäne (Abb. 1).

Die N-terminale Domäne spielt eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen [19] und der Dephosphorylierung von STAT-Proteinen [20]. Des Weiteren scheint sie an der Rekrutierung von STAT4 an aktive, oligomerisierte Rezeptoren beteiligt zu sein [21] und die DNS-Bindung durch Tetramerisierung bestimmter STAT-Faktoren zu beeinflussen [22,23]. Erst vor kurzem wurde ihr die Eigenschaft zugesprochen, die Ausbildung präformierter Dimere von STAT3 zu ermöglichen [24].

Die sich aus vier antiparallelen α -Helices zusammensetzende *coiled-coil*-Domäne dient der Interaktion mit anderen Proteinen [25]. Als Beispiel kann die Interaktion der *coiled-coil*-Domäne von STAT5A mit SMRT (*silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor*) bzw. die Interaktion von STAT1 mit PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT*) genannt werden [26,27]. Die Interaktion dimerisierter STAT-Proteine mit Promotorbereichen von Zielgenen wird durch die DNS-Bindedomäne vermittelt. Die DNS-Bindung findet klassisch an sogenannten GAS (*γ -interferon activated sequence*)-Motiven statt, welche durch die Konsensussequenz -TTN₅AA charakterisiert sind. Außerdem wurde die Interaktion dieser Domäne mit Importinen beschrieben [28,29].

Die *Linker*-Domäne liegt zwischen der DNS-Binde- und SH2-Domäne. Neben ihrer Bedeutung für die Verbindung der DNS-Binde- mit der SH2-Domäne, wurden ihr zumindest für STAT1 weitere Funktionen zugewiesen. Punktmutationen innerhalb dieser Region beeinflussten die transkriptionelle Aktivität negativ nach IFN- γ -Stimulation. Außerdem scheint die *Linker*-Domäne am nukleären Import von STAT1 beteiligt zu sein, indem es die Interaktion mit Importinen ermöglicht [30,31]. Die SH2-Domäne ist eine strukturell konservierte Domäne. SH2 steht für *Src homology 2*, abgeleitet von der Tyrosinkinase c-Src, in der die Domäne das erste Mal beschrieben wurde. Sie erkennt spezifisch phosphorylierte Tyrosinmotive, wodurch eine Interaktion vermittelt wird. Die Rekrutierung an tyrosinphosphorylierte Rezeptor-

komplexe [32], aber auch die Dimerisierung der STAT-Faktoren wird hierdurch gewährleistet [33].

Die Modulation der Transkription wird durch die Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich bewerkstelligt, da hier die Interaktion mit Koaktivatoren, wie z.B. p300 und CBP (*CREB-binding protein*) stattfindet. Zudem können Phosphatasen in diesem Bereich binden [34,35]. Zwischen der SH2-Domäne und der Transaktivierungsdomäne befindet sich das kritische Tyrosin eines jeden STAT-Transkriptionsfaktors. Nach dessen Phosphorylierung kommt es zur reziproken Interaktion zweier STAT-Proteine über die Bindung des Phosphotyrosins mit der SH2-Domäne eines weiteren STAT-Proteins. Neben der Homodimerisierung kann es ebenfalls zur Heterodimerisierung zweier STAT-Proteine kommen. Für STAT1/STAT2, STAT1/STAT3 sowie für STAT5A/STAT5B ist dies beschrieben worden [36,37]. Außerdem wurde die Tetramerisierung von STAT-Faktoren beschrieben, welche jedoch nur im Nukleus gebunden an die DNS realisiert wird [23,38,39]. Am Beispiel von STAT1 und STAT3 wurde gezeigt, dass unabhängig von einer Tyrosinphosphorylierung stabile Dimere im Zytoplasma zu finden waren [40]. Die unphosphorylierten Dimere von STAT1 scheinen außerdem transkriptionell aktiv zu sein, indem sie vermutlich als Co-Regulatoren wirken können [41].

Die Kristallstrukturen des sogenannten *Core*-Fragments, dem die N- und die C-terminale Domänen fehlen, konnten von STAT1, STAT3 und STAT5A generiert werden [42–45]. Nur die Kristallstrukturen der isolierten N-terminalen Domäne von STAT4 und der N-terminalen Domäne von unphosphoryliertem C-terminal verkürztem STAT1 konnten entschlüsselt werden [46,47]. Die hohe Flexibilität der N-terminalen Domäne zum *Core*-Fragment und die Unstrukturiertheit der C-terminalen Domäne machen vermutlich die Kristallisierung so schwierig.

Neben der Phosphorylierung am kritischen Tyrosin der STAT-Transkriptionsfaktoren wurden weitere posttranslationale Modifikationen beschrieben. Diese Modifikationen beinhalten weitere Tyrosinphosphorylierungen bzw. Serinphosphorylierungen, Argininmethylierungen, Lysinacetylierungen, Ubiquitylierungen, SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)-ylierungen und ISG(*interferon-stimulated gene*)-ylierungen [48–53].

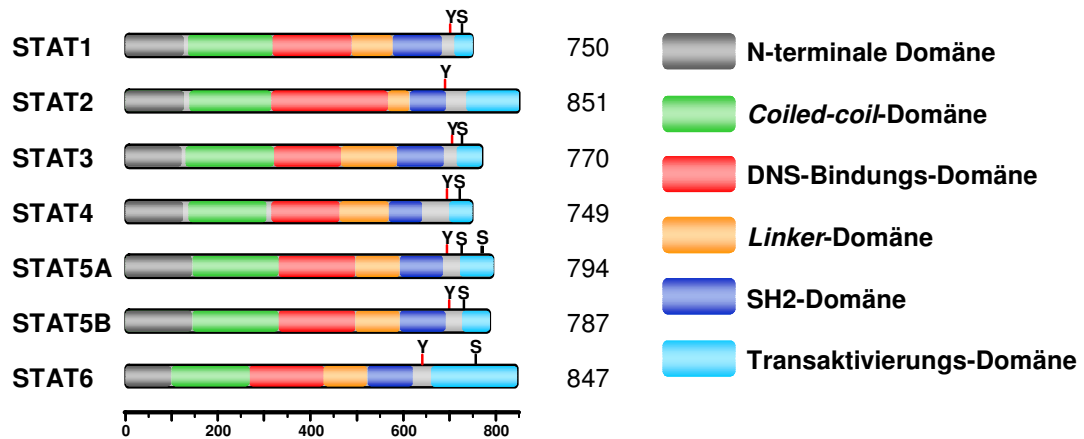


Abb. 1: Domänenabfolge der Familie der STAT Transkriptionsfaktoren. Die Zahlen neben den schematischen Darstellungen der jeweiligen STAT-Proteine gibt die Gesamtgröße in As an. Tyrosine (Y) und Serine (S), deren Phosphorylierung bestätigt wurde, wurden hervorgehoben. Die Skalierung bezieht sich auf die Aminosäureanzahl. Die Farbschemata für die Domänen sind rechts abgebildet [54].

1.3 Regulation des JAK/STAT-Signalweges

Die Inaktivierung von STAT-Proteinen wird durch eine Vielzahl von Faktoren vermittelt und soll hier anhand des JAK/STAT-Signalweges näher erläutert werden. Wie bereits beschrieben wurde, können STAT-Faktoren durch JAK-Kinasen am kritischen Tyrosin phosphoryliert werden. Janus Kinasen werden aktiviert durch die Ligandenbindung induzierte Oligomerisierung von Zytokinrezeptoren, an deren zytoplasmatischen Bereich (Box-Motive) die JAKs assoziiert sind. Durch die Oligomerisierung der Rezeptoren kommt es zu einer Veränderung der räumlichen Struktur der zytoplasmatischen Domänen, wodurch die JAKs in direkte Nähe zueinander gelangen. Dies wiederum führt zu der gegenseitigen Phosphorylierung (Transphosphorylierung) der JAKs, wodurch diese aktiviert werden. Die aktiven JAKs phosphorylieren spezifische Tyrosine der Rezeptoren und eben diese Phosphotyrosine dienen als Andockstellen für die SH2-Domäne der STAT-Proteine. Nun können die JAKs die Transkriptionsfaktoren an ihren kritischen Tyrosinen phosphorylieren [55,56]. Es folgt die Dimerisierung, nukleäre Translokation und Induktion der Transkription von Zielgenen.

Die STAT-Inaktivierung kann durch eine Vielzahl Proteine und Wege vermittelt werden. Hierzu gehören sowohl die Familie der SOCS (*suppressor of cytokine signaling*)-Proteine, PIAS (protein inhibitor of activated STAT)-

Proteine und diverse Phosphatasen, als auch die Proteindegradierung im Proteasom nach Ubiquitinierung. Häufig induzieren STAT-Faktoren bereits die Expression der eigenen *feedback*-Inhibitoren, wie es z.B. für STAT5 und CIS oder STAT3 und SOCS-3 der Fall ist [57,58].

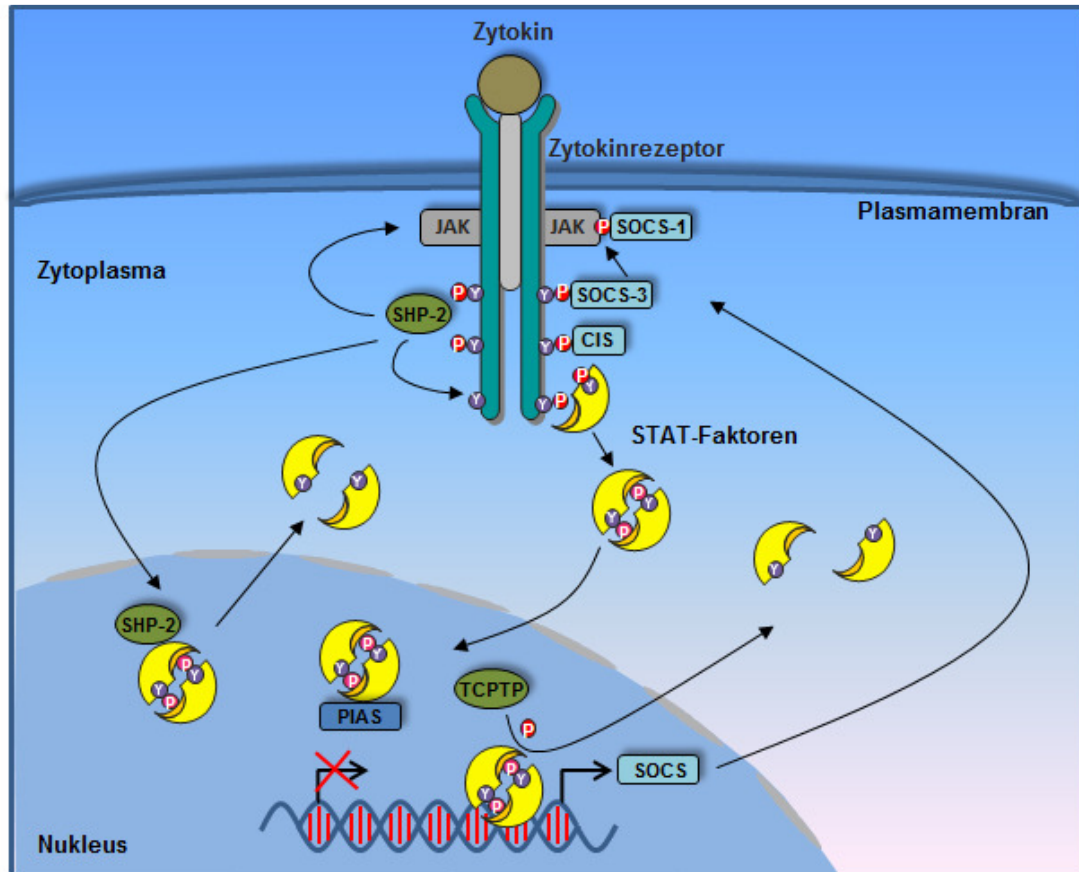


Abb. 2: Negative Regulation des JAK/STAT-Signalweges. Nach Aktivierung der STAT-Transkriptionsfaktoren am Rezeptor kann über unterschiedliche Wege der Signalweg abgeschaltet werden. CIS – *Cytokine-Inducible SH2-containing protein*; JAK – Janus Kinase; P – Phosphatrest; PIAS – *Protein Inhibitor of Activated STAT*; SHP2 - *SH2-domain containing PTP-2*; SOCS – *Suppressor of Cytokine Signaling*; STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*; TCPTP - *T-cell Protein Tyrosine Phosphatase*

Die Familie der SOCS-Proteine besteht aus acht Mitgliedern (SOCS-1/JAB/SSI-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 und CIS). Drei mögliche Mechanismen wurden den SOCS-Proteinen zugeschrieben, durch die sie den JAK/STAT-Signalweg blockieren können. Der Erste besagt, dass SOCS-1 durch direkte Interaktion die JAK-Aktivität inhibiert. Zweitens kann SOCS-3 anfangs mit dem phosphorylierten Rezeptor interagieren, im Folgenden dann mit den JAKs, was zu deren Deaktivierung führt. Drittens soll CIS (*cytokine-inducible SH2-containing protein*) mit den STAT-Proteinen um dieselben Andockstellen am Rezeptor konkurrieren, und so die

Signalweiterleitung unterdrücken [59,60]. Für eine direkte Interaktion von STAT-Faktoren und SOCS-Proteinen gibt es bislang keine Hinweise.

Die Mitglieder der PIAS-Proteinfamilie werden konstitutiv exprimiert. Die Familie setzt sich aus PIAS1, PIAS3, PIASy, PIASx α /ARIP3 und PIASx β /Miz1 zusammen. PIAS-Proteine interagieren direkt mit den phosphorylierten STAT-Transkriptionsfaktoren im Nukleus und führen zu deren Inaktivierung [61]. Unterschiedliche Spezifitäten der PIAS-Proteine für die jeweiligen STAT-Faktoren sind nachgewiesen worden.

Die Phosphatase SHP-2 (*SH2-domain containing PTP-2*) ist eine der bestuntersuchtsten Phosphatasen, die den JAK/STAT-Signalweg inhibieren können. SHP-2 kann sowohl am Rezeptor, an der Janus Kinase, als auch am phosphorylierten STAT-Transkriptionsfaktor selber wirken [56]. Die T-Zell Protein-Tyrosinphosphatase (TCPTP) TC45 befindet sich im Nukleus und dephosphoryliert hier aktives STAT1 [62]. Eine Vielzahl weiterer Phosphatasen mit unterschiedlicher Spezifität für die STAT-Proteine wurde bereits beschrieben [61,63].

1.4 Signal Transducer and Activator of Transkription 5 A/B

1.4.1 Allgemein

Der Transkriptionsfaktor STAT5 (STAT5A) wurde ursprünglich MGF (*Mammary Gland Factor*) genannt, da er in der Milchdrüse entdeckt wurde und dort die Expression von Milchproteinen (z.B. β -Casein) reguliert [64]. Aufgrund seiner strukturellen Homologie zu den STAT-Faktoren wurde es letztlich in STAT5 umbenannt [65,66]. Als die mRNA von STAT5 aus Brustgewebe isoliert wurde, konnte aus der cDNA eine bis dahin unbekannte zu 96 % homologe DNA-Sequenz zur ursprünglichen STAT5-Sequenz aufgereinigt werden. Es stellte sich heraus, dass zwei unterschiedliche Gene für zwei Protein-Isoformen kodierten, STAT5A und STAT5B [67].

Die Gene für STAT5A und STAT5B befinden sich in direkter Nachbarschaft auf Chromosom 13 und entstanden wohl durch eine Duplikation [68]. Die Aminosäuresequenzen der zwei Transkriptionsfaktoren sind zu 95 % homolog und weichen zum größten Teil nur im C-Terminus, also in der Trans-

aktivierungsdomäne, voneinander ab [2,69]. Die Expressionsmuster von STAT5A oder STAT5B können sich je nach Gewebe voneinander unterscheiden. Während STAT5A verstärkt im hämatopoetischen System und im Brustdrüsengewebe exprimiert wird, findet man STAT5B verstärkt in der Leber und im Epithelgewebe. Die Funktionen von STAT5A und STAT5B sind zum Teil redundant, wobei die gewebespezifische Expression der Transkriptionsfaktoren Differenzen bezüglich ihrer Aktivierung und der Expression von Zielgenen bedingen [70,71].

Der Transkriptionsfaktor STAT5A spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung der Brustdrüse und der Milchproduktion, was durch die Arbeit mit *knockout*-Mäusen (STAT5A) nachgewiesen wurde. Der *knockout* von STAT5B führt zu Zwergenwachstum in männlichen Mäusen, Infertilität, Defekten in der Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Veränderungen der Enzymregulation in der Leber [72–74]. Der Doppel-*knockout* beeinträchtigt die gesamte Hämatopoese, was spätestens acht Wochen nach Geburt zum Tode der Mäuse führt [75,76]. Es wurde davon berichtet, dass der *knockout* beider STAT5-Gene zur erhöhten Expression und Aktivierung anderer STAT-Proteine führen kann, wodurch die Interpretation einiger Phänotypen erschwert wird [77,78].

Eine persistente Aktivierung von STAT5 wurde bereits für eine Vielzahl unterschiedlicher Karzinomen, u.a. Brust-, Prostata-, Eierstock-, und Kopf-Hals-Tumoren, beschrieben [79–82]. Außerdem scheint der Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von hämatopoetischen Neoplasien zu spielen [83,84]. Eine Mutation innerhalb der Gene von STAT5A/B, die zur konstitutiven Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führen, ist in humanen Tumoren noch nicht nachgewiesen worden. Eine Ausnahme stellt die Fusion des STAT5B-Gens mit dem RARA (*Retinoic Acid Receptor Alpha*)-Gen dar, was in der Akuten Promyelozytären Leukämie (APL) detektiert werden konnte [85]. Dennoch wurden schon des Öfteren artifizielle konstitutiv aktive Mutanten von STAT5 genutzt, um dessen Potential zu untersuchen, gesunde Zellen in Krebs- bzw. Leukämiezellen zu transformieren. Diese Mutanten entstanden ursprünglich durch zufällige Mutagenese [86,87]. Das erste Konstrukt dieser Art wurde jedoch durch Fusion von STAT5 und JAK2 erschaffen. Die starke Transaktivierungsdomäne (TAD) des VP16-Proteins

aus dem Herpes simplex Virus wurde zwischen STAT5 und JAK2 kloniert, da die TAD von STAT5 als schwache transaktivierende Domäne gilt [88].

1.4.2 Struktur und Funktion

Der Transkriptionsfaktor STAT5A (murin) setzt sich aus 793 Aminosäuren zusammen, während STAT5B unwesentlich kürzer, nämlich 786 Aminosäuren misst. Daraus errechnet sich für STAT5A ein Molekulargewicht von 94 und für STAT5B von 92 kDa. Die beiden Faktoren zeigen eine gewisse Redundanz. Vor allem auf der Ebene der DNS-Bindung scheinen sie geringe Spezifitätsunterschiede aufzuweisen [89]. Die Deletionen eines der STAT5-Gene kann durch den anderen Faktor komplementiert werden, wobei die Gewebespezifität und die Funktionen der TAD die Unterschiede der verwandten Proteine auszumachen scheinen.

Die Domänenabfolge und die Struktur von STAT5 gleicht der, der übrigen STAT-Faktoren (Abb. 1). Die N-terminale Domäne ist ca. 138 Aminosäuren lang und ihre Funktion wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Ein Grund hierfür ist auch der vermeintlich erste Doppel-*knockout* von STAT5, der sich zu einem späteren Zeitpunkt als nicht kompletter *knockout* herausstellte [70]. Eine N-terminal verkürzte Variante von STAT5A sowie STAT5B wurde weiterhin exprimiert. Die resultierenden Mäuse wurden im Weiteren als STAT5^{AN}-Mäuse bezeichnet.

Der N-terminalen Domäne wurde eine wichtige Rolle für die Protein-Protein-Interaktion zugewiesen. Die direkte Interaktion von STAT5 mit dem Glukokortikoid Rezeptor (GR) war abhängig von der N-terminalen Domäne, die als Andockplattform dient. Es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion essenziell für normales Körperwachstum ist. STAT5^{AN}-Mäuse sind kleinwüchsig, was einer gestörten Signalweiterleitung durch Wachstumshormone zugrunde liegt. Der GR dient STAT5 als klassischer Kofaktor für eine effektive Geninduktion [90–92]. Weitere Koaktivatoren (p100, CBP/p300, NCoA/SRC) scheinen mit dem N-Terminus von STAT5 zu interagieren, wobei hier z. T. auch die Beteiligung der C-terminalen Transaktivierungsdomäne diskutiert wurde [93,94]. Außerdem findet in der N-terminalen Domäne eine posttranslationale Modifikation statt in Form einer O-Glc-NAC-Glykosylierung eines Threonins an der Aminosäureposition 92. Diese Modifi-

kation soll entscheidend für die effektive Interaktion von STAT5 und CBP/p300 sein [95].

Die N-terminale Domäne von STAT5 wird als Tetramerisierungsdomäne bezeichnet. Eine solche Oligomerisierung zweier STAT5-Dimere findet nur auf der DNS statt. Es wird vermutet, dass STAT5-Tetramere an DNS-Bindestellen andocken und die Transkription von Genen induzieren können, die normalerweise eine geringe Affinität für den Transkriptionsfaktor aufweisen [96,97]. Es stellte sich heraus, dass die Mutation eines Tryptophans (W37) in der N-terminalen Domäne von STAT5 die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors, Tetramere auszubilden, aufhob [39,98]. Weitere Faktoren, wie z.B. Kofaktoren der Transkription, können im Komplex mit den STAT5-Tetrameren vorliegen und die Oligomere als Andockplattform nutzen [99].

Die *coiled-coil*-Domäne setzt sich aus vier α -Helices zusammen und dient unter anderem der Interaktion mit weiteren regulatorischen Kofaktoren. Hierzu gehören der negative Regulator der Transkription SMRT, sowie Nmi (*N-myc interactor*) [27,100]. Nmi verstärkt die Interaktion von CBP/p300 mit STAT5 aber auch mit STAT1. Eine wichtige Region innerhalb der *coiled-coil*-Domäne scheint die nukleäre Translokation sowohl von latentem, als auch aktiviertem STAT5 zu beeinflussen. Die Deletion dieser Region führte zur vollständigen zytoplasmatischen Lokalisation von STAT5 [101,102].

Die DNS-Bindungsdomäne besteht aus acht β -Faltblatt-Strukturen, die durch unstrukturierte Schleifen verbunden sind. Die Domäne vermittelt die Interaktion mit GAS-Motiven, welche die Konsensussequenz -TTC(C/T)N(G/A)GAA-beinhalten und in regulatorischen Bereichen STAT5-induzierbarer Gene liegen [59]. Die Domäne wurde außerdem im Zusammenhang mit der nukleären Translokation von STAT5B beschrieben [103].

Teile der *Linker*-Domäne scheinen ebenfalls an der DNS-Bindung beteiligt zu sein [103]. Außerdem wurde zumindest für STAT1 gezeigt, dass die *Linker*-Domäne einen Anteil an der Regulation der Transkription hat [31].

Die SH2-Domäne, die die konservierteste Domäne innerhalb der STAT-Familie darstellt, dient der Bindung an den phosphorylierten Rezeptor und ermöglicht die Dimerisierung zweier STAT5-Moleküle über die reziproke Wechselwirkung mit dem kritischen Phosphotyrosin des jeweiligen Partnerproteins [92,104]. Obwohl beobachtet wurde, dass das STAT5A-core-

Fragment im latenten Zustand Dimere ausbilden kann, formierten sich diese Komplexe vollkommen anders als tyrosinphosphorylierte Dimere [43].

Die C-terminale Domäne, oder Transaktivierungsdomäne (TAD), zeigt die stärkste Varianz zwischen STAT5A und STAT5B. Sie hat die wichtige Funktion der Induktion von Zielgenen [105]. Die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren aber auch mit Phosphatasen wurde für die TAD nachgewiesen. Zu nennen sind hier u. a. p300/CBP, NcoA-1 (*nuclear receptor co-activator-1*), CPAP (*centrosomal P4.1-associated protein*), p100 (*nuclear co-activator protein*) und Oct-1 (*octamer binding transcription factor-1*) [94,106–108].



Abb. 3: Schematische Darstellung von murinem STAT5A und STAT5B. Ausgewählte posttranslationale Modifikationen, die für STAT5A/B nachgewiesen wurden, sind eingezeichnet. Die kritischen Tyrosine befinden sich an den Positionen 694 für STAT5A und 699 für STAT5B. Außerdem hervorgehoben sind die Serine 127/128 und 725, 779 in STAT5A. Die korrespondierende Position von Serin 725 in STAT5A ist 730 in STAT5B. Das Farbschema der Domänen ist in Abb. 1 abgebildet.

Am Beginn der C-terminalen Domäne befindet sich das kritische Tyrosin (STAT5A: Y694; STAT5B: Y699) das essenziell für die Dimerisierung aktivierter STAT5-Monomere ist. Innerhalb der TAD von STAT5 liegt eine amphipatische Region, die sowohl für die transkriptionelle Aktivität, als auch für den proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors und somit der Beendigung der Transkription verantwortlich ist [109].

Die C-terminale Domäne ist Ziel von weiteren posttranslationalen Modifikationen. Zwei Serine, an Position 725 (730 bei STAT5B) und 779 von STAT5A, werden phosphoryliert und scheinen der Verstärkung und der Regulation der transkriptionellen Aktivität zu dienen [53,110]. Weitere Serinphosphorylierungen liegen an den Aminosäurepositionen 127/128. Diese Serine regulieren, zumindest im Brustgewebe, die Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosins von STAT5A [110]. Für STAT5B konnten außerdem zusätzliche Tyrosinphosphorylierungen nachgewiesen werden (Y25, Y679, Y724, Y740,

Y743), denen jedoch zumeist keine eindeutigen Funktionen zugewiesen werden konnten [111,112].

1.4.3 Aktivierung von STAT5 und nukleozytoplasmatisches shuttling

Eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine und Wachstumshormone können die Aktivierung von STAT5 induzieren. Zu nennen sind u.a. Mitglieder der IL-2-Zytokinfamilie (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15), der IL-3-Familie (IL-3, IL-5, GM-CSF, G-CSF), hämatopoetische Zytokine (Erythropoetin (Epo), Thrombopoetin (TPO), SCF (*stem cell factor*), Flt3-Ligand), Wachstumsfaktoren (EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*)), sowie IFN- γ , OSM, GH (*growth hormone*) und Prolaktin [113,114] (Abb. 4).

Die Bindung einiger dieser Faktoren an ihre Rezeptoren führen zur Aktivierung assoziierter JAKs (Janus Kinasen), die wiederum die Rezeptoren tyrosinphosphorylieren und die Rekrutierung von STAT5 veranlassen. STAT5 kann nun durch die JAKs, vorzugsweise JAK2, am aktivierenden Y694 (STAT5A) bzw. Y699 (STAT5B) phosphoryliert werden. Zu diesen mit Janus Kinasen assoziierten Rezeptoren gehören u. a. der EpoR, IL-3-R und der IFN- γ -Rezeptor. Rezeptortyrosinkinasen, die eine intrinsische Kinaseaktivität besitzen, können unabhängig von JAKs STAT5 phosphorylieren. Die Rezeptoren von z.B. EGF und SCF sind eben solche Rezeptortyrosinkinasen. Nach Tyrosinphosphorylierung von STAT5A bzw. STAT5B kann es nun zur Ausbildung von Homo- aber auch Heterodimeren über die wechselseitige Interaktion von phosphoryliertem Tyrosin und der SH2-Domäne kommen. Die Affinität dieser Wechselwirkung ist stärker als die zwischen STAT5 und dem Rezeptor, wodurch die Ablösung der Dimere vom Rezeptorkomplex ermöglicht wird. Die Transkriptionsfaktoren translozieren nun in den Nukleus, wo sie mit *enhancer*-Elementen entsprechender Zielgene interagieren können (Abb. 4).

Eine große Anzahl von STAT5-responsiven Genen, z.B. cyclin D (1-3), c-myc, osm, igf-1, pim-1, bcl-2, bcl-xL, cis, socs-1 und socs-2, cd25, foxp3 und rad 51, konnte bereits nachgewiesen werden. Somit beeinflusst STAT5 die Transkription von Genen, deren Proteine für den Zellzyklus, das Zellwachstum, Überleben, negative feedback-Inhibition, aber auch für DNS-Reparatur und Reproduktion wichtig sind [105]. Zum Teil werden durch die

oben genannten Zytokine und Wachstumsfaktoren auch weitere STAT-Faktoren, aber auch andere Signalwege, wie der Ras-MAPK-Signalweg und PI3K-Signalweg, aktiviert.

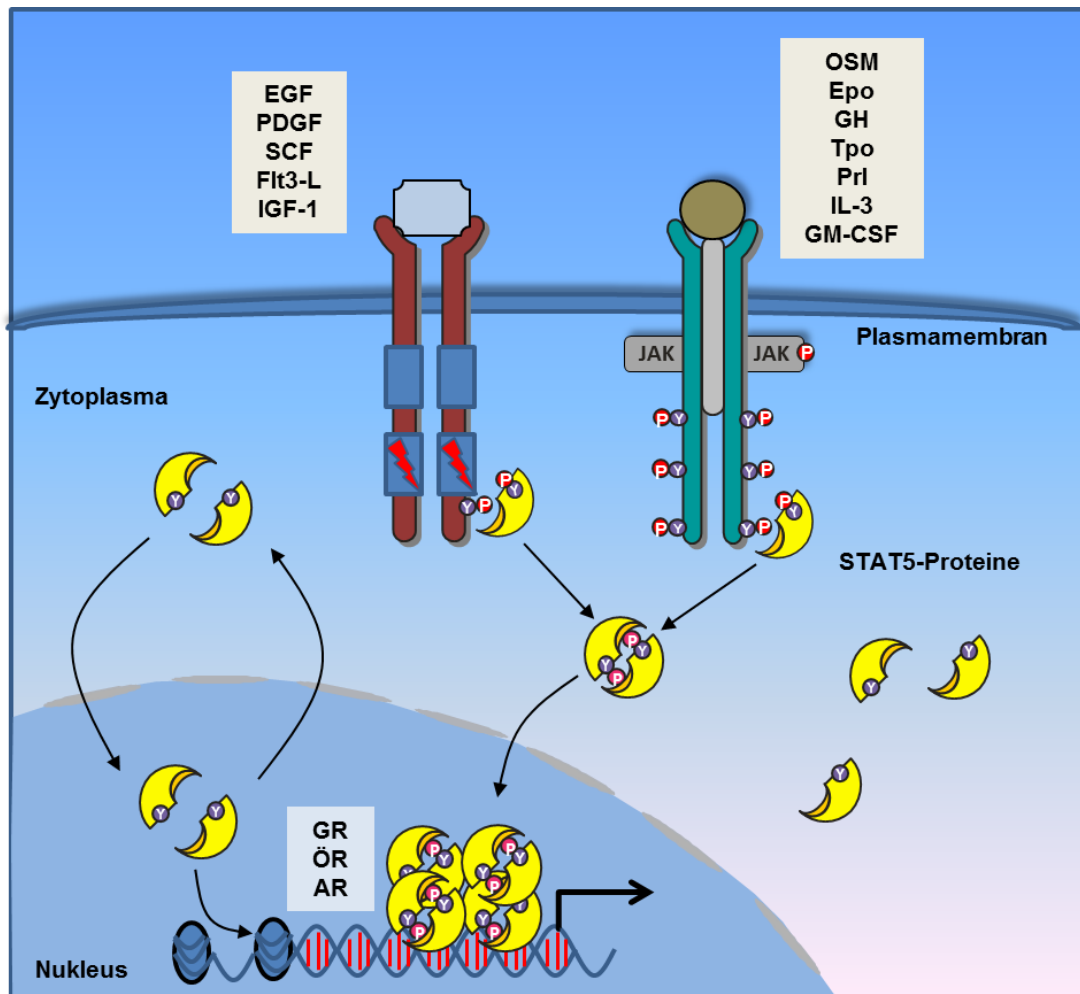


Abb. 4: Aktivierung von STAT5 durch unterschiedliche Zytokine und Wachstums-hormone/-faktoren. Nach der ligandeninduzierten Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (links) bzw. rezeptorassoziierten JAKs (rechts) wird STAT5 durch diese tyrosinphosphoryliert. Die Dimerisierung, nukleäre Translokation und DNS-Bindung als Tetramer, sowie die mögliche Interaktion mit nukleären Hormonrezeptoren (GR, ÖR, AR) ist angedeutet. Links im Bild ist das nukleozytoplasmatische *shuttling* von nicht phosphorylierten STAT5-Monomeren skizziert. Auf die möglichen chromatinmodifizierenden Eigenschaften (an Histonen) von nicht phosphoryliertem STAT5 wird durch einen Pfeil hingewiesen (links unten) [115]. Abk.: AR – Angrogen Receptor; EGF – Epidermal Growth Factor; Epo – Erythropoietin; Flt3-L – *fms-like tyrosine kinase ligand*; GH – Growth Hormone; GM-CSF – Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor; GR – Glucocorticoid Receptor; IGF-1 – Insulin-like Growth Factor 1; IL-3 – Interleukin 3; JAK – Janus Kinase; OSM – Oncostatin M; ÖR – Östrogen Rezeptor; P – Phosphatrest; PDGF – Platelet-Derived Growth Factor; Prl – Prolactin; SCF – Stem Cell Factor; TPO – Thrombopoietin; Y – Tyrosin; Abbildung abgewandelt von [105].

Der zumeist beschriebene kanonische Signalweg von STAT-Faktoren beinhaltet die Aktivierung von STAT5 am Rezeptor und die anschließende Translokation in den Zellkern. Hierbei wird zumeist unter Anderem die Tatsache außer Acht gelassen, dass eine gewisse Population von STAT-

Proteinen schon vor der Aktivierung im Zellkern vorliegt. Eine solche subzelluläre Verteilung kommt durch den dynamischen Austausch von STAT-Faktoren zwischen Zytoplasma und Zellkern zustande, also durch konstitutive nukleäre Import- und Exportprozesse. Ein solches nukleozytoplasmatisches *shuttling* wurde bereits für STAT1, STAT2, STAT3, STAT5A, STAT5B und STAT6 beschrieben [116–120]. STAT-Proteine sind zu groß, um frei durch die nukleären Poren zu diffundieren. Ein aktiver, energieaufwändiger Prozess ist hier vonnöten. Der Import in den Zellkern bzw. Export aus diesem heraus wird durch Karyopherine ermöglicht. Diese Transportmoleküle interagieren mit NLS- (*nuclear localization sequence*) bzw. NES- (*nuclear export sequence*) Sequenzen, wobei in keinem der STAT-Proteine eine klassische NLS bzw. NES gefunden werden konnte.

Durch die Behandlung von Ba/F3-Zellen mit LMB (Leptomycin B), ein CRM1 (Exportin-1)-Inhibitor, konnte gezeigt werden, dass sich STAT5B über die Zeit im Zellkern anreicherte. Somit konnte für STAT5B ein CRM1-abhängiger Export und der Transport von latentem STAT5B in den Nukleus nachgewiesen werden. Sowohl für STAT5A, als auch STAT5B konnte eine Region innerhalb der *coiled-coil*-Domäne identifiziert werden, die zumindest teilweise für den nukleären Import zuständig ist [101,102].

Der nicht-kanonische Signalweg integriert als Erweiterung des kanonischen Weges das nukleozytoplasmatische *shuttling* und die Ausbildung präformierter, unphosphorylierter STAT-Dimere [54,115].

1.5 Tyrosinkinasen der Src-Familie (SFKs)

Peyton Rous beschrieb bereits 1911 einen Virus bzw. einen filterbaren Erreger, der die Bildung von Tumoren in Hühnern auslösen konnte [121]. Dieser Virus wurde Jahre später nach seinem Entdecker benannt, Rous Sarkoma Virus (RSV). Im Laufe der 70-iger und Anfang der 80-iger Jahre konnte schlussendlich das Gen isoliert werden, dessen Produkt transformierende Wirkung aufwies [122–124]. Das Protein wurde als v-Src bezeichnet, für *viral sarcoma*. Außerdem wurde im Zuge der Entdeckung von v-Src zum ersten Mal die Tyrosinphosphorylierung von Substraten beschrieben [122]. Kurz darauf wurde nachgewiesen, dass *v-src* seinen Ursprung in einem homolo-

gen Vertebratengen hatte. Das Vorgängergen wurde *c-src* (*cellular sarcoma*) genannt und als proto-Onkogen bezeichnet. Dies beschreibt einen zellulären Vorgänger eines transformierenden viralen Gens und wurde daher von dem Begriff "Onkogen" abgehoben [125,126].

Heute sind der Src-Familie neun Mitglieder zugeordnet worden, welche neben c-Src die Proteine Blk, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck, Yrk und Yes sind. Sie gehören der Gruppe der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase an. Nur ein Teil der Src-Kinasen wird ubiquitär exprimiert, während sie zumeist gewebe-spezifische Expressionsmuster aufweisen (Tab. 2) [127,128]. Für einige der Kinasen sind sekundäre Startcodons bzw. Spleißvarianten nachgewiesen worden, die auch unterschiedliche Funktionen aufweisen können. SFKs (*src family kinases*) regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie z.B. Zelladhäsion und -migration, Zelldifferenzierung, Mortalität, sowie Zellwachstum und Morphologie [129].

Tab. 2: Charakteristika der SFKs. Die Mitglieder der Src-Familie werden aufgezählt und ihre spezifische Gewebeexpression und mögliche Isoformen aufgezeigt. Tabelle modifiziert nach [127].

Src-Familien-Mitglied	Gewebeexpression	Isoformen
c-Src	ubiquitär	Neuronen spezifische Isoformen
Blk	B-Zellen	
Fgr	Myeloische Zellen; B-Zellen	
Fyn	ubiquitär	T-Zell-spezifische Isoform
Lck	NK-Zellen; T-Zellen; Hirngewebe	
Lyn	Myeloische Zellen; B-Zellen; Hirngewebe	Zwei Spleißvarianten (p53, p56)
Hck	Myeloische Zellen	Zwei Startcodons (p59, p60)
Yes	ubiquitär	
Yrk	ubiquitär	

1.5.1 Struktur und Funktion

Die Struktur aller SFKs in Vertebraten ist ähnlich und ihre molekulare Masse liegt zwischen 52 und 62 kDa. Die Src-Kinasen setzen sich aus sieben Domänen zusammen: die N-terminale Domäne mit Myristylanker (SH4-Domäne), die sogenannte *unique* Domäne, die SH3-Domäne, die SH2-Domäne, die kurze *linker*-Domäne, die katalytische Domäne (SH1-Domäne) und die C-terminale regulatorische Domäne. An Position 1 der N-terminalen Domäne befindet sich ein Glycin, das irreversibel myristyliert wird. Myristoylierung beschreibt die Glycin-Modifikation mit einer C14-Fettsäure (Myristinsäure), welche die Membranverankerung des modifizierten Proteins nach sich zieht. Drei Lysine an den Positionen 5, 7 und 9 fördern die Assoziation mit der Plasmamembran durch ionische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide [130]. Außerdem werden in der N-terminalen Domäne, auch als SH4-Domäne bezeichnet, basische Aminosäuren palmitoyliert. Dieser reversible Prozess kann die Membranlokalisierung der Src-Kinasen nach Stimulation der Zelle variabler gestalten [131]. Die Lokalisation von c-Src konnte in der perinukleären Membran, in der Plasmamembran sowie in den Membranen von Endosomen und sekretorischen Vesikeln nachgewiesen werden, wobei die SH2- und SH3-Domäne die bevorzugte Lokalisation in der perinukleären Membran bedingt [132,133].

Die *unique* Domäne weist für alle Src-Kinasen unterschiedliche Sequenzen auf. Potentielle spezifische Eigenschaften, wie z.B. die Interaktion mit speziellen Rezeptoren oder Substraten könnten durch diese Domäne gesteuert werden [131]. Die Phosphorylierung von Threonin 34, Threonin 46, und Serin 72 durch die Cyclin-abhängige Kinase (Cdc2) und den Cyclin-B-Komplex in der M-Phase des Zellzyklus wurde in c-Src nachgewiesen. Die Funktion dieser posttranslationalen Modifikationen konnte jedoch nicht aufgeklärt werden [134].

Die allgemeine Funktion einer SH3-Domäne ist die Interaktion mit prolinreichen Regionen von Substraten mit der typischen Erkennungssequenz PXXP. Die Umgebung der Proline kann die Bindungsspezifität zusätzlich beeinflussen. Die SH3-Domäne von Src-Proteinen zeichnet sich durch eine globuläre Struktur aus, deren jeweiligen Enden hydrophobe Eigenschaften

haben. Innerhalb der globulären Struktur findet sich ein hoher Anteil saurer Aminosäuren. Neben der Aufgabe der Interaktion mit Substraten manipuliert die SH3-Domäne die katalytische Aktivität durch intramolekulare Bindung und die Proteinlokalisierung innerhalb der Zelle [135].

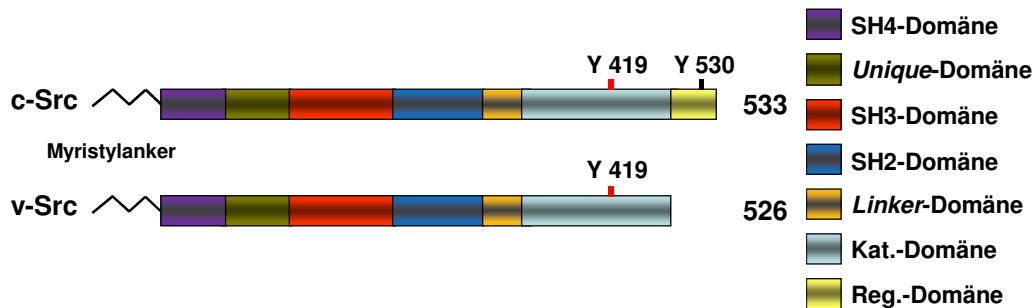


Abb. 5: Domänenstruktur von c-Src und v-Src. Abgebildet sind die sieben Domänen der SFKs stellvertretend durch humanes c-Src. Darunter befindet sich das um die regulatorische Domäne verkürzte v-Src. Der N-terminale Myristylanker ist eingezeichnet. Das für die Aktivierung kritische Tyrosin 419 (Y416 u.a. im Huhn) in der katalytischen Domäne und das regulatorische Tyrosin 530 (bei c-Src) wurden hervorgehoben. Die Domänenlegende befindet sich rechts im Bild. Die Gesamtgröße in Aminosäuren ist angegeben. Kat. Domäne: katalytische Domäne; Reg. Domäne: regulatorische Domäne. Abb. modifiziert nach [129].

Der SH3-Domäne folgt eine weitere modulierende Region, die SH2-Domäne. Sie ist hoch konserviert und mit der bereits beschriebenen SH2-Domäne innerhalb der STAT-Proteine vergleichbar. Sie bewirkt die Proteinbindung bzw. Substratbindung über phosphorylierte Tyrosinreste. Jedoch hat sie außerdem eine Funktion bezüglich der Autoinhibition von Src-Proteinen, die zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben wird. Unter anderem interagieren Src-Kinasen über ihre SH2-Domäne mit FAK (*focal adhesion kinase*) [136]. Es wurde beschrieben, dass Src-Kinasen abgesehen von ihrer katalytischen auch eine Kinase-unabhängige *scaffolding* Funktion aufweisen. Die Aktivierung von STAT5 am Prolaktin-Rezeptor sollte abhängig von einer funktionsfähigen SH2- bzw. SH3-Domäne der c-Src-Kinase sein [137].

Die Linker-Domäne setzt sich aus zahlreichen Prolinen zusammen, verbindet die SH2- mit der katalytischen Domäne und ist ebenfalls an der nicht-kovalenten Substratbindung beteiligt [131].

Die katalytische Domäne (SH1-Domäne) ist die am stärksten konservierte Domäne innerhalb der Familie der Src-Kinasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Substratspezifität. Die Kinaseaktivität dieser Domäne wird durch die Autophosphorylierung des kritischen Tyrosins an der Position 419 (humanes c-Src) reguliert, welches gleichzeitig eine Andockstelle weiterer SH2-

Domänen beinhaltender Proteine darstellt (Abb. 6). Die Spezifität für Tyrosine kommt durch eine in allen Tyrosinkinasen konservierte Sequenz zustande. Ein Prolin innerhalb einer Schleifenstruktur ermöglicht die Interaktion mit dem Phenylalaninring des Tyrosins, während die Interaktion mit Serinen oder Threoninen nicht zustande kommen kann. Das ATP-Bindemotiv liegt im Anfangsbereich der katalytischen Domäne, wo das ATP zu ADP hydrolysiert wird und der Phosphatrest auf das Substrat übertragen werden kann.

Die regulatorische C-terminale Domäne ist entscheidend für die Autoinhibition der Src-Kinasen (Abb. 6). Das phosphorylierte Tyrosin an Position 530 des humanen c-Src wird im inaktiven Src-Protein von der eigenen SH2-Domäne gebunden, wodurch die Kinasedomäne verdeckt und eine geschlossene Konformation eingenommen wird [138].

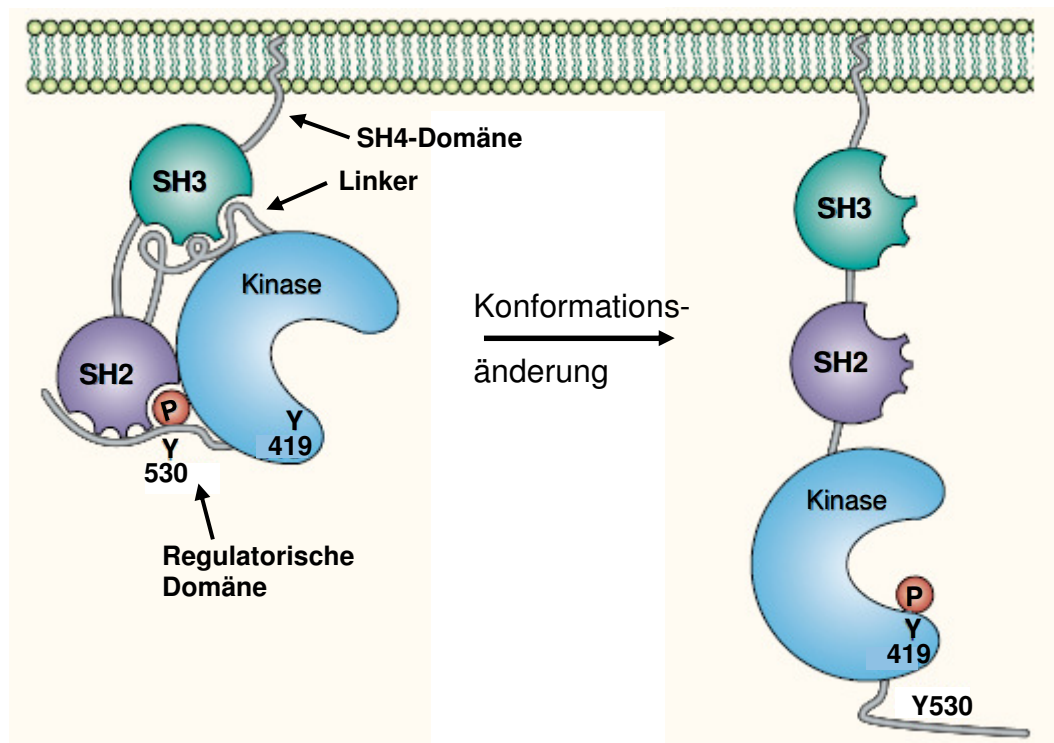


Abb. 6: Regulation der Aktivierung von c-Src. Die Konformationsänderung (von links nach rechts) führt zur Aktivierung von c-Src. Der inaktive Zustand liegt bei phosphoryliertem Tyrosin 530 und dephosphoryliertem Tyrosin 419 vor, wobei die Autoinhibition durch interne Interaktionen erreicht wird. Wird Tyrosin 419 phosphoryliert entfaltet sich das Protein und die Kinasedomäne bzw. katalytische Domäne wird zugänglich. Die Dephosphorylierung von Tyrosin 530 ist möglich, aber nicht notwendig für die Aktivierung der Kinase. Die Domänen sind gekennzeichnet. Abb. modifiziert nach [129].

Das konstitutiv aktive v-Src ist C-terminal verkürzt, was zur Folge hat, dass das regulatorische Tyrosin (Y530) fehlt und somit eine Autoinhibition unmöglich ist. Des Weiteren wurden einige Aminosäuresubstitutionen innerhalb des

v-Src-Proteins nachgewiesen. Erst vor kurzem wurde berichtet, dass die Phosphorylierung des regulatorischen Tyrosins (Y530) keine zuverlässige Aussage über die Aktivität der Src-Kinase zulässt. Ausschlaggebend für die geöffnete Konformation und somit die Aktivität der Kinase sollte das Tyrosin 419 sein auch bei gleichzeitiger Phosphorylierung des Tyrosins 530 [139]. Ein Umstand durch den die Relevanz der Phosphorylierung des Tyrosins 530 für die Inaktivierung der Kinase gemindert wird.

1.5.2 STAT-Aktivierung durch SFKs

Janus Kinasen (JAKs) sind entscheidend an der Aktivierung der STAT-Faktoren unterhalb ligandengebundener Rezeptoren beteiligt (Kap. 1.3). Dennoch scheinen SFKs ebenfalls in der Phosphorylierung von STATs im JAK/STAT-Signalweg involviert zu sein [140,141].

Die am häufigsten beschriebenen STAT-Faktoren, die durch Src-Kinasen phosphoryliert werden, sind STAT3, STAT5A und STAT5B. Vor allem ihre Aktivierung an Rezeptoren der Wachstumsfaktoren wozu u. a. Prolaktin und EGF zählen, scheint in hohem Maße von der gleichzeitigen Aktivität von c-Src abhängig zu sein [142]. Versuche zeigten, dass die Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 nach EGF-Stimulation nur im Falle einer katalytisch aktiven Src-Kinase detektiert werden konnte [143]. Die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 durch Lck in T-Lymphozyten und von STAT5 durch Lyn nach Epo-Stimulation wurde nachgewiesen [144,145]. Es ist davon auszugehen, dass durch das Zusammenwirken von SFKs und JAKs die STAT-Aktivierung potenziert wird.

Die direkte Aktivierung von STAT3 durch v-Src wurde nachgewiesen. Zudem wurde gezeigt, dass die onkogene Aktivität und transformierende Eigenschaften von v-Src abhängig von STAT3 sind [141,146]. Auch STAT5B scheint die v-Src vermittelte Transformation von NIH-3T3-Zellen zu verstärken [147]. Die direkte Phosphorylierung des Y694 von STAT5A durch c-Src wurde in einem *in vitro kinase assay* belegt und die Relevanz der Kinase für den Epo-Signalweg hervorgehoben [148]. STAT5A und STAT5B werden durch c-Src an zusätzlichen Tyrosinen, abgesehen vom kritischen Tyrosin, phosphoryliert.

Ein großes Problem einiger Studien ist die Verwendung sehr hoher Src-Inhibitor-Konzentrationen (z.B. PP1, PP2), wodurch Nebeneffekte der Inhibitoren nicht auszuschließen sind.

Überraschenderweise konnte in Immunfluoreszenzstudien nachgewiesen werden, dass nur STAT5B nach Aktivierung durch konstitutiv aktives c-Src in den Nukleus transloziert, während phosphoryliertes STAT5A im Zytoplasma zurückblieb [149].

Eine direkte Beeinflussung der STAT-Funktion durch Src-Kinasen wurde schon häufig überzeugend nachgewiesen, wobei auch in unterschiedlichen Karzinomen STAT-Proteine und SFKs zusammenwirken können. Diesen Beobachtungen soll sich unter Anderem im folgenden Kapitel gewidmet werden.

1.6 Dysregulation von STAT5 in Tumoren

Die persistente Aktivierung von STAT5 wurde in Tumoren der Brust, der Prostata, der Leber, der Lunge und in Melanomen nachgewiesen. Vor allem in hämatopoetischen Neoplasien wurde die Bedeutung von STAT5 hervorgehoben und in der Vergangenheit ausführlich untersucht. STAT5 veranlasst die Transkription von anti-apoptotischen Genen und Genen des Zellzyklus, wodurch die Proliferation der Zellen angetrieben wird.

Die Phosphorylierung von STAT5 in Brusttumoren wird häufig durch die Überexpression des EGF-Rezeptors (HER: *human EGF receptor*) hervorgerufen [150]. Aber auch von der Überexpression und daraus resultierenden konstitutiven Aktivierung von c-Src wurde berichtet [142]. Zudem kann die dauerhafte Expression von Wachstumshormonen (GH, Prl) eine autokrine Schleife induzieren und somit unkontrollierte Proliferation nach sich ziehen [151–154]. In SCCHN (*squamous cell carcinoma of the head and neck*) wurde dauerhaft aktives STAT5 nachgewiesen und eine Beteiligung der Src-Kinasen und des EGFR vermutet [155,156].

Allein 95% aller Prostatatumoren weisen persistent aktives STAT5 auf. Die Interaktion von STAT5 mit dem Androgenrezeptor (AR) soll die nukleäre Akkumulation und transkriptionelle Aktivität von STAT5 verstärken und den malignen Phänotyp unterstützen [157].

Eine erhöhte STAT5-Aktivität ist eng verbunden mit myeloischer Zelltransformation. Leukämien, die persistent aktives STAT5 aufweisen, sind die CML (Chronisch Myeloische Leukämie), AML (Akute Myeloische Leukämie), ALL (Akute Lymphatische Leukämie), angeborene Neutropenie, außerdem myeloproliferative Erkrankungen (MPDs) wie z.B. essenzielle Thrombozytopenie (ET), Polyzythämia vera (PV) und die Mastozytose.

Die dauerhafte Aktivierung von STAT5 wird häufig durch konstitutiv aktive Kinasen verursacht, welche sowohl zytoplasmatische Proteine, als auch Rezeptortyrosinkinasen bzw. Rezeptor-assoziierte Kinasen sein können. In einigen Kinasen reicht eine einzelne Punktmutation aus, um eine konstitutive Aktivierung zu verursachen. Ein Beispiel hierfür ist die Janus Kinase JAK2(V617F), die in einem hohen Anteil der Patienten mit einer PV (bis zu 70%) und einer ET (ca. 30%) nachweisbar ist. Die Mutation bzw. die Erkrankung führt zu einer erhöhten Anzahl der Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten [158]. Wie zuvor beschrieben, ist STAT5 eines der bevorzugten Substrate von JAK2 (siehe 1.4.3), wodurch die konstitutive Phosphorylierung des STAT-Faktors zu erklären ist. Eine bekannte Mutation des SCF-Rezeptors KIT, KIT(D816V), kann durch die Aktivierung von STAT5 und des PI3K-Signalweges zur Ausbildung einer Mastozytose führen [159].

1.6.1 Abelson-induzierte CML

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine Stammzellerkrankung, bei der die sogenannten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) entarten. Die CML macht ca. 20% aller adulten Leukämien aus. Der Verlauf der CML wird in drei Stadien unterteilt. Die chronische Phase zeichnet sich durch eine Leukozytose (Vermehrung der weißen Blutzellen) und Splenomegalie (Milzvergrößerung) aus. In der Akzelerationsphase nimmt die Erkrankung an Dynamik zu, was bedeutet, dass eine Anämie (Blutarmut) und Thrombozytopenie (Mangel an Thrombozyten) beobachtet wird. Chromosomenveränderungen können auftreten. Es folgt die Blastenkrise, in der ein hoher Anteil Blasten im peripheren Blut vorliegt und diese verschiedene Gewebe infiltrieren. Man spricht nun von einer akuten Leukämie.

Die entscheidende Anomalie, die dieser Erkrankung zugrunde liegt, ist das Auftreten des Philadelphia Chromosoms (Ph⁺), das durch die reziproke

Translokation zwischen dem *c-abl*-Lokus auf Chromosom 9 und dem *bcr*-Lokus (*breakpoint cluster region*) auf Chromosom 22 entsteht. Das Resultat dieser Translokation ist die konstitutiv aktive Tyrosinkinase BCR-ABL. Die Abl-Tyrosinkinase bedingt die katalytische Aktivität.

Eines der am häufigsten verwendeten Medikamente zur Bekämpfung des Erkrankungsfortschritts und des Übergangs in die Blastenkrise ist Imatinib (Gleevec[®]), ein Inhibitor der Abl-Kinasen durch kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle.

Drei Isoformen (p210, p190 und p230) des Fusionsproteins sind beschrieben worden [160,161]. BCR-ABL ist in der Lage, viele Wege der Signaltransduktion zu aktivieren und so die kontinuierliche Proliferation und faktorunabhängiges Wachstum der Zellen zu ermöglichen. Vor allem der JAK/STAT-Signalweg, aber auch der PI3K- und Ras/MAPK-Signalweg werden aktiviert, wobei die Aktivierung der Janus Kinasen nicht essenziell für die STAT5-Aktivierung ist [162,163]. Aktuelle Studien anhand von STAT5-*knockout*-Mäusen, gewebespezifischer konditionaler *knockouts* und mittels STAT5-Inhibitoren bestätigen die Notwendigkeit einer persistenten Aktivierung von STAT5 für die Entstehung BCR-ABL induzierter Leukämien [162,164,165].

Häufig bediente man sich konstitutiv aktiver Mutanten von STAT5 (z.B. S710F), die in Ba/F3-Zellen faktorunabhängiges Wachstum ermöglichen, um die Rolle von STAT5 in hämatopoietischen Tumoren zu untersuchen [166]. Des Weiteren wurden STAT5A(S710F) exprimierende Zellen des Knochenmarks in Mäuse transplantiert, die im Folgenden eine CML-ähnliche Leukämie ausbildeten [167]. Interessanterweise lag die STAT5-Mutante trotz konstitutiver Tyrosinphosphorylierung im Zytoplasma vor. Die Interaktion von phosphoryliertem STAT5 mit Gab2 und p85, einer PI3K-Untereinheit, bedingte vermutlich die beobachtete zytoplasmatische Lokalisation. Außerdem resultierte aus genannter Interaktion die Aktivierung von PI3K und im Folgenden der Serin/Threonin-Kinase Akt. Eine zytoplasmatische Funktion von STAT5 unabhängig seiner Aufgabe als Transkriptionsfaktor wurde postuliert [166,167].

Eine weitere Studie berichtete von der Akkumulation von phosphoryliertem STAT5 in Podosomen. Diese aktinreichen Strukturen werden durch Hck hervorgerufen und spielen in der Adhäsion und Tumorinvasion eine Rolle [168].

Die Beteiligung der Src-Kinasen in der Ausbildung einer CML und weiterer Leukämien wurde des Öfteren diskutiert. Im Laufe der Studien konnte eine direkte Interaktion von BCR-ABL und Hck, Lyn und Fyn nachgewiesen und die Phosphorylierung regulatorischer Tyrosine von BCR-ABL durch SFKs bestätigt werden [169,170].

Die Bedeutung der SFKs in BCR-ABL positiven Leukämien wurde deutlich, als berichtet wurde, dass Hck nach Aktivierung durch BCR-ABL die Phosphorylierung von STAT5 vermittelt. Die Inhibition der SFKs in CML-Zelllinien und primären CML-Zellen hatte deren Apoptose zur Folge, die durch die Blockade des STAT5- und ERK-Signals induziert wurde [171,172]. Ein solcher Mechanismus könnte eventuell vor allem in einer Imatinib-resistenten CML zutreffen, in der von einer erhöhten Expression der Src-Kinasen berichtet wurde [173]. Konträre Daten besagen, dass SFKs nur für die Induktion einer BCR-ABL ausgelösten ALL (Akute Lymphatische Leukämie) aber nicht einer CML erforderlich sind [174].

BCR-ABL reguliert das negative *feedback*-Signal von SFKs (z.B. durch Csk und SHP-2) und nimmt auch auf diesem Wege Einfluss auf die Aktivität der Kinasen [139].

Aufgrund der mannigfaltigen Signalwege, die in einer CML aktiviert werden, wundert es nicht, dass außer Imatinib Inhibitoren der zweiten Generation eingesetzt werden, um Erkrankten das Leben und Überleben zu ermöglichen. Dasatinib ist ein solcher Tyrosinkinase-Inhibitor, der sowohl Abl- als auch Src-Kinasen inhibiert [175]. Auch die Inhibition des AKT/mTOR-Signals durch Rapamycin, meist in Kombination mit Imatinib, konnte in Mausmodellen der Erkrankung Erfolge verbuchen [176].

1.6.2 AML (Akute Myeloische Leukämie)

Die Akute Myeloische Leukämie zeichnet sich durch eine Störung der normalen Hämatopoese aus, was sich durch eine Reduktion der Erythrozyten, Blutplättchen und reifen Granulozyten sowie einer Leukozytose bemerkbar macht. Die AML macht etwa 80% aller akuten Leukämien bei Erwachsenen aus, wenn man davon ausgeht, dass die CML erst in der Blastenkrise als akute Leukämie bezeichnet wird. Ungefähr 30% der Patienten mit einer AML weisen eine Mutation des FLT3-Rezeptors auf. Die häufigste dieser Mutatio-

nen ist die Interne Tandem Duplikation (ITD), die in der sogenannten Juxtamembran Domäne (JM) stattfindet, in der sich regulatorische Tyrosine befinden. Es wird vermutet, dass durch die Duplikation die Autoinhibition des Rezeptors verhindert wird [177,178].

Eine Besonderheit dieser Mutation ist die qualitative Veränderung der Signaltransduktion. Ist der Wildtyp-Rezeptor nach Ligandenbindung (FLT3-L) noch ein schwacher Aktivator von STAT5, so scheinen durch die Duplikation Tyrosine an die Oberfläche des Rezeptors zu gelangen, die nach ihrer Phosphorylierung als Andockstellen für STAT5 dienen [179]. STAT5 wurde als direktes Ziel der Tyrosinphosphorylierung von FLT3-ITD bestätigt und der Transkriptionsfaktor kann als einer der wichtigsten *second messenger* in einer durch FLT3-Mutation ausgelösten AML bezeichnet werden [180,181]. Interessanterweise signalisiert der mutierte Rezeptor verstärkt vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Vergleich zum Wildtyp, was möglicherweise zur veränderten Signaltransduktion beiträgt [182].

Auch in der AML wurde von zytoplasmatisch lokalisiertem und phosphoryliertem STAT5 berichtet. Sämtliche Patienten, in deren Biopsien die Anreicherung von aktivem STAT5 im Zytoplasma bestätigt wurde, waren jedoch negativ für die FLT3-ITD-Mutation [183]. Demnach konnte sowohl in der AML (FLT3-ITD negativ) als auch in der CML zytoplasmatisch lokalisiertes STAT5 trotz bestätigter Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden.

Die Relevanz der SFKs für die Ausbildung einer AML wurde in diversen Studien untersucht. Die Interaktion von Lyn mit phosphorylierten Tyrosinen des Rezeptors FLT3-ITD und die anschließende Aktivierung der Src-Kinase wurde nachgewiesen [184]. Zudem wurde gezeigt, dass die Inhibition der SFK-Aktivität und die Unterdrückung der Lyn-Expression das faktorunabhängige Wachstum einer myeoblasten Zelllinie unterdrückt. Sowohl die Reduktion der konstitutiven Phosphorylierung von STAT5 konnte detektiert, als auch Tumorstadium unterdrückt bzw. Tumorstadium verringert werden. Die Aktivierung von STAT5 durch Lyn unterhalb von FLT3-ITD kann demnach entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Die Inhibition der Lyn-Aktivität scheint daher ein vielversprechendes Ziel der Behandlung einer AML zu sein [185].

1.7 Ziel der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor STAT5 ist an einer Vielzahl von Abläufen der Signalübertragung vor allem im Immunsystem, in der Brustdrüse und der Leber beteiligt. Einige solide Tumoren, Leukämien und myeloproliferative Erkrankungen sind durch die persistente Phosphorylierung von STAT5 charakterisiert, welche die Viabilität der Zellen und unkontrollierte Proliferation begünstigt. Diese Tatsache macht STAT5 und dessen Aktivatoren zu interessanten Zielen der therapeutischen Intervention.

Ein großer Aufwand wurde betrieben, die klinische Relevanz von STAT5 in Leukämien wie der CML und der AML hervorzuheben und Einblick in die zugrundeliegenden biochemischen Prozesse zu gewähren. Dennoch ist noch ein weiter Weg zurückzulegen, um die mannigfaltigen Mechanismen der STAT5-Signaltransduktion und weiterer Aufgaben des Transkriptionsfaktors zu erklären.

In dieser Arbeit sollten die biochemischen Prozesse und die Hintergründe analysiert bzw. aufgeklärt werden, die zur zytoplasmatischen Retention des phosphorylierten STAT5A in der CML führen. Eine Beobachtung, die für die Familie der STAT-Faktoren einmalig ist, da STAT-Proteine nach Aktivierung überwiegend nukleär vorliegen.

Hierfür sollten die Befunde anderer Gruppen zunächst in primären Zellen eines BCR-ABL⁺ CML-Patienten und einer CML-Zelllinie reproduziert werden. Da ein Schwerpunkt dieser Studie auf der Analyse mittels konfokaler Mikroskopie lag, mussten zu Anfang fluoreszierende STAT5A-Fusionsproteine kloniert und diese auf ihre Funktionalität überprüft werden.

Im Folgenden sollten BCR-ABL induzierbare, adhärente HEK293-Zellen generiert werden, die die Handhabung in der Mikroskopie vereinfachten und genetische Manipulationen zuließen. Im Zuge der Arbeit wurde der Familie der Src-Kinasen eine wichtige Rolle für die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A zugewiesen, weswegen die SFKs v-Src, Hck und Lyn mit Fluoreszenzproteinen fusioniert wurden. Mit Hilfe von Mutanten sowohl von STAT5A, als auch der SFKs, dem Gebrauch von Inhibitoren, durch Analyse der Geninduktion und nativer Gele sollten Aussagen über die Mechanismen der zytoplasmatischen Lokalisation des aktiven Transkriptions-

faktors gemacht werden. Die Analyse neuer Interaktionspartner und Funktionen der Signalweiterleitung von STAT5 könnte in Zukunft die Therapie von Leukämien entscheidend verbessern.

2 Material und Methoden

Material und Methoden sind nach Standardprotokollen des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie, RWTH Aachen, verfasst und entsprechend individueller experimenteller Änderungen modifiziert.

2.1 Verbrauchsmaterial

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* eingesetzt. Alle wässrigen Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt.

2.1.2 Antikörper

α -GAPDH (6C5)	monoklonales Maus-Antiserum gegen die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
α -Akt 1/2 (N-19)	polyklonales Ziegen-Antiserum gegen die N-terminale Domäne von Akt 1/2 (sc-1619, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
α -pS ⁴⁷³ -Akt	polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die an Serin 473 phosphorylierte Form von Akt (#9271, Cell Signaling, Beverly, USA)

α -c-Abl (K12)	monoklonales Kaninchen-Antiserum gegen c-Abl und seine Mutanten (sc-131, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
α -pY ⁴¹² -BCR-ABL	monoklonales Kaninchen-Antiserum gegen Abl-Proteine, die an Tyrosin 412 phosphoryliert sind (#2865, Cell Signaling, Beverly, USA)
α -GFP	polyklonales Ziegen-Antiserum gegen <i>green fluorescent protein</i> (GFP) und seine Derivate (600-103-215, Rockland, Gilbertsville, USA)
α -GFP	monoklonales Maus-Antiserum gegen <i>green fluorescent protein</i> (GFP) und seine Derivate (600-301-215, Rockland, Gilbertsville, USA)
α -Hsp70 (N27F34)	monoklonales Maus-Antiserum gegen die <i>heat shock protein 70</i> Familie (ADI-SPA-820-D, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, USA)
α -Lamin A/C	monoklonales Maus-Antiserum gegen die N-terminale Domäne des Lamin A und seine Spleißvariante Lamin C (sc7292, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

α -c-Src (N-16)	polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen den N-Terminus von c-Src (sc-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
α -pY ⁴¹⁶ -Src	polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die an Tyrosin 416 phosphorylierte Form von c-Src und korrespondierender Tyrosine anderer <i>Src family kinases</i> (SFKs) (#2101, Cell Signaling, Beverly, USA)
α -STAT5A (L-20)	polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen ein Epitop innerhalb der C-terminalen Domäne des Transkriptionsfaktors STAT5A (sc-1081, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
α -STAT5A/B (5075)	polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen die C-terminale Domäne der Transkriptionsfaktoren STAT5A/B. Das Antiserum wurde freundlicherweise von Richard Moriggl (LBI, Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.
α -pY-STAT5A/B (Y ^{694/699})	monoklonales Kaninchen-Antiserum gegen die tyrosinphosphorylierte Form der Transkriptionsfaktoren STAT5A und STAT5B (#9351, Cell Signaling, Beverly, USA)
α -pY-STAT5A/B (Y ^{694/699})	monoklonales Kaninchen-Antiserum gegen die tyrosinphosphorylierte Form der Transkriptionsfaktoren STAT5A und STAT5B (#9314, Cell Signaling, Beverly, USA)

α -pY(99)	monoklonales Maus-Antiserum gegen Proteine in tyrosinphosphorylierter Form (sc-7020, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
Kaninchen- α -Ziege-IgG/HRP	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Ziege-Immunglobulins; Meerrettich-Peroxidase (HRP)- konjugiert (00045307, DAKO, Hamburg)
Ziege- α -Kaninchen-IgG/HRP	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Kaninchen-Immunglobulins; Meerrettich-Peroxidase (HRP)- konjugiert (00052233, DAKO, Hamburg)
Ziege- α -Maus-IgG/HRP	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Maus-Immunglobulins; Meerrettich-Peroxidase (HRP)- konjugiert (00058737, DAKO, Hamburg)
Esel- α -Kaninchen-IgG/Cy2	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Kaninchen-Immunglobulins; Cy2-konjugiert (Jackson Immuno Lab., USA)
Esel- α -Kaninchen-IgG/Cy3	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Kaninchen-Immunglobulins; Cy3-konjugiert (Jackson Immuno Lab., USA)

2.1.3 Plasmide

pcDNA3.1 [Ⓢ] (+)	Expressionsvektor (Invitrogen, Paisley, UK)
---------------------------	---

Setzt einkloniertes Zielgen unter die Kontrolle des humanen CMV (Cytomegalovirus)-Promotors, *Multiple Cloning Site (MCS)*, T7 Promotor, Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone (BGH-pA)*, f1 ori, Promotor des *simian vacuolating virus (SV40)*, Neomycin Resistenzgen, SV40-pA, β -Lactamase Promotor, Ampicillin Resistenzgen, pUC ori

pcDNA5/FRT/TO[®]

Expressionsvektor (Invitrogen, Paisley, UK)

Das Plasmid beinhaltet eine tetrazyklin-regulierte Expressionskassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor verfügt über ein Hygromycin-Resistenzgen in dessen 5'-kodierender Sequenz eine FRT (*Flp recombination target*) Stelle integriert ist. Dem Hygromycin-Resistenzgen fehlt der Promotor und das ATG-Startcodon. *MCS*, BGH-pA, SV40-Promotor, pUC ori, Ampicillin Resistenzgen, β -Lactamase Promotor

pcDNA5/FRT/TO[®]spezial

Siehe oben, jedoch wurde die MCS hinsichtlich ihrer Restriktionsschnittstellen verändert

pOG44

Expressionsvektor (Invitrogen, Paisley, UK)

CMV-Promotor, Flp (Rekombinase)-Gen, Ampicillin Resistenzgen, pUC ori

peYFP-N1

Expressionsvektor (Clontech, Mountain View, USA)

CMV-Promotor, *MCS*, eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*)-Gen, SV40-pA

peCFP-N1/C1

Expressionsvektor (Clontech, Mountain View, USA)

CMV Promotor, MCS, eCFP (*enhanced cyan fluorescent protein*)-Gen, SV40-pA

Plasmide	Insertion
pcDNA3.1 [®] (+)	v-Src-DsRed
pcDNA3.1 [®] (+)	v-Src(K295N)-DsRed
pcDNA3.1 [®] (+)	Δ N-v-Src-DsRed
pcDNA3.1 [®] (+)	STAT5A-eYFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT5A-eYFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT5A-eCFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT5A
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT5A-eCFP-NLS
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT5A(R618Q)-eYFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT5A(R618Q)-eCFP-NLS
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT3-eCFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	STAT3(R609Q)-eYFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	Hck-eYFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	Hck-eCFP
pEYFP-N1	Hck
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	Hck(K269N)-eCFP
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	Lyn-eCFP
pM	Lyn
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	BCR-Abl (p210)
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	FLT3-ITD-DsRed
pcDNA5/FRT/TO [®] spezial	OSMR
pCR(TM) ₃ -lacZ	β -Galaktosidase (Amersham Biosciences)
pGL3-t _k	β -Casein-Promotor vor Luziferase-cDNA
pMIEG	BCR-Abl (p210)

2.1.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen oder waren im Labor bereits vorhanden.

v- <i>Src</i> (K295N) s	5'-CCA GAG TGG CCA TAA ACA CTC TGA AGC CCG GCA C-3'
v- <i>Src</i> (K295N) as	5'-GTG CCG GGC TTC AGA GTG TTT ATG GCC ACT CTG G-3'
Δ N-v- <i>Src</i> KpnI s	5'-CAT CAT GGT ACC ATG GAC-3'
#1.67 dsRed as	5'-GATCTCGAAGTAGTG-3'
STAT5A(R618Q) s	5'-GGA CCT TCC TGC TGC AGT TCA GTG ACT CGG AAA TC-3'
STAT5A(R618Q) as	5'-GAT TTC CGA GTC ACT GAA CTG CAG CAG GAA GGT CC-3'
XhoI-Hck s	5'-CAT AAT CTC GAG GGG GCT GCC GAG CTG GGG-3'
Hck-AgeI as	5'-ATG ATG ACC GGT GCC GGC TGC TGT TGG TAC TGG C-3'
Hck(K295N) s	5'-CCA AGG TGG CAG TGA ACA CGA TGA AGC CAG GG-3'
Hck(K295N) as	5'-CCC TGG CTT CAT CGT GTT CAC TGC CAC CTT GG-3'
XhoI-Lyn s	5'-GCA GCT CGA GCC GGC ATG GGA TGT ATT AAA TCA AAA AGG-3'
Lyn-AgeI as	5'-GAT GAC CGG TGC CGC CGG TTG CTG CTG ATA CTG-3'

2.1.5 Zytokine

OSM
Humanes Oncostatin M wurde von der Firma Peptotech (London, UK) bezogen und in einer

Konzentration von 5ng/ml Medium für die Stimula-Stimulation von Zellen eingesetzt.

Epo	Humanes Erythropoetin wurde von der Firma Roche in einer Konzentration von 35 U/μl (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Stimulation von Zellen erfolgte mit einer Endkonzentration von 7 U/ml.
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> wurde von der Firma Peprotech (London, UK) bezogen und in einer Konzentration von 50 ng/ml Medium für die Stimulation von Zellen eingesetzt.
IFN-γ	Interferon-gamma wurde von der Firma ImmunoTools bezogen und in einer Konzentration von 25 ng/ml Medium für Zelleexperimente eingesetzt.

2.2 Allgemeine zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von prokaryotischen Zellen

Zur Vervielfältigung plasmidärer DNS wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (E. coli) JM83 verwendet. Für die zielgerichtete Mutagenese wurde der Bakterienstamm XL-10 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) eingesetzt. Rekombinante Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Nährböden mit Ampicillin-Zusatz (100 μg/ml) kultiviert. Zur Lagerung der Klonierungsprodukte wurden Stammkulturen mit 20% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

<u>JM83:</u>	F ⁻ ara Δ(lac-proAB) rpsL (Str ^r) [φ80 d lacΔ (lacZ) M15]
<u>XL-10:</u>	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]

<u>LB-Flüssigmedium:</u>	5 g/l	NaCl	
	5 g/l	Hefe-Extrakt	(Difco, Detroit, USA)
	10 g/l	Bactotrypton	(Difco, Detroit, USA)

LB-Nährboden: LB-Flüssigmedium mit 1,5% Bacto-Agar (w/v)

2.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

DMEM Flüssigmedium + L-Glutamin	(Gibco, Eggenstein)
DMEM/F12 Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
RPMI 1640 Medium	(Gibco, Eggenstein)
Nicht essenzielle As	(Gibco, Eggenstein)
FKS (fötales Kälberserum)	(Cytogen, Boulder, USA)
Penicillin/Streptomycin	(Lonza, Verviers, Belgien)
Trypsin (0.05%)/EDTA (0.02%)-Lösung	(Lonza, Verviers, Belgien)

<u>PBS (<i>phosphate buffered saline</i>):</u>	200 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7.4

Folgende Zelllinien wurden in dieser Studie genutzt:

HEK293T: Adhärent wachsende humane embryonale Nierenzellen, die im Vergleich zu ihrer Ursprungszelllinie HEK293 stabil das große T-Antigen von SV40 exprimieren. Kultivierung in DMEM-Medium + GlutaMAX™-I (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10%

fetalem Kälberserum (FKS) und 5% Penicillin/Streptomycin.

T-REx™-293

HEK293 Zelllinie, die stabil den Tetrazyklin Repressor exprimiert. In das Genom wurde sowohl das Blasticidin-, als auch das Zeocin-Resistenzgen integriert (R710-07, Invitrogen, Darmstadt). Kultivierung in DMEM-Medium mit 10% FKS und 5% Penicillin/Streptomycin. Enthält FRT-Sequenz zur Erzeugung stabiler Zelllinien.

MCF-7:

Adhärenz wachsende humane Brustkrebszellen. Kultivierung in DMEM/NUT-MIX-F12 + GlutaMAX™-I Flüssigmedium (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe). Zugewetzt wurden 10% FKS, 5% Penicillin/Streptomycin und 0,1 mM nicht essenzielle As (Gibco).

K562:

In Suspension wachsende chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie (A.T.C.C., USA). Kultivierung in RPMI 1640 Medium (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FKS und 5% Penicillin/Streptomycin.

Molm-13:

In Suspension wachsende akute myeloische Leukämie-Zelllinie (A.T.C.C., USA). Kultivierung in RPMI 1640 Medium (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FKS und 5% Penicillin/Streptomycin.

Primäre CML-Zellen:

Für den Adhäsionsfaktor CD34 positive, angereicherte Zellen eines frisch diagnostizierten CML-Patienten (Chronische Myeloische Leukämie) mit via PCR bestätigter BCR-ABL-Translokation. Aufgereinigt in der Medizinischen Klinik IV des UK Aachen nach gängigem Protokoll [186].

MEF STAT3^{-/-} Adhärent wachsende murine embryonale Fibroblasten, defizient für STAT3 (bezogen von V. Poli, Turin, Italien). Kultivierung in DMEM-Medium mit 10% FKS und 5% Penicillin/Streptomycin.

Die Zellen wurden in den angegebenen Medien mit Zusätzen kultiviert. Penicillin und Streptomycin wurden in einer Konzentration von 25.000 U/l zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und wassergesättigter Luft mit 5% CO₂-Gehalt. Adhärent wachsende Zellen wurden bei Konfluenz mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Gefäßböden gelöst. Die Zellen wurden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und in Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 auf neue Platten mit frischem Medium ausgesät.

Suspensionszellen wurden bei einer Dichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml Medium subkultiviert und 1:4 mit frischem Medium verdünnt ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml Medium).

Eine Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen erfolgte in Kulturmedium nach Zusatz von 10% DMSO und 20% FKS bei -150°C bzw. bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

2.2.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die transiente Transfektion wurden die HEK293T- (HEK-T) und die MCF-7-Zellen am Tag vor der Transfektion subkultiviert und ausgesät, so dass sie ca. 24 h später eine Konfluenz von 60-80% hatten. Als Transfektionsreagenz wurde entweder *TransIT*[®]-LT1 Transfektionsreagenz (KLN01511, Mirus, Madison, USA) oder für die MCF-7-Zellen FuGENE6 (Roche, Mannheim, Deutschland) genutzt.

Pro Transfektionsansatz wurden 3 µl Transfektionsreagenz pro 1 µg zu transfizierendes Plasmid und 200 µl OptiMEM (Gibco, Paisley, UK) zusammenpipettiert. Das OptiMEM wurde vorher auf 37°C vorgewärmt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h kultiviert. In Abhängigkeit des durchgeführten Versuches wurden die Zellen auf *6-well* Platten *gesplittet* und für weitere 24 h kultiviert.

Die Suspensionszelllinie K562 wurde mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Paisley, UK) transfiziert. Hierfür wurden die K562-Zellen gezählt, bei 200 x g für 5 min herunterzentrifugiert und in Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin aufgenommen, so dass ihre Zelldichte bei 5×10^5 Zellen/ml Medium lag. Zwei Ansätze wurden nun zusammenpipettiert. Der erste Ansatz bestand aus 100 µl OptiMEM und 2 µl Lipofectamine™ 2000/µg Plasmid-DNS. Der zweite Ansatz setzte sich aus 100 µl OptiMEM und der Plasmid-DNS zusammen. Es wurden 5 µg Plasmid-DNS verwendet. Die Ansätze wurden für 5 min inkubiert und im Anschluss zusammen pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min wurden die Transfektionsansätze in das Kulturmedium gegeben. Etwa 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für den jeweiligen Versuch verwendet.

2.2.4 Stabile Transfektion (*Flp-In*™ System®)

Die stabile Transfektion von induzierbaren T-REx™-293-Zellen wurde mit dem *Flp-In*™ System (Invitrogen, Paisley, UK) durchgeführt. In dieser Zelllinie ist der Vektor pcDNA6/TR bereits ins Genom integriert, was die konstitutive Expression des Tetrazyklin-Repressors und zugleich die Selektion mittels Blasticidin (Invitrogen, Paisley, UK) ermöglicht. Des Weiteren ist eine sogenannte FRT-Sequenz im Genom der T-REx™-293-Zellen integriert und ein Zeocin-Resistenz-Gen vorhanden. Die Expressionsvektoren pcDNA5/FRT/TO®spezial-STAT5A-eYFP bzw. pcDNA5/FRT/TO®spezial-BCR-Abl (p210) beinhalten ebenfalls eine FRT-Sequenz. Der Vektor pOG44 kodiert für die Flp-Rekombinase, welche die homologe Rekombination von FRT-Sequenzen katalysiert. Durch Kotransfektion der verschiedenen Vektoren mit pOG44 wurden die Konstrukte durch homologe Rekombination in die genomische FRT-Sequenz integriert. Dies resultierte in der Zerstörung des Zeocin-Resistenz-Gens, jedoch erhielten die Zellen eine Hygromycin-Resistenz. Die positiven Klone konnten durch Zugabe von 250 µg/ml Hygromycin B (PAA, Austria) und Blasticidin (15 µg/ml) ins Kulturmedium selektiert werden. Die stabilen Klone enthalten das *gene of interest*, welches unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-Operators (*TetO₂*) steht. Dies ermöglicht die Induktion der Expression des *gene of interest*. Das

konstitutiv exprimierte Repressorprotein (*tetR*) bindet spezifisch an der Operatorsequenz, wodurch die Transkription verhindert wird. Durch die Zugabe des Antibiotikums Doxyzyklin (*Tetrazyklin-Derivat*) erfährt das Repressorprotein eine Konformationsänderung, wodurch die Bindung an die Operatorsequenz verhindert und die Gentranskription, ausgehend vom CMV-Promotor, beginnen kann.

2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) dient der spezifischen Amplifikation von DNS-Abschnitten bzw. eines gesamten Plasmids, wie es bei der gerichteten Mutagenese der Fall ist. Das Prinzip der *PCR* ist die exponentielle Vermehrung eines spezifischen DNS-Abschnittes, welcher von zwei Oligonukleotiden (*primer*) flankiert wird. Das Produkt eines Reaktionszyklus kann in den nachfolgenden Reaktionsschritten erneut als Substrat der DNS-Polymerase fungieren. Der erste Schritt ist die Denaturierung der Matrizen-DNS bei 98°C. Die Temperatur wird nun abgesenkt, so dass kurze Oligonukleotide (*primer*) an die komplementären Stränge der einzelsträngigen Ziel-DNS (*Annealing*) binden können. Die betreffenden Oligonukleotide flankieren die zu amplifizierende DNS-Region, während ein *primer* an den kodierenden und der zweite *primer* an den nicht-kodierenden DNS-Strang bindet. Bei 72°C synthetisiert die thermostabile *Taq*-DNS-Polymerase unter Zusatz von Nukleotiden (*dNTPs*) und Mg^{2+} -Ionen, beginnend vom 3'-Ende der Oligonukleotide, einen neuen DNS-Strang komplementär zum Matrizenstrang durch den Einbau von Desoxyribonukleotiden (*Elongation*). Durch die Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte (Zyklen) wird der von den *primern* flankierte Abschnitt der Matrizen-DNS annähernd exponentiell amplifiziert.

Für die Durchführung der PCR-Reaktionen wurde das *Phusion High Fidelity PCR Kit* (Finnzymes, F-553S) benutzt.

Schema der PCR-Ansätze:

5x Phusion HF Buffer	10	μl
10 mM dNTPs	1	μl
10 pmol primer A	2,5	μl
10 pmol primer B	2,5	μl
5-10ng DNS-Matrize	x	μl
Phusion DNA Polymerase	0.5	μl

Thermo-Cycler Einstellungen:

98	°C	30	s	} 30 Zyklen
98	°C	10	s	
45-72	°C	10-30	s	
72	°C	15-30	s/kb	
72	°C	720	s	
4	°C	∞	s	

Die *Annealing*-Temperatur der *primer* wurde 5°C niedriger als der T_m -Wert gewählt, wobei der T_m -Wert die Temperatur angibt, bei der 50% der Oligonukleotide als Einzelstränge vorliegen. Die *PCR* wurde eingesetzt, um Restriktionsschnittstellen einzufügen, ganze Plasmide zu amplifizieren (siehe gerichtete Mutagenese) und das Vorhandensein von artifiziellen DNS-Molekülen in transformierten Bakterien (JM83) spezifisch nachzuweisen (*Mini-PCR*).

Hierzu wurden Klone von ampicillinhaltigen LB-Nährböden gepickt, in 10 μl H₂O resuspendiert und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Zu dem Ansatz wurden zur Durchführung der *PCR* 15 μl des Reaktionsgemisches pipettiert.

2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

10-20 μl der Ligationsansätze oder 5-10 ng Plasmid-DNS wurden mit 70 μl kompetenten Bakterien versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 90 s bei 42°C und anschließend wurden die Bakterien 2 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Nährböden mit 100mg/l Ampicillin zur Selektion ausgestrichen. Rekombinante Klone wuchsen im Brutschrank bei 37°C über Nacht zu Kolonien an, so dass sie anschließend analysiert werden konnten.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNS

Minipräparation:

Zur Analyse positiver Klone wurden 3 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin-Zusatz [100 mg/l] mit einzelnen Kolonien einer Transformationsplatte angeimpft. Die Kultur wuchs 6 h bzw. über Nacht schüttelnd bei 37°C an. Im Folgenden wurden die Zellen abzentrifugiert (13200 rpm, 1 min, RT) und aus dem Zellpellet die Plasmid-DNS mittels des *Qiaquick Plasmidpräparationskit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNS wurde in Chromatographie-Wasser (Merck) aufgenommen.

Maxipräparation:

Um größere Mengen an Plasmid-DNS zu gewinnen (Maxipräparation) wurden Übernachtskulturen rekombinanter Bakterien in LB-Flüssigmedium (250 ml) angesetzt. Das Medium wurde mit 100 mg/l Ampicillin versetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 15 min, 4°C) sedimentiert. Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgte mit Hilfe des *Qiaquick Plasmidpräparationskit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die DNS wurde in Chromatographie-Wasser (Merck) aufgenommen.

2.3.4 Konzentrationsbestimmung isolierter DNS

Zur Konzentrationsbestimmung des DNS-Gehalts einer Probe wurde die optische Dichte mittels eines UV-Spektrometers (NanoDrop, ThermoScientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Extinktion von $E_{260}=1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNS pro ml. Über die Messung der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm wurde der Reinheitsgrad der DNS-Probe bestimmt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} liegt bei reinen Präparationen im Bereich zwischen 1,8 und 2,0.

2.3.5 Restriktionsverdau von DNS

Die in dieser Arbeit durchgeführten Restriktionen von DNS erfolgten alle nach Herstellerangaben zu den jeweiligen Enzymen. Das Enzym wurde im 5-

fachen Überschuss eingesetzt und der Verdau bei angegebener Temperatur für 1 h bei analytischen und für 1,5 h bei präparativen Restriktionen inkubiert. Bei Restriktionen mit zwei Enzymen erfolgte dies nur im selben Ansatz, wenn Temperatur und Pufferbedingungen den Aktivitätsanforderungen der Restriktionsendonukleasen entsprachen. Sofern dies nicht der Fall war, wurden zwei Restriktionen nacheinander durchgeführt. Nach dem Verdau mit dem ersten Restriktionsenzym wurde der Ansatz auf ein Volumen von 200 µl mit Chromatographie-Wasser aufgefüllt. Durch die Zugabe von 5 µl 8 M LiCl, 200 µl Isopropanol (*absolut*), sowie 1 µl Glycogen (20 mg/ml Fermentas, Sankt Leon-Rot) wurde die DNS bei -20°C für 45 min gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (13200 rpm, 20 min, 4°C) wurde die sedimentierte DNS mit 70% Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (13200 rpm, 5 min, 4°C), getrocknet und in Chromatographie-Wasser aufgenommen. Sämtliche genutzten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Ipswich, USA) bezogen.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach einer *PCR* bzw. einem Restriktionsverdau bediente man sich der Methode der Agarose-Gelelektrophorese, um DNS-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. In einem elektrischen Gleichspannungsfeld migrieren die negativ geladenen DNS-Moleküle durch eine Agarose-Gelmatrix in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell. Die Proben wurden mit 10x DNS-Ladepuffer (Endkonzentration 1x) vermischt. Es wurden 1%-ige Agarosegele (Roth, Karlsruhe) in TAE-Laufpuffer verwendet. Den Agarosegelen wurde Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt (Endkonzentration: 20 µg/ml). EtBr interkaliert mit doppelsträngiger DNS und kann mit UV-Licht für die Detektion der DNS-Banden angeregt werden. Als Größenstandard wurde die 1 kB-Leiter (Invitrogen, Paisley, UK) verwendet.

<u>10x DNS-Ladepuffer:</u>	25 %	Ficoll 400.000
	0,4 %	Xylencyanolblau
	0,4 %	Bromphenolblau
<u>1x TAE-Laufpuffer:</u>	40 mM	Tris-Base

1	mM	EDTA
20	mM	Essigsäure

2.3.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die gewünschten DNS-Fragmente zu isolieren, wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte mit dem *QIAquick-Gel-Extraction-Kit* (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die DNS wurde in 30 µl Chromatographie-Wasser (Merck) aufgenommen.

2.3.8 DNS-Ligation

Zur Ligation doppelsträngiger DNS (*sticky end*) wurde T4-DNS-Ligase (#EL0016, 200 U/µl, Fermentas, St. Leon-Rot) in ATP-enthaltendem Ligationspuffer (Roche, Mannheim) verwendet. Pro Ansatz wurden 50 ng geschnittener Vektor und ein dreifacher bzw. fünffacher molarer Überschuss an zu inserierender DNS eingesetzt. Im Anschluss wurde der Ansatz 1 - 3 h bei RT inkubiert und in kompetente Bakterien transformiert.

2.3.9 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNS erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg). Es wurden 1 µg Plasmid-DNS eingesendet. Der DNS wurden entweder 1,5 µl spezifischer *primer* (10 pmol/µl) beigemischt oder die *primer* von MWG bezogen.

2.3.10 RNS-Isolation

K562 Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen ausplattiert und 24 bzw. 1 h mit 0,1 µM PP1 (Sigma) behandelt. RNS wurde aus den homogenisierten Lysaten mittels *RNeasy Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Es wurden ausschließlich RNase freie Materialien eingesetzt. Die RNS wurde in 30 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch über die OD₂₆₀ mit Hilfe des UV-Spektrometers (NanoDrop, ThermoScientific). Die RNS wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.11 Synthese von copy-DNS (cDNS) aus RNS

Die isolierte Gesamt-RNS wurde mit dem *Omniscript-RT-PCR-Kit* (Qiagen, Hilden) in cDNS umgeschrieben. Hierfür wurden 1 µg Gesamt-RNS in 10 µl RNase-freiem H₂O für 10 min bei 65 °C denaturiert. Es folgte die Zugabe von 10 µl des Reaktionsgemischs und anschließend die cDNS-Synthese für 1 h bei 37 °C. Die cDNS wurde bei 4 °C gelagert.

<u>Reaktionsgemisch (1x):</u>	2 µl	10x Reverse Transkriptase Puffer
	2 µl	dNTP Mix (5 mM)
	2 µl	random primer
	1 µl	Omniscript Reverse Transkriptase
	3 µl	RNase freies H ₂ O

2.3.12 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die Expression spezifischer Gene quantifizieren zu können, wurde die quantitative *Real-Time-PCR* angewendet, die auf dem Mechanismus der herkömmlichen *PCR* basiert. Die Quantifizierung erfolgt hierbei über die Messung der Fluoreszenz. Diese nimmt in Abhängigkeit des spezifisch amplifizierten *PCR*-Produkts proportional in jedem Zyklus

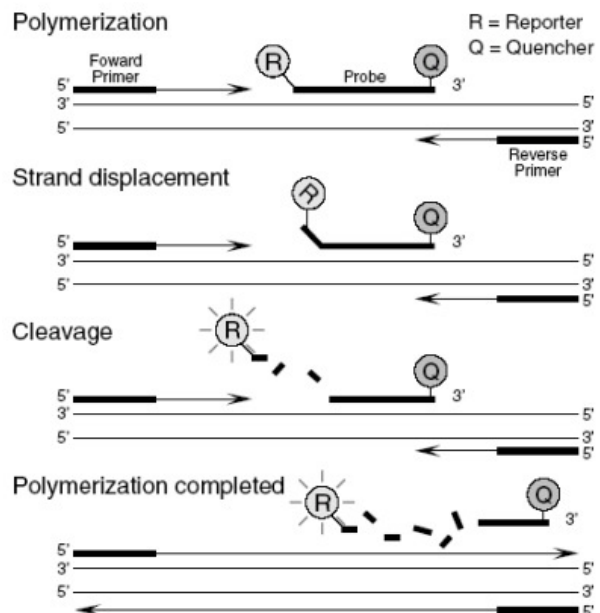


Abb. 7: Schematische Darstellung der qRT-PCR

zu. Die Fluoreszenzmessungen wurden ausschließlich in der exponentiellen Phase der *PCR* ausgewertet, in der die Reaktionsbedingungen optimal sind. Die *qRT-PCR* wurde mit einer TaqMan[®]-Sonde (Hs01003603_m1; Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt, die mit dem humanen

CIS1-Gen (*cytokine inducible SH2-containing protein*) hybridisiert. Die Sonde ist am 5`-Ende kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM-Phosphoramidit (*Reporter*) verknüpft, welcher mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm angeregt wird und langwelligeres Licht ($\lambda = 518$ nm) emittiert. Das 3`-Ende der Sonde ist kovalent mit einem nicht fluoreszierenden Quencher (Q) versehen (Abb.7).

Während der PCR hybridisieren die *forward* und *reverse primer* (Hs01003603_m1; Applied Biosystems, Foster City, USA), sowie die Sonde (*TaqMan probe*) spezifisch mit der komplementären cDNS. Solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe befinden, wird die Fluoreszenz des Reporters durch FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) verhindert. Die im *qPCR Mastermix-plus* (RT-QP2X-03-0757, Eurogentec) enthaltene DNS-Polymerase (*Hot start DNA polymerase*) beginnt die Synthese des komplementären DNS-Stranges an Hand der cDNS-Matrize an den freien 3`-Enden der hybridisierten *primer*. Das Enzym besitzt neben der für die Synthese entscheidenden 5`→3` Polymeraseaktivität auch eine 5`→3` Exonukleaseaktivität, wodurch die hybridisierte Sonde bei der Synthese des komplementären DNS-Stranges von ihrem 5`-Ende her abgebaut wird. Hierdurch werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt, wodurch nun der *Reporter* Licht emittiert.

Als interner Standard wurde eine Sonde spezifisch für die cDNS des konstitutiv transkribierten humanen Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (hHPRT1, Hs99999909_m1, Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Die *qRT-PCR* wurde in einem *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Quantifizierung anhand der Fluoreszenzsignale erfolgte über die Bestimmung der Zyklenzahl (Ct-Werte), bei der das Fluoreszenzsignal der Probe die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Ct-Werte der Messung des hCIS1-Gens wurden mit den Ct-Werten der Messung des hHPRT1-Gens normalisiert und anschließend nach Pfaffl ausgewertet [187]. Für die Auswertung wurden jeweils Dreifachmessungen (*Triplikate*) bzw. Zweifachmessungen (Dublikate) durchgeführt.

<u>Reaktionsgemisch (1x):</u>	10 μ l	<i>qPCR Mastermix plus</i>
	7 μ l	H ₂ O

	1	μl	TaqMan [®] -Sonde (hCIS1, hHPRT1)
	2	μl	cDNS (5 ng/μl)
<u>PCR-Programm:</u>	50	°C	120 s
	95	°C	600 s
	95	°C	95 s
	60	°C	60 s
			} 40 Zyklen

2.3.13 Klonierung verwendeter Expressionsvektoren

STAT5A sollte mit einer NLS (*Nuclear Localization Sequence*) ausgestattet werden. Hierfür wurden zwei Oligonukleotide (*sense/antisense*) geordert, die für die Aminosäuresequenz PKKKRKV kodierten und von den Restriktionsschnittstellen KpnI und NotI flankiert waren. Diese Peptidsequenz repräsentiert die NLS des großen T-Antigens aus dem SV40-Virus. Die Nukleotide wurden hybridisiert und mit KpnI und NotI geschnitten. Der Vektor pECFP-C1 wurde mit den Enzymen AgeI und KpnI restringiert. Außerdem wurde der Vektor pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A-eCFP mit AgeI und NotI verdaut. Nach der Auftrennung der Fragmente im Agarosegel und der Gelextraktion wurden die isolierten Fragmente ligiert. Das Resultat war der Vektor pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A-eCFP-NLS.

Für die Klonierung des Plasmids pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-FLT3-ITD-DsRed wurde aus dem Ursprungsvektor pEGFP-N1-FLT3-ITD mit den Enzymen HindIII und AgeI die cDNA von FLT3-ITD ausgeschnitten. Der Vektor pcDNA5/FRT/TO[®]spezial wurde mit HindIII und NotI verdaut und isoliert. DsRed wurde aus dem Plasmid pcDNA3.1[®](+)-v-Src-DsRed, der mit AgeI und NotI verdaut wurde, isoliert. Eine Ligation mit drei Fragmenten wurde durchgeführt.

Um den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A(R618Q)-eCFP-NLS zu erhalten, wurde pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A(R618Q)-eYFP mit den Restriktionsenzymen NsiI und AgeI verdaut und das die Punktmutation enthaltende Fragment aufgereinigt. Der Vektor pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A-eCFP-NLS wurde mit denselben Enzymen geschnitten und das Vektor-Fragment isoliert. Diese zwei Fragmente wurden zu einem funktionsfähigen Vektor zusammenligiert.

Die cDNA für Δ N-v-Src wurde mittels *PCR* mit entsprechenden *Primern* (Δ N-v-Src KpnI s + #1.67 dsRed as; Kap. 2.1.4) aus dem Plasmid pcDNA3.1[⊕](+)-v-Src-DsRed amplifiziert und anstatt der DNS-Sequenz für v-Src in den pcDNA3.1[⊕](+)-DsRed Vektor einkloniert.

Für die Konstruktion des Vektors pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial-Hck-eCFP bzw. -eYFP wurde mittels *PCR* und mit Hilfe der angegebenen *primer* (2.1.4 Oligonukleotide) das Fragment XhoI-Hck-Agel aus dem Ursprungsvektor pEYFP-N1-Hck amplifiziert. Anschließend wurde das Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt und mit den Enzymen XhoI und Agel verdaut. Der Leervektor pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial wurde mit den Enzymen XhoI und NotI verdaut und isoliert. Aus den Leervektoren pEYFP-N1 bzw. pECFP-N1 wurden die DNS-Sequenzen der Fluorophore durch Verdau mit den Enzymen Agel und NotI gewonnen. Die drei erhaltenen Fragmente (eYFP oder eCFP) wurden mit einer Dreifragmentligation zu funktionellen Expressionsvektoren zusammengefügt.

Der Vektor pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial-Lyn-eCFP wurde analog zu den Hck-Konstrukten hergestellt. Ursprungsvektor für die *PCR* mit den *primern* XhoI-Lyn s und Lyn-Agel as war pM-Lyn.

BCR-Abl (p210) wurde über Zwischenprodukte aus dem Ursprungsvektor pMIEG-BCR-Abl (p210) in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial, flankiert von den Enzymen XhoI und NotI, einkloniert.

Sämtliche weiteren benutzten Vektoren waren bei Beginn dieser Arbeit im Labor bereits vorhanden.

2.3.14 Zielgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe des *QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) wurden Punktmutationen in die STAT5A-Konstrukte und das v-Src-Konstrukt eingeführt. Das Plasmid pcDNA3-v-Src-DsRed diente als DNS-Matrize für die Generierung des Konstrukts pcDNA3-v-Src(K295N)-DsRed. Für die Herstellung des Konstrukts pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial-STAT5A(R618Q)-eYFP diente als Matrize das Plasmid pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial-STAT5A-eYFP. Des Weiteren wurde das Konstrukt pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial-Hck(K295N)-eCFP generiert, wobei pcDNA5/FRT/TO[⊕]spezial-Hck-eCFP als Ursprungsplasmid genutzt

wurde. Für die beschriebenen Punktmutanten wurden die oben aufgeführten *primer* (*sense/antisense*; Kap. 2.1.4) verwendet. Die Mutagenese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wurde die Transformation lediglich mit den *PCR*-Ansätzen durchgeführt, bei denen 10 bzw. 20 ng Matrizen-DNS eingesetzt wurden.

<u>Reaktionsgemisch (1x):</u>	5	µl	10x <i>PfuUltra</i> -Puffer
	1,1	µl	<i>sense primer</i> (10 pmol/µl)
	1,1	µl	<i>antisense primer</i> (10 pmol/µl)
	1	µl	<i>dNTP-Mix</i>
	3	µl	<i>QuickSolution</i>
	1	µl	<i>PfuUltra</i> -Polymerase (2,5 U/µl)
	1	µl	DNS-Matrize (10 ng/µl)

Die Ansätze wurden auf ein Volumen von 50 µl mit ddH₂O aufgefüllt.

<u>PCR-Programm:</u>	95	°C	60	s	} 18 Zyklen
	95	°C	50	s	
	60	°C	50	s	
	68	°C	480	s	
	68	°C	420	s	
	4	°C	∞		

Nach Ablauf der *PCR* wurde ein DpnI-Verdau (*QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit*, #200517-5, Stratagene, Lost Pines, USA) durchgeführt, um die parentale DNS-Matrize zu schneiden. Die durch die *PCR* synthetisierten Nukleinsäuren verfügen über keine Adenin-methylierungen, so dass nur die parentale DNS geschnitten wird. Die Transformation der Plasmide erfolgte nach Herstellerangaben, jedoch wurde nach dem Hitzeschock LB-Flüssigmedium zur Kultivierung der Bakterien eingesetzt. Von allen positiven Klonen wurden Glyceroldauerkulturen angelegt. Die Vektoren wurden mittels Maxipräparation isoliert und um den Erfolg der gerichteten Mutagenese zu überprüfen, wurden Proben zur Sequenzierung geschickt.

2.3.15 Reporter-gen-Assay

Die genregulatorischen Eigenschaften des Fusionsproteins STAT5A-eCFP wurden über ein β -Casein-luc-Konstrukt analysiert. Hierbei handelt es sich um ein Konstrukt, bei dem die kodierende Sequenz der Luciferase dem Promotor des β -Casein-Gens nachgestellt ist. β -Casein ist ein Zielgen von STAT5. Die Expression der Luciferase kann mit Hilfe des *Luciferase-Assay-Systems* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben im Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen werden.

HEK293T-Zellen wurden mit dem Vektor pGL3-t_k- β -Casein-luc (2 μ g), dem Kontrollvektor pCR(TM)₃-lacZ (2 μ g), der die Expression der β -Galactosidase steuert und versuchsabhängig mit weiteren Plasmiden transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen auf 6-well-Platten subkultiviert. Weitere 24 h später wurden die Zellen für ca. 6 h mit 25 ng IFN- γ /ml Medium stimuliert, zweimal mit PBS gewaschen und in 300 μ l 1x Reporter-Lysis-Puffer aufgeschlossen. Hierfür wurde der 5x Reporter-Lysis-Puffer mit ddH₂O auf 1x verdünnt. Außerdem wurden dem Puffer 100 μ l DTT auf 10 ml Puffer frisch hinzugefügt.

Die Zellen wurden abgeschabt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 30 min auf Eis inkubiert, kurz gevortext und bei 4°C herunterzentrifugiert (2 min, 13200 x g). Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

Für den Luciferase-Assay wurden 10 μ l Lysat mit 50 μ l Luciferase-Substrat gemischt und die Proben mit dem Luminometer gemessen. Um Schwankungen in der Transfektionseffizienz miteinzubeziehen, wurde die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Hierfür wurden 100 μ l der Zelllysate mit 500 μ l β -GAL-Mix und 100 μ l ONPG gemischt. Als Referenz diente ein Ansatz, der 100 μ l Lysispuffer anstatt des Zelllysats enthielt. Die Reaktion wurde nach 5-10 min bei 37°C mit 250 μ l 1 M Na-Carbonat pro Probe gestoppt. Der Umsatz von Ortho-Nitrophenyl-galactopyranosid (ONPG) zu Ortho-Nitrophenol konnte nun bei OD_{420nm} gemessen werden.

<u>5x Reporterlysispuffer:</u>	25	mM	Tris/H ₃ PO ₄ , pH 7,8
	2	mM	EDTA
	10	%	Glycerin
	1	%	Triton X-100
<u>β-GAL-Mix:</u>	60	mM	Na ₂ HPO ₄
	40	mM	NaH ₂ PO ₄

	1 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	3,9 ml/l	β-Mercaptoethanol
<u>ONPG:</u>	1 mg/ml	2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid

2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C und mit entsprechend vorgekühlten Puffern ausgeführt. Die zu lysierenden adhären Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 100-250 µl RIPA-Lysepuffer auf die Zellen pipettiert. Dann wurden die Zellen abgeschabt und in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte 30 min auf Eis. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (13200 rpm, 10 min, 4°C) sedimentiert und der Überstand für die nachfolgenden Experimente abgenommen. Die Zelllysate wurden bei -20°C gelagert.

Suspensionszellen wurden bei 200 x g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in PBS aufgenommen. Der Waschschrift mit PBS wurde dreimalig wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet in 100-200 µl Ripa-Lysepuffer aufgenommen.

Sollten Lysate für Immunpräzipitationen hergestellt werden, wurden die Zellen in 500 µl Frackelton-Puffer lysiert. Lysate für die *BN-Page* wurden in 200 µl *NativePAGE™ Sample Buffer* (1X) + 2% Digitonin hergestellt.

<u>RIPA-Lysepuffer:</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,5 %	Nonidet P-40
	1 mM	NaF
	15 %	Glycerol
<u>Frackelton-Puffer:</u>	10 mM	Hepes, pH 7,5
	30 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
	50 mM	NaCl
	50 mM	NaF
	5 µM	ZnCl ₂

Der Puffer wurde auf pH 7,1 eingestellt und folgendes hinzugefügt:

0,2	%	Triton X-100
10	%	Glycerol

Protease-Inhibitoren wurden den verwendeten Lysepuffern jeweils frisch zugesetzt und setzten sich entweder zusammen aus,

1	mM	Na ₃ VO ₄
0,5	mM	EDTA
0,25	mM	PMSF
2	µg/ml	Aprotinin (A1153-25, Sigma, St. Louis, USA)
1	µg/ml	Leupeptin (L2884, Sigma, St. Louis, USA)

oder wurden von der Firma Thermo Scientific (Oberhausen) als Fertiglösungen geordert und eingesetzt:

0,01	Vol.	<i>HaltTM Phosphatase Inhibitor (#LC142945)</i>
0,01	Vol.	<i>HaltTM Protease Inhibitor (#LD1273844)</i>

2.4.2 Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung

Der quantitative Nachweis von Proteinen in wässriger Lösung erfolgte über ein kolorimetrisches Messverfahren nach Bradford. Das Prinzip des Bradford-Tests basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant-Blau G-250 von $\lambda = 465$ nm nach $\lambda = 595$ nm in proteingebundener Form. Die Protein-induzierte Erhöhung der Absorption einer Coomassie-Lösung ist direkt proportional zum Proteingehalt der Lösung.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Bradford-Reagenzlösung (BioRad, München) 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde mit 10 µl der Proteinprobe gemischt. Nach wenigen Minuten haben sich die Farbstoff-Protein-Komplexe ausgebildet, die für etwa 1 h stabil sind. Die Extinktion der Lösung wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert photometrisch ermittelt. Als Referenz der gemessenen Proteinkonzentration

diente eine Eichkurve, welche für BSA ermittelt wurde. Eine Extinktion von 1.0 bei $\lambda = 595$ nm entspricht einer Proteinkonzentration von 18 $\mu\text{g/ml}$.

2.4.3 Immunpräzipitation (IP)

Die (Ko-)Immunpräzipitation wurde angewendet um Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen. Hierbei bediente man sich der Eigenschaften des an Sepharose gekoppelten Protein A, welches ein Bestandteil der Zellwand von bestimmten Streptokokken-Stämmen (*Staphylococcus aureus*) ist. Protein A bindet mit hoher Spezifität an die Fc-Region vieler Säugetier-Immunglobuline. Da es nur an die Fc-Regionen bindet, ist die Fab-Region frei für Antigenbindungen. Durch Zentrifugation und Waschschrte können nun die Immunkomplexe isoliert und durch *SDS-PAGE* und *Western Blot* analysiert werden.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und benötigte Puffer bei 4 °C vorgekühlt. Zunächst wurden 2 mg Protein A Sepharose (Protein A Sepharose™ CL-4B, GE Healthcare, Dornstadt) pro IP-Ansatz abgewogen, 15 min in PBS quellen gelassen, bei 2000 rpm für 2 min herunterzentrifugiert und abermals in PBS aufgenommen. Pro Ansatz wurden 2 μl Kaninchen- α -Maus-IgG hinzugegeben und 2 h über Kopf schüttelnd inkubiert. Dieser Zwischenschritt war notwendig, da Protein A Sepharose keine optimale Bindung an Maus-IgG aufweist. Die Sepharose wurde nun dreimal mit PBS gewaschen, 2 μl anti-GFP Antikörper (Rockland, 600-301-215) pro Ansatz hinzupipettiert und für 5 h bzw. über Nacht über Kopf schüttelnd bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Protein A Sepharose-Antikörper-Mischung dreimal gewaschen und in 100 μl PBS/IP-Ansatz aufgenommen. Den Zelllysaten mit einem Proteingehalt von 200 μg wurden jeweils 100 μl der Protein A Sepharose-Antikörper-Mischung hinzugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C kopfüber schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die IP-Ansätze dreimalig mit PBS gewaschen, in 15 μl PBS + 5 μl 4x Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Präzipitate wurden nun durch *SDS-PAGE* und *Western Blot* analysiert.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese nach Laemmli wurde durchgeführt um unter denaturierenden Bedingungen Proteine elektrophoretisch aufzutrennen. Die SDS-PAGE wurde in einer vertikalen Flachgelkammer durchgeführt. Die jeweiligen Proben wurden in reduzierendem 4x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 min denaturiert. SDS ist ein anionisches Detergenz, das mit dem apolaren Peptidrückgrat der Proteine interagiert. Hierdurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass die Nettoladung der Makromoleküle stark negativ wird, was die gleichmäßige Auftrennung über ein Polyacrylamid-Gel ermöglicht. Die Elektrophorese wurde in der Regel mit 20 µg Gesamtprotein und einer Stromstärke von 35 mA bei RT durchgeführt. Folgende Puffer wurden für die SDS-PAGE genutzt:

<u>Trenngel:</u>	10	%	Acrylamid
	375	mM	Tris/HCl, pH 8,8
	0,1	%	SDS
	0,02	%	TEMED
	0,1	%	APS
<u>Sammelgel:</u>	5	%	Acrylamid
	125	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	0,1	%	SDS
	0,02	%	TEMED
	0,1	%	APS
<u>SDS-Laufpuffer:</u>	1,5	%	Tris-Base, pH 8,3
	7,2	%	Glycin
	0,5	%	SDS
<u>4x Laemmli-Probenpuffer:</u>	40	%	Glycerin
	8	%	SDS
	250	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4	%	Bromphenolblau
	20	%	β-Mercaptoethanol

2.4.5 Western Blot und Immundetektion

Die durch die SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels einer semi-trockenen Elektroblobmethode auf eine PVDF-Membran (PALL, Dreieich) transferiert ($I = 45 \text{ mA}$). Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch in Methanol equilibriert. Um unspezifische Bindungen zu unterdrücken, wurde die Membran anschließend 45 min in Blockierungslösung blockiert. Die Membran wurde im Anschluss mit TBS-N gewaschen und unter gleichmäßigem Schwenken mit der jeweiligen Antikörperlösung (meist 1:1000 in TBS-N) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nun wurde die Membran zweimal für je 10 min mit TBS-N gewaschen und mit der entsprechenden Lösung eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers (1:2000 in TBS-N) behandelt. Die entstandenen Immunkomplexe konnten mit Hilfe des *ECL*-Detektionssystems (ImmobilonTMWestern, Millipore, Billerica, USA) auf der PVDF-Membran mittels eines LAS-4000 mini (Fujifilm, Edison, USA) visualisiert werden.

<u>Anodenpuffer I:</u>	300	mM	Tris-Base, pH 10,4
	20	%	Methanol
<u>Anodenpuffer II:</u>	25	mM	Tris-Base, pH 10,4
	20	%	Methanol
<u>Kathodenpuffer:</u>	400	mM	6-Aminohexansäure
	20	%	Methanol
<u>TBS-N:</u>	20	mM	Tris/HCl, pH 7,4
	137	mM	NaCl
	0,1	%	Nonidet P-40
<u>Blockierungslösung:</u>	10	%	Rinderserumalbumin (w/v)
	1	x	TBS-N
<u>ECL-Lösung:</u>	1	Vol.	<i>HRP Substrate Luminol Reagent</i>
	1	Vol.	<i>HRP Substrate Peroxide Solution</i>

Um eine Gegenfärbung durchzuführen, wurde die PVDF-Membran in *Stripping*-Puffer gelegt und für 25 min bei 70°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte über jeweils 15 min. Dann wurde die Membran erneut in 10%-

iger Blockierungslösung inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden, wie oben beschrieben, hergestellt.

<u>Stripping-Puffer:</u>	2	%	SDS
	62,5	mM	Tris/HCl, pH 6,7

Frisch hinzupipettiert: 78 µl β-Mercaptoethanol/10 ml *Stripping-Puffer*

2.4.6 **Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)**

Um native Proteine bzw. Proteinkomplexe unter nicht-denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch auftrennen zu können, wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant-Blau G-250 benutzt. G-250 interagiert mit den Proteinen (Proteinkomplexen) und maskiert ihre Eigenladung, so dass überwiegend eine negative Ladung vorliegt. Die dreidimensionale Konformation der Makromoleküle wird durch die Coomassie-Anlagerung nur in geringem Maße gestört, wodurch die Separation von nativen Proteinen und Proteinkomplexen ermöglicht wird. Die Migration der Protein-/Farbstoffkomplexe in der Gelmatrix ist abhängig vom Molekulargewicht der Proteine und geringfügig von der Menge des angelagerten Coomassie-Farbstoffes. Zur elektrophoretischen Auftrennung von nativen Proteinen und Proteinkomplexen unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde das *NativePAGE™ Novex® Bis-Tris* Gelsystem der Firma Invitrogen (BN1004BOX, Paisley, UK) genutzt. Die Elektrophorese wurde mit dem *XCell SureLock™ MiniCell*-System der Firma Invitrogen (EI0002, Paisley, UK) durchgeführt. Die Elektrophorese wurde nach Herstellerangaben in einem 4-16%-igen Gradientengel durchgeführt. Die eingesetzten Zelllysate wurden in 1x *NativePAGE™ Sample Buffer* (BN2003, Invitrogen) hergestellt. Digitonin (D141-100MG, Sigma, St. Louis, USA) wurde als mildes Detergenz in einer finalen Konzentration von 2% hinzugefügt. Es wurden 30 µg Gesamtprotein mit 0,5 µl *NativePAGE™ 5%-igem G-250 Sample Additive* (BN2004, Invitrogen) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 50 V und einer Temperatur von 4°C über Nacht durchgeführt. Die Detektion der Proteine und Proteinkomplexe wurde mit dem *Fluoreszenz-Scanner Typhoon-9410* der Firma GE Healthcare (Dornstadt) durchgeführt. Da die zu analysierenden Transkriptionsfaktoren

mit eYFP fusioniert waren, konnten die Fluorophore im Gel entsprechend angeregt und detektiert werden. Folgende Einstellungen wurden gewählt:

<i>Typhoon-Settings:</i> Anregungslaser	$\lambda = 532 \text{ nm}$
Emissionsfilter	$\lambda = 526 \text{ nm short pass (SP)}$ <i>Fluorescein</i>
PMT	$U = 600 \text{ V}$
<i>Sensitivity</i>	normal
<i>Pixel size</i>	200 microns

2.5 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

2.5.1 Grundlagen

Das konfokale Laser Scanning Mikroskop (LSM) hat sich in den letzten Jahren zu einem etablierten Forschungsinstrument entwickelt. Durch die Nutzung des Mikroskops Zeiss LSM 710 ist es möglich verschiedene Fluorophore mit

bestimmten

Wellenlängen anzuregen

und das emittierte Licht durch einen

Sekundärelektronenvervielfacher oder

Photomultiplier (PMT) zu detektieren. Dies wird durch eine Anordnung

von Spiegeln und Filtern ermöglicht (Abb. 11). Der Hauptfarbteiler

(HFT) oder *multiple beam splitter* (MBS) lenkt das

Anregungslicht auf das Präparat und lässt gleich-zeitig emittiertes Licht zum Detektor passieren.

Zusätzlich werden durch frei variierbare Filter nur bestimmte

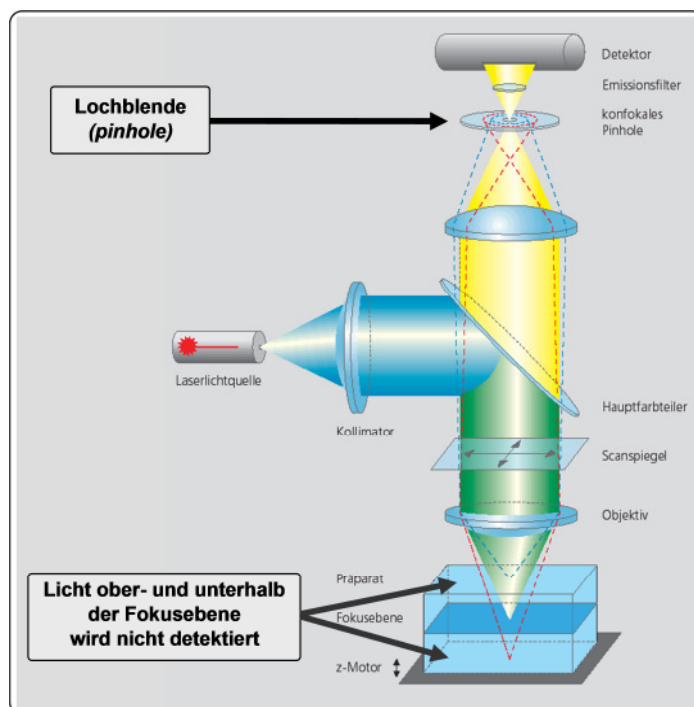


Abb. 8 Schematischer Strahlengang eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops

Emissionswellenlängen durchgelassen, die dann den Detektor erreichen. Das Laser Scanning Mikroskop LSM 710 bietet die Möglichkeit, die Fluoreszenzen verschiedener Fluorophore zeitnah in getrennten Kanälen zu messen. Im Vergleich zu einem konventionellen Mikroskop werden die Objektpunkte nicht gleichzeitig (parallel) aufgenommen und in ein Bild umgewandelt. Stattdessen ermöglicht der Laser die punktgenaue Anregung (seriell) in einem Bildfeld. Daher wird das konfokale Mikroskop auch als Punktscanner bezeichnet. Aus den Detektionen einzelner Bildpunkte (*pixel*) wird im Computer eine Gesamtaufnahme errechnet, welche dann als eigentliches „Bild“ dargestellt wird. Es sind Bildaufnahmen mit einer Auflösung zwischen 256 x 256 bis 2046 x 2046 Bildpunkten möglich. Ein entscheidender Unterschied der konfokalen LSM zur konventionellen Lichtmikroskopie ist die Nutzung einer Lochblende (*pinhole*) vor dem Detektor, so dass nur Licht aus einer bestimmten Fokusebene auf den Detektor fällt (Abb. 8). Durch die Variabilität des Blendendurchmessers ist es möglich, den Grad der Konfokalität zu variieren. Je kleiner das *pinhole*, desto dünner ist die Schichtdicke. Die Schichtdicke wird allerdings auch durch die Abstrahlungswellenlänge limitiert. Ein zusätzlicher Vorteil der konfokalen Blende ist ihre streulichtunterdrückende Wirkung, was zu einer Steigerung des Kontrasts führt.

2.5.2 Fixierung von Zellen für die Fluoreszenz-Mikroskopie

Um adhärente Zellen und Suspensionszellen für die Fluoreszenz-Mikroskopie zu fixieren, wurden die Zellen auf Deckgläser (\varnothing 18mm *cover slips*) ausplattiert, die sich in 12-*well*-Platten befanden. Zuvor wurden die Deckgläser mit 0,01% (w/v) Poly-L-Lysin für 30 min *gecoatet*. Nach 24 h wurden die Zellen, abhängig vom jeweiligen Versuch, mit Expressionsvektoren transient transfiziert und weitere 24 h kultiviert. Handelte es sich um T-REx™-293-Zellen, die nach Induktion STAT5A-eYFP exprimierten, wurde 16 h vor der Fixierung 5 ng/ml Medium Doxzyclin auf die Zellen gegeben. Sollte in T-REx™-293-Zellen die BCR-Abl (p210)-Expression induziert werden, wurde 6 h vor der Fixierung mit 8 ng/ml Medium Doxzyclin gearbeitet.

Die Zellen wurden 2 x mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 500 µl Methanol pro *well* für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Um Aldehydgruppen abzusättigen und somit die Hintergrundfluoreszenz abzuschwächen, wurden die Zellen mit 1 ml NH₄Cl (50 mM) in PBS⁺⁺ für 5 min inkubiert, was als *quenchen* bezeichnet wird. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS⁺⁺ wurden die *cover slips* in Wasser getaucht, abgetupft und auf einen Tropfen *Immu-Mount* (9990402, Thermo Scientific, Oberhausen) auf den Objektträgern gelegt. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser am Rand mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln gelagert, um das Ausbleichen zu verhindern.

<u>PBS⁺⁺</u> :	1 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	CaCl ₂
	in PBS	

2.5.3 Immunfluoreszenzen

Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, kultiviert und auf *gecoateten* Deckgläsern ausplattiert. Für die Fixierung wurden pro *well* 500 µl Methanol auf die Zellen gegeben und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS⁺⁺ gewaschen und für 5 min mit PBS^{T++} permeabilisiert. Die Zellen wurden in 1 ml NH₄Cl (50 mM) in PBS^{T++} für 5 min inkubiert. Es schloss sich ein Waschschrift mit PBS^{T++} an. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mit 1% BSA in PBS^{T++} für 60 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu unterdrücken. Der spezifische primäre Antikörper wurde 1:100 bzw. 1:200 in 0,2%-igem BSA/PBS^{T++} verdünnt, in einer Feuchtkammer auf Parafilm getropft (ca. 40 µl) und die Deckgläser für 45 min auf den Tropfen gelegt. Dann wurden sie 3 x in 0,2% BSA/PBS^{T++} gedippt und abgetupft, bevor sie auf den Cy2- bzw. Cy3-konjugierten sekundären Antikörper (1:100 in 0,2% BSA/PBS^{T++}) gelegt und für 45 min inkubiert wurden. Die Deckgläser wurden nun 2-3x in Wasser gedippt und auf einen Tropfen ImmuMount (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA), der auf einem Objektträger vorgelegt wurde, gebettet. Im Falle der K562-Zellen wurde dem sekundären Antikörper der nukleäre

	MBS_InVis:	MBS 405 nm
	UV-Diode:	1%
<u>eYFP:</u>	Anregung:	514 nm
	MBS:	458/514 nm
	Argon-Laser:	2%
<u>DsRed/Cy3:</u>	Anregung:	561 nm
	MBS:	488/561 nm
	DPSS 561-10-Laser:	2%
<u>Cy2:</u>	Anregung:	488 nm
	MBS:	488/561/633 nm
	Argon-Laser:	2%
<u>DRAQ5:</u>	Anregung:	633 nm
	MBS:	488/561/633 nm
	HeNe633:	2%

Für alle Aufnahmen wurde das *pinhole* auf 1 AU eingestellt und eine Auflösung von 1024 x 1024 *pixel* (12-bit) gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der STAT5A-Fusionsproteine

In dieser Arbeit lag ein Schwerpunkt auf der konfokalen Mikroskopie und der Verwendung von fluoreszierenden Fusionsproteinen. Die Funktionalität der Fusionsproteine, in denen eCFP bzw. eYFP an den C-Terminus von STAT5A kloniert wurde, sollte validiert werden. Die Phosphorylierung des Tyrosins der AS-Position 694 (Y694) von STAT5A, welches essenziell für die Dimerisierung des Transkriptionsfaktors und die Induktion der Zielgenexpression ist, wurde in einer Stimulations-Zeitreihe nachgewiesen. Hierfür wurden HEK293T-Zellen transient mit STAT5A-eYFP bzw. unmarkiertem STAT5A transfiziert, über unterschiedliche Zeitspannen mit IFN- γ stimuliert und Lysate hergestellt. Die Untersuchung der Phosphorylierungskinetik wurde mittels *SDS-PAGE*, anschließend *Western Blot* und Immundetektionen durchgeführt.

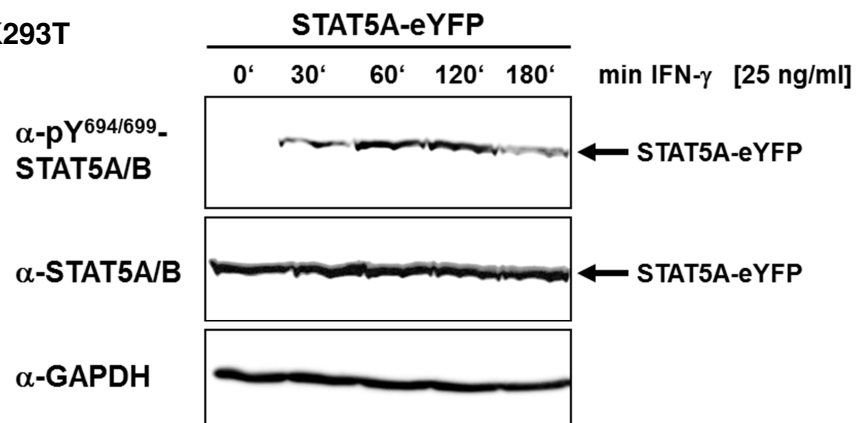
Die IFN- γ -Stimulation führte zur Phosphorylierung von STAT5A-eYFP (oben) und *ungetaggetem* STAT5A (unten) an Y694 (Abb. 9A, B). Die durch Chemilumineszenz auf der Membran sichtbar gemachten Banden von STAT5A-eYFP erschienen auf einer Höhe von ca. 120 kDa, wobei nicht markiertes STAT5A eine Größe von 94 kDa aufweist. Die Expression von endogenem STAT5A bzw. STAT5B konnte in HEK293T-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Nach 30 minütiger Stimulation der Zellen konnte eindeutig eine Bande für tyrosinphosphoryliertes STAT5A detektiert werden. Die Signalstärke stieg bis 60 min nach Stimulation an und fiel zwischen 60 und 120 min kaum ab. Erst nach 180 min war eine Reduktion der Phosphorylierung von STAT5A-eYFP bzw. STAT5A detektierbar.

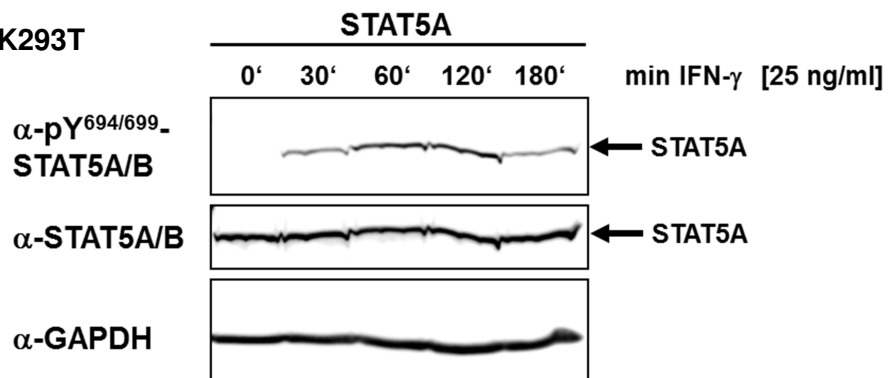
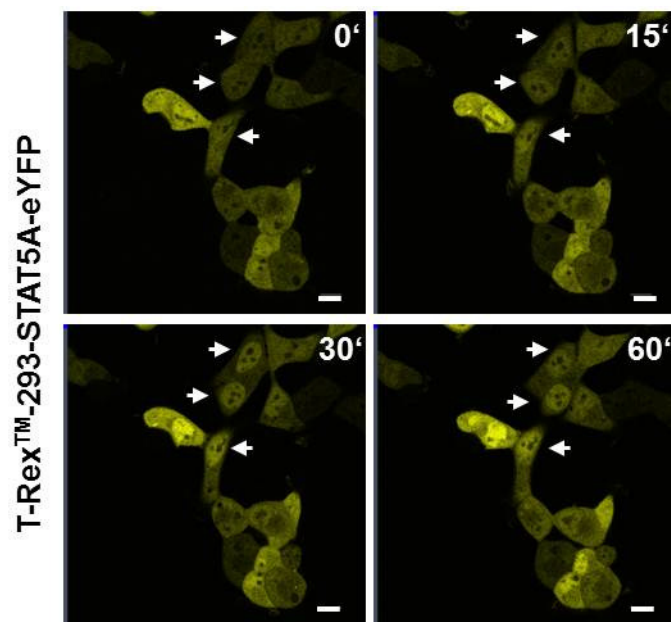
Zusammenfassend konnte durch den Versuch gezeigt werden, dass der fluoreszenzmarkierte Transkriptionsfaktor und *ungetaggetes* STAT5A vergleichbare Phosphorylierungskinetiken aufwiesen (Abb. 9A, B).

A

HEK293T

**B**

HEK293T

**C**

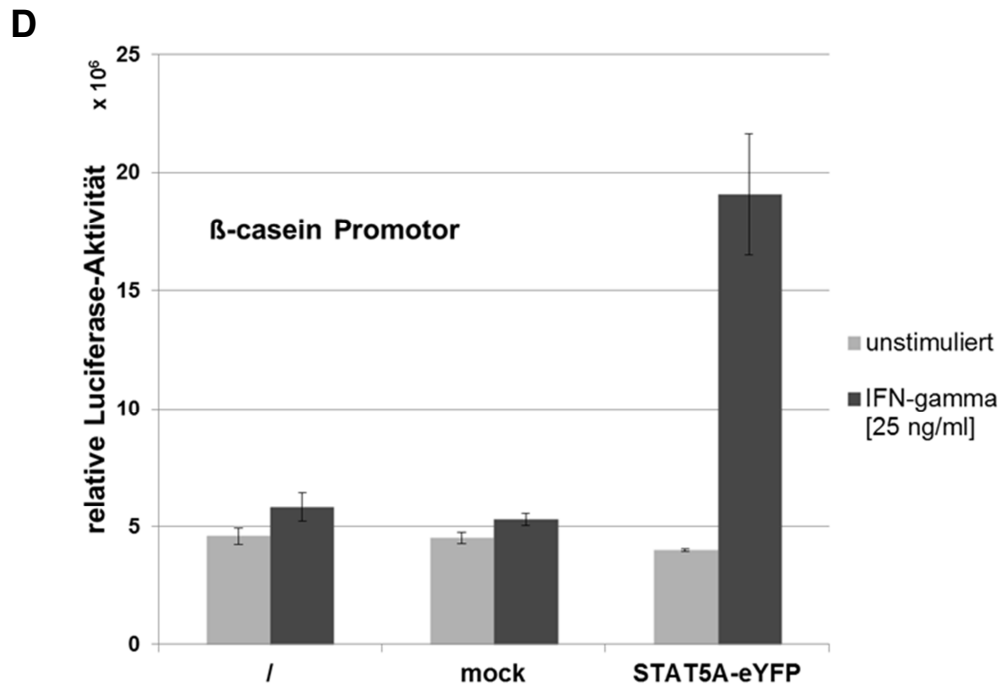


Abb. 9: Biochemische und funktionelle Charakterisierung der STAT5A-Fusionsproteine. (A, B) HEK293T-Zellen wurden mit STAT5A-eYFP bzw. STAT5A transient transfiziert und 24 h kultiviert. Im Anschluß wurden die Zellen für 30 min mit 25 ng/ml IFN- γ stimuliert oder unstimuliert belassen und daraufhin ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten kultiviert und Lysate hergestellt. 20 μ g Gesamt-Zelllysate wurden im elektrischen Feld eines SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und im *Western Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern spezifisch für pY^{694/699}-STAT5A/B, STAT5A/B und GAPDH inkubiert und durch eine Immundetektion analysiert. **(C)** Die subzelluläre Lokalisation von STAT5A wurde in stabil transfizierten T-RexTM-293-Zellen untersucht, welche STAT5A-eYFP doxycyclin-abhängig exprimieren. Auf cover slips kultivierte Zellen wurden transient mit dem OSMR transfiziert. Die Expression von STAT5A-eYFP wurde mit 5 ng/ml Doxycyclin für 16 h induziert. Die Zellen wurden im *live cell imaging* am LSM 710 für die angegebene Dauer stimuliert (5 ng/ml OSM). Ein Teil der Zellen, der auf den Stimulus reagierte, wurde mit Pfeilen markiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. **(D)** Die transkriptionelle Aktivität der Fusionsproteine wurde durch einen Reporteragen Assay (RGA) bestätigt. HEK293T-Zellen wurden mit einem STAT5A/B responsiven Luciferase-Reportergenplasmid (β -Casein-Promotor), einem β -Galaktosidase-kodierenden Plasmid, sowie je nach Ansatz mit Expressionsvektoren für eYFP (mock) oder STAT5A-eYFP transfiziert. Die Zellen wurden für 6 h mit 25 ng/ml IFN- γ stimuliert (graue Balken) oder blieben unstimuliert (dunkelgraue Balken). Die Balken repräsentieren Mittelwerte der resultierenden relativen Luciferase-Aktivität (RLA) aus drei parallelen Experimenten. Die Standardabweichung ist durch Fehlerindizes angegeben.

Die Phosphorylierung am kritischen Y694 führt zur nukleären Translokation von STAT5A-Dimeren. Es wurden stabil transfizierte T-RexTM-293-Zellen, die nach Doxycyclinzugabe STAT5A-eYFP exprimierten, transient mit dem OSM-Rezeptor transfiziert. Die Zellen wurden im *live cell imaging* auf Deckgläsern mit OSM stimuliert, wobei die erste Aufnahme vor der Stimulation gemacht wurde. Die Untersuchung der nukleären Translokation von STAT5A-eYFP nach Stimulation wurde an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM 710) durchgeführt.

Durch die OSM-Stimulation der T-RexTM-293-Zellen im *live cell imaging* konnte eindeutig die Translokation von STAT5A-eYFP in den Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 9C). Einige auf den Stimulus reagierende Zellen, d.h. Zellen, die den OSMR exprimierten, wurden mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Vor der Stimulation wies STAT5A-eYFP eine gleichmäßige Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern auf. Schon 15 min nach der Stimulation war eine geringe Anreicherung im Kern zu erkennen, während sich nach 30 min ein Großteil der STAT5A-eYFP-Population im Kern angereichert hatte (Abb. 9C). Teilweise ließ die Intensität des eYFP-Signals im Kern nach 60 min nach, was auf die Dephosphorylierung bzw. den nukleären Abbau von STAT5A-eYFP hinweisen könnte.

Um die Charakterisierung des Fusionsproteins abzuschließen, wurde die Induktion von Zielgenen untersucht. Im Zellkern binden aktive STAT5A-Dimere an GAS-Sequenzen bzw. *enhancer*-Elementen innerhalb der Promotoren von Zielgenen. Die Rekrutierung weiterer regulatorischer Faktoren führt zur Induktion der Genexpression. Die Bindung von STAT5A an spezifische Promotorregionen und die Induktion der Zielgenexpression wurde im Reportergen-Assay (RGA) untersucht. Hierbei wurde überprüft, ob STAT5A-eYFP an den Promotor des β -Casein-Gens binden und so die Expression des nachgeschalteten Luciferasegens induzieren kann.

HEK293T-Zellen, die mit den Reporterkonstrukten transfiziert wurden, reagierten gar nicht oder marginal auf die IFN- γ -Stimulation. Daraus konnte geschlossen werden, dass kein oder kaum endogenes STAT5A bzw. STAT5B vorhanden war, das eine Expression bewirken konnte. Auch die Kofektion mit einem Leervektor (*mock*-Transfektion) hatte keinen Effekt auf die Expression des Luciferasegens. Wurde nun jedoch das Fusionsprotein STAT5A-eYFP in den HEK293T-Zellen exprimiert, kam es nach Stimulation der Zellen zu einer Vervierfachung der relativen Luciferase-Aktivität (Abb. 9D). Demnach führte die Stimulation der Zellen zu der Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP, dessen Translokation in den Kern und zur anschließenden Induktion der Genexpression eines artifiziellen Zielgens von STAT5.

Experimentell konnte bestätigt werden, dass das Fusionsprotein STAT5A-eYFP die Eigenschaften von Wildtyp-STAT5A aufwies und grundlegende Charakteristika eines Transkriptionsfaktors erfüllt wurden.

3.2 Zytoplasmatische Lokalisation von aktiviertem STAT5A in myeloproliferativen Erkrankungen

Wie in Abschnitt 3.1 (Abb. 9B) beschrieben wurde, transloziert STAT5A-eYFP nach Aktivierung, d.h. nach Zytokinstimulation der Zellen und Phosphorylierung an Y694, in den Zellkern und reichert sich dort an. Die Aktivierung von STAT5A durch konstitutiv aktive Kinasen und die anschließende nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors ist beschrieben worden [183]. Dennoch mehren sich die Beschreibungen von aktiviertem STAT5A in myeloproliferativen Erkrankungen, welches sich nicht im Zellkern anreichert, sondern eine größtenteils zytoplasmatische Lokalisation aufweist [166,168]. Es wurde aufgrund dieser Beobachtungen angenommen, dass STAT5A eine Aufgabe im Zytoplasma hat, was den Eigenschaften eines klassischen Transkriptionsfaktors widerspricht. Die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von STAT5A(S710F) führte in der Maus zu der Ausbildung einer CML-ähnlichen Erkrankung. Diese konstitutiv aktive Mutante war überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert und interagiert mit p85, einer Untereinheit der PI3K, und Gab2, was zu der Aktivierung der Serin-/Threonin-Proteinkinase Akt führte [167].

Um die Lokalisation von persistent aktiviertem STAT5A zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Leukämie-Zelllinien benutzt. Molm-13 sind akute myeloische Leukämiezellen humanen Ursprungs. Diese exprimieren die konstitutiv aktive Mutante des FLT3-Rezeptors, FLT3-ITD. Laut Literatur ist in dieser Zelllinie STAT5A dauerhaft tyrosinphosphoryliert und somit aktiv [180]. K562-Zellen sind ebenfalls humanem Ursprungs und sind positiv für das sogenannte Philadelphia-Chromosom, das die Expression des Onkogens BCR-ABL bedingt. Die Zellen stammen ursprünglich aus einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) in der Blastenkrise.

Die Zellen wurden auf *cover slips* ausgesät, die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden. Am nächsten Tag wurden sie mit Methanol fixiert und

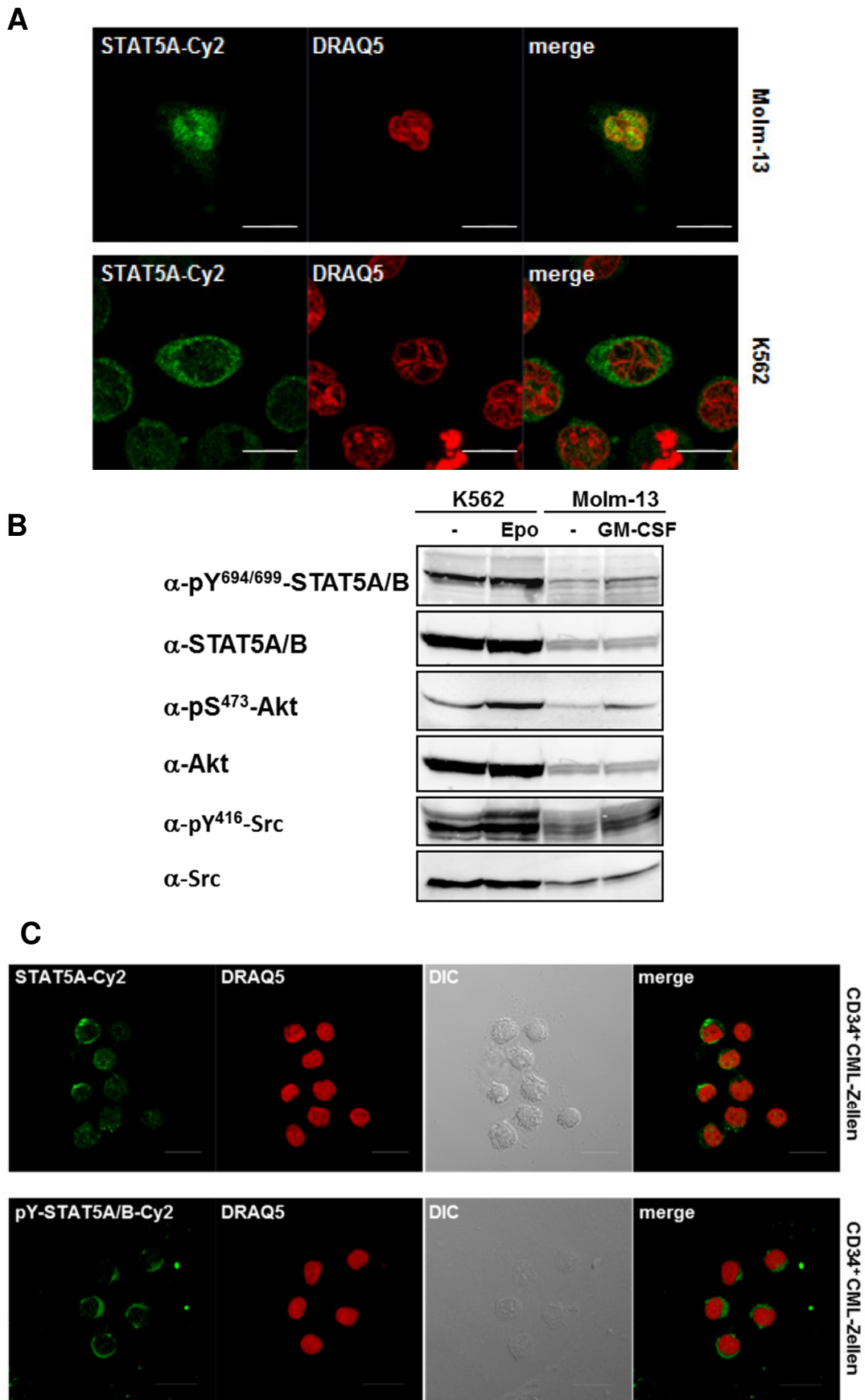
mit Antikörpern, die spezifisch an endogenem STAT5A banden, und Cy2-*getaggt*en Zweitantikörpern angefärbt. Der Zellkern wurde mittels DRAQ5TM markiert. Um nun die subzelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurde die konfokale Mikroskopie genutzt. Zusätzlich wurden Lysate aus den Zelllinien hergestellt, um die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A und den Aktivierungsstatus anderer Signalwege zu überprüfen. Die K562-Zellen wurden außerdem mit Epo und die Molm-13-Zellen mit GM-CSF stimuliert, um zu untersuchen, ob ein weiterer Stimulus die Tyrosinphosphorylierung von STAT5 steigern kann.

Wie aus der indirekten Immunfluoreszenz in K562- und Molm-13-Zellen ersichtlich war (Abb. 10A), gab es eklatante Unterschiede in der subzellulären Verteilung von STAT5A. In Molm-13-Zellen befand sich STAT5A überwiegend im Nukleus und kolokalisierte dort mit DRAQ5TM. STAT5A ist in Molm-13-Zellen konstitutiv an Y694 phosphoryliert, was im *Western Blot* nachgewiesen wurde (Abb. 10B). Die Stimulation mit GM-CSF konnte nur eine geringfügig erhöhte Tyrosinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors bewirken. Die Serinphosphorylierung von Akt nahm nach GM-CSF-Stimulation zu, während kein Effekt auf c-Src bzw. Kinasen der Src-Familie zu beobachten war (Abb. 10B).

In K562-Zellen konnte eine starke Tyrosinphosphorylierung von STAT5A detektiert werden (Abb. 10B), die durch Epo-Stimulation der Zellen nicht erhöht wurde. Die Akt-Phosphorylierung wurde nach Epo-Stimulation verstärkt, wobei auch die Tyrosinphosphorylierung von Kinasen der Src-Familie zunahm. Trotz Phosphorylierung war STAT5A in K562-Zellen vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 10A). Die Beobachtung der zytoplasmatischen Retention des aktiven Transkriptionsfaktors STAT5A konnte somit in einer CML-Zelllinie reproduziert werden.

Diese Ergebnisse wurden in Leukämie-Zelllinien erbracht und sollten zusätzlich in primären Zellen eines unbehandelten CML-Patienten, der positiv für das Fusionsprotein BCR-ABL getestet wurde, bestätigt werden. Hierfür wurden primäre CD34-positive Zellen aus dem Blut eines neu diagnostizierten CML-Patienten isoliert. Mittels *PCR* wurde das Gen für BCR-ABL nachgewiesen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (*Cyto-spin*; siehe Kap. 2.5.3) auf Deckgläschen aufgebracht. Es folgte die Fixierung der Zellen

und die indirekte Immunfärbung von STAT5A sowie phosphoryliertem STAT5A bzw. STAT5B.



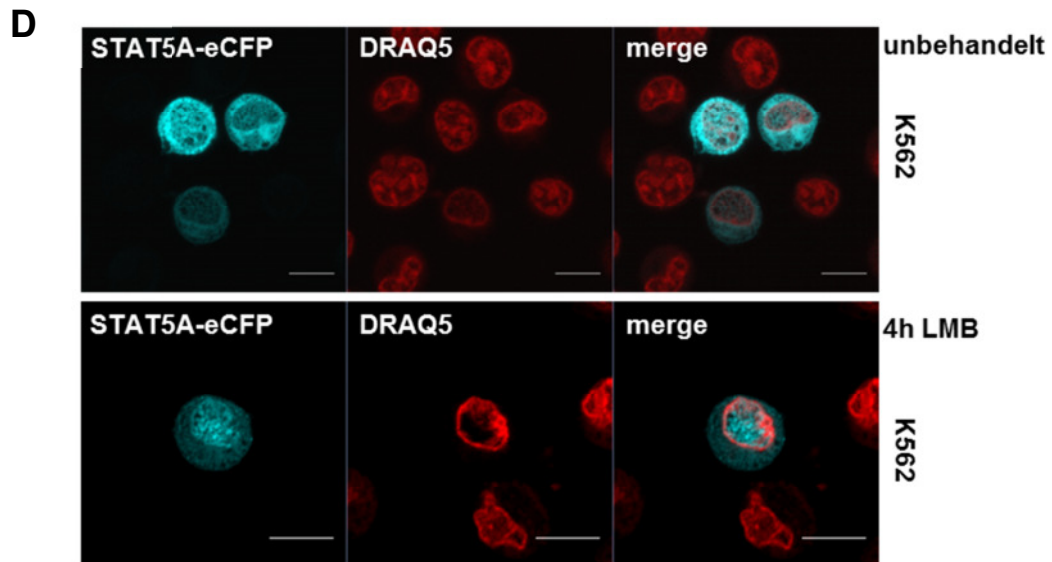


Abb. 10: Zytoplasmatische Retention von tyrosinphosphoryliertem STAT5A. (A) Molm-13- bzw. K562-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten *cover slips* ausgesät und 24 h kultiviert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und endogenes STAT5A mit einem spezifischen Erstantikörper gegen STAT5A und einem Cy2-markierten Zweitantikörper angefärbt. Der Nukleus wurde durch die Zugabe von DRAQ5TM sichtbar gemacht. **(B)** K562- bzw. Molm-13-Zellen wurden für 30 min mit Epo (7 U/ml) bzw. GM-CSF (50 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Es wurden Lysate hergestellt, die in eine *SDS-PAGE* eingesetzt wurden. Ein *Western Blot* wurde durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde mit den angegebenen Antikörpern und für die Immundetektion mit HRP-markierten Zweitantikörpern inkubiert und analysiert. **(C)** Die CD34⁺-Zellen eines BCR-ABL⁺ CML-Patienten wurden auf *cover slips* zentrifugiert und mit 3,7%-igem PFA fixiert. Endogenes STAT5A wurde mit einem spezifischen Erstantikörper gegen STAT5A und einem Cy2-markierten Zweitantikörper angefärbt. In einem weiteren Ansatz wurde phosphoryliertes (Y694/699) STAT5A/B Cy2-markiert. Zusätzlich wurde DRAQ5TM als nukleärer Marker eingesetzt. **(D)** K562-Zellen wurden mit einem für STAT5A-eCFP kodierenden Vektor transfiziert und auf *cover slips* ausgesät. 20 h später wurde einer der Ansätze für 4 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) behandelt und im Anschluß alle Ansätze mit Methanol fixiert. Der Nukleus wurde mit DRAQ5TM angefärbt. Sämtliche Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. Die fixierten Zellen wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 710) analysiert. merge = Überlagerung; DIC = Differenzieller Interferenz-Kontrast.

Die konfokalen Aufnahmen zeigten eine zytoplasmatische Retention sowohl von STAT5A (Abb. 10C oben), als auch tyrosinphosphoryliertem STAT5A/B (Abb. 10C unten). In einigen Regionen des Zytoplasmas war eine verstärkte Anreicherung von STAT5A zu sehen. Durch die Zentrifugation der Zellen war es z.T. schwierig eine eindeutige Abgrenzung von Kern und Zytoplasma zu erkennen (Abb. 10C oben). Wurde ausschließlich phosphoryliertes STAT5A/B angefärbt, konnte zweifelsfrei eine Lokalisation im Zytoplasma nachgewiesen werden, was besonders in der Überlagerung der Signale (*merge*) gut zu erkennen war. Die beschriebenen Resultate in primären CML-Zellen unterstrichen die mögliche Relevanz von aktivem, zytoplasmatischem STAT5A in myeloischen Neoplasien.

Es wurde überprüft, ob sich die fluoreszierenden Fusionsproteine von STAT5A in einer CML-Zelllinie genauso verhalten wie das endogene Protein. K562-Zellen wurden mit einem für STAT5A-eCFP-kodierenden Plasmid transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf *cover slips* ausgesät und 24 h später fixiert oder zuvor für 4 h mit Leptomycin B (LMB) behandelt und dann fixiert. Mittels LMB, ein Inhibitor des nukleären CRM-1 vermittelten Exports, sollte überprüft werden, ob es sich bei der zytoplasmatischen Lokalisation von STAT5A um einen statischen Zustand oder ein Fließgleichgewicht (steady state) mit konstantem nukleärem Import und Export handelt.

STAT5A-eCFP wurde ebenso wie endogenes STAT5A hauptsächlich im Zytoplasma von K562-Zellen detektiert (Abb. 10D oben). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Fusionsproteine wesentliche Charakteristika der endogenen Proteine teilen.

Wurden die Zellen mit LMB behandelt, lag eine signifikante Population von STAT5A-eCFP im Nukleus vor (Abb. 10D unten). Ein statischer Zustand der zytoplasmatischen Lokalisation von STAT5A war auszuschließen. Außerdem zeigte der Versuch, dass der Export von STAT5A zumindest teilweise von CRM1/Exportin-1 abhängig ist, da LMB spezifisch CRM1 inhibiert.

Es war also möglich, die Beobachtungen anderer Gruppen zu reproduzieren [167]. Persistent aktiviertes STAT5A war in einer CML-Zelllinie (K562) und in primären CML-Zellen überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Das Fusionsprotein STAT5A-eCFP war ebenso wie endogenes STAT5A überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Die Behandlung von K562-Zellen mit LMB ermöglichte den Nachweis des nukleozytoplasmatischen *shuttlings* von dauerhaft aktivem STAT5A trotz verstärkter Anreicherung im Zytoplasma.

3.3 Ektopische Expression von BCR-ABL führt zur nukleären Akkumulation von STAT5A

Die zytoplasmatische Retention von STAT5A, wie sie in einer BCR-ABL positiven chronisch myeloischen Leukämie beobachtet wurde, war Gegenstand weiterer Experimente. Um eine vereinfachte experimentelle

Handhabung im Vergleich zu Suspensionszellen zu erreichen, wurde eine stabil transfizierte Zelllinie (T-RexTM-293-Zellen) hergestellt, in der nach Doxycyclin-Zugabe BCR-ABL (p210) exprimiert wird. Weitere Parameter, die die Lokalisationsstudien in den T-RexTM-293-Zellen vereinfachen, sind adhärentes Wachstum, die gute Transfizierbarkeit und ein vergleichbares Größenverhältnis von Nukleus zu Zytoplasma (augenscheinlich).

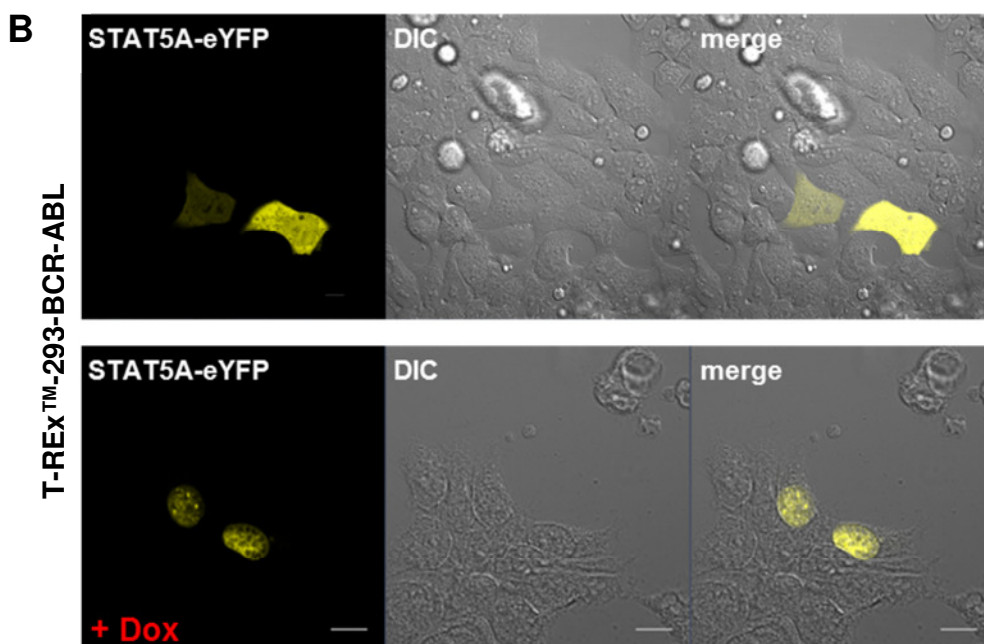
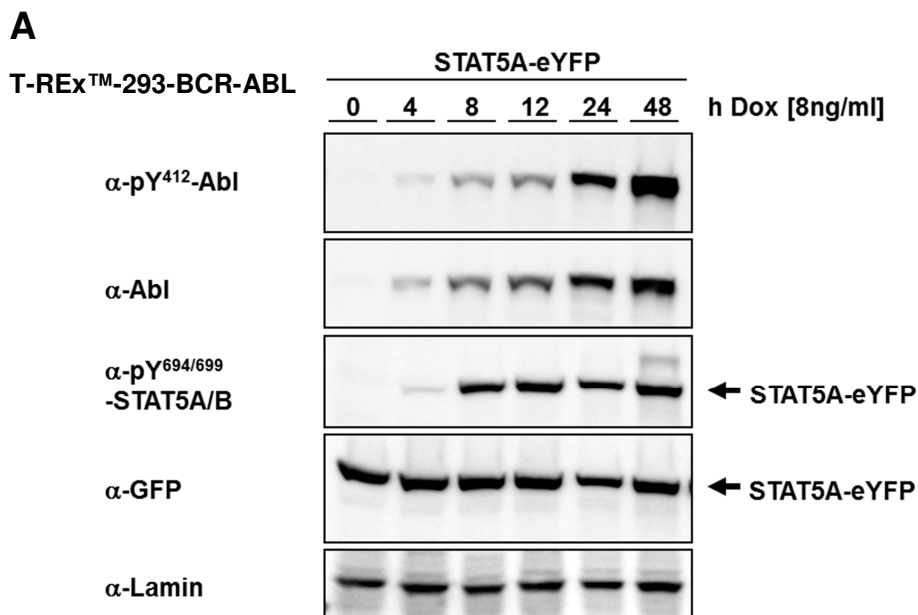
T-RexTM-293-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-BCR-ABL (p210) transfiziert und durch die Inkubation mit Hygromycin und Blasticidin selektiert. Ein Klon, der nach Doxycyclinzugabe ins Kulturmedium der Zellen BCR-ABL exprimiert, wurde im Folgenden für die Experimente eingesetzt. Die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A wurde in T-RexTM-293-BCR-ABL-Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1[®](+)-STAT5A-eYFP transient transfiziert, das die Expression von STAT5A, unabhängig von Doxycyclin, vermittelt. Nach 24 h wurden die Zellen auf 6-*well*-Platten subkultiviert und, für unterschiedliche Zeitperioden mit Doxycyclin behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Lysate für eine *SDS-PAGE* eingesetzt und ein *Western Blot* durchgeführt.

Die Doxycyclin-vermittelte Expression von BCR-ABL und die Detektion der tyrosinphosphorylierten Form der Kinase konnte bereits 4 h nach der Induktion nachgewiesen werden. BCR-ABL ist ein Onkogen und konstitutiv aktiv, weshalb die Tyrosinphosphorylierung durch die Expression des Proteins bedingt wurde. Die Menge von BCR-ABL stieg stetig an und selbst zwischen 24 und 48 h war noch kein Expressionsmaximum erreicht (Abb. 11A). Mit steigender Expression von BCR-ABL wurde nach 4 h eine leichte Phosphorylierung von STAT5A-eYFP nach 8 h aber bereits eine starke Tyrosinphosphorylierung detektiert. Nach ca. 12 h Induktionszeit war das Intensitätsmaximum der Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP erreicht. Für weitere Versuche wurde eine Induktionszeit von 6 bis 16 h gewählt, da sich nach 24 h BCR-ABL-Expression ein Großteil der Zellen von der Petrischalenoberfläche löste und in Suspension übergang.

Die Immunfärbung gegen GFP, diente der Detektion der STAT5A-eYFP-Expression, da der Antikörper nicht nur gegen GFP, sondern auch gegen seine Derivate YFP und CFP gerichtet ist. Die Expression von STAT5A-eYFP war gleichmäßig. Die Ladungskontrolle gegen Lamin zeigte eine

identische Proteinauftragung in der *SDS-PAGE* (Abb. 11A). Es konnte nachgewiesen werden, dass STAT5A-eYFP in Koexpression mit BCR-ABL an Y694 phosphoryliert wurde, weshalb in der Folge Lokalisationsstudien durchgeführt wurden.

Die T-RexTM-293-BCR-ABL-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausplattiert und 8 h kultiviert, bevor Doxycyclin für 16 h dem Medium hinzugegeben wurde. Des Weiteren wurde ein Ansatz unbehandelt belassen. Im Folgenden wurden die Zellen mit Methanol fixiert und am konfokalen Mikroskop hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von STAT5A-eYFP untersucht.



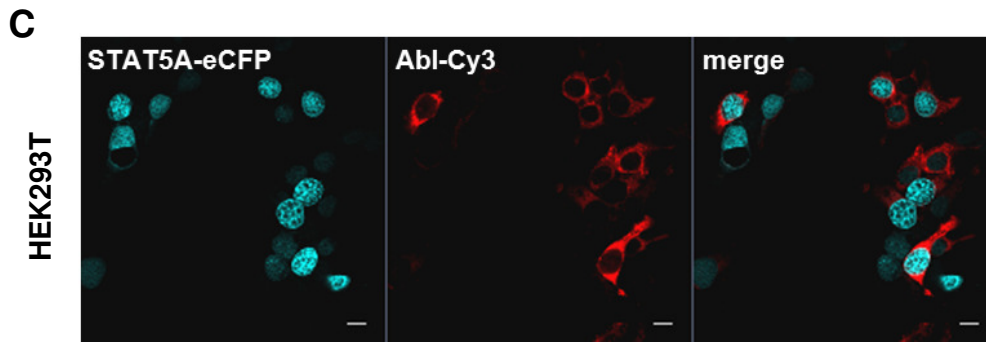


Abb. 11: Analyse der Aktivierung und subzellulären Lokalisation von STAT5A in BCR-ABL exprimierenden Zellen. (A) T-RExTM-293-BCR-ABL-Zellen wurden mit dem Vektor pcDNA3[®](+)-STAT5A-eYFP transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurde die Expression von BCR-ABL (p210) über die angegebenen Zeitspannen mit 8 ng/ml Doxycyclin (Dox) induziert und Lysate hergestellt. 20 µg Protein pro Ansatz wurden in einer *SDS-PAGE* aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen. Mit den angegebenen Erstantikörpern und HRP-markierten Zweitantikörpern wurden Immundetektionen durchgeführt. Die Laminfärbung diente der Ladungskontrolle. **(B)** T-RExTM-293-BCR-ABL-Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten *cover slips* ausgesät und mit einem Plasmid für die Expression von STAT5A-eYFP transfiziert. Die Zellen blieben unbehandelt oder die Expression von BCR-ABL wurde mit 8 ng/ml Doxycyclin für 16 h induziert. Im Anschluß wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Proben am LSM 710 ausgewertet. **(C)** HEK293T-Zellen, welche mit Plasmiden transfiziert wurden, die für STAT5A-eCFP und BCR-ABL (p210) kodierten, wurden 24 h auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Im Folgenden wurden sie mit Methanol fixiert und eine indirekte Immunfärbung durchgeführt. BCR-ABL wurde mit einem Primärantikörper gegen Abl und einem Sekundärantikörper, der Cy3-konjugiert war, angefärbt. Die Auswertung fand am LSM 710 statt. Sämtliche Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. *Merge* = Überlagerung; DIC = Differenzieller Interferenz-Kontrast

STAT5A-eYFP akkumulierte nach der 16 stündigen Induktion der Expression von BCR-ABL im Nukleus (Abb. 11B). In der Überlagerung des STAT5A-eYFP-Signals und der differentiellen Interferenz-Kontrast (DIC)-Aufnahme wurde die ausschließlich nukleäre Lokalisation von STAT5A-eYFP gut sichtbar. In Zellen, die nicht mit Doxycyclin behandelt wurden, war STAT5A-eYFP gleichmäßig über Zytoplasma und Zellkern verteilt.

Um zu überprüfen, ob Unterschiede in der Verteilung von STAT5A in induzierbaren Zellen im Vergleich zu HEK293T-Zellen zu beobachten sind, wurden HEK293T-Zellen transient mit dem Expressionsplasmiden pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-BCR-ABL (p210) und pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A-eCFP transfiziert. Etwa 24 h später wurden die Zellen auf *cover slips* fixiert und BCR-ABL mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Cy3 angefärbt. Endogenes c-Abl wurde ebenfalls durch den Antikörper markiert, jedoch war das Signal transfizierter Zellen ungleich stärker, so dass BCR-ABL exprimierende Zellen durch eine erhöhte Fluoreszenz erkannt werden konnten.

In Abb. 11C wird deutlich, dass auch die transiente Expression von BCR-ABL in HEK293T-Zellen zur nukleären Akkumulation von STAT5A-eCFP führte. Zusammenfassend wurde durch die ektopische Expression von BCR-ABL (Abb. 11A) die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A erreicht. Die zytoplasmatische Lokalisation von aktivem STAT5A, wie sie in einer CML beobachtet wurde, konnte durch transiente und induzierte Expression von BCR-ABL nicht nachgeahmt werden (Abb. 11B, C). Die Zellen zeigten keine zytoplasmatische Retention, sondern eine intensive Anreicherung von STAT5A im Zellkern.

Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass ein Faktor fehlte, der in den K562-Zellen bzw. den primären CML-Zellen zur zytoplasmatischen Anreicherung von aktiviertem STAT5A führte.

3.4 Aktivierung von STAT5A durch Src-Kinasen führt zur zytoplasmatischen Retention des Transkriptionsfaktors

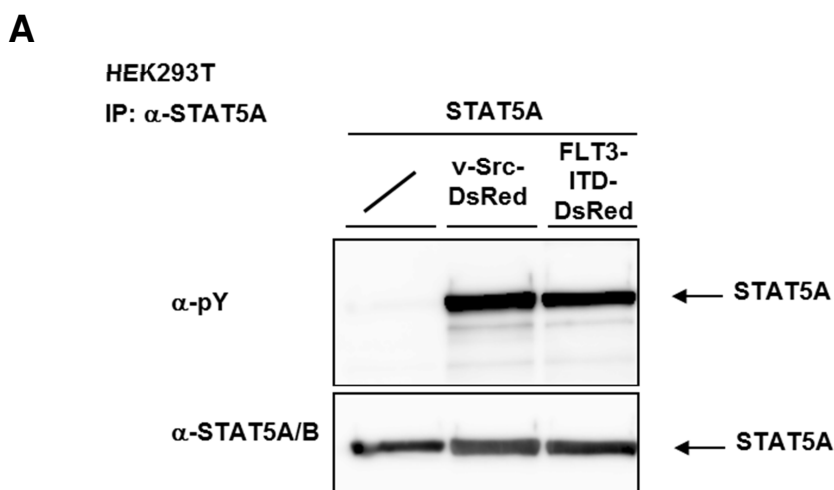
Kinasen der Src-Familie können STAT5A phosphorylieren und beeinflussen entscheidend den Verlauf einer myeloischen Leukämie [139,171,172] (Kap. 1.6). Vor einigen Jahren wurde berichtet, dass konstitutiv aktives Src STAT5A an seinem Haupttyrosin 694 phosphorylieren kann [148], es aber zu keiner nukleären Anreicherung des Transkriptionsfaktors kommt [149]. Im Vergleich führt die rezeptorvermittelte Aktivierung von STAT5A zur nukleären Akkumulation des Transkriptionsfaktors (Kap. 3.1, Abb. 9C). Demnach unterscheiden sich die Src-vermittelte und die rezeptorvermittelte Aktivierung von STAT5A bezüglich der subzellulären Lokalisation des Transkriptionsfaktors. Die Beobachtung von Kazansky *et al.* [149] wurde im Folgenden reproduziert, um weitere Erkenntnisse über die subzelluläre Verteilung von aktiviertem STAT5A zu erhalten.

Um die Src-vermittelte STAT5A-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen auf 10 cm-Schalen ausgesät und mit dem Plasmid pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A allein oder zusammen mit pcDNA3.1[®](+)-vSrc-DsRed bzw. pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-FLT3-ITD-DsRed kotransfiziert. Die Expression von FLT3-ITD-DsRed diente als Positivkontrolle, da bereits in der AML-Zelllinie Molm-13, die positiv für FLT3-ITD ist, die

Tyrosinphosphorylierung von STAT5A gezeigt wurde (Abb. 10B). Die Zellen wurden nach der Transfektion 24 h kultiviert und im Anschluss lysiert. Mit Hilfe eines gegen STAT5A gerichteten Antikörpers wurde der Transkriptionsfaktor aus den Lysaten präzipitiert. Die Präzipitate wurden in Lämmli-Puffer aufgenommen, aufgeköcht und die Proteine in einer *SDS-PAGE* aufgetrennt. Ein *Western Blot* wurde im Anschluss durchgeführt.

Die Expression von STAT5A allein führte nicht zu dessen Tyrosinphosphorylierung. Wurde jedoch v-Src-DsRed oder FLT3-ITD-DsRed mit STAT5A koexprimiert, konnte eine intensive Tyrosinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors detektiert werden (Abb. 12A). Die Färbung der Membran mit einem Antikörper gegen STAT5A/B zeigte die gleichmäßige Präzipitation von STAT5A. Nach der Bestätigung der Tyrosinphosphorylierung von STAT5A durch die Koexpression mit v-Src-DsRed sollte dessen Lokalisation in fixierten Zellen untersucht werden.

Hierfür wurde die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 mit Expressionsvektoren, die für STAT5A-eYFP, STAT3-eCFP und v-Src-DsRed kodierten, transfiziert. STAT3-eCFP diente als Positivkontrolle, da die nukleäre Translokation von STAT3 nach Aktivierung durch v-Src bereits beschrieben wurde [188]. Die Zellen wurden 8 h nach der Transfektion auf *cover slips* gesplittet und 24 h später fixiert. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Mikroskop gemacht. Zellen die eine gemäßigte Expression von v-Src-DsRed aufwiesen, wurden in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation von STAT5A und STAT3 untersucht.



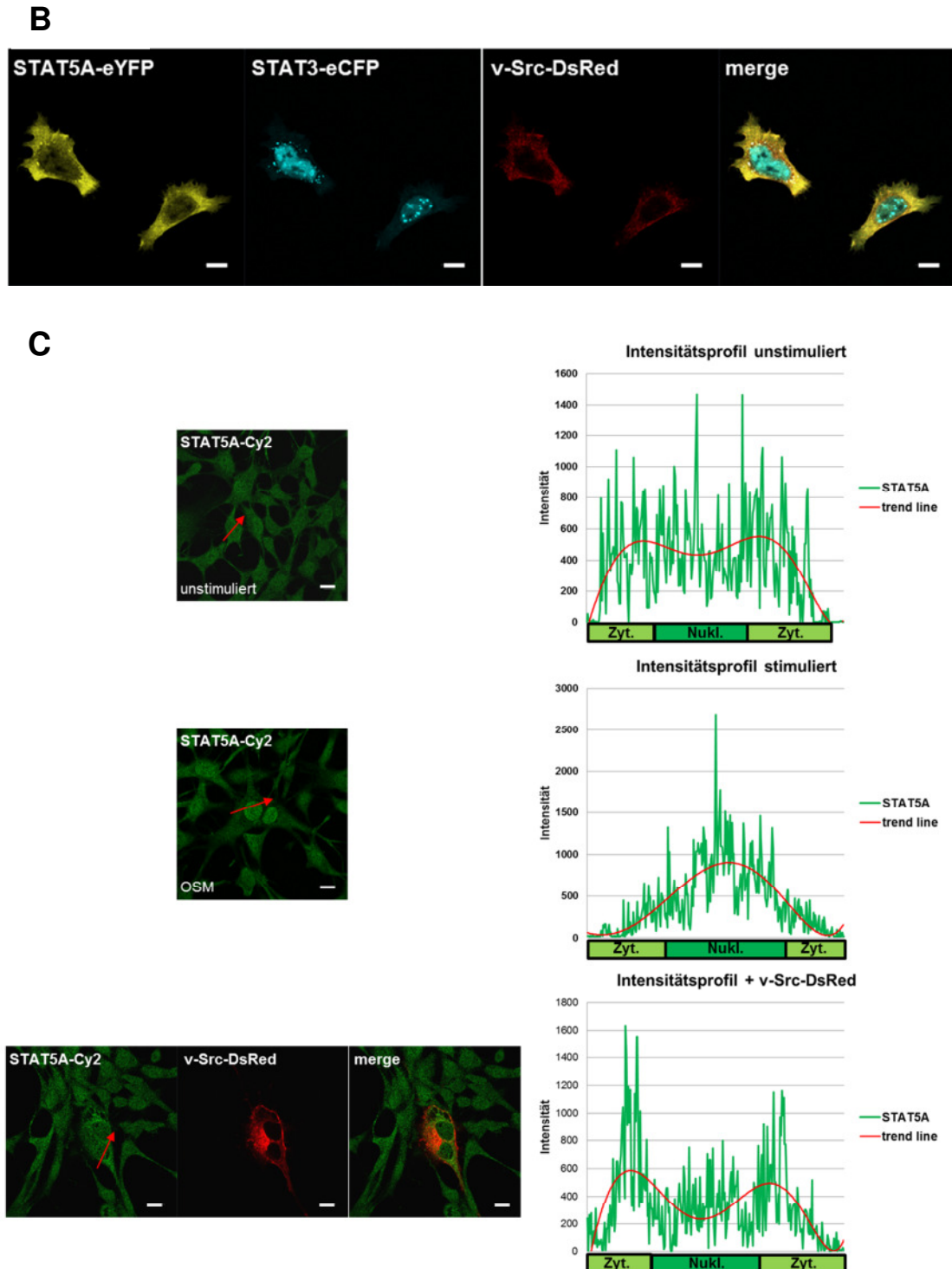


Abb. 12: Zytoplasmatische Lokalisation von STAT5A trotz Aktivierung durch v-Src-DsRed. (A) HEK293T-Zellen wurden transient mit einem Vektor für STAT5A transfiziert. Je nach Ansatz wurde zusätzlich ein Plasmid, das für v-Src-DsRed oder für FLT3-ITD-DsRed kodierte, kotransfiziert. Nach 24 h wurden Lysate hergestellt und mit einem spezifischen Antikörper gegen STAT5A, der an Protein A-Sepharose gekoppelt wurde, eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Phosphorylierung von STAT5A wurde mittels pY-Antikörper nachgewiesen. Als Ladungskontrolle diente die Färbung gegen STAT5A/B. (B) MCF-7-Zellen wurden transient mit Plasmiden für STAT5A-eYFP, STAT3-eCFP und v-Src-DsRed kotransfiziert. Die Zellen wurden auf Deckgläschen gesplittet, 24 h kultiviert und mit Methanol fixiert. (C) STAT3 defiziente MEF-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und einer der Ansätze mit einem Vektor für v-Src-DsRed transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurde ein Ansatz mit 5 ng/ml OSM für 30 min stimuliert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und

endogenes STAT5A durch eine indirekte Immunfärbung visualisiert. Der Primärantikörper war gegen STAT5A gerichtet und der Sekundärantikörper mit Cy2 konjugiert. Am konfokalen Laserscanning Mikroskop wurden Aufnahmen gemacht und zu jeder Aufnahme mittels ZEN 2009 Software ein Intensitätsprofil einer repräsentativen Zelle erstellt (rechts). Die Intensitätsprofile stellen die Fluoreszenzintensität entlang der roten Pfeile dar. Eine Trendlinie (*trend line*) ist eingezeichnet. Die Positionen des Zytoplasmas und des Zellkerns wurden markiert (Zyt. = Zytoplasma; Nukl. = Nukleus). Sämtliche Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. *Merge* = Überlagerung.

STAT5A-eYFP akkumulierte in Koexpression mit v-Src-DsRed nicht im Zellkern, trotz der bestätigten aktivierenden Tyrosinphosphorylierung (Abb. 12B). Der fluoreszenzmarkierte Transkriptionsfaktor war verstärkt im Zytoplasma lokalisiert. Die konstitutiv aktive Kinase v-Src-DsRed lag nahezu ausschließlich membrangebunden vor, was durch den N-terminalen Myristylanker zu erklären ist, der die Kinase an Membransysteme verankert. STAT3-eCFP akkumulierte fast vollständig im Nukleus. Die zytoplasmatische Retention von tyrosinphosphoryliertem STAT5A konnte somit nicht nur in einer BCR-ABL positiven CML, sondern auch nach Aktivierung durch v-Src beobachtet werden.

Um auszuschließen, dass die zytoplasmatische Retention von STAT5A-eYFP in Koexpression mit v-Src-DsRed ein durch den *Fluoreszenztag* hervorgerufenes Artefakt war, sollte diesbezüglich endogenes STAT5A untersucht werden.

Die Expression von STAT5A ist vor allem im hämatopoetischen System detektierbar. Hämatopoetische Zelllinien wachsen jedoch in Suspension und eignen sich weniger für konfokale Untersuchungen. Daher wurden STAT3 defiziente MEF-Zellen (MEF STAT3 ^{-/-}) für die folgenden Versuche eingesetzt. Die Deletion des STAT3-Gens führt zu einer im Vergleich zu Wildtyp-MEF-Zellen gesteigerten STAT5-Expression.

Die STAT3 defizienten MEF-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 24 h später einer der Ansätze mit einem Plasmid kodierend für v-Src-DsRed transfiziert. Abermals 24 h später wurde ein Ansatz mit 5 ng/ml OSM für 30 min stimuliert und alle Ansätze im Anschluss fixiert. Eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung schloss sich an. Endogenes STAT5A wurde mittels spezifischem Erstantikörper und einem sekundären Antikörper, der Cy2 markiert war, angefärbt. Es wurden repräsentative Aufnahmen am konfokalen Mikroskop aufgenommen und mit der Zeiss ZEN 2009 Software Intensitätsprofile angefertigt. Durch diese Profile war es möglich den Anstieg

und den Abfall der Cy2-Intensität und somit die Konzentration an STAT5A innerhalb der Zellkompartimente (Zytoplasma und Nukleus) zu verdeutlichen. Wurden die MEF-Zellen nicht stimuliert, konnte man eine gleichförmige Verteilung von STAT5A über Zytoplasma und Zellkern erkennen (Abb. 12C oben). Die graphische Auswertung zeigt eine geringfügig kleinere Konzentration von Cy2-markiertem STAT5A im Kern, wie an der eingezeichneten Trendlinie (*trend line*) verdeutlicht wurde (Abb. 12C oben, rechts).

Wurden die Zellen nun mit OSM stimuliert, translozierte STAT5A in den Zellkern und reicherte sich dort an (Abb. 12 C zentral, links). Die Trendlinie des Intensitätsprofils ist parabelförmig und spiegelt die nukleäre Lokalisation von STAT5A wider (Abb. 12C zentral, rechts). OSM ist ein starker Aktivator von STAT5A. Über die Aktivierung von JAK2, das zytoplasmatisch mit dem OSMR assoziiert ist, wird STAT5A an Y694 phosphoryliert, weshalb eine intensive Anreicherung im Nukleus zustande kam.

Die Lokalisation von endogenem STAT5A in MEF-Zellen, die mit v-Src-DsRed transfiziert wurden, entsprach der zuvor beobachteten zytoplasmatischen Retention von STAT5A-eYFP in MCF-7-Zellen (Abb. 12B). Endogenes STAT5A lag zum größten Teil im Zytoplasma vor. Die Expression von v-Src-DsRed wurde eindeutig durch die Detektion des DsRed-Signals nachgewiesen (Abb. 12C unten, links). Die subzelluläre Verteilung von STAT5A in einer repräsentativen Zelle wurde ebenfalls durch ein Intensitätsprofil veranschaulicht. Die Trendlinie verdeutlicht eine Anreicherung von STAT5A im Zytoplasma, während das nukleäre Signal deutlich absinkt. Die konstitutiv aktive Kinase v-Src-DsRed beeinflusst demnach die subzelluläre Verteilung von persistent phosphoryliertem STAT5A hin zu einer zytoplasmatischen Lokalisation.

Die Familie der Src-Kinasen besteht aus neun Mitgliedern, wobei zwei dieser Kinasen schon des Öfteren in Zusammenhang mit einer chronisch myeloischen Erkrankung beschrieben wurden. Diese, verstärkt im hämatopoetischen System exprimierten Src-Kinasen, sind Hck (*hematopoietic cell kinase*) und Lyn (*v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene*). STAT5A wurde als direktes Zielprotein dieser Tyrosinkinase beschrieben. Es wurde berichtet, dass in einer CML Hck von

BCR-ABL aktiviert wird und im Anschluss Hck die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A verursacht [172]. Des Weiteren wurde eine Hck-vermittelte Anreicherung von STAT5A an Podosomen nachgewiesen [168].

Die Aktivierung von Lyn durch BCR-ABL und umgekehrt korreliert mit einer schlechten Prognose einer fortgeschrittenen CML [173]. Außerdem ist Lyn unterhalb des EpoR an der Aktivierung von STAT5A beteiligt [144]. Diese Beobachtungen wurden zum Anlass genommen, den Effekt von Hck bzw. Lyn auf die Lokalisation von STAT5A zu untersuchen.

HEK293T-Zellen wurden hierfür mit Expressionsvektoren transfiziert, die für STAT5A-eCFP bzw. STAT5A-eYFP und Hck-eYFP bzw. Lyn-eCFP kodierten. Die Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten *cover slips* kultiviert und transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und Aufnahmen am LSM 710 gemacht.

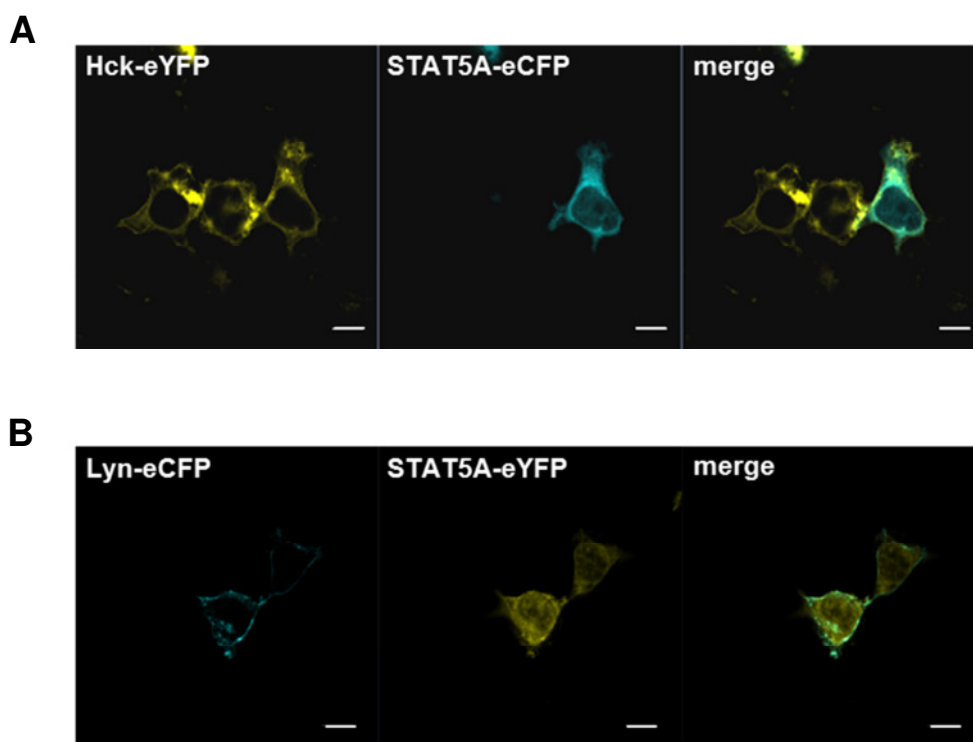


Abb. 13: Überwiegend zytoplasmatische Lokalisation von STAT5A in Koexpression mit Src-Kinasen des hämatopoetischen Systems. HEK293T-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten *cover slips* ausgesät und mit Plasmiden transfiziert, die für STAT5A-eCFP und Hck-eYFP (**A**) bzw. STAT5A-eYFP und Lyn-eCFP (**B**) kodierten. Nach der Fixierung mit Methanol wurden die Zellen am LSM 710 untersucht. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm . merge = Überlagerung

Weder die Koexpression des fluoreszenzmarkierten Transkriptionsfaktors mit Hck-eYFP, noch mit Lyn-eCFP führte zu einer auffälligen Anreicherung von STAT5A im Nukleus (Abb. 13A, B). Hck-eYFP ist vollständig im Zytoplasma

lokalisiert und schien in einigen Regionen des Zytoplasmas verstärkt akku-akkumuliert zu sein. STAT5A-eCFP befand sich ebenfalls nahezu ausschließlich im Zytoplasma. Kolokalisationen waren andeutungsweise zu erkennen (Abb. 13A).

Lyn-eCFP wies eine deutlichere Plasmamembranlokalisation als Hck-eYFP auf. Sowohl Lyn, als auch Hck haben einen N-terminalen Myristylanker, der die Verankerung in Membransystemen verursacht. Die SH2- und SH3-Domäne der Src-Kinasen spielen für die Membranlokalisation ebenfalls eine Rolle [132]. Auch in Koexpression mit Lyn war keine Akkumulation von STAT5A im Zellkern zu beobachten (Abb. 13B).

Die Mitglieder der Familie der Src-Kinasen sind potente Aktivatoren von STAT5A bezüglich dessen Tyrosinphosphorylierung (Abb. 12A; siehe auch Abb. 14A, B). Die Akkumulation von STAT5A im Zellkern konnte jedoch in keinem Fall gezeigt werden, obwohl laut Literatur STAT5A ein wichtiges *downstream target* dieser Kinasen ist [142]. Da Hck und Lyn wichtige Aufgaben im Ablauf einer CML zugewiesen wurden, sollte deren Einfluss auf STAT5A vertiefend untersucht werden.

3.5 Rekonstitution eines CML-ähnlichen Status in HEK-Zellen

Die Beobachtung der zytoplasmatischen Retention von STAT5A trotz der Tyrosinphosphorylierung durch SFKs erinnerte an die Situation in einer CML. Die Expression von Mitgliedern der Src-Familie (Hck, Lyn, Src) könnte die durch BCR-ABL hervorgerufene Akkumulation von STAT5A im Nukleus verhindern. Es stellte sich daher die Frage, ob die durch SFKs ausgelöste zytoplasmatische Retention von STAT5A dominant über der von BCR-ABL-vermittelten nukleären Akkumulation des Transkriptionsfaktors ist.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsvektoren für STAT5A-eYFP, Hck-eCFP und BCR-ABL (p210) in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert (Abb. 14A). Die Zellen wurden 24 h kultiviert und Lysate hergestellt. Da auch die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A untersucht werden sollte, wurde eine *SDS-PAGE* und im Anschluss ein *Western Blot* durchgeführt. Außerdem wurden Zellen für konfokale

Aufnahmen fixiert. Die subzelluläre Lokalisation von STAT5A wurde am LSM 710 untersucht.

Alternativ wurde anstatt des für Hck-eCFP kodierenden Vektors, der Vektor pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-Lyn-eCFP für die beschriebenen Experimente eingesetzt (Abb. 14B).

Im *Western Blot* wurde die Phosphorylierung von STAT5A-eYFP an Y694 sowohl durch BCR-ABL, als auch durch Hck-eCFP nachgewiesen (Abb. 14A oben). Die Koexpression von BCR-ABL und Hck-eCFP führte zu keiner verstärkten Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP. Möglicherweise war durch eine der Kinasen bereits das Gros der STAT5A-Population phospho-ryliert, wodurch die Koexpression der beiden Kinasen keine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung bewirkte. Durch die Färbung gegen GFP war es möglich, die gleichmäßige Expression von STAT5A-eYFP und Hck-eCFP zu überprüfen. Die Expression von Hck-eCFP bei einer Größe von ca. 82 kDa wurde bestätigt. Die BCR-ABL-Expression konnte durch die Färbung gegen Abl nachgewiesen werden. Es entstanden zwei Banden, wobei die untere Bande möglicherweise ein Spaltprodukt repräsentiert. Für die Ladungs-kontrolle wurde gegen das *housekeeping* Gen Hsp-70 gefärbt, dass konstitutiv exprimiert wird (Abb. 14A oben).

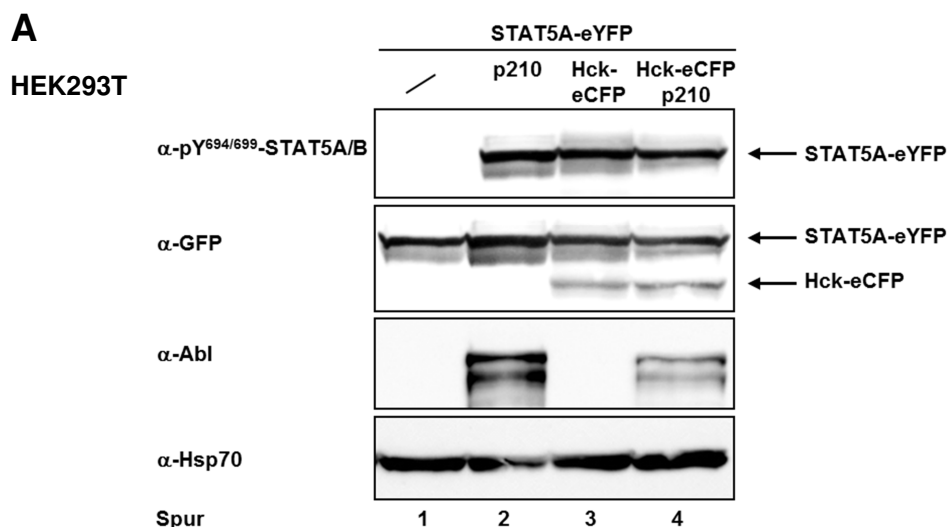
Die mit STAT5A-eYFP, Hck-eCFP und BCR-ABL kotransfizierten HEK293T-Zellen wurden am konfokalen Mikroskop untersucht. Sämtliche Zellen, die STAT5A-eYFP exprimierten, bildeten auch BCR-Abl, was durch die indirekte Immunfluoreszenz (p210-Cy3) ersichtlich ist. STAT5A-eYFP reicherte sich in Abwesenheit von Hck nahezu vollständig in diesen Zellen im Nukleus an, wobei punktförmige Akkumulationen von STAT5A-eYFP gebildet wurden (Abb. 14A unten). Im Falle von STAT3 wurden diese Regionen erhöhter Intensität im Zellkern als *nuclear bodies* bezeichnet [189].

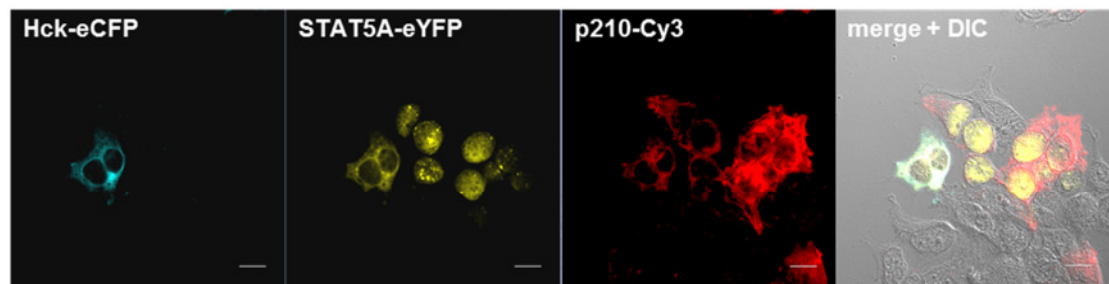
Im linken Bildabschnitt exprimierten jedoch zwei Zellen sowohl Hck-eCFP, als auch BCR-ABL. Diese Konstellation führte zur zytoplasmatischen Retention von STAT5A-eYFP (Abb. 14A unten), obwohl die aktivierende Tyrosinphosphorylierung von STAT5A im *Western Blot* eindeutig gezeigt werden konnte. Der Effekt der durch Hck ausgelösten zytoplasmatischen Retention von aktiviertem STAT5A-eYFP ist demnach dominant über der durch BCR-ABL bewirkten Kerntranslokation.

Die Vermutung, dass die Src-Kinase Lyn in ähnlicher Weise die Lokalisation von STAT5A beeinflussen könnte, wurde im Folgenden untersucht. Die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP durch Lyn-eCFP wurde im *Western Blot* nachgewiesen (Abb. 14B oben). Die Koexpression von Lyn-eCFP und STAT5A-eYFP wurde durch die Färbung gegen GFP bestätigt. In Ansatz 4, in dem die beiden Kinasen mit STAT5A-eYFP koexprimiert wurden, konnte abermals keine Zunahme der Phosphorylierung von STAT5A beobachtet werden. Die Färbung gegen Abl zeigte die zuvor beschriebenen Doppelbanden von BCR-ABL. Als Ladungskontrolle diente die Färbung gegen GAPDH, dass ebenso wie Hsp70 ein *housekeeping* Gen ist (Abb. 14B oben).

Eine repräsentative Aufnahme der Koexpression von STAT5A-eYFP, Lyn-eCFP und BCR-ABL (p210-Cy3) zeigt, dass die Koexpression mit Lyn-eCFP zu keiner zytoplasmatischen Retention von STAT5A-eYFP führt (Abb. 14B unten). Der fluoreszenzmarkierte Transkriptionsfaktor akkumulierte vollständig im Zellkern. Lyn-eCFP lokalisierte zum größten Teil an der Plasma-membran (Abb. 14B unten), während Hck-eCFP auch im Zytoplasma bzw. an weiteren Membransystemen detektiert werden konnte (Abb. 14A unten).

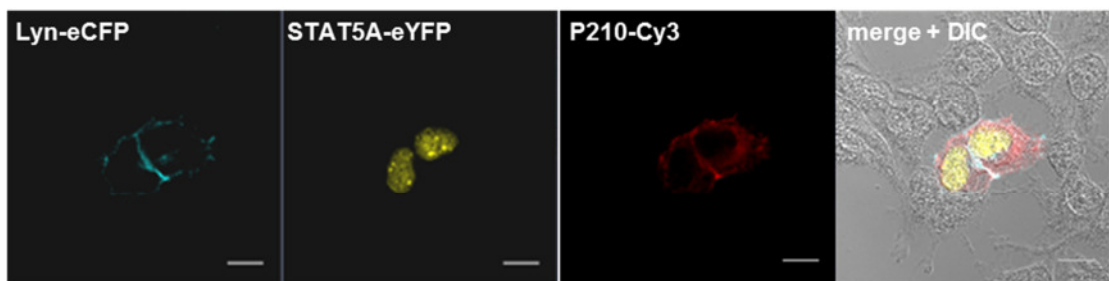
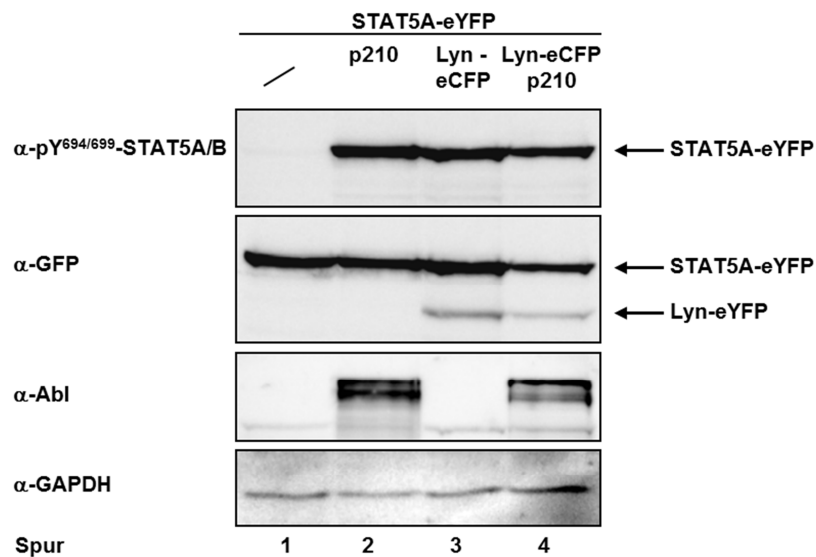
Das Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass Hck und möglicherweise weitere Src-Kinasen einen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation von STAT5A in K562-Zellen bzw. in der BCR-ABL positiven CML haben. Jedoch begünstigen nicht alle SFKs, wie im Falle von Lyn gezeigt wurde, die zytoplasmatische Retention von STAT5A.





B

HEK293T



C

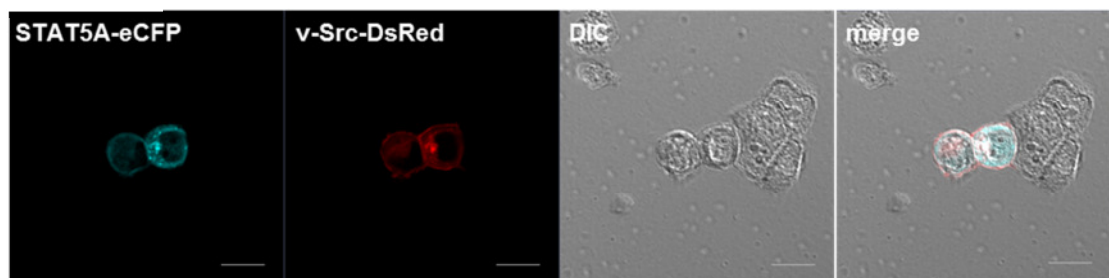


Abb. 14: Einfluss der SFKs Hck, Lyn und v-Src in Koexpression mit BCR-ABL auf die subzelluläre Verteilung von STAT5A. (A) HEK293T-Zellen wurden 24 h vor der Lyse mit STAT5A-eYFP (Spur/Ansatz 1 - 4) transfiziert. Zusätzlich wurde je nach Ansatz BCR-ABL (p210) (2, 4) und Hck-eCFP (3, 4) kotransfiziert. Die Zellen wurden lysiert und 20 μ g Gesamtprotein in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Die Immundetektion wurde mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Das *house keeping* Gen Hsp-70 wurde als Ladekontrolle genutzt. Die Zellen des Ansatzes 4 der Kotransfektionen wurden zusätzlich auf beschichteten Deckgläschen ausgesät und mit Methanol fixiert. BCR-ABL wurde mittels eines spezifischen Abl-Antikörpers und eines Cy3-konjugierten

Zweitantikörpers markiert. Die Aufnahmen wurden am LSM 710 erstellt. **(B)** HEK293T-Zellen wurden wie in (A) transfiziert, jedoch wurde das für Lyn-eCFP anstatt des für Hck-eCFP kodierenden Plasmids verwendet. Ebenso wie in (A) wurden die Zellen aus Ansatz 4 zusätzlich zur *Western Blot*-Analyse auf Deckgläschen ausgesät, fixiert und angefärbt. Als Ladungs-kontrolle im *Western Blot* diente die Färbung gegen GAPDH. **(C)** T-REx™-293-BCR-ABL-Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten *cover slips* ausgesät und mit Plasmiden für die Expression von STAT5A-eYFP und v-Src-DsRed kotransfiziert. Die Expression von BCR-ABL wurde mit 8 ng/ml Doxycyclin für 16 h induziert. Im Anschluß wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Proben am LSM 710 ausgewertet. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. *Merge* = Überlagerung; DIC = Differenzieller Interferenz-Kontrast.

Die Expression von v-Src-DsRed führte zur zytoplasmatischen Retention von STAT5A (Abb. 12B). Somit könnte die konstitutiv aktive Kinase einen ähnlichen Effekt wie Hck in BCR-ABL exprimierenden Zellen haben.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden T-REx™-293-BCR-ABL-Zellen auf beschichteten *cover slips* ausgesät. Die Zellen wurden 4 h später mit für STAT5A-eCFP und v-Src-DsRed kodierenden Plasmiden transfiziert. Etwa 18 h später wurden die Zellen für 6 h mit Doxycyclin behandelt, um die Expression von BCR-ABL zu induzieren.

STAT5A-eCFP war in Koexpression mit v-Src-DsRed und BCR-ABL zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 14C). Anreicherungen von STAT5A-eCFP waren dort im Zytoplasma zu beobachten, wo sich auch eine größere Menge v-Src-DsRed ansammelte, so dass von einer Kolokalisation in diesen Regionen gesprochen werden konnte (Abb. 14C). Die Morphologie der T-REx™-293-BCR-ABL (p210)-Zellen veränderte sich stark. Die Zellen rundeten sich ab, was bei der Expression von v-Src häufig zu beobachten war.

Die Src-Kinasen Hck und v-Src konnten in HEK-Zellen, die BCR-ABL exprimierten, bezüglich der Lokalisation von STAT5A einen CML-Status rekonstituieren, während Lyn dazu nicht fähig war.

Sollte nun jedoch eine allgemeingültige Aussage über den Einfluss bestimmter Src-Kinasen auf STAT5A getroffen werden, stellte sich die Frage, warum in einer AML (Akute myeloische Leukämie), die positiv für FLT3-ITD war, STAT5A im Kern akkumulierte. In AML-Zelllinien (Molm-13, MV4-11 etc.) werden Src-Kinasen wie z.B. Hck und c-Src exprimiert und laut Literatur auch aktiviert [184]. Dies konnte in Molm-13-Zellen in dieser Arbeit bereits bestätigt werden (Abb. 10B). Die durch Src-Kinasen ausgelöste zytoplas-

matische Retention in einer CML könnte BCR-ABL spezifisch sein und somit auf FLT3-ITD exprimierende Zellen nicht zutreffen.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden HEK293T-Zellen auf *gecoateten* Deckgläschen ausgesät und mit Plasmiden, die für STAT5A-eYFP, Hck-eCFP und FLT3-ITD-DsRed kodierten, transfiziert. 24 h später wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von STAT5A-eYFP am konfokalen Mikroskop analysiert.

In Gegenwart von FLT3-ITD-DsRed und Hck-eCFP reichte sich STAT5A-eYFP im Nukleus an. Im Zellkern bildeten sich punktförmige Akkumulationen von STAT5A-eYFP aus. FLT3-ITD-DsRed war ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Durch die interne Tandem Duplikation (ITD) liegt ein großer Teil des Rezeptors im Endoplasmatischen Retikulum vor und wird nur bedingt zur Plasmamembran transportiert [182]. Hck-eCFP ist ebenfalls weitgehend zytoplasmatisch (Abb. 15).

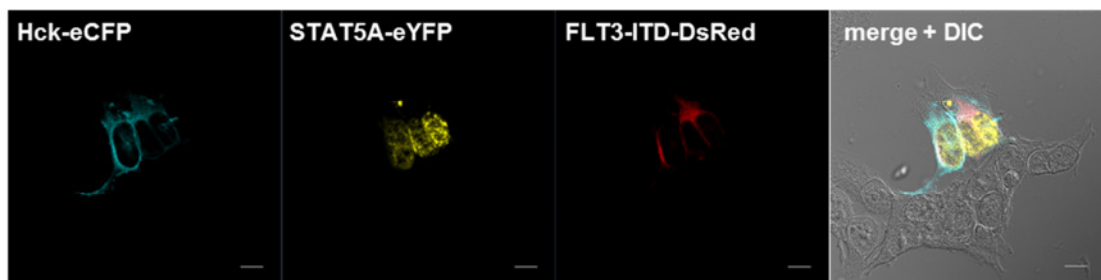


Abb. 15: Nukleäre Translokation durch FLT3-ITD ist dominant über der durch Hck ausgelösten zytoplasmatischen Retention von STAT5A. HEK293T-Zellen wurden auf beschichteten *cover slips* transient mit Plasmiden transfiziert, die für Hck-eCFP, STAT5A-eYFP und FLT3-ITD-DsRed kodierten. Nach einer 24 stündigen Inkubation wurden die Zellen mit Methanol fixiert und am konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Ein Maßstabsbalken von 10 μm wurde eingefügt. Die Überlagerung der Bilder (*merge*) und der Differenzielle Interferenz-Kontrast (DIC) wurden zusammen dargestellt.

Dieses Ergebnis unterstreicht die Beobachtungen, die in der AML-Zelllinie Molm-13 gemacht wurden. FLT3-ITD ist, im Gegensatz zu BCR-ABL, dominant über der durch Hck verursachten zytoplasmatischen Retention von STAT5A. Hck und Src scheinen daher Effektorproteine zu sein, die speziell die zytoplasmatische Anreicherung von aktivem STAT5A in BCR-ABL positiven Leukämien vermitteln.

Es stellte sich die Frage, welche Funktion der Src-Kinasen und welcher Mechanismus verantwortlich für die zytoplasmatische Retention von STAT5A ist.

3.6 Die Kinaseaktivität der SFKs ist notwendig für die zytoplasmatische Retention von STAT5A in BCR-ABL positiven Zellen

Src-Kinasen haben drei Domänen, die entscheidend ihre Aktivität und Eigenschaften beeinflussen. Vom N-Terminus beginnend besitzen die Kinasen eine SH3-Domäne, es folgt eine SH2-Domäne und im C-terminalen Bereich die Kinasedomäne. Da in eigenen Experimenten beobachtet wurde (nicht gezeigt), dass verschiedene Kinasen weitere Tyrosine innerhalb von STAT5 phosphorylieren können, wurde sich in den folgenden Versuchen auf die Kinasedomäne konzentriert.

Es sollte untersucht werden, ob die Kinaseaktivität von Hck die Verteilung von STAT5A in der Zelle steuern kann. Durch eine Punktmutation, die mittels zielgerichteter Mutagenese eingeführt wurde, konnte die Kinasedomäne inaktiviert werden. Die Mutante Hck(K269N) ist nicht mehr in der Lage ATP zu binden, von dem das γ -Phosphat auf ein Tyrosin des Substrats übertragen wird [190]. Die Inaktivität der Kinasedomäne von Hck(K269N)-eCFP wurde im Western Blot nachgewiesen. Die Koexpression von STAT5A-eYFP und Hck-eCFP in HEK293T-Zellen führte zur Phosphorylierung des kritischen Y694, während die Expression von Hck(K269N)-eCFP keinen Effekt bezüglich der Tyrosinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors hatte (Abb. 16A oben). Die Detektion von GFP-Derivaten bewies die Expression von STAT5A-eYFP und Hck-eCFP bzw. Hck(K269N)-eCFP. Die GAPDH-Färbung bewies eine gleichmäßige Auftragung der Proben.

Für Lokalisationsstudien wurden T-REx™-293-BCR-ABL(p210)-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für STAT5A-eYFP und Hck(K269N)-eCFP kodierten. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten *cover slips* ausgesät. Nach 16 stündiger Doxycyclinbehandlung, um die Expression von BCR-ABL zu induzieren, wurden die Zellen fixiert. Die Proben wurden am konfokalen Mikroskop untersucht. Sollte Hck und dessen Kinaseaktivität notwendig für die zytoplasmatische Retention von STAT5A sein und nicht z.B. die *scaffolding*-Aktivität der Src-Kinasen, würde STAT5A nach Aktivierung durch BCR-ABL in Gegenwart von Hck(K269N)-eCFP in den Nukleus translozieren.

Die Mutante Hck(K269N)-eCFP war nicht mehr in der Lage, die Translokation von STAT5A-eYFP zu verhindern, nachdem es durch BCR-ABL phosphoryliert wurde (Abb. 16B). Ein geringer Anteil von STAT5A-eYFP war weiterhin im Zytoplasma vorhanden, was möglicherweise auf einen geringen Einfluss der *scaffolding*-Aktivität von Hck auf die subzelluläre Verteilung von STAT5A hinweist. Die inaktive Kinasemutante von Hck zeigte eine geringfügig veränderte Lokalisation innerhalb der Zelle im Vergleich zum Wild-Typ-Protein. Die Kinaseaktivität von Hck ist demnach essenziell für eine effiziente Retention von STAT5A im Zytoplasma.

Durch die Behandlung der Zellen mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP1 konnte dieser Befund untermauert werden. HEK293T-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für STAT5A-eYFP, Hck-eCFP und BCR-ABL (p210) kodierten. Zum Zeitpunkt der Transfektion befanden sich die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten *cover slips*. Nach 24 h wurden die Zellen für 2 h mit 0,1 μ M PP1 behandelt und im Anschluss fixiert.

Mit einem spezifischen Antikörper für die Abl-Kinase und Cy3-markiertem Sekundärantikörper wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Die Konzentration des eingesetzten PP1 wurde bewußt so gewählt, dass keine Hemmung der Kinaseaktivität von BCR-ABL auftrat. Die Aufnahmen zeigten die vollständige Translokation von STAT5A-eYFP in den Zellkern, obwohl Hck-eCFP erfolgreich kotransfiziert und detektiert werden konnte (Abb. 16C).

Die Kinaseaktivität von Hck ist demnach entscheidend für die zytoplasmatische Retention von durch BCR-ABL tyrosinphosphoryliertem STAT5A.

Ein entsprechendes Experiment mit PP1 wurde in K562-Zellen für endogenes STAT5A durchgeführt. Hierfür wurden K562-Zellen auf beschichteten *cover slips* ausgesät. Nach einer 24 stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen 1 bzw. 2 h mit 0,1 μ M PP1, das dem Medium zugesetzt wurde, behandelt. Zudem gab es einen Ansatz der unbehandelt blieb. Dann wurden die Zellen mit Methanol fixiert und eine Immunfärbung durchgeführt. Endogenes STAT5A wurde mittels spezifischem Primärantikörper und Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper angefärbt. Außerdem wurde DRAQ5TM als nukleärer Marker genutzt.

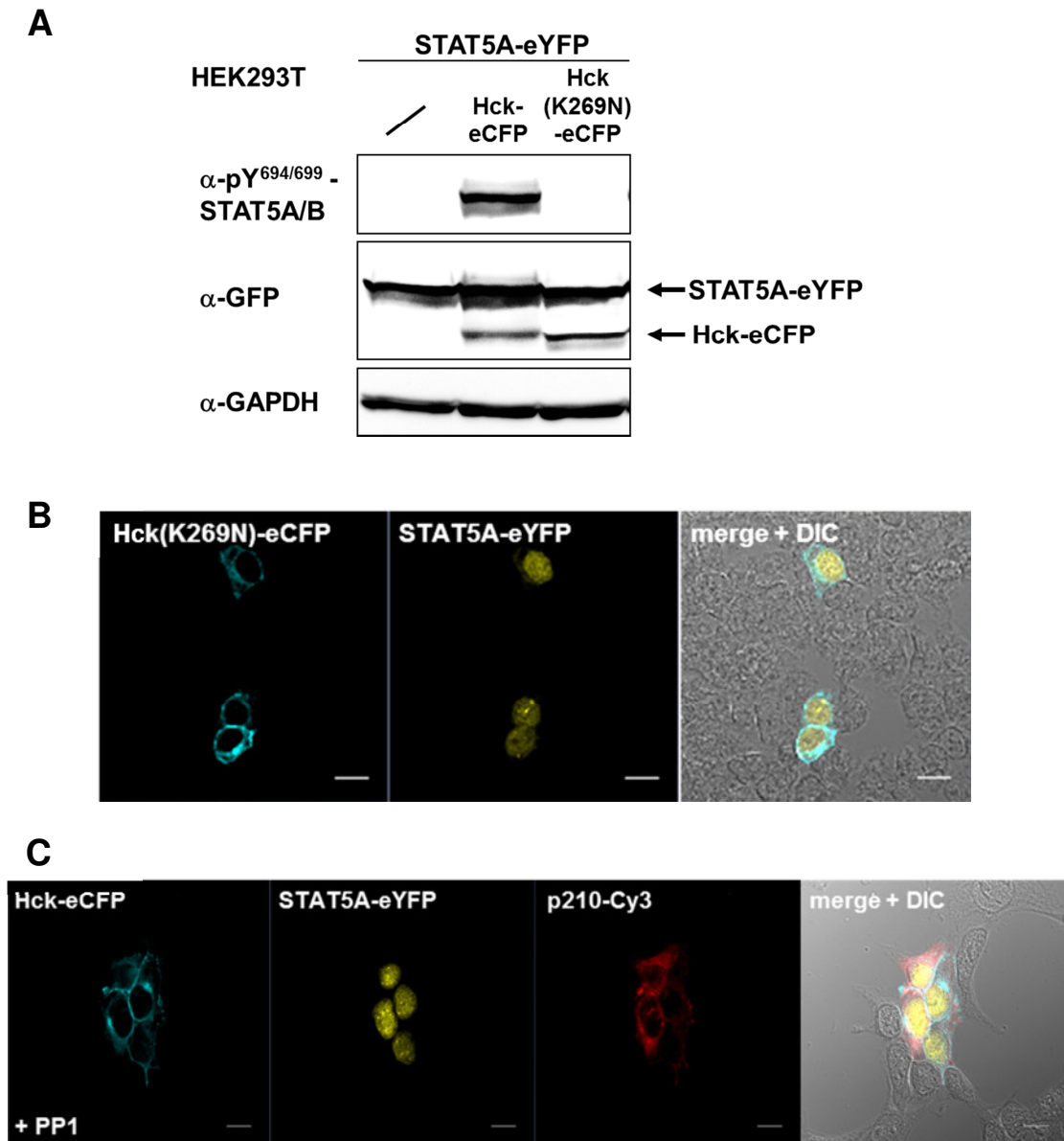


Abb. 16: Einfluss der Kinaseaktivität von Hck auf die subzelluläre Verteilung von STAT5A in BCR-ABL positiven HEK293-Zellen. (A) HEK293T-Zellen wurden mit einem Plasmid für STAT5A-eYFP transfiziert. Außerdem wurde in einem Ansatz Hck-eCFP und in einem weiteren Ansatz Hck(K269N)-eCFP koexprimiert. Nach 24 stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden in eine SDS-PAGE eingesetzt und ein *Western Blot* durchgeführt. Die angegebenen Immundetektionen wurden vorgenommen. **(B)** T-REx™-293-BCR-ABL-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete *cover slips* gesplittet und mit Plasmiden für die Expression von STAT5A-eYFP und Hck(K269N)-eCFP kotransfiziert. Mit 8 ng/ml Doxycyclin wurde für 16 h die Expression von BCR-ABL (p210) induziert. Im Anschluß wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Proben am LSM 710 ausgewertet. **(C)** HEK293T-Zellen wurden mit 0,1 μ M PP1 für 2 h behandelt, nachdem sie für die Expression von STAT5A-eYFP, Hck-eCFP und BCR-ABL (p210) transfiziert und 24 h kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und die Lokalisation von STAT5A-eYFP analysiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. *Merge* = Überlagerung; DIC = Differenzieller Interferenz-Kontrast

In den unbehandelten K562-Zellen war STAT5A zum größten Teil im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 17A oben, links). Die Suspensionszellen

zeichnen sich durch ein verhältnismäßig kleines Zytoplasma aus, so dass es wie ein heller Ring um den Nukleus zu sehen ist. Analog zum Versuch in Abb. 12C wurden Intensitätsprofile angefertigt (Abb. 17A rechts). Es waren jeweils Maxima der Intensität im Zytoplasma erkennbar, während die Cy2-Signalstärke im Kern, wo das DRAQ5-Signal anstieg, absank (Abb. 17A oben, rechts).

Wurden die K562-Zellen nun für 1 h mit PP1 behandelt, kam es zu einer Akkumulation von STAT5A im Nukleus (Abb. 17A zentral, links). In der Überlagerung des DRAQ5- und des Cy2-Signals (*merge*) wurde in der Region des Nukleus aus dem grünen Cy2-Signal und dem roten DRAQ5-Signal eine gelbliche Mischfarbe, was auf eine Kolo-kalisation im Nukleus schließen lässt. Im Intensitätsprofil ist zu erkennen, dass dort wo das DRAQ5-Signal am stärksten ist, auch die höchste Intensität des Cy2-Signals (Abb. 17A zentral, rechts) detektiert wurde. Demnach war ein Großteil von STAT5A kernlokalisiert. Die Morphologie der Zellen veränderte sich leicht durch die Zugabe von PP1 ins Kulturmedium, was vermutlich durch den Einfluss der Src-Kinasen auf fokale Adhäsionen und das Zytoskelett zustande kam [129].

Auch nach einer Inkubationszeit von 2 h mit PP1, war STAT5A hauptsächlich kernlokalisiert (Abb. 17A unten, links). Die Signalintensität von STAT5A-Cy2 ist im Nukleus am höchsten (Abb. 17A unten, rechts). Der Verlauf der Intensitätsprofile nach 1 bzw. 2 h PP1-Behandlung ist vergleichbar.

Durch den Einsatz spezifischer Src-Inhibitoren konnte nachgewiesen werden, dass Src-Kinasen die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A in einer BCR-ABL positiven CML-Zelllinie verursachten.

Um zu zeigen, dass die Behandlung mit dem SFK-Inhibitor PP1 in entsprechender Konzentration nicht die Aktivität bzw. die Phosphorylierung von STAT5A und BCR-ABL beeinflusste, wurden K562-Zellen für 1 h und 24 h mit dem Src-Kinase-Inhibitor behandelt bzw. unbehandelt belassen. Im Anschluss wurden Lysate hergestellt und eine *SDS-PAGE* und ein *Western Blot* durchgeführt.

Bereits nach 1 h Inkubation der K562-Zellen mit PP1 war c-Src nahezu vollständig dephosphoryliert (Abb. 17B). Die Gegenfärbung gegen Src, bestätigte die Bande der Phosphofärbung als c-Src-Protein. Die

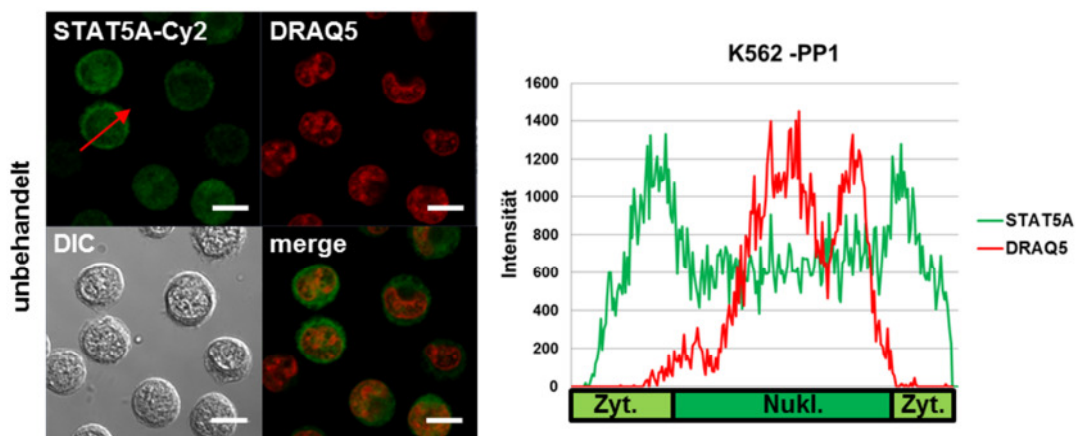
Phosphorylierung von BCR-ABL wurde durch die eingesetzte PP1-Konzentration nicht beeinträchtigt (Abb. 17B).

Die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A/B sank geringfügig nach Inkubation der Zellen mit dem Src-Kinase-Inhibitor ab. Bezog man hier jedoch die Gegenfärbung gegen STAT5A/B mit ein, war zu erkennen, dass auch die Gesamtmenge an STAT5A/B-Protein in den behandelten Ansätzen geringer war. Die direkte Tyrosinphosphorylierung von STAT5A durch einige der Mitglieder der Src-Familie wurde bereits beschrieben [142]. Eine Abnahme der Phosphorylierung von STAT5A war daher denkbar. Die Färbung gegen Hsp-70 diente der Ladungskontrolle und war gleichmäßig. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit PP1 nur die Kinaseaktivität von Src entscheidend beeinträchtigt wurde (Abb. 17B).

Im Folgenden wurde die Auswirkung der SFK-Inhibition auf die Expression eines direkten Zielgens von STAT5A untersucht.

K562-Zellen wurden, wie schon im Versuch zuvor beschrieben (Abb. 17B), für 1 h und 24 h mit PP1 behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNS isoliert. Es wurden 1 µg RNS pro Ansatz in cDNS umgeschrieben und mit Primern, die spezifisch an *cis*-cDNS banden, in einer *qRT-PCR* eingesetzt. Das CIS-Protein (*Cytokine-Inducible SH2-containing protein*) ist eines von acht Mitgliedern der SOCS (*Suppressor of Cytokine Signalling*)-Familie, die auf unterschiedliche Weise die Signalweiterleitung des JAK/STAT-Signalwegs negativ beeinflussen können (Kap. 1.3). Die Expression von CIS wird direkt durch aktives STAT5 reguliert.

A



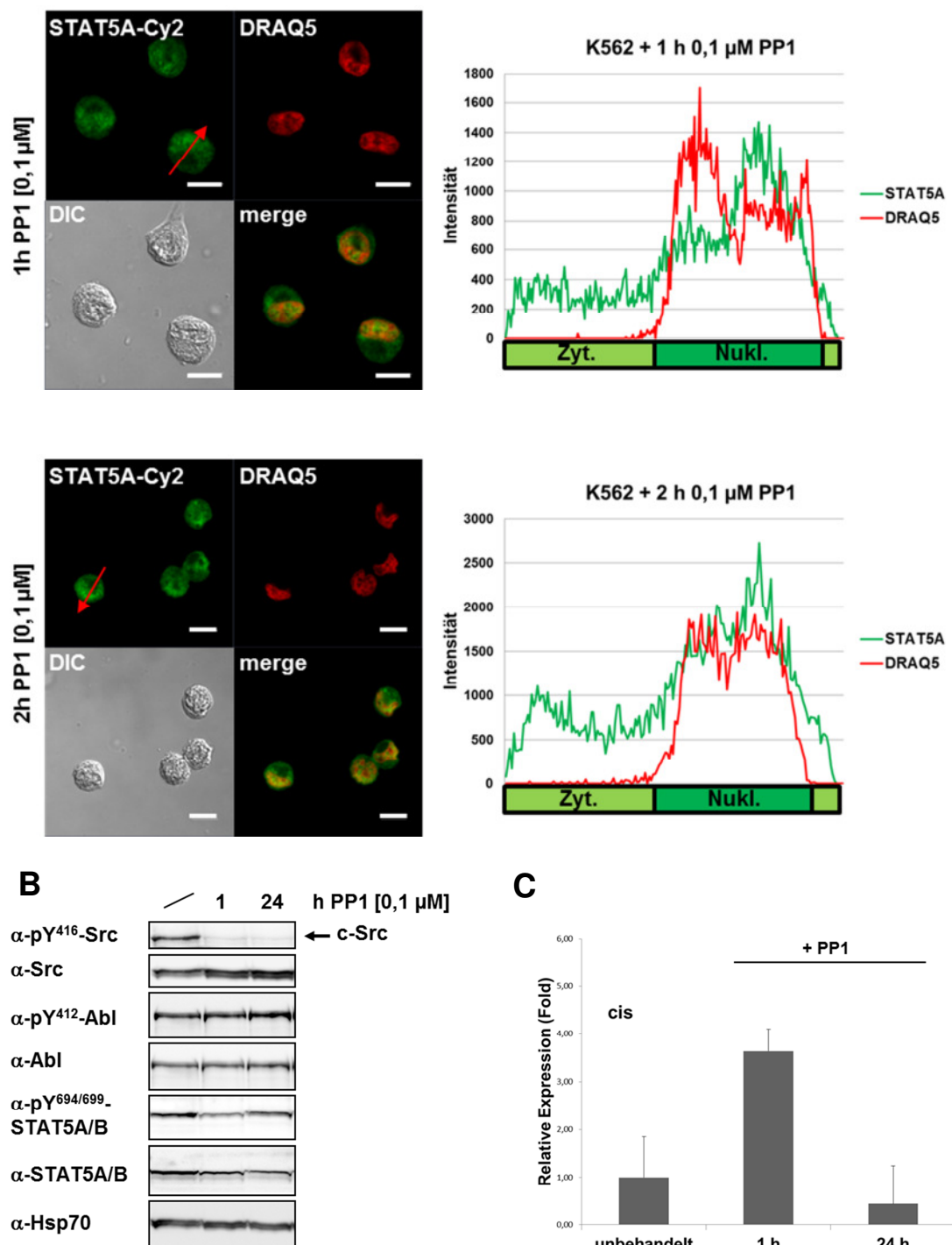


Abb. 17: Einfluss der Kinaseaktivität von SFKs auf die subzelluläre Verteilung von STAT5A in BCR-ABL positiven K562-Zellen. (A) K562-Zellen wurden auf beschichteten *cover slips* ausgesät und für 1 bzw. 2 h mit 0,1 µM PP1 behandelt, oder unbehandelt belassen. Es folgte die Methanolfixierung und Immunfärbung von endogenem STAT5A mittels spezifischem Erstantikörper gegen STAT5A und Cy2-konjugiertem Zweitantikörper. DRAQ5TM wurde als nukleärer Marker hinzugegeben. Illustrativ wurde ein Intensitätsprofil einer repräsentativen Zelle aus jedem Ansatz abgebildet. Der rote Pfeil markierte den Verlauf des Profils durch die Zelle. Positionen des Nukleus (Nukl.) bzw. des Zytoplasmas (Zyt.) wurden farblich markiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. *Merge* = Überlagerung; DIC = Differenzieller Interferenz-Kontrast **(B)** K562-Zellen wurden unbehandelt belassen, oder 1 bzw. 24 h mit PP1 [0,1 µM] inkubiert. Lysate wurden

hergestellt, 20 µg Gesamtprotein für eine *SDS-PAGE* eingesetzt und anschließend *geblottet*. Der Effekt des Src-Kinase-Inhibitors auf weitere Signaltransduktionswege wurde durch Immundetektionen untersucht. Die Bande für c-Src wurde markiert. Als Ladungskontrolle diente Hsp-70. **(C)** Eine *qRT-PCR* wurde mit mRNA aus K562-Zellen durchgeführt, die 1 bzw. 24 h mit PP1 [0,1 µM] behandelt, oder unbehandelt belassen wurden. Zuvor wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression des *cis*-Gens wurde mit spezifischen TaqMan[®]-Sonden überprüft. Fehlerindizes wurden eingefügt.

Die graphische Auswertung der *qRT-PCR* zeigte, dass nach einstündiger Behandlung der K562-Zellen die Expression des *cis*-Gens anstieg (Abb. 17C), was möglicherweise durch die Anreicherung von phosphoryliertem STAT5A im Nukleus bewirkt wurde (Abb. 17C). Nach 24 h wurde die Expression von *cis* wieder drastisch herabreguliert, obwohl weiterhin keine Phosphorylierung von Src detektiert werden konnte (Abb. 17B).

Durch die beschriebenen Versuche konnte der Einfluss von Src-Kinasen auf die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A in BCR-ABL positiven Zellen und die daraus resultierenden Veränderungen der Genexpression nachgewiesen werden.

Im Folgenden sollte der Mechanismus, wie Src-Kinasen die zytoplasmatische Retention von STAT5A verursachen, näher untersucht werden.

3.7 Keine Reduktion der STAT5A-Dimerisierung nach Aktivierung durch Src-Kinasen in T-Rex-293-Zellen

Es wäre denkbar, dass die zytoplasmatische Retention von tyrosin-phosphoryliertem STAT5A durch mehrere Mechanismen reguliert wird. Zum einen kann eine direkte Interaktion von STAT5A und unterschiedlicher Src-Kinasen, evtl. im Komplex mit weiteren Faktoren, den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma zurückhalten. Zum anderen könnte eine posttranslationale Modifikation von STAT5A die Anreicherung im Zytoplasma verursachen. Die Eigenschaft des Transkriptionsfaktors zu dimerisieren bzw. mit Importinen zu interagieren könnte dadurch gestört werden.

Zu Anfang sollte untersucht werden, ob nach Phosphorylierung durch Src die Dimerisierung von STAT5A und somit die Translokation in den Nukleus beeinträchtigt ist.

Um die Dimerisierung von STAT5A, die durch die reziproke SH2-Domänen-Phosphotyrosin-Interaktion zweier aktivierter STAT5A-Moleküle zustande

kommt, nach unterschiedlichen Stimuli zu analysieren, sollte die Methode der *Blue Native Page (BN-PAGE)* angewandt werden. Hierbei werden native Proteine über ein Gel aufgetrennt.

Induzierbare T-REx™-293-BCR-ABL-Zellen wurden mit STAT5A-eYFP transfiziert. Je nach Ansatz wurden Plasmide für Hck-eGFP bzw. v-Src-DsRed kotransfiziert. Zudem wurde einer der Ansätze für 45 min mit IFN- γ stimuliert, um die Dimerisierung nach Zytokinstimulation als Positivkontrolle zu nutzen. Die IFN- γ -Stimulation führte zur Expression eines Reportergens durch STAT5A-eYFP, wonach von einer erfolgreichen Dimerisierung ausgegangen werden konnte (Kap 3.1, Abb. 9D).

Die markierten Ansätze (+) wurden für 16 h mit Doxycyclin behandelt, um die Expression von BCR-ABL (p210) zu induzieren (Abb. 18A). Im Anschluss wurden aus den Zellen Lysate hergestellt und die nativen Proteine über Nacht in einer *BN-Page* aufgetrennt. Die STAT5A-Dimere konnten mit Hilfe eines Fluoreszenz-*Scanners* anhand des eYFP-Signals sichtbar gemacht werden (siehe Material und Methoden, *BN-Page*). Außerdem wurden die Lysate für eine *SDS-PAGE* und anschließendem *Western Blot* eingesetzt, um die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP zu überprüfen. Es sollte ausgeschlossen werden, dass mögliche Unterschiede in der Dimerisierung auf Differenzen der Tyrosinphosphorylierung beruhen.

Im nativen Gel war nach der IFN- γ -Stimulation eine Dimerbande zu sehen, wobei in den unbehandelten Zelllysaten nur die Monomerbande detektiert werden konnte (Abb. 18A). Die Intensität der STAT5A-eYFP-Monomerbande wies je nach Ansatz kaum Intensitätsunterschiede auf. Nach Induktion der Expression von BCR-ABL durch Doxycyclin und der anschließenden Aktivierung von STAT5A, bildete das Fusionsprotein ebenfalls Dimerkomplexe aus. Wurden die Src-Kinasen Hck-eGFP oder v-Src-DsRed mit STAT5A-eYFP koexprimiert, kam es ebenfalls zu einer ausgeprägten Dimerformation. Dies änderte sich auch nicht, wenn die Expression von BCR-ABL induziert wurde (Abb. 18A).

Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass die Dimerisierung von STAT5A nach Aktivierung durch Src-Kinasen nicht negativ beeinflusst wird. Es waren keine größeren Abweichungen zu beobachten, unabhängig davon

ob eine konstitutiv aktive Kinase STAT5A tyrosinphosphorylierte oder die Zytokinstimulation die Aktivierung von STAT5A induzierte.

Im *Western Blot* konnte durch die Immundetektion eine relativ gleichmäßige Phosphorylierung von STAT5A-eYFP sowohl durch die kotransfizierten Src-Kinasen, als auch durch die Induktion von BCR-ABL nachgewiesen werden (Abb. 18B). Lediglich die IFN- γ -Stimulation führte zu einer etwas geringeren Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP. Die Gegenfärbung gegen GFP diente der gleichzeitigen Detektion von STAT5A-eYFP und Hck-eGFP, deren Expression keinen größeren Schwankungen unterlag.

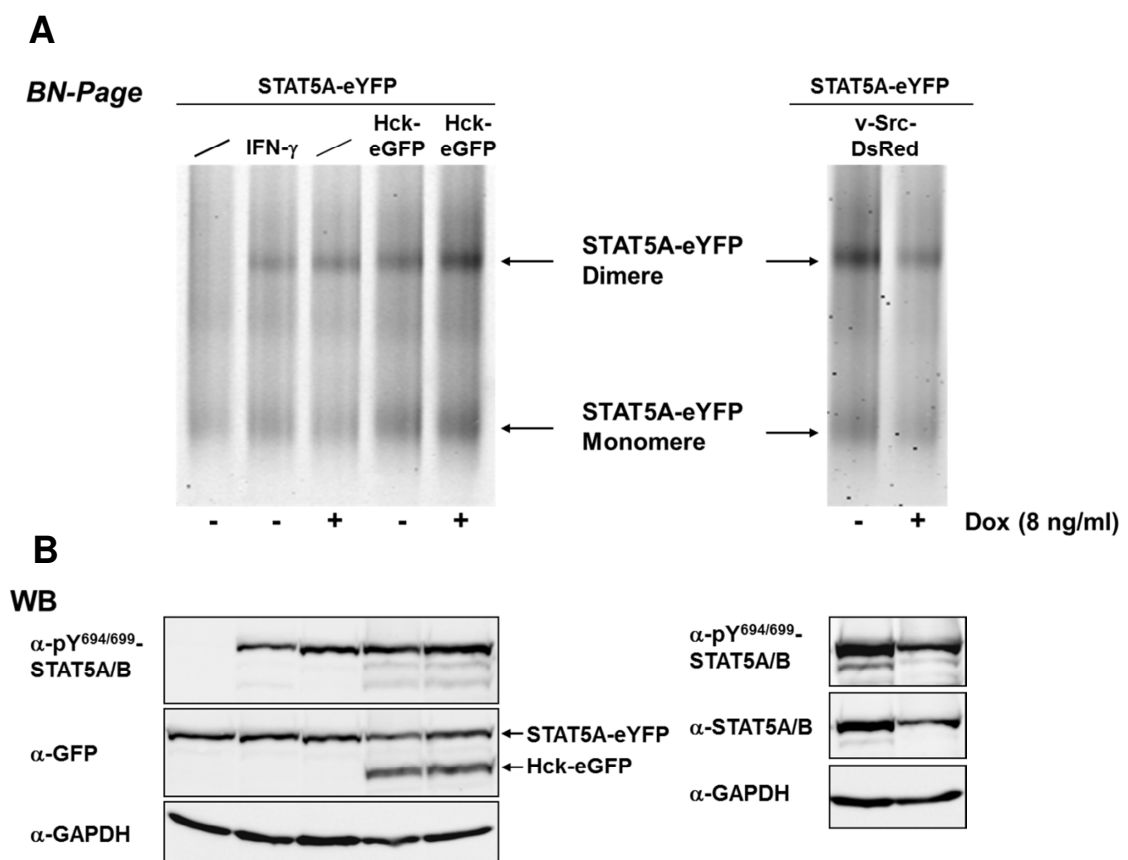


Abb. 18: Dimerisierungsanalyse von STAT5A nach Aktivierung durch Src-Kinasen. (A) T-REx™-293-BCR-ABL-Zellen wurden mit einem Plasmid, das für STAT5A-eYFP kodierte, transfiziert. Außerdem wurden je nach Ansatz Plasmide für Hck-eGFP oder v-Src-DsRed kotransfiziert. Ein Ansatz wurde für 45 min mit 25 ng/ml IFN- γ stimuliert. Markierte Ansätze wurden für 16 h mit Doxycyclin (8 ng/ml) behandelt, um die Expression von BCR-ABL (p210) zu induzieren. Lysate wurden hergestellt und 30 μ g Gesamtprotein für eine *BN-Page* eingesetzt. Die Detektion der fluoreszierenden Proteinkomplexe im nativen Gel erfolgte durch die Anregung der Fluoreszenzproteine im Typhoon Fluoreszenz-Scanner. (B) Die Lysate aus (A) wurden in eine *SDS-PAGE* eingesetzt, die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran *geblottet* und Immundetektionen mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Die GAPDH-Färbung diente der Ladungskontrolle. Das Auftragungsmuster entsprach der *BN-Page* (A).

Bei den Ansätzen in denen BCR-ABL induziert wurde, konnte durch die Färbung gegen STAT5 eine leicht verminderte STAT5A-eYFP-Menge auf der

Membran detektiert werden (Abb. 18B, rechts). Deswegen war vermutlich die Dimerbande nach Induktion der Expression von BCR-ABL etwas schwächer (Abb. 18A, rechts). Die Auftragung der gleichen Proteinkonzentrationen auf das SDS-Gel wurde durch die Detektion des *house keeping* Gens GAPDH belegt.

Durch das beschriebene Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die zytoplasmatische Retention von STAT5A nach Aktivierung durch die Src-Kinasen Hck und Src nicht auf einer gestörten Dimerisierung des Transkriptionsfaktors beruht.

3.8 Dysregulation der Lokalisation von v-Src beeinflusst die subzelluläre Verteilung von STAT5A

Im Anschluß an die Dimerisierungsstudie wurde sich der Fragestellung gewidmet, ob die direkte Interaktion der Src-Kinasen mit STAT5A zur zytoplasmatischen Retention beiträgt.

Hierfür wurde eine Mutante von v-Src mittels PCR hergestellt, deren N-Terminus um die ersten neun Aminosäuren verkürzt war (Δ N-v-Src). Durch diese Deletion wurde das Glycin, an das der Myristylanker angehängt wird, und die nachfolgende lysinreiche Region entfernt. Die Myristylierung reguliert maßgeblich die Assoziation der Src-Kinasen mit Membransystemen. Das Resultat der Deletion war ein v-Src-Protein, das nicht mehr mit der Membran assoziiert ist. Die Deletion des Myristylankers hat zur Folge, dass Zellen durch v-Src nicht mehr transformiert werden. Membranlokalisierte Proteine werden nicht mehr im gleichen Maße tyrosinphosphoryliert [191]. Daher wurde zu Anfang überprüft, ob STAT5A weiterhin durch Δ N-v-Src phosphoryliert werden kann.

HEK293T-Zellen wurden mit Vektoren transfiziert, die für STAT5A-eCFP und Δ N-v-Src-DsRed bzw. v-Src-DsRed kodierten. Nach 24 h wurden aus den Zellen Lysate hergestellt und im Anschluss eine *SDS-PAGE* und ein *Western Blot* durchgeführt. Zusätzlich wurde jeweils ein Ansatz von Zellen, die STAT5A-eCFP und Δ N-v-Src bzw. v-Src exprimierten, auf beschichteten

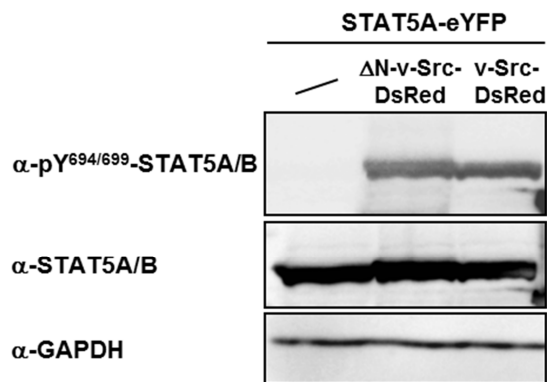
3 Ergebnisse

Deckgläschen ausplattiert und fixiert, um sie am konfokalen Mikroskop zu untersuchen.

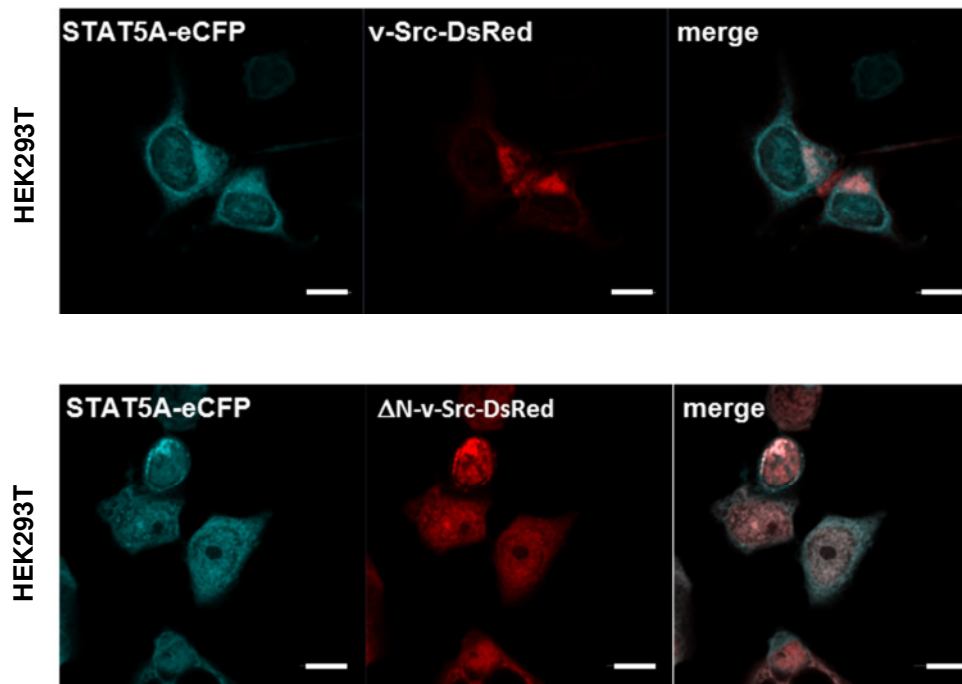
Durch die Immundetektion von phosphoryliertem STAT5A/B (pY^{694/699}) konnte gezeigt werden, dass die N-terminal verkürzte Variante von v-Src STAT5 genauso phosphoryliert wie der Wildtyp (Abb. 19A). Die Färbungen gegen STAT5 und GAPDH als Ladungskontrolle belegten, dass gleichmäßige Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden. Um nun zu überprüfen, ob Δ N-v-Src die subzelluläre Verteilung von aktiviertem STAT5A beeinflusst, wurden die fixierten HEK293T-Zellen am konfokalen Mikroskop untersucht.

A

HEK293T



B



C

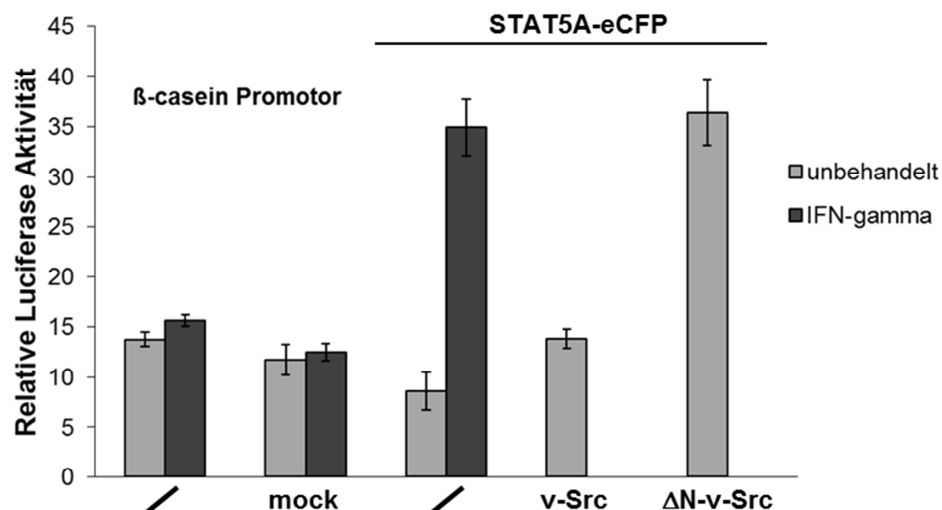


Abb. 19: Analyse des Einflusses einer nicht-myristoylierten v-Src-Mutante auf die Aktivierung und subzelluläre Verteilung von STAT5A. (A) HEK293T-Zellen wurden mit Plasmiden kotransfiziert, die für STAT5A-eYFP und v-Src-DsRed bzw. Δ N-v-Src-DsRed kodierten. 24 h später wurden Lysate hergestellt und in eine SDS-PAGE eingesetzt und die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit den angegebenen Antikörpern wurden Immundetektionen durchgeführt. Die GAPDH-Färbung diente der Ladungskontrolle. (B) Für Immunfluoreszenzaufnahmen wurden HEK293T-Zellen mit STAT5A-eCFP und Δ N-v-Src-DsRed transfiziert, 24 h kultiviert und mit Methanol fixiert. Die Aufnahmen wurden am LSM 710 gemacht. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. Merge = Überlagerung; DIC = Differenzieller Interferenz-Kontrast (C) HEK293T-Zellen wurden mit einem STAT5-responsiven Luciferase-Reporterplasmid (β -Casein-Promotor), einem β -Galaktosidase-kodierenden Plasmid, sowie je nach Ansatz mit Expressionsvektoren für eCFP (mock) oder STAT5A-eCFP transfiziert. Außerdem wurde ansatzabhängig entweder v-Src oder Δ N-v-Src ko-transfiziert. Die Zellen einiger Ansätze (dunkelgraue Balken) wurden für 6 h mit 25 ng/ml IFN- γ stimuliert oder blieben unstimuliert (hellgraue Balken). Die Balken repräsentieren Mittelwerte der resultierenden relativen Luciferase-Aktivität (RLA) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerindizes angegeben.

Die N-terminal verkürzte Mutante von v-Src, die mit DsRed fusioniert war, konnte nun nicht mehr ausschließlich an Membransystemen detektiert werden, sondern war homogen über Zytoplasma und Zellkern verteilt (Abb. 19B unten). STAT5A-eCFP akkumulierte zwar nicht im Zellkern, wies jedoch keine zytoplasmatische Retention mehr auf (Abb. 19B unten), wie es in Koexpression mit Wildtyp-v-Src der Fall war (Abb. 19B oben). Das Verteilungsmuster von STAT5A-eCFP entsprach dem von Δ N-v-Src-DsRed. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Lokalisation von v-Src in der Zelle direkten Einfluss auf die Verteilung von STAT5A hat.

Da STAT5A, phosphoryliert durch Δ N-v-Src, verstärkt im Kern detektiert werden konnte, wurde die transkriptionelle Aktivität von STAT5A in einem Reporterassay untersucht. HEK293T-Zellen wurden mit Reporter-

Konstrukten transfiziert, die die transkriptionelle Aktivität von STAT5A anhand der Bindung am β -Casein-Promotor und der daraus resultierenden Expression eines Luciferasegens messbar macht. Um Nebeneffekte durch endogene Proteine und durch die Transfektion an sich auszuschließen, wurden in weiteren Ansätzen nur die Reporter-Konstrukte oder zusätzlich ein eCFP-exprimierender Vektor (pECFP-C1) hinzutransfiziert (mock).

Außerdem wurden entsprechende Expressionsvektoren in die unterschiedlichen Ansätze transfiziert (Abb. 19C), um den Effekt von v-Src-DsRed bzw. Δ N-v-Src-DsRed auf die STAT5A-abhängige Expression des Luciferase-reporters zu untersuchen. Markierte Ansätze wurden zusätzlich mit IFN- γ stimuliert, um die transkriptionelle Aktivität induziert durch Zytokinstimulation oder hinzutransfizierter Src-Kinase zu vergleichen.

Ohne die Kotransfektion von STAT5A-eCFP gab es keine Veränderung der Luciferase-Expression, unabhängig davon ob mit oder ohne IFN- γ stimuliert wurde. Dies bestätigte die zuvor gemachte Aussage, dass kaum endogenes STAT5 in HEK293T-Zellen exprimiert wurde. Die Expression von eCFP alleine bewirkte keine Veränderung der Luciferase-Aktivität (Abb. 19C, mock).

Wurde nun STAT5A-eCFP kotransfiziert, konnte nach Stimulation ein deutlicher Anstieg der Luciferase-Aktivität ermittelt werden. Wurde v-Src-DsRed mit STAT5A-eCFP koexprimiert, stieg die Luciferase-Aktivität kaum an. Dies war vermutlich ein Resultat der zytoplasmatischen Retention von STAT5A nach Aktivierung durch v-Src (Kap. 3.4). Ein starker Anstieg der relativen Luciferase-Aktivität wurde jedoch durch die Koexpression mit Δ N-v-Src gemessen und dieser Anstieg war vergleichbar mit der Luciferase-Aktivität nach IFN- γ -Stimulation (Abb. 19C).

Der Versuch zeigt, dass die durch Src modifizierte subzelluläre Verteilung von STAT5A Einfluss nimmt auf die Induktion STAT5-abhängiger Gene.

Die beschriebenen Versuche wiesen auf eine direkte Interaktion von STAT5A mit v-Src hin. In den folgenden Experimenten sollte der Verdacht erhärtet werden.

3.9 Die SH2-Domäne von STAT5A vermittelt die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit v-Src

Anhand der Interaktion von STAT5A mit p85/Gab2 wurde gezeigt, dass die Interaktion von aktiviertem STAT5A mit zytoplasmatischen Faktoren dessen Lokalisation beeinflussen kann [166,167]. Hieraus resultierte die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Im Folgenden sollte die Interaktion von STAT5A und v-Src, stellvertretend für weitere Src-Kinasen, untersucht und strukturelle Voraussetzungen hierfür analysiert werden.

Um die Wechselwirkung von STAT5A und v-Src nachzuweisen, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, ob ein Komplex aus dem Transkriptionsfaktor und v-Src detektierbar ist.

HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die entweder für den Wildtyp von STAT5A bzw. STAT3 oder für die jeweiligen SH2-Domänen-Mutanten kodierten. Innerhalb von SH2-Domänen befindet sich ein konserviertes Arginin, das entscheidend für die Affinität zu Phosphotyrosinen ist. In STAT5A wurde das Arginin 618 und in STAT3 das Arginin 609 zu Glutamin mutiert. Hierdurch wird die reziproke Interaktion und die daraus resultierende Dimerisierung der STAT-Proteine unmöglich gemacht. Auch die Interaktion von STAT5A mit Phosphotyrosinen anderer Proteine über die SH2-Domäne wurde hierdurch verhindert. Ist nun die SH2-Domäne von STAT5A notwendig für eine potentielle Interaktion mit v-Src, könnte dies in der Immunpräzipitation nachgewiesen werden.

Die STAT-Proteine wurden als Fusionsproteine mit eYFP kloniert und eingesetzt. Sämtliche Ansätze wurden zusätzlich mit dem Plasmid pcDNA3.1[Ⓢ](+)-v-Src-DsRed transfiziert. STAT3 wurde durch v-Src ebenso wie STAT5A tyrosinphosphoryliert, jedoch akkumulierte STAT3 nach Aktivierung im Nukleus (Kap. 3.4, Abb. 12A, B).

Die transfizierten HEK293T-Zellen wurden 24 h kultiviert und anschließend Lysate hergestellt. Die Lysate wurden in einer Immunpräzipitation eingesetzt. Ein Antikörper, der spezifisch GFP und seine Derivate erkennt, wurde an Protein A-Sepharose-*Beads* immobilisiert. Die *beads*-Antikörper-Suspension wurde zu den Lysaten gegeben, so dass Immunkomplexe mit den eYFP-markierten STAT-Molekülen entstanden. Interaktionspartner der STAT-

Fusionsproteine wurden mit den *beads* präzipitiert. Die Präzipitate wurden in eine *SDS-PAGE* eingesetzt und im *Western Blot* analysiert (IP). Außerdem wurde eine *SDS-PAGE* und ein *Western Blot* mit den ursprünglichen Lysaten durchgeführt (WB), um die Expression von v-Src-DsRed nachzuweisen.

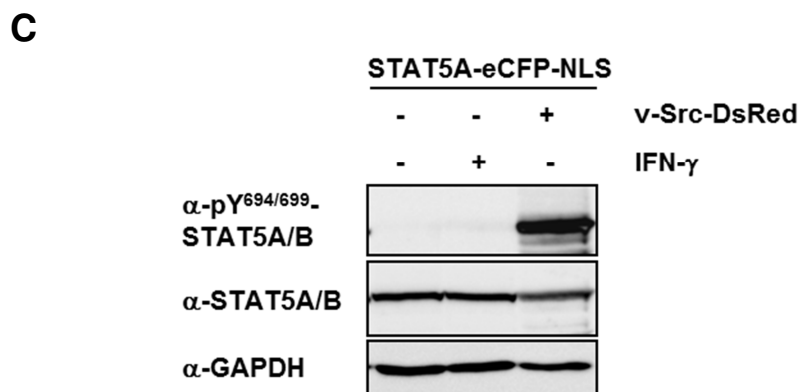
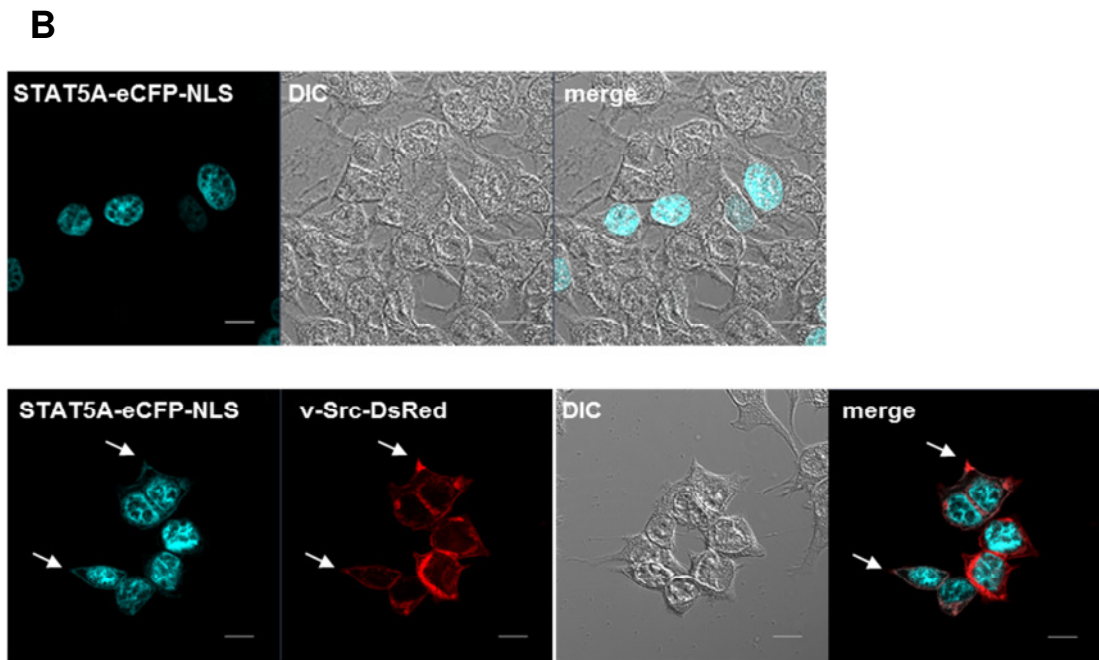
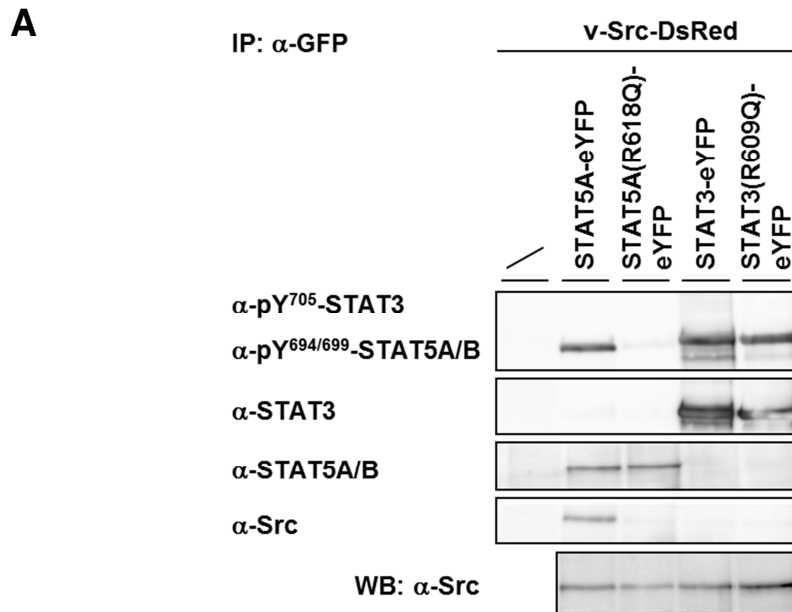
Die Antikörper, die der Detektion von tyrosinphosphoryliertem STAT5A/B und STAT3 dienten, wurden gemischt, so dass die gleichzeitige Identifizierung der STAT-Phosphorylierungen möglich war. Sowohl STAT5A-, als auch STAT3-eYFP wurden durch v-Src-DsRed am Haupttyrosin phosphoryliert. Die SH2-Domänen-Mutanten verhielten sich diesbezüglich unterschiedlich. Nur die Phosphorylierung von STAT3(R609Q)-eYFP konnte ermittelt werden, wobei STAT5A(R618Q)-eYFP kaum eine Tyrosinphosphorylierung aufwies (Abb. 20A). Die Membran wurde gegen STAT3 bzw. STAT5 gefärbt, um die gleichmäßige Präzipitation zu überprüfen. STAT5A-eYFP, STAT3-eYFP und ihre Mutanten konnten detektiert werden. Die Bandenstärke von STAT3 war etwas höher als die von STAT5A, dennoch konnte von einer erfolgreichen Immunpräzipitation der Fusionsproteine durch den GFP-Antikörper gesprochen werden (Abb. 20A).

Lediglich in Koexpression mit STAT5A-eYFP wurde v-Src-DsRed koimmunpräzipitiert. Die Interaktion der Proteine konnte somit nachgewiesen werden. Die Mutante STAT5A(R618Q)-eYFP, in der die SH2-Domäne inaktiviert ist, kopräzipitierte die konstitutiv aktive Kinase nicht. STAT3-eYFP, sowie die R609Q-Mutante zeigten keine vergleichbar stabile Interaktion mit v-Src-DsRed.

Im *Western Blot* mit den ursprünglichen Lysaten vor der Präzipitation zeigte sich eine gleichmäßige v-Src-DsRed-Expression (Abb. 20A, WB).

Um die Interaktion von STAT5A und v-Src mikroskopisch sichtbar zu machen, musste das Hintergrundsignal des zytoplasmatischen STAT5A reduziert werden. Aus diesem Grund wurde die cDNS der NLS des großen SV40-T-Antigens C-terminal an die cDNS des Fusionsproteins STAT5A-eCFP kloniert. Die erste klassische NLS, die entdeckt und beschrieben wurde war die des großen SV40-T-Antigens [192]. Es ist eine äußerst starke NLS, die fusioniert an freie zytoplasmatische Proteine zu deren nukleärer Akkumulation führt. Sie beinhaltet eine Vielzahl basischer Aminosäuren, die für die direkte Interaktion mit α -Importinen verantwortlich sind. Im Komplex

mit dem β -Karyopherin Importin- β , das den Durchtritt durch die Kernporen vermittelt, gelangt das zu transportierende Protein in den Zellkern.



D

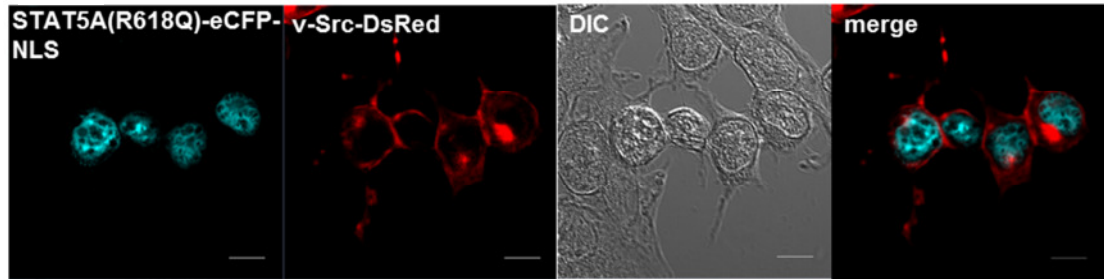


Abb. 20: Die SH2-Domäne von STAT5A vermittelt die Interaktion mit v-Src. (A) HEK293T-Zellen wurden mit STAT5A-eYFP bzw. STAT3-eYFP oder den entsprechenden SH2-Domänen-Mutanten transfiziert. Außerdem wurde ein Plasmid, das für v-Src-DsRed kodierte, kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h lysiert und die Lysate für eine Immunpräzipitation gegen GFP eingesetzt. Eine SDS-PAGE wurde durchgeführt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (*Western Blot*). Immundetektionen wurden mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Eine SDS-PAGE, ein anschließender *Western Blot* und die Detektion von Src wurde mit den ursprünglichen Lysaten durchgeführt. **(B)** HEK293T-Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das für STAT5A-eCFP-NLS kodierte. Ein Ansatz wurde zusätzlich mit v-Src-DsRed transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen auf beschichteten *cover slips* fixiert. Die konfokalen Aufnahmen wurden am LSM 710 gemacht. **(C)** HEK293T-Zellen, die nach Transfektion STAT5A-eCFP-NLS und je nach Ansatz zusätzlich v-Src-DsRed exprimierten, wurden nach 24 h Inkubation lysiert. Ein Ansatz wurde vor der Lyse für 45 min mit IFN- γ [25 ng/ml] stimuliert. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran *geblottet*. Angegebene Antikörperimmundetektionen schlossen sich an. Für die Ladungskontrolle wurde die Färbung gegen GAPDH genutzt. **(D)** HEK293T-Zellen wurden wie in (B) transfiziert. Jedoch wurde anstatt des Wildtyps ein Plasmid für STAT5A(R618Q)-eCFP-NLS verwendet. Die Zellen befanden sich auf beschichteten *cover slips* und wurden nach 24 h mit Methanol fixiert. Die Auswertung der Proben fand am LSM 710 statt. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. *Merge* = Überlagerung; DIC = Differenzieller Interferenz-Kontrast

HEK293T-Zellen wurden auf *cover slips* ausgesät und mit dem Konstrukt pcDNA5/FRT/TO[®]spezial-STAT5A-eCFP-NLS transfiziert. In einen der Ansätze wurde zusätzlich ein Vektor kotransfiziert, der die Expression von v-Src-DsRed vermittelte. Die Zellen wurden 24 h inkubiert und im Anschluß für die Untersuchung am konfokalen Mikroskop fixiert.

Die Aufnahme in Abb. 20B zeigte die vollständige Akkumulation von STAT5A-eCFP-NLS im Nukleus ohne jeglichen Stimulus. Demnach war die fusionierte NLS aktiv. In Koexpression mit v-Src-DsRed wurde der größte Teil von STAT5A-eCFP-NLS im Nukleus detektiert. Es konnte jedoch, da das Zytoplasma relativ frei vom fluoreszierenden Fusionsprotein war, eine Ansammlung von STAT5A-eCFP-NLS an der Zellmembran beobachtet werden (Abb. 20B unten, Pfeile). Das DsRed-Signal der membranständigen Src-Kinase kolokalisierte dort mit dem eCFP-Signal von STAT5A. Demnach interagiert STAT5A mit Src an der Plasmamembran.

Um zu überprüfen, ob STAT5A-eCFP-NLS weiterhin durch die Src-Kinase phosphoryliert werden kann, wurden HEK293-T-Zellen mit einem für

STAT5A-eCFP-NLS kodierendem Plasmid transfiziert. Ein weiterer Ansatz wurde zusätzlich mit einem Plasmid für v-Src-DsRed kotransfiziert. Etwa 24 h später wurde ein Ansatz ohne v-Src-DsRed-Expression für 45 min mit IFN- γ stimuliert und aus den Zellen Lysate hergestellt.

Durch die anschließende *SDS-PAGE* und den *Western Blot* konnte mittels Antikörperfärbung tyrosinphosphoryliertes STAT5A-eCFP-NLS in Koexpression mit v-Src-DsRed nachgewiesen werden. Die Stimulation mit IFN- γ führte nicht zur Phosphorylierung des Fusionsproteins (Abb. 20C). Die Färbungen der PVDF-Membran gegen STAT5 und GAPDH zeigte, dass gleichmäßige Mengen Protein aufgetragen wurden.

In der Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die SH2-Domäne von STAT5A notwendig für die Interaktion mit v-Src ist. Es stellte sich die Frage, ob die SH2-Domänen-Mutante, fusioniert an eine NLS, mit v-Src-DsRed an der Membran kolokalisieren würde. HEK293T-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die die Expression von STAT5A(R618Q)-eCFP-NLS und v-Src-DsRed vermitteln. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen für 24 h kultiviert und im Anschluß fixiert.

Die SH2-Domänen-Mutante akkumulierte vollständig im Kern. Es war keine Anreicherung der Mutante an der Zellmembran zu beobachten, wie es beim Wildtyp der Fall war (Abb. 20D). Die Interaktion von STAT5A und v-Src ist demnach abhängig von der SH2-Domäne des Transkriptionsfaktors und trägt entscheidend zur zytoplasmatischen Retention von STAT5A bei.

4 Diskussion

Die Erforschung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie und deren Signaltransduktion ist von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten von Tumor- und Autoimmunerkrankungen. Der kanonische Signalweg der STAT-Proteine umfasst die Rezeptor-vermittelte Aktivierung durch Phosphorylierung eines kritischen Tyrosins, die Dimerisierung, die Translokation in den Nukleus und zuletzt die Induktion der Genexpression. Unser Verständnis der Signalweiterleitung durch STAT-Proteine wurde durch die Beobachtung erweitert, dass persistent aktives STAT5 in hämatopoetischen Neoplasien im Zytoplasma angereichert ist. Dort führt die Interaktion von tyrosinphosphoryliertem STAT5 mit PI3K und Gab2 zur Aktivierung der Serin-/Threoninkinase Akt, sowie zur Induktion einer Leukämie in Mäusen [167]. Diese und andere Publikationen deuten auf eine zytoplasmatische Funktion von STAT5 hin, die unabhängig von der Regulation der Zielgenexpression ist [166,193].

Im Jahr 1999 konnten Kazansky *et al.* zeigen, dass die Koexpression von STAT5A mit einer konstitutiv aktiven Variante von c-Src (SrcK+) zur Phosphorylierung des kritischen Tyrosins von STAT5A führte, aber eine nukleäre Anreicherung ausblieb. Überraschenderweise konnte das zu 95% homologe Protein STAT5B nach Aktivierung durch Src in den Zellkern translozieren. Eine Chimäre aus STAT5A und STAT5B, in der die Transaktivierungsdomäne (TAD) von STAT5A gegen die von STAT5B ausgetauscht wurde, akkumulierte nach Aktivierung durch Src im Nukleus [149]. Zusätzliche Tyrosinphosphorylierungen der STAT5-Proteine und aberrante transkriptionelle Eigenschaften wurden festgestellt [111]. Die Studien beschäftigten sich mit der fehlenden nukleären Translokation von aktivem STAT5A, während STAT5B seiner gewohnten Funktion als Transkriptionsfaktor nachgehen konnte. Der zugrunde liegende Mechanismus und eine mögliche Funktion von STAT5A im Zytoplasma wurden außer Acht gelassen.

Eine Beteiligung der Familie der Src-Kinasen (SFK) bei der Ausbildung unterschiedlicher Leukämien wurde schon beschrieben [194]. Diese Tatsache und

die Relevanz von persistent aktivem STAT5 in hämatopoetischen Neoplasien begründen das Interesse, das Zusammenwirken von STAT5 und SFKs näher zu untersuchen.

In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen analysiert werden, die der zytoplasmatischen Retention von permanent tyrosinphosphoryliertem STAT5 in hämatopoetischen Erkrankungen zugrunde liegen.

4.1 Fluoreszenzmarkierte STAT5-Fusionsproteine: Ein probates Mittel für die Untersuchung der Proteinfunktionen und subzellulären Verteilung

Die Fusion von Fluoreszenzproteinen an Zielproteine und die anschließende Studie biologischer Prozesse ist heute eine alltägliche Anwendung. Die unterschiedlichsten Proteine konnten auf diesem Wege schon u. a. hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation, Mobilität und potenzieller Interaktionspartner untersucht und beschrieben werden [195–197]. Auch mit fluoreszenzmarkierten STAT-Proteinen konnte schon des Öfteren erfolgreich gearbeitet und tiefere Erkenntnisse über die Funktion der Transkriptionsfaktoren gewonnen werden. Mit fluoreszierenden Fusionsproteinen konnte u. a. für STAT2, STAT3, STAT5A/B und STAT6 nukleozytoplasmatisches shuttling nachgewiesen werden [101,102,118–120]. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist die mikroskopische Analyse der subzellulären Verteilung von STAT5A in Abhängigkeit des aktivierenden Stimulus. STAT5A wurde mit eYFP bzw. eCFP C-terminal fusioniert. Die Fusion eines Fluoreszenzproteins an STAT5A vereinfachte die mikroskopischen Studien insofern, dass sowohl Lebendzellanalysen möglich waren, als auch indirekte Immunfluoreszenzen durch Anti-körperfärbungen unnötig wurden. Außerdem ermöglichte der *tag* die Analyse der Fusionsproteine in Immunpräzipitationen (IP) und *Western Blots* (WB), sowie die Detektion in nativen Gelen.

Um zu überprüfen, ob die STAT5A-Fusionsproteine wesentliche Charakteristika mit dem unmarkierten STAT-Protein teilen, wurde STAT5A-eYFP hinsichtlich seiner Zytokin-vermittelten Tyrosinphosphorylierung,

nukleären Translokation und transkriptionellen Aktivität untersucht (Kap. 3.1 Abb. 9). Da endogenes STAT5 in HEK293T-Zellen nicht nachweisbar ist, können in diesen Zellen die biochemischen und funktionellen Eigenschaften fluoreszierender STAT5-Fusionsproteine untersucht werden.

Im *Western Blot* wurde eine vergleichbare Phosphorylierungskinetik von STAT5A und STAT5A-eYFP nach IFN- γ -Stimulation gemessen (Kap. 3.1, Abb. 9A). Sowohl STAT5A, als auch STAT5A-eYFP waren nach 30 min Stimulation tyrosinphosphoryliert. 180 min nach dem Stimulus war das Phosphotyrosinsignal von STAT5A und STAT5A-eYFP mit vergleichbarer Kinetik abgesunken. In der Literatur findet man eine kürzere Dephosphorylierungszeit für endogenes STAT5, die jedoch je nach Zytokin- bzw. Hormon-stimulation und Zelltyp differieren kann [198,199]. Die ektopische Expression von STAT5 scheint zu einer verlängerten Aktivierungsdauer zu führen. IFN- γ ist kein typischer Aktivator von STAT5, sondern von STAT1. Aufgrund der endogenen Expression der IFN- γ -Rezeptorketten in HEK293T-Zellen wurde jedoch dieses Zytokin benutzt, um die Tyrosinphosphorylierung von STAT5 zu untersuchen.

Die Aktivierung des OSM-Rezeptors nach Ligandenbindung führt zu einer intensiven JAK2-vermittelten STAT5-Phosphorylierung, welche wiederum die nukleäre Akkumulation von STAT5 und die Zielgenexpression nach sich zieht [13,200]. Die Anreicherung von STAT5A-eYFP im Nukleus nach OSM-Stimulation wurde im *live cell imaging* nachgewiesen (Abb. 9B).

Im Kern angelangt, induziert STAT5A die Expression von Zielgenen. Ein Beispiel ist die Expression von β -Casein in Milchdrüsengewebe [201]. Die IFN- γ -vermittelte Induktion der Zielgenexpression durch aktiviertes STAT5A-eYFP wurde in einem Reporter-gen-Assay, in dem die β -Casein-Promotor-vermittelte Expression des Luciferasegens gemessen wurde, eindeutig nachgewiesen (Abb. 9C). Die Fähigkeit des C-terminal fluoreszenzmarkierten STAT5A die Luciferaseexpression zu induzieren, war geringfügig schwächer als die von ungetagtem STAT5A (nicht gezeigt). Aufgrund der Nähe des Fluoreszenzproteins (eYFP bzw. eCFP) zur TAD könnte die Interaktion mit Kofaktoren (z.B. CBP) am Promotor leicht gestört sein. Dennoch wurde die Aktivierung des fluoreszierenden Fusionsproteins, dessen nukleäre Akkumulation und die Induktion der Zielgenexpression nach Stimulation

bestätigt. Die fluoreszenzmarkierten STAT5A-Proteine wurden somit für die weiteren Studien eingesetzt.

4.2 BCR-ABL positive CML-Zellen zeichnen sich durch persistent aktives, zytoplasmatisch lokalisiertes STAT5A aus

Der Mechanismus der zytoplasmatischen Retention von phosphoryliertem STAT5A in der CML sollte untersucht werden. Eine der häufigsten Mutationen, die zu der Ausbildung einer CML führt, ist die Fusion des BCR-Gens (*Breakpoint Cluster Region*) mit dem Gen der Tyrosinkinase c-ABL. Die beschriebene Fusion kommt durch die reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 zustande, wodurch das sogenannte Philadelphia Chromosom (Ph⁺) entsteht.

Das Protein BCR hat eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität, die jedoch durch die Fusion verloren geht. Die konstitutive Aktivität des BCR-ABL-Onkogens kommt vermutlich durch eine Oligomerisierung des BCR-Anteils zustande, wodurch die Tyrosinkinasedomäne des Abl-Anteils dauerhaft aktiv ist [202].

Es bestand die Möglichkeit mit primären CD34⁺-Vorläuferzellen zu arbeiten, die aus einem Patienten mit Primärdiagnose einer CML isoliert wurden. Der CML-Patient wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht medikamentös behandelt (z.B. Imatinib, Dasatinib). Die CD34⁺-Stammzellen des Patienten waren BCR-ABL positiv (siehe Kap. 2.2.2).

Die indirekte Immundetektion von endogenem STAT5A und tyrosinphosphoryliertem STAT5 in den primären humanen CML-Zellen bestätigte eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des Transkriptionsfaktors (Kap. 3.2, Abb. 10C). Trotz der zytoplasmatischen Retention von STAT5 konnte in einem Tiermodell, die absolute Notwendigkeit der STAT5-Expression für die Ausbildung einer BCR-ABL induzierten CML nachgewiesen werden [164,165]. Dies ist ein Hinweis auf eine zytoplasmatische Funktion des Transkriptionsfaktors unabhängig von seiner nukleären Funktion. Des Weiteren konnte in einer CML-Zelllinie (K562), die ebenfalls BCR-ABL exprimierte, durch indirekte Immundetektion die

zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A festgestellt werden (Abb. 10A).

Das Fusionsprotein STAT5A-eCFP, das in K562 exprimiert wurde, zeigte ebenso wie das endogene STAT5A eine zytoplasmatische Retention. STAT5A-eCFP reicherte sich außerdem durch Inhibition des nukleären Exports mittels Leptomycin B (LMB) im Nukleus an (Abb. 10D). Der Einsatz von LMB, ein Inhibitor von CRM1/Exportin-1, bewies somit, dass die zytoplasmatische Lokalisation von STAT5A-eCFP in K562-Zellen kein statischer Zustand war, sondern auf einem Fließgleichgewicht (*steady state*) aus konstantem nukleärem Import und Export beruhte. Trotz der zytoplasmatischen Retention kommt es daher zur Expression STAT5-spezifischer antiapoptotischer Gene, wie z.B. bcl-xl, bcl-2 und des Proto-Onkogens pim-1 [203].

Eine AML-Zelllinie (Molm-13), die positiv für die konstitutiv aktive Rezeptor-tyrosinkinase FLT3-ITD war, wurde ebenfalls hinsichtlich der subzellulären Verteilung von STAT5A untersucht. In Molm-13-Zellen befand sich STAT5A jedoch primär im Nukleus (Abb. 10A). Diese Beobachtung spricht STAT5 die Fähigkeit zu, in Leukämie-Zellen in den Zellkern zu translozieren und validiert die Versuchsdurchführung inklusive die Wahl des Antikörpers. Im *Western Blot* wurde die Phosphorylierung von STAT5, aber auch von Akt und Src sowohl in K562-, als auch in Molm-13-Zellen nachgewiesen. Durch Stimulation der K562-Zellen mit Epo, bzw. der Molm-13-Zellen mit GM-CSF konnte eine geringfügige Steigerung der STAT5-Phosphorylierung detektiert werden. Die Stimulation der Zellen hatte auf die Serinphosphorylierung von Akt stärkeren Einfluss, was möglicherweise auf eine verstärkte Aktivität der PI3K hinweist (Abb. 10B).

4.3 Src-Kinasen bestimmen die zytoplasmatische Retention von STAT5A in BCR-ABL positiven zellulären Modellsystemen und einer CML-Zelllinie

Das BCR-ABL-Onkogen bewirkt die nukleäre Akkumulation von STAT5A

Aufgrund der maßgeblichen Rolle von BCR-ABL für die Ausbildung einer hämatopoetischen Neoplasie und der Feststellung, dass in einer CML aktives STAT5A im Zytoplasma angereichert ist, wurde eine adhärenz Zelle konstruiert, die nach Doxycyclinbehandlung BCR-ABL exprimiert. In diesem Modellsystem wurden die Mechanismen untersucht, die die subzelluläre Verteilung von STAT5A hinsichtlich einer zytoplasmatischen Anreicherung beeinflussen. Die Arbeit mit den T-REx™-293-Zellen ermöglichte eine einfache Handhabung und genetische Manipulation der Zellen durch Induktion der BCR-ABL-Expression sowie die Kofektion mit weiteren Konstrukten. Außerdem war für die konfokalen Aufnahmen von Vorteil, dass die adhärenz Zellen über ähnliche Dimensionen des Zytoplasmas und des Zellkerns verfügten.

Eine der häufigsten Modellzelllinien für die Untersuchung der transformierenden Aktivität von BCR-ABL waren Ba/F3-Zellen. Die Ba/F3-Zelllinie ist eine aus dem murinen Knochenmark gewonnene immortalisierte pro-B-Zelllinie, die in Abhängigkeit von IL-3 proliferiert. Die Transduktion dieser Zellen mit BCR-ABL verleiht ihnen die Fähigkeit sich faktorunabhängig zu teilen. Entscheidend für die faktorabhängige und -unabhängige Proliferation war die Aktivierung von STAT5 und die Expression seiner Zielgene [204]. Als Suspensionszellen sind die Ba/F3-Zellen jedoch ähnlich wie K562-Zellen nicht geeignet für mikroskopische Analysen.

Die induzierbare Expression von BCR-ABL in den T-REx™-293-Zellen wurde durch eine Zeitreihe im *Western Blot* nachgewiesen. Die Autophosphorylierung und damit die Aktivierung der Kinase konnte mit entsprechenden Phosphotyrosin-Antikörpern im *Western-Blot* gezeigt werden. Nach acht stündiger Induktion der Expression führten schon geringe Mengen von BCR-ABL zur intensiven Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP (Kap. 3.3, Abb. 11A). Überraschenderweise wurde in der konfokalen Mikroskopie nach 16 stündiger Induktion der BCR-ABL-Expression die vollständige nukleäre Akkumulation von STAT5A-eYFP festgestellt. In den nicht induzierten Zellen lag STAT5A-eYFP gleichmäßig verteilt zwischen Zellkern und Zytoplasma vor (Abb. 11B).

Die Zugabe von Doxycyclin, ein Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline, in das Kulturmedium diente der Induktion der Expression von

BCR-ABL im T-Rex-Zellsystem. Um auszuschließen, dass die Behandlung mit Doxycyclin entscheidende Auswirkungen auf die Zellen und somit auf die Lokalisation von STAT5A hat, wurden STAT5A-eCFP und BCR-ABL (p210) in HEK293T-Zellen koexprimiert. Die Expression von BCR-ABL wurde durch indirekte Immunfärbungen kontrolliert. Die nukleäre Akkumulation von STAT5A-eCFP wurde nunmehr auch in transienter Expression von BCR-ABL nachgewiesen (Abb. 11C). Es konnte somit vermutet werden, dass in Zellen des hämatopoetischen Systems, Faktoren vorliegen, die die zytoplasmatische Retention von persistent aktivem STAT5A bewirken.

Nicht nur in der BCR-ABL positiven CML wurde von der zytoplasmatischen Lokalisation des aktiven STAT5-Proteins berichtet. Auch in der Kit(D816V) vermittelten Mastozytose wurde die zytoplasmatische Retention von STAT5A festgestellt [159,193]. Der Kit-Rezeptor ist eine Rezeptortyrosinkinase, die nach Ligandenbindung (*stem cell factor*, SCF) aktiviert wird. Die Punktmutation D816V führt zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, persistenten Phosphorylierung von STAT5 und Entwicklung einer Mastozytose im Patienten. Zytoplasmatisch lokalisiertes, aktives STAT5 wurde außerdem in Patienten mit einer FLT3-ITD negativen AML nachgewiesen [183].

Zytoplasmatische Anreicherung von STAT5A nach Aktivierung durch Src-Kinasen

Kazansky *et al.* beschrieben im Jahr 1999, dass eine konstitutiv aktive Variante von Src die zytoplasmatische Retention von STAT5A begünstigte [149]. Der Einfluss der SFKs auf die Entwicklung und den Verlauf einer hämatopoetischen Erkrankung, war schon des Öfteren Bestandteil von Studien, die in Kap. 1.6.1 erörtert wurden.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist ein bedeutender Faktor für die v-Src vermittelte Transformation von Zellen [146]. Die Tyrosinphosphorylierung und anschließende nukleäre Akkumulation von STAT3, aber auch ein beschleunigtes nukleozytoplasmatisches *shuttling* nach Koexpression von v-Src wurde anhand von fluoreszierenden STAT3-Fusionsproteinen nachgewiesen [188].

STAT5A-eYFP wurde durch v-Src am kritischen Tyrosin phosphoryliert, jedoch kam es zu keiner Akkumulation im Zellkern (Kap 3.4, Abb. 12A, B). Die konstitutiv aktive Kinase verhinderte jedoch nicht unspezifisch die nukleäre Translokation von Proteinen, da sich der Transkriptionsfaktor STAT3 nach Aktivierung durch v-Src im Zellkern anreicherte.

In STAT3 defizienten MEF-Zellen war endogenes STAT5A in Koexpression mit v-Src zum größten Teil im Zytoplasma lokalisiert. Die STAT3 defizienten MEF-Zellen wurden gewählt, da sie eine erhöhte Expression von STAT5 aufwiesen. Die Funktionen des deletierten STAT-Faktors wurden durch ein anderes Mitglied der STAT-Familie zumindest teilweise übernommen, weswegen STAT5 vermutlich verstärkt exprimiert wird. Dieser Kompensationsmechanismus kann das Studium von STAT-*knockouts* erschweren [78]. Die Frage, wie ein solcher Mechanismus zustande kommt, ist bis heute unbeantwortet geblieben.

Unstimuliertes STAT5A zeigte eine homogene Verteilung innerhalb der STAT3 defizienten MEF-Zellen, während die OSM-Stimulation zur Akkumulation des Faktors im Nukleus führt. MEF-Zellen, die transient mit v-Src-DsRed transfiziert wurden, wiesen keine Akkumulation von STAT5A im Zellkern, sondern eher eine zytoplasmatische Anreicherung auf (Abb. 12C). Intensitätsprofile durch die Zellkompartimente konnten die zytoplasmatische Anreicherung von STAT5A verdeutlichen.

Die Src-Kinasen Hck und Lyn, deren Expression und Funktion im hämatopoetischen System beschrieben wurden, führten in HEK293T-Zellen ebenfalls zu keiner nukleären Anreicherung von STAT5A (Kap 3.4, Abb. 13A, B), obwohl die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A im *Western Blot* eindeutig nachgewiesen wurde (Kap 3.5, Abb. 14A, B). Die Src-Kinasen trugen keine aktivierenden Mutationen, jedoch führte die Überexpression der Kinasen zu deren Aktivierung. Vermutlich waren die endogenen Kinasen (z.B. CSK), die verantwortlich für die Phosphorylierung des regulatorischen Tyrosins der SFKs sind, nicht mehr in der Lage sämtliche Substrate zu phosphorylieren.

Die Koexpression mit BCR-ABL führte zu keiner detektierbaren Verstärkung des Phosphosignals von STAT5A (Abb. 14A, B). Überraschenderweise konnte die Expression von Hck-eCFP in HEK293T-Zellen, die ebenfalls

STAT5A-eYFP und BCR-ABL exprimierten, die zytoplasmatische Retention des Transkriptionsfaktors hervorrufen. Lyn-eCFP konnte dies jedoch nicht. Demnach wurde gezeigt, dass durch die Expression einer Src-Kinase in einer adhärennten nicht-hämatopoetischen Zelllinie ein CML-Modellsystem bezüglich der subzellulären Verteilung von STAT5 erschaffen wurde. Hck und v-Src waren dominant über der STAT5A-kerntranslozierenden Wirkung von BCR-ABL (Abb. 14A, C), während Lyn keine zytoplasmatische Retention vermitteln konnte (Abb. 14B). Dies ist ein Beispiel für die nicht immer redundanten Wirkungsweisen der SFKs, die sich zumeist durch eine zelltyp-spezifische Expression bemerkbar machen.

SFKs in der AML und weiteren myeloischen Erkrankungen

In der FLT3-ITD-positiven AML-Zelllinie Molm-13 akkumulierte aktiviertes STAT5A im Zellkern (Abb. 10A). Der Einfluss der Src-Kinase Lyn auf die Signalweiterleitung unterhalb von FLT3-ITD wurde gezeigt. Die Src-Kinaseaktivität ist demnach essentiell für Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation von FLT3-ITD positiven Zellen [184,185]. Die Kinase Lyn hatte sich in dieser Arbeit als nicht dominant über BCR-ABL herausgestellt und konnte keine zytoplasmatische Retention von STAT5A verursachen (Abb. 14B). Dennoch wurde auch die Expression und Aktivierung von Src und Hck durch FLT3-ITD nachgewiesen [184,205]. Diese SFKs verursachen jedoch die zytoplasmatische Retention von STAT5A in BCR-ABL exprimierenden HEK293T-Zellen.

In Gegenwart von FLT3-ITD kann Hck die nukleäre Translokation von STAT5A nicht verhindern (Abb. 15). Dieses Ergebnis berechtigt zur Aussage, dass das Phänomen der zytoplasmatischen Retention abhängig vom exprimierten Onkoprotein ist. Außerdem validieren die Befunde die Vergleichbarkeit des Modellsystems mit der Situation in Leukämiezellen.

FLT3-ITD interagiert direkt mit STAT5A und aktiviert den Transkriptionsfaktor [180]. Bezüglich BCR-ABL wurde zumeist eine Beteiligung der SFKs bei der STAT5-Aktivierung in Leukämien vorgeschlagen [172,206]. Dies trifft jedoch laut Literatur nicht für eine durch BCR-ABL ausgelöste CML zu [174]. Ob die direkte Aktivierung von STAT5A durch eine onkogene Kinase (ohne den „Umweg“ über SFKs) notwendig für die nukleäre Akkumulation ist, ist

fraglich, da in der Kit(D816V)-positiven Mastozytose aktives STAT5A zytoplasmatisch vorliegt, obwohl Kit(D816V) unter Umgehung der SFKs signalisiert [207]. Jedoch wurde auch in der Kit(D816V) positiven Mastozytose die zytoplasmatische Anreicherung von aktivem STAT5 festgestellt [193].

Vermutlich ist ein komplexes Zusammenspiel der Src-Kinasen und unterschiedlicher Onkoproteine verantwortlich für die zytoplasmatische Retention des Transkriptionsfaktors STAT5A. Auch weitere Faktoren könnten hier von Bedeutung sein und werden noch diskutiert.

Anwendung von Kinaseinhibitoren in hämatopoetischen Neoplasien und in dieser Studie

Seit nunmehr 10 Jahren wird für die Behandlung einer CML und anderer maligner Erkrankungen Imatinib eingesetzt. Die Entwicklung dieses Abl-Kinaseinhibitors, der zu der Zeit seiner Synthese im Jahre 1992 als STI-571 bezeichnet wurde, war ein Meilenstein für die Bekämpfung BCR-ABL positiver Neoplasien. Auch weitere konstitutiv aktive Kinasen, wie z.B. die mutierte Form der Rezeptortyrosinkinase PDGFR, wird durch Imatinib inhibiert [208].

Der Inhibitor bindet innerhalb der Kinasedomäne von Abl, aber nur in dessen geschlossener, inaktiver Konformation. Dies ist ein wichtiger Faktor für die Spezifität des Inhibitors, da in der geschlossenen Konformation der Kinasen individuelle Strukturen entstehen. Die geöffneten Kinasedomänen weisen eine hohe Homologie zwischen den Proteinfamilien auf [209,210].

Aufgrund der Ausbildung von Resistenzen und der Überexpression von Src-Kinasen in diversen hämatopoetischen Erkrankungen wurden Kinaseinhibitoren der zweiten Generation entwickelt (z.B. Nilotinib). Diese Inhibitoren zielen auf Imatinib-resistente Patienten und die Hemmung der Abl- sowie der Src-Kinasen ab. Dasatinib ist ein solcher dualer Kinaseinhibitor, der die Effektivität von Imatinib in Bezug auf die Behandlung von hämatopoetischen Erkrankungen noch übertraf [211]. Ein großes Problem stellt jedoch bis heute die Punktmutation T315I im BCR-ABL-Onkogen dar. Durch diesen Aminosäureaustausch kann eine entscheidende Wasserstoffbrücke zwischen Imatinib/Dasatinib und der Kinasedomäne

nicht ausgebildet werden. Zudem wird auch die Bindung aller bislang in marktreife befindlicher Tyrosin-kinaseinhibitoren sterisch gehindert [212]. Obwohl klinische Studien bislang fehlen, gibt es Erfolge in der Synthese von Substanzen, die die Kinase-aktivität dieser BCR-ABL-Mutante inhibieren können [213,214].

In dieser Studie konnten überzeugende Ergebnisse für die Beteiligung der Src-Kinasen an der zytoplasmatischen Retention von STAT5 durch Experimente mit Kinaseaktivität-defizienten Mutanten und Src-Kinase-Inhibitoren geliefert werden. Durch die Punktmutation K269N in Hck-eCFP verlor das Protein seine Kinaseaktivität. Die Mutation innerhalb der ATP-Binderegion der Src-Kinase verhindert die Bindung und Hydrolyse von ATP [190].

Nach Koexpression von BCR-ABL und Hck(K269N)-eCFP wurde STAT5A-eYFP nicht im Zytoplasma zurückgehalten, sondern akkumulierte im Zellkern (Abb. 16A). Die Kinaseaktivität von SFKs ist demnach essenziell für die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A. Aufgrund dieses Befunds wurden Src-Kinaseinhibitoren eingesetzt, um die enzymatische Aktivität der SFKs zu inhibieren und die Auswirkung auf die subzelluläre Verteilung von STAT5A in BCR-ABL-positiven Zellen zu untersuchen.

Die Wirkung des Src-Inhibitors PP1 wurde im *Western Blot* überprüft. Die Spezifität des Inhibitors ist stark abhängig von der eingesetzten Konzentration. Die Inhibitorkonzentration wurde daher zuvor titriert, um eine Beeinträchtigung der BCR-ABL-Aktivität auszuschließen [215]. Bereits ab einer PP1-Konzentration von 0,5-1 μM nahm die Phosphorylierung an Tyrosin 412 von BCR-ABL stark ab (nicht gezeigt). Die Phosphorylierung an Tyrosin 419 (bzw. Y416) von c-Src wurde durch PP1-Behandlung mit einer Konzentration von 0,1 μM effektiv herunterreguliert während die Aktivität von BCR-ABL nicht beeinflusst wurde (Abb. 17B). Die Inhibition der Kinaseaktivität von Hck-eCFP durch PP1 führte zur BCR-ABL-vermittelten nukleären Translokation von STAT5A-eYFP in HEK293T-Zellen (Abb. 16B). Derselbe Effekt konnte durch die Behandlung der CML-Zelllinie K562 mit 0,1 μM PP1 für endogenes STAT5A nachgewiesen werden. Bereits eine Stunde nach Zugabe des Src-Inhibitors akkumulierte STAT5A im Nukleus (Abb. 17A). Die erhöhte Menge von nukleärem STAT5A führte 1 h nach

Inhibitorzugabe zur gesteigerten Expression eines STAT5-Zielgens (*cis*) (Abb. 17C). Die Expression des *cis*-Gens sank dann jedoch nach 24 h unter die relative Expression des Ansatzes ohne Inhibitorzugabe. Die Phosphorylierung von STAT5A wurde nach 1 h sowie 24 h Inhibitorbehandlung nur geringfügig beeinflusst und auch die Src-Aktivität blieb konstant herunterreguliert. Hier kann demnach nicht der Grund für die Reduktion der *cis*-Expression nach 24 h zu suchen sein. Möglicherweise wurde durch die verstärkte Lokalisation von phosphoryliertem STAT5A im Kern die Expression weiterer negativer *feedback*-Inhibitoren induziert. CIS selbst ist ein solcher negativer *feedback*-Inhibitor. Laut Literatur soll CIS an aktiven Rezeptoren wirken, wobei die volle Bandbreite der Funktionen des SOCS-Proteins bis heute nicht verstanden ist [216]. Möglicherweise steigt die Bedeutung anderer Src-Substrate oder unspezifischer Effekte des Src-Inhibitors PP1 nach 24 h Inkubation.

Die verstärkte Aktivierung von STAT5 korreliert mit der Transformation myeloider Zellen durch Förderung der Proliferation und Hemmung der Apoptose [113]. Die Analyse des Expressionsmusters von STAT5-Zielgenen je nach subzellulärer Lokalisation des aktiven Transkriptionsfaktors wäre von großem Interesse.

Durch die Inhibition der Src-Kinasen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die SFKs entscheidenden Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von STAT5 haben. Zudem wirft der Befund ein neues Licht auf den Nutzen von Src-Kinaseinhibitoren (Dasatinib) zur Behandlung von hämatopoetischen Neoplasien. Die Anwendung des dualen Abl-/ Src-Kinaseinhibitors Dasatinib würde in BCR-ABL(T315I) positiven Patienten die Src-Kinasen inhibieren, das mutierte BCR-ABL jedoch nicht. Somit würde, wie in dieser Studie gezeigt, eine verstärkte nukleäre Translokation von STAT5 vermittelt werden. Dies wiederum könnte möglicherweise sowohl positive als auch negative Effekte auf die Proliferation der Leukämiezellen haben. Dem phosphorylierten Transkriptionsfaktor STAT5 werden neben seiner onkogenen Wirkung auch Tumorsupressorfunktionen zugesprochen [113]. Unter bestimmten Bedingungen kann STAT5 die Zelldifferenzierung und Zellseneszenz begünstigen [217]. Dies sind zelluläre Mechanismen, die einer kanzerogenen Entwicklung entgegenwirken und weiterer Studien bedürfen

[217–219]. Die Frage ist in welchem Ausmaß die subzelluläre Lokalisation von aktivem STAT5A die unterschiedlichen Funktionen des Transkriptionsfaktors beeinflusst.

4.4 Die Interaktion der SH2-Domäne von STAT5A mit SFKs ist Bestandteil des Mechanismus der zytoplasmatischen Retention

Ausbildung von STAT5A-Dimeren nach Aktivierung durch Src-Kinasen

Die aktive Rolle der Src-Kinasen für die zytoplasmatische Anreicherung von aktiviertem STAT5A in der CML konnte nachgewiesen werden, doch der Mechanismus blieb ungeklärt. Die Dimerisierung zweier STAT-Proteine durch die reziproke Wechselwirkung der SH2-Domäne mit dem phosphorylierten kritischen Tyrosin des Dimerpartners ist essenziell für die nukleäre Akkumulation der Transkriptionsfaktoren. Für STAT1, STAT2 und STAT3 wurde nach stimulationsabhängiger Aktivierung die Interaktion der STAT-Dimere mit Importinen nachgewiesen, die wiederum den Import in den Nukleus ermöglichen [29,220]. Da die Src-Kinasen, wie z.B. Src und Hck, die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A vermittelten, aber eine Akkumulation im Zellkern ausblieb, wurde vermutet, dass eine Störung der Dimerisierung vorlag. Eine instabile Interaktion mit Importinen könnte die Folge sein.

Durch die Analyse des nativen STAT5A-eYFP-Fusionsproteins in der *BN-Page* sollte die Dimerisierung des Transkriptionsfaktors abhängig vom aktivierenden Stimulus untersucht werden. Das eYFP-Fluoreszenzprotein ermöglichte die Detektion der Monomere und Dimere des Transkriptionsfaktors im nativen Gel. Sowohl durch die Induktion der Expression von BCR-ABL, als auch durch die IFN- γ -Stimulation kam es zu einer vergleichbaren Dimerisierung von STAT5A-eYFP. Die Expression von Hck bzw. v-Src führte zu keiner Reduktion der Dimerisierung des STAT5A-Fusionsproteins (Kap 3.7, Abb. 18A). Es konnte demnach ausgeschlossen werden, dass die zytoplasmatische Retention in unserem Zellsystem (T-REx™-293) durch eine gestörte Dimerisierung verursacht wurde.

Nachweis der Interaktion von STAT5A und v-Src

Schon früh nach Entdeckung und Beschreibung von v-Src wurden dem Myristylanker der Kinase wichtige Funktionen zugewiesen. Eine nicht myristylierte Mutante der Tyrosinkinase zeigte noch katalytische Aktivität, jedoch ging ihre zelltransformierende Wirkung verloren. Membranlokalisierte Substrate wurden anscheinend nicht mehr im gleichen Maße phosphoryliert [191,221,222].

Eine N-terminal verkürzte Variante von v-Src (Δ N-v-Src), die nicht mehr myristyliert werden konnte, wurde generiert. Hierdurch sollte eine Aussage über den Einfluss der Membranverankerung von Src auf die subzelluläre Verteilung von STAT5A getroffen werden.

Die Mutante Δ N-v-Src phosphorylierte weiterhin STAT5A am kritischen Tyrosin. Die Koexpression von STAT5A-eCFP und Δ N-v-Src führte zur ubiquitären Verteilung beider Proteine (Kap. 3.8, Abb. 19A, B), wobei die nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors weiterhin ausblieb. Diese Beobachtung spricht für eine direkte Interaktion der Src-Kinase und STAT5A. Die erhöhte Menge an nukleärem STAT5A-eCFP, das durch Δ N-v-Src phosphoryliert wurde, führte außerdem zu einer Verstärkung der Expression eines STAT5-spezifischen Reportergenkonstrukts (Kap. 3.8, Abb. 19C). Die relative Luciferase-Aktivität nach Phosphorylierung von STAT5A-eCFP durch v-Src lag nur wenig über der Aktivität ohne Stimulus. Wie schon in der *qRT-PCR* für die *cis*-Expression gezeigt werden konnte (Kap. 3.6, Abb. 17C), führte die scheinbare Normalisierung der nukleären Lokalisation von aktivem STAT5A zu einer erhöhten Zielgenexpression. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A durch Src-Kinasen (hier v-Src) die durch den Transkriptionsfaktor vermittelte Zielgenexpression ermöglicht.

Die bisherigen Ergebnisse wiesen auf eine Interaktion von STAT5A und Mitgliedern der Src-Familie hin. Der Nachweis einer solchen Interaktion wurde durch eine Immunpräzipitation erbracht. Wurde die STAT5A-eYFP-Population durch spezifische Antikörper angereichert, so war es möglich, in den Präzipitaten v-Src-DsRed nachzuweisen. Die Interaktion war abhängig von der intakten SH2-Domäne von STAT5A (Kap. 3.9, Abb. 20A), jedoch

unabhängig von der SH2- sowie SH3-Domäne von v-Src (Daten nicht gezeigt). Die SH2-Domäne von STAT5A ist verantwortlich für die Rekrutierung an aktivierte Zytokinrezeptoren durch Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinen und die Dimerisierung zweier STAT5-Proteine (Kap. 1.4.2).

Aus den Ergebnissen ist zu schließen, dass STAT5A über die SH2-Domäne mit Phosphotyrosinen von v-Src interagiert. Das aktivierende Tyrosin 416 (bzw. Y419 im Menschen) von Src kann bereits ausgeschlossen werden, da die Deletion dieses Tyrosins (Y416F) weiterhin die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A nach sich zog (nicht gezeigt). Die konstitutiv aktive Kinase v-Src ist trotz der Mutation des Tyrosins 416 (Y416F) weiterhin aktiv. STAT3, ein bekanntes Substrat von v-Src, wurde nicht kopräzipitiert. Eine schwache und transiente Interaktion könnte der Grund für die nukleäre Akkumulation von STAT3 nach Aktivierung durch Src sein.

Nach Fusion von STAT5A mit einer starken NLS ist die Interaktion mit Src mikroskopisch darstellbar

STAT5A beinhaltet keine klassische NLS, die die Interaktion mit Importinen und den Transport in den Nukleus vermittelt. Es wurde jedoch eine Sequenz innerhalb der *coiled-coil*-Domäne identifiziert, die sowohl den Import des latenten, als auch des aktiven Transkriptionsfaktors ermöglicht [102]. Durch die Fusion einer klassischen, starken NLS aus dem großen SV40 T-Antigen an den C-Terminus von STAT5A-eCFP sollte überprüft werden, ob Src auch hier die zytoplasmatische Retention bewirkt.

Die fluoreszenzmarkierte Src-Kinase v-Src-DsRed konnte die nukleäre Akkumulation von STAT5A-eCFP-NLS nicht verhindern. Demnach beeinflusst Src die Importin-abhängige nukleäre Akkumulation von STAT5A, während generelle durch Importin regulierte Mechanismen der nukleären Translokation nicht gestört werden. Die Reduktion des zytoplasmatischen Signals von STAT5A ermöglichte zudem die Detektion der membranständigen Interaktion von STAT5A-eCFP-NLS und v-Src-DsRed. Diese Kollokalisierung war im Fall der SH2-Mutante von STAT5A (R618Q), die ebenfalls mit einer NLS versehen wurde, nicht mehr nachweisbar (Kap. 3.9, Abb. 20).

Die SH2-Domäne von STAT5A ist somit essenziell für die Interaktion mit v-Src und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Die Fusion der NLS stellte eine elegante Methode dar, die Interaktion zweier zytoplasmatischer Proteine mikroskopisch nachzuweisen. Ob dies nur bei einer robusten Interaktion möglich ist, wie sie zwischen v-Src und STAT5A der Fall zu sein scheint, ist abzuklären. Die Nachweisgrenze sollte aber über die Stärke der NLS beeinflusst werden können.

Zusammengefasst trägt die Interaktion zwischen STAT5A und v-Src entscheidend zur zytoplasmatischen Retention von STAT5A bei.

Modell der zytoplasmatischen Retention von STAT5A in BCR-ABL positiven myeloproliferativen Erkrankungen

In Abb. 21 wurde die nukleäre Akkumulation von STAT5A-Dimeren illustriert, nachdem der STAT-Faktor durch BCR-ABL tyrosinphosphoryliert wurde (links). SFKs, die die zytoplasmatische Retention von STAT5A vermitteln können (Src-Effekt), sind nicht oder nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Die potentielle transkriptionelle Aktivität durch nukleär angereichertes und aktives STAT5A wurde durch die Stärke des Pfeils auf der DNS dargestellt. Auch eine veränderte Präferenz von STAT5A für Zielgene durch ein erhöhtes Tetramerisierungspotenzial ist vorstellbar.

Wird nun eine Src-Kinase, z.B. Hck, exprimiert, kann diese durch BCR-ABL phosphoryliert werden (Abb. 21 rechts) [170]. Die Interaktion von STAT5A über dessen SH2-Domäne mit einem Phosphotyrosin der Src-Kinase ist die Folge. Sowohl BCR-ABL als auch Hck können die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A bzw. unbekannter Faktoren vermitteln. Möglicherweise katalysiert BCR-ABL die Phosphorylierung des Tyrosins von SFKs, das durch die SH2-Domäne von STAT5A erkannt und gebunden wird. Die unbekannt Faktoren könnten zusammen mit der Interaktion von STAT5A und SFKs die zytoplasmatische Retention bewirken. Fest steht, dass die Kinaseaktivität der SFKs essenziell für den Src-Effekt ist. Ein geringer Anteil von aktivem STAT5A kann dennoch in den Nukleus translozieren und hier die Expression von anti-apoptotischen Genen induzieren.

Die Beteiligung weiterer Faktoren an der Anreicherung von aktivem STAT5A im Zytoplasma kann, wie in Abb. 21 angezeigt ist, nicht ausgeschlossen werden. Die Interaktion von konstitutiv aktivem STAT5A mit p85 (PI3K) und Gab2 konnte in einer CML-vergleichbaren Leukämie bestätigt werden [167]. Diese Interaktion wurde als Ursache für die zytoplastische Retention des aktivierten STAT-Faktors vermutet.

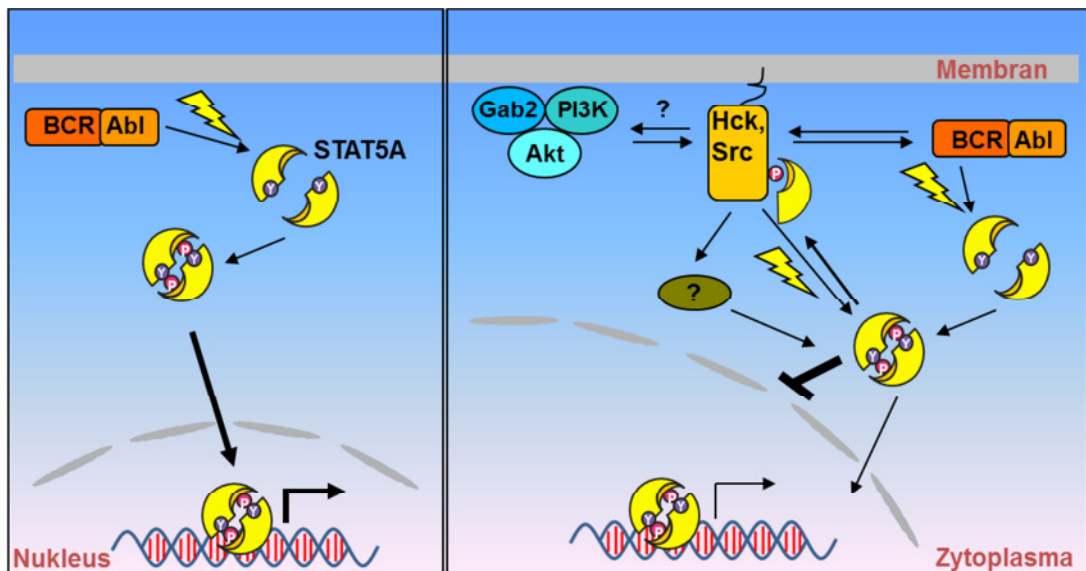


Abb. 21: Schematische Darstellung des Src-Effekts auf STAT5A. Die Aktivierung von STAT5A durch BCR-ABL führt zur nukleären Akkumulation des Transkriptionsfaktors (links). Die Expression einer Src-Kinase (z.B. Hck) vermittelt die zytoplasmatische Retention von STAT5A (rechts). Kinaseaktivität wurde durch Blitzsymbole verbildlicht. Die Stärke der Pfeile verdeutlichte Intensitätsunterschiede der nukleären Translokation und auf DNS-Ebene, die veränderte Expressionsstärke sowie -spezifität. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Die Familie der 14-3-3-Proteine wurde ebenfalls schon mit der Regulation des nukleozytoplasmatischen *shuttlings* und der nukleären Akkumulation von Interaktionspartnern in Verbindung gebracht. Unter Anderem sind hier die Abl-Tyrosinkinase und KSRP (*K-homology splicing regulator protein*) zu nennen [223,224]. In Säugetieren werden neun unterschiedliche 14-3-3-Proteine exprimiert. Eine Gewebespezifität ist nur in einzelnen Fällen nachgewiesen worden. Die 14-3-3-Proteine sind *scaffold*-Proteine, die Phosphoserine binden. Diverse Phosphoserin-Konsensussequenzen sind bereits beschrieben worden. Die Aminosäuresequenz von STAT5A weist keine dieser Konsensussequenzen auf, wobei von abweichenden Bindesequenzen bereits berichtet wurde [225,226].

In uns vorliegenden Massenspektren wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Serinphosphorylierungen nachgewiesen. Auch unbekannte Tyrosine und

Threonine scheinen innerhalb von STAT5A phosphoryliert zu werden. Weitere posttranslationale Modifikationen könnten Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von STAT5A haben.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor STAT5 (STAT5A/B) gehört zur Familie der STAT-Proteine und ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie der Hämatopoese, Brustdrüsenentwicklung und Funktionen der Leber beteiligt. Ein gemeinsames Merkmal der STAT-Faktoren ist ein kritisches Tyrosin, dessen Phosphorylierung essenziell für die Dimerisierung der Proteine, die Translokation in den Zellkern, die DNS-Bindung und folgenden Induktion der Gen-expression ist [59]. Hämatopoetische Zytokine, wie z.B. Epo und IL-3, binden an ihre Rezeptoren, wodurch assoziierte JAKs aktiviert werden, welche wiederum das Tyrosin 694 von STAT5A phosphorylieren. Das Resultat ist die nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors. Auch diverse Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. EGFR) und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. Src, Abl) können die Phosphorylierung von STAT5 bewirken [142].

Umso erstaunlicher war die Beobachtung, dass dauerhaft aktives STAT5A in einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) hauptsächlich im Zytoplasma vorlag und nur geringe Mengen im Zellkern detektiert werden konnten. Charakteristisch für die CML ist das Auftreten einer chromosomalen Translokation, die die Generierung der chimären, konstitutiv aktiven Tyrosinkinase BCR-ABL zur Folge hat [227]. Die Aktivierung von STAT5 durch BCR-ABL und die essenzielle Rolle von STAT5 in der Initiierung und Aufrechterhaltung der CML im Mausmodell der Erkrankung wurde nachgewiesen [164,165].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der zytoplasmatischen Retention von dauerhaft aktivem STAT5A in der CML anhand von fluoreszenzmarkierten STAT5A-Fusionsproteinen analysiert und näher beschrieben.

- Die Funktionalität der STAT5A-Fusionsproteine wurde durch biochemische und mikroskopische Methoden nachgewiesen. Im *Western Blot* wurde die Phosphorylierung des Tyrosins 694 von STAT5A-eYFP nach IFN- γ -Stimulation gezeigt. Aktiviertes STAT5A-eYFP translozierte nach OSM-Stimulation in den Nukleus und

konnte in Folge einer IFN- γ -Stimulation an spezifische Promotoren binden, was die Expression eines Reportergens nach sich zog.

- Durch die indirekte Immunfärbung von STAT5A in primären Zellen eines BCR-ABL positiven CML-Patienten und in einer CML-Zelllinie (K562) wurde die zytoplasmatische Retention des tyrosinphosphorylierten Transkriptionsfaktors bestätigt. Das Fusionsprotein STAT5A-eCFP zeigte dieselbe subzelluläre Verteilung in K562-Zellen wie endogenes STAT5A. Ein *steady state* von nukleärem Import und Export (nukleozytoplasmatisches *shuttling*) des aktivierten STAT5A-eCFP konnte durch die Inhibition von CRM1 (Exportin-1) in K562 nachgewiesen werden. In einer FLT3-ITD exprimierenden AML-Zelllinie (Molm-13) akkumulierte STAT5A im Nukleus.
- Der Einfluss der onkogenen Kinase BCR-ABL auf die zytoplasmatische Retention von STAT5A wurde untersucht. Wie die induzierbare Expression von BCR-ABL in T-REx™-293-Zellen zeigte, führte das Onkoprotein alleine nicht zur zytoplasmatischen Retention eines fluoreszierenden STAT5A-Fusionsproteins. STAT5A akkumulierte nach induzierter sowie transientser Expression von BCR-ABL im Nukleus. Man konnte daraus schließen, dass ein Faktor fehlte, der die zytoplasmatische Anreicherung von STAT5A verursachte. Die Tyrosinphosphorylierung von STAT5A-eYFP nach Induktion der BCR-ABL-Expression wurde im *Western Blot* nachgewiesen.
- Src-Kinasen wurden als mögliche Auslöser der zytoplasmatischen Retention von tyrosinphosphoryliertem STAT5A diskutiert. Die zytoplasmatische Retention nach Aktivierung durch v-Src-DsRed wurde sowohl für das fluoreszenzmarkierte STAT5A-Konstrukt, als auch für endogenes STAT5A in der konfokalen Mikroskopie nachgewiesen. Die Koexpression von STAT5A-eYFP und Hck-eCFP bzw. Lyn-eCFP bewirkte die Phosphorylierung des STAT-Faktors. Auch diese SFKs verhinderten die Anreicherung von aktiviertem STAT5A im Nukleus.

- In der konfokalen Mikroskopie zeigte sich, dass die Src-Kinasen Hck und v-Src dominant über der onkogenen Kinase BCR-ABL sind und die nukleäre Translokation von STAT5A verhinderten. Lyn konnte die nukleäre Akkumulation, die aus der Aktivierung von STAT5A durch BCR-ABL resultierte, nicht verhindern. Folglich haben die SFKs unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Aktivierung und Beeinflussung der nukleären Translokation von STAT5A. Die subzelluläre Verteilung von STAT5A, wie sie in der CML zu beobachten war, konnte durch die Koexpression der Src-Kinasen Hck oder Src mit BCR-ABL generiert werden.
- Durch die Mutante Hck(K269N)-eCFP wurde gezeigt, dass die Kinaseaktivität der Src-Kinasen wesentlich zur zytoplasmatischen Retention von STAT5A beiträgt. Entsprechend konnte durch die dosierte Anwendung des Src-Kinaseinhibitors PP1 die nukleäre Translokation von aktivem STAT5A vermittelt werden. Dies traf auf endogenes STAT5A in K562-Zellen, sowie auf transient exprimiertes STAT5A-eYFP in HEK293T-Zellen zu. Die Dephosphorylierung des aktivierenden Tyrosins von SFKs in K562-Zellen durch Behandlung mit PP1 konnte im *Western Blot* nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde kein Effekt des Src-Kinaseinhibitors auf die Tyrosinphosphorylierung von BCR-ABL und STAT5A/B detektiert. Src-Kinasen sind demnach entscheidende Mediatoren der zytoplasmatischen Retention von STAT5A in der CML.
- Im Folgenden wurde der Mechanismus der durch SFKs vermittelten zytoplasmatischen Retention von STAT5A näher untersucht. Die Dimerisierung der STAT-Proteine ist ein wichtiger Schritt für die nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren und die DNA-Bindung an GAS-Sequenzen. Durch den Einsatz von nativen Gelen konnte nachgewiesen werden, dass weder durch Hck noch durch v-Src die Dimerisierung von STAT5A-eYFP in HEK293T-Zellen beeinträchtigt wurde und eine gestörte Dimerisierung demnach auch nicht der Grund für die zytoplasmatische Retention war.

- Eine N-terminal verkürzte v-Src-Mutante, die nicht mehr myristyliert werden kann, war in HEK293T-Zellen homogen über Zytoplasma und Zellkern verteilt. Der Myristylanker dient der Assoziation mit Membransystemen. Fluoreszenzmarkiertes STAT5A wurde weiterhin durch die Mutante phosphoryliert und folgte der subzellulären Verteilung von Δ N-v-Src-DsRed. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die stabile Interaktion von STAT5A und membranverankertem Src die zytoplasmatische Anreicherung des STAT-Proteins verursacht. Als direkte Konsequenz der erhöhten Menge von aktivem STAT5A im Nukleus, konnte die Expression eines Reporter-genkonstruktes nachgewiesen werden.
- Durch eine Immunpräzipitation wurde die Interaktion von STAT5A-eYFP und v-Src-DsRed belegt. Die Interaktion war abhängig von der SH2-Domäne des Transkriptionsfaktors. Die Fusion einer starken NLS an den C-Terminus von STAT5A-eCFP führte zur Akkumulation des Fusionsproteins im Nukleus von HEK293T-Zellen. In Koexpression mit v-Src-DsRed konnte die Kolo-kalisation von STAT5A-eCFP-NLS und v-Src-DsRed an der Plasmamembran detektiert werden, was auf eine starke Interaktion der Proteine hinweist. Dennoch war ein Großteil von STAT5A-eCFP-NLS kernlokalisiert, was zeigte, dass v-Src generelle Importin-gesteuerte Importmechanismen nicht beeinträchtigt.

6 Ausblick

Die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A in der CML und konträr dazu die nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors in der AML sind beschrieben worden und wurden in dieser Arbeit bestätigt. Die Notwendigkeit der Expression von STAT5 für die Ausbildung und Aufrechterhaltung beider Erkrankungen ist jedoch unbestritten. Der Mechanismus der zytoplasmatischen Retention, aber auch die Funktion des zytoplasmatisch lokalisierten und aktivierten Transkriptionsfaktors STAT5A wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Mitglieder der Familie der Src-Kinasen wurden als essenzielle Faktoren, die die zytoplasmatische Retention von STAT5A in der CML verursachen, identifiziert. STAT5A wird über eine SH2-Domänen-vermittelte Interaktion mit SFKs gehindert, in den Nukleus zu translozieren.

Dennoch können weitere Faktoren an der Verankerung von tyrosinphosphoryliertem STAT5A im Zytoplasma beteiligt sein. Es ist fraglich, ob die direkte Interaktion von STAT5A und SFKs der alleinige Mechanismus der zytoplasmatischen Retention ist. Wie bereits in der Diskussion erwähnt wurde, sind sogenannte Ankerproteine im Zytosol vorhanden, die die zytoplasmatische Lokalisation einiger Faktoren verursachen. Ein interessantes Beispiel ist die Familie der 14-3-3-Proteine. Eines der Mitglieder interagiert mit cdc25C und kann so dessen nukleäre Translokation verhindern. 14-3-3-Proteine nehmen hierdurch direkten Einfluss auf den Zellzyklus [228]. Außerdem vermittelt BCR-ABL die Serinphosphorylierung von c-Abl durch JNK, wodurch c-Abl durch 14-3-3-sigma gebunden und im Zytoplasma zurückgehalten wird [223]. SFKs könnten für STAT5A in der CML eine ähnliche Funktion einnehmen wie BCR-ABL für c-Abl einnimmt.

Eigene Ergebnisse einer Massenspektrometrie bestätigten eine hohe Anzahl phosphorylierter Serine bzw. Threonine verteilt über STAT5A. Diese Serine und Threonine könnten Bindestellen für Ankerproteine (z.B. 14-3-3-Proteine) sein. Eine Analyse potentieller Interaktionspartner von STAT5A wäre demnach von großem Interesse.

In einigen Arbeiten wurde die zusätzliche Tyrosinphosphorylierung neben der des kritischen Tyrosins 694 von STAT5A beobachtet. Verantwortliche Kina-

sen waren in diesen Studien SFKs [111,148]. Auch unbekannte Tyrosinphosphorylierungen bzw. weitere posttranslationale Modifikationen könnten interessante Ansatzpunkte sein, die zytoplasmatische Retention von aktiviertem STAT5A in Leukämien zu verstehen.

Durch native Gele konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von STAT5A nach Aktivierung durch v-Src bzw. Hck nicht beeinträchtigt wurde (Kap. 3.7). Die Interaktion mit Importinen wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht. Kawashima *et al.* berichteten von einem ternären Komplex aus der GTPase Rac1, MgcRacGAP (*GTPase-Activating-Protein*) und STAT5 bzw. STAT3. MgcRacGAP und GTP-gebundenes Rac1 diene als NLS-beinhaltenendes nukleäres Chaperon, das sowohl für den Transport in den Zellkern, als auch für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors am Rezeptor notwendig ist [229,230]. Eine Analyse der Interaktion von STAT5A mit Importinen bzw. MgcRacGAP und eine mögliche Fehlregulation dieser Wechselwirkung nach Tyrosinphosphorylierung durch Src-Kinasen könnte Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

Harir *et al.* zeigten, dass eine artifizielle, konstitutiv aktive Mutante von STAT5A (S710F), deren Expression in Mäusen eine CML-ähnliche Erkrankung hervorrief, im Zytoplasma mit PI3K und Gab2 interagiert [167]. Diese Mutante lokalisierte, trotz dauerhafter Tyrosinphosphorylierung, im Zytoplasma und bewirkte die Aktivierung der Serin-/Threoninkinase Akt [166,167]. Ähnlich direkte Effekte des tyrosinphosphorylierten STAT5A auf andere Signalwege im Zytoplasma konnten bis dato nicht gezeigt werden. Die Interaktion von STAT5A und v-Src wurde in dieser Arbeit nachgewiesen. Die Ausbildung eines zytoplasmatischen regulatorischen Komplexes („Signalsom“) aus STAT5A/PI3K/Akt und SFKs unter Einbindung des *scaffold*-Proteins Gab2 (s. Kap. 4.4, Abb. 21) ist vorstellbar. Es wäre von Interesse, ob die Aktivierung weiterer Signalwege außer dem PI3K/Akt-Signalweg durch zytoplasmatisch lokalisiertes STAT5A vermittelt werden kann.

In der Kit(D816V) positiven Mastrozytose konnte ebenfalls die zytoplasmatische Retention von STAT5A beobachtet werden [193]. STAT5A ist ein direktes Ziel der konstitutiv aktiven Rezeptortyrosinkinase. Die mögliche Relevanz der SFKs für die fehlende nukleären Akkumulation von STAT5A in

der Mastozytose wurde noch nicht untersucht, wäre aber für die Behandlung von Patienten mit Tyrosinkinaseinhibitoren von Bedeutung.

Die Ursache für die Beobachtung, dass manche der Src-Kinasen die zytosplasmatische Retention von STAT5A in Koexpression mit BCR-ABL vermitteln (Hck, Src) andere jedoch nicht (Lyn), ist weiterhin nicht geklärt. Spezifische, aber derzeit unbekannte Funktionen der SFKs scheinen hierfür verantwortlich zu sein.

7 Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/ Adenosintriphosphat
Akt	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Acute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren

B

Bcl-xL	B-cell-lymphoma protein-xL
BCR-ABL	breakpoint cluster region- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
bzw.	beziehungsweise

C

C-terminal	carboxy-terminal
CBP	CREB binding protein
CIS	cytokine-inducible SH2-containing protein
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie Virus
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CPAP	centrosomal P4.1-associated protein
CREB	cAMP response element-binding protein
CRM1	chromosome region maintenance 1 (exportin-1)
CT-1	cardiotrophin 1
Cy	Cyanin-Farbstoff

D

D	Asparaginsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure

7 Abkürzungsverzeichnis

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRed	rot-fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma spec.</i>
DTT	Dithiothreitol

E

E	Extinktion
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
eCFP	enhanced cyan fluorescent protein
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
Epo	Erythropoetin

F

F	Phenylalanin
FAK	focal adhesion kinase
FKS	Fötales Kälberserum
FLT3-ITD	fms-like tyrosine kinase receptor-3-internal tandem duplication
FRET	fluorescence (förster) resonance energy transfer
FRT	Flp recombination target sequence

G

G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
G-Protein	Guaninnukleotid-Bindeprotein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAS	γ -interferone activated sequence
GFP	green fluorescent protein
GH	growth hormone
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulationg factor

H

h	Stunde
HEK293T	Human Embryonic Kidney + SV40 large T-Antigen
HRP	horseradish peroxidase

I

IgG	Immunglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
ISG	interferon-stimulated gene

J

JAK	Janus Kinase
-----	--------------

K

K	Lysin
kat.	katalytisch
kDa	Kilo Dalton

L

L	Leucin
LB	lysogeny broth
LIF	leukemia inhibitory factor
LMB	Leptomycin B

M

MAPK	mitogen-activated protein-kinase
MBS	multiple beam splitter
MCS	multiple cloning site
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MGF	mammary gland factor
min	Minute

N

N	Asparagin
N-terminal	Amino-terminal
NcoA-1	nuclear receptor co-activator-1
NES	nuclear export sequence

7 Abkürzungsverzeichnis

NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NIH 3T3	Fibroblasten-Zelllinie
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLS	nuclear localization sequence
Nmi	N-Myc interactor

O

OD	optische Dichte
Oct-1	octamer binding transcription factor-1
OSM	Oncostatin M

P

p100	<i>nuclear co-activator protein</i>
p53	<i>tumor-suppressor 53</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
Pim	<i>proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
PRL	Prolaktin
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>
PVDF	Polyvinyliden-difluorid

R

mRNS	messenger RNS
RIPA	<i>radioimmune precipitation assay</i>
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative <i>real-time-PCR</i>

S

s	Sekunde
---	---------

S	Serin
SCCHN	<i>squamous cell carcinoma of the head and neck</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	<i>sodium-dodecylsulfate</i>
SH2-Domäne	<i>src-homology 2-Domäne</i>
SHP	<i>SH2 domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SFK	<i>src family kinase</i>
SMRT	<i>silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor</i>
SOCS	<i>suppressors of cytokine signaling</i>
Src	kurz für Sarcoma / <i>proto-oncogenic tyrosine kinase</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STAT5	STAT5A/B
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>

T

T	Threonin
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq.	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS-N	<i>Tris buffered saline/Nonidet P-40</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TM	Schmelztemperatur
TPO	Thrombopoietin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TYK2	Tyrosinkinase 2

U

U	unit
ü.N.	über Nacht
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

V

V	Valin
Vol	Volumen
v-Src	viral sarcoma

7 Abkürzungsverzeichnis

W

W Tryptophan

Wt Wildtyp

X

X beliebige Aminosäure

Y

Y Tyrosin

Z

z.B. zum Beispiel

8 Literaturverzeichnis

- 1 Hevehan, D. L. *et al.* (2002) Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood*. 99, 1627-37
- 2 Azam, M. *et al.* (1995) Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *The EMBO journal*. 14, 1402-11
- 3 Benekli, M. *et al.* (2003) Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*. 101, 2940-54
- 4 Ramos, H. L. *et al.* (2007) STAT5 isoforms: controversies and clarifications. *The Biochemical journal*. 404, e1-2
- 5 Fu, X. Y. *et al.* (1990) ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87, 8555-9
- 6 Fu, X. Y. *et al.* (1992) The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 7840-3
- 7 Schindler, C. *et al.* (1992) Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 7836-9
- 8 Schindler, C. *et al.* (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science (New York, N.Y.)*. 257, 809-13
- 9 Qureshi, S. a. *et al.* (1995) Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 3829-33
- 10 Hou, X. S. *et al.* (1996) Marelle acts downstream of the Drosophila HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell*. 84, 411-9
- 11 Wang, Y. and Levy, D. E. (2006) C. elegans STAT: evolution of a regulatory switch. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 20, 1641-52
- 12 Constantinescu, S. *et al.* (1999) The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 10, 18-23
- 13 Hintzen, C. *et al.* (2008) Oncostatin M-induced and constitutive activation of the JAK2/STAT5/CIS pathway suppresses CCL1, but not CCL7 and CCL8, chemokine expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 181, 7341-9
- 14 Sartor, C. I. *et al.* (1997) Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. *Cancer research*. 57, 978-87

- 15 Ryan, J. J. *et al.* (1997) Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Experimental hematology*. 25, 357-62
- 16 Luchtefeld, M. *et al.* (2001) Role of G beta-subunit in angiotensin II-type 1 receptor signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 280, 756-60
- 17 Constantinescu, S. *et al.* (1999) The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 10, 18-23
- 18 Paukku, K. and Silvennoinen, O. (2004) STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine & growth factor reviews*. 15, 435-55
- 19 Wenta, N. *et al.* (2008) Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, 9238-43
- 20 Zhong, M. *et al.* (2005) Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 3966-71
- 21 Murphy, T. L. *et al.* (2000) Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 20, 7121-31
- 22 Vinkemeier, U. *et al.* (1996) DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *The EMBO journal*. 15, 5616-26
- 23 Soldaini, E. *et al.* (2000) DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Molecular and cellular biology*. 20, 389-401
- 24 Vogt, M. *et al.* (2011) The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3. *Journal of cell science*. 124, 900-9
- 25 Levy, D. E. and Darnell, J. E. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3, 651-62
- 26 Liao, J. *et al.* (2000) Distinct roles of the NH2- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 5267-72
- 27 Nakajima, H. *et al.* (2001) Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *The EMBO journal*. 20, 6836-44
- 28 Melen, K. *et al.* (2001) Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *The Journal of biological chemistry*. 276, 16447-55
- 29 Ma, J. and Cao, X. (2006) Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. *Cellular signalling*. 18, 1117-26
- 30 Marg, A. *et al.* (2004) Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *The Journal of cell biology*. 165, 823-33

- 31 Yang, E. *et al.* (1999) The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Molecular and cellular biology*. 19, 5106-12
- 32 Greenlund, A. C. *et al.* (1994) Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *The EMBO journal*. 13, 1591-600
- 33 Shuai, K. *et al.* (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*. 76, 821-8
- 34 Moriggl, R. *et al.* (1996) Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Molecular and cellular biology*. 16, 5691-700
- 35 Bhattacharya, S. *et al.* Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. , *Nature*,383. 26-Sep-(1996) , 344-7
- 36 Philp, J. a *et al.* (1996) Differential activation of STATs 3 and 5 during mammary gland development. *FEBS letters*. 396, 77-80
- 37 Horvath, C. M. *et al.* (1996) Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Molecular and cellular biology*. 16, 6957-64
- 38 Zhang, X. and Darnell, J. E. (2001) Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *The Journal of biological chemistry*. 276, 33576-81
- 39 John, S. *et al.* (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Molecular and cellular biology*. 19, 1910-8
- 40 Braunstein, J. *et al.* (2003) STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 278, 34133-40
- 41 Chatterjee-Kishore, M. *et al.* (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *The EMBO journal*. 19, 4111-22
- 42 Ren, Z. *et al.* (2008) Crystal structure of unphosphorylated STAT3 core fragment. *Biochemical and biophysical research communications*. 374, 1-5
- 43 Neculai, D. *et al.* (2005) Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer. *The Journal of biological chemistry*. 280, 40782-7
- 44 Chen, X. *et al.* (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*. 93, 827-39
- 45 Becker, S. *et al.* (1998) Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature*. 394, 145-51
- 46 Vinkemeier, U. *et al.* (1998) Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science (New York, N.Y.)*. 279, 1048-52
- 47 Mao, X. *et al.* (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Molecular cell*. 17, 761-71

- 48 Olayioye, M. a *et al.* (1999) ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*. 274, 17209-18
- 49 Malakhov, M. P. *et al.* (2003) High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 278, 16608-13
- 50 Tanaka, T. *et al.* (2005) SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity*. 22, 729-36
- 51 Yuan, Z.-L. *et al.* (2005) Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science (New York, N.Y.)*. 307, 269-73
- 52 Mowen, K. A. *et al.* (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell*. 104, 731-41
- 53 Beuvink, I. *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. *The Journal of biological chemistry*. 275, 10247-55
- 54 Mohr, A. *et al.* (2011) Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. *European journal of cell biology*. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.09.005
- 55 Heinrich, P. C. *et al.* (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal*. 334 (Pt 2, 297-314
- 56 Heinrich, P. C. *et al.* (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*. 374, 1-20
- 57 Matsumoto, a *et al.* (1997) CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*. 89, 3148-54
- 58 Campbell, J. S. *et al.* (2001) Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *The Journal of clinical investigation*. 107, 1285-92
- 59 Lim, C. P. and Cao, X. (2006) Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular bioSystems*. 2, 536-50
- 60 Starr, R. *et al.* (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*. 387, 917-21
- 61 Shuai, K. and Liu, B. (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews. Immunology*. 3, 900-11
- 62 ten Hoeve, J. *et al.* (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Molecular and cellular biology*. 22, 5662-8
- 63 Xu, D. and Qu, C.-K. (2008) Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 13, 4925-32
- 64 Schmitt-Ney, M. *et al.* (1992) Developmental and environmental regulation of a mammary gland-specific nuclear factor essential for transcription of the gene encoding beta-casein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 3130-4

- 65 Gouilleux, F. *et al.* (1994) Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *The EMBO journal*. 13, 4361-9
- 66 Wakao, H. *et al.* (1995) Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *The EMBO journal*. 14, 854-5
- 67 Liu, X. *et al.* (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 8831-5
- 68 Copeland, N. G. *et al.* Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. , *Genomics*,29. 01-Sep-(1995) , 225-8
- 69 Mui, A. L. *et al.* (1995) Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *The EMBO journal*. 14, 1166-75
- 70 Teglund, S. *et al.* (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*. 93, 841-50
- 71 Yao, Z. *et al.* (2007) Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood*. 109, 4368-75
- 72 Liu, X. *et al.* (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & Development*. 11, 179-186
- 73 Udy, G. B. *et al.* (1997) Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 7239-44
- 74 Imada, K. *et al.* (1998) Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *The Journal of experimental medicine*. 188, 2067-74
- 75 Kerenyi, M. a *et al.* (2008) Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood*. 112, 3878-88
- 76 Cui, Y. *et al.* (2004) Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *Molecular and cellular biology*. 24, 8037-47
- 77 Murray, P. J. (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 178, 2623-9
- 78 Hennighausen, L. and Robinson, G. W. (2008) Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes & development*. 22, 711-21
- 79 Bowman, T. *et al.* (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 19, 2474-88
- 80 Buettner, R. *et al.* (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 8, 945-54

- 81 Lee, T. K. *et al.* (2006) Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research*. 66, 9948-56
- 82 Li, H. *et al.* (2004) Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer research*. 64, 4774-82
- 83 Kotecha, N. *et al.* (2008) Single-cell profiling identifies aberrant STAT5 activation in myeloid malignancies with specific clinical and biologic correlates. *Cancer cell*. 14, 335-43
- 84 Kieslinger, M. *et al.* (2000) Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes & development*. 14, 232-44
- 85 Arnould, C. *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. *Human molecular genetics*. 8, 1741-9
- 86 Onishi, M. *et al.* (1998) Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Molecular and cellular biology*. 18, 3871-9
- 87 Ariyoshi, K. *et al.* (2000) Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain. *The Journal of biological chemistry*. 275, 24407-13
- 88 Berchtold, S. *et al.* (1997) Cytokine receptor-independent, constitutively active variants of STAT5. *The Journal of biological chemistry*. 272, 30237-43
- 89 Ehret, G. B. *et al.* (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *The Journal of biological chemistry*. 276, 6675-88
- 90 Engblom, D. *et al.* (2007) Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes & development*. 21, 1157-62
- 91 Stoecklin, E. *et al.* (1997) Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Molecular and cellular biology*. 17, 6708-16
- 92 Stöcklin, E. *et al.* Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. , *Nature*,383. 24-Oct-(1996) , 726-8
- 93 Pfitzner, E. *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. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 12, 1582-93
- 94 Paukku, K. *et al.* (2003) Tudor and nuclease-like domains containing protein p100 function as coactivators for signal transducer and activator of transcription 5. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 17, 1805-14
- 95 Gewinner, C. *et al.* (2004) The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *The Journal of biological chemistry*. 279, 3563-72

- 96 Meyer, T. *et al.* (2004) A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *The Journal of biological chemistry.* 279, 18998-9007
- 97 Meyer, W. K. *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. *The Journal of biological chemistry.* 272, 31821-8
- 98 Meyer, T. *et al.* (2004) A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *The Journal of biological chemistry.* 279, 18998-9007
- 99 Moriggl, R. *et al.* (2005) Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer cell.* 7, 87-99
- 100 Zhu, M. *et al.* (1999) Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell.* 96, 121-30
- 101 Zeng, R. *et al.* (2002) Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950).* 168, 4567-75
- 102 Iyer, J. and Reich, N. C. (2008) Constitutive nuclear import of latent and activated STAT5a by its coiled coil domain. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 22, 391-400
- 103 Herrington, J. *et al.* (1999) A functional DNA binding domain is required for growth hormone-induced nuclear accumulation of Stat5B. *The Journal of biological chemistry.* 274, 5138-45
- 104 Welte, T. *et al.* (1994) Prolactin-dependent activation of a tyrosine phosphorylated DNA binding factor in mouse mammary epithelial cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.).* 8, 1091-102
- 105 Kornfeld, J.-W. *et al.* (2008) The different functions of Stat5 and chromatin alteration through Stat5 proteins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 13, 6237-54
- 106 Magné, S. *et al.* (2003) STAT5 and Oct-1 form a stable complex that modulates cyclin D1 expression. *Molecular and cellular biology.* 23, 8934-45
- 107 Litterst, C. M. *et al.* (2003) NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain. *The Journal of biological chemistry.* 278, 45340-51
- 108 Peng, B. *et al.* (2002) CPAP is a novel stat5-interacting cofactor that augments stat5-mediated transcriptional activity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.).* 16, 2019-33
- 109 Wang, D. *et al.* (2000) A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5. *The EMBO journal.* 19, 392-9
- 110 Clark, D. E. *et al.* (2005) ERBB4/HER4 potentiates STAT5A transcriptional activity by regulating novel STAT5A serine phosphorylation events. *The Journal of biological chemistry.* 280, 24175-80

- 111 Kabotyanski, E. B. and Rosen, J. M. (2003) Signal transduction pathways regulated by prolactin and Src result in different conformations of activated Stat5b. *The Journal of biological chemistry*. 278, 17218-27
- 112 Weaver, A. M. and Silva, C. M. (2006) Modulation of signal transducer and activator of transcription 5b activity in breast cancer cells by mutation of tyrosines within the transactivation domain. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 20, 2392-405
- 113 Ferbeyre, G. and Moriggl, R. (2011) The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes. *Biochimica et biophysica acta*. 1815, 104-14
- 114 Meinke, A. *et al.* (1996) Activation of different Stat5 isoforms contributes to cell-type-restricted signaling in response to interferons. *Molecular and cellular biology*. 16, 6937-44
- 115 Li, W. X. (2008) Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends in cell biology*. 18, 545-51
- 116 Banninger, G. and Reich, N. C. (2004) STAT2 nuclear trafficking. *The Journal of biological chemistry*. 279, 39199-206
- 117 Meyer, T. *et al.* (2002) Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *The EMBO journal*. 21, 344-54
- 118 Pranada, A. L. *et al.* (2004) Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling. *The Journal of biological chemistry*. 279, 15114-23
- 119 Chen, H.-C. and Reich, N. C. (2010) Live cell imaging reveals continuous STAT6 nuclear trafficking. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 185, 64-70
- 120 Frahm, T. *et al.* (2006) IFN-type-I-mediated signaling is regulated by modulation of STAT2 nuclear export. *Journal of cell science*. 119, 1092-104
- 121 Rous, P. (1911) A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *The Journal of experimental medicine*. 13, 397-411
- 122 Hunter, T. and Sefton, B. M. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77, 1311-5
- 123 Martin, G. S. (1970) Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature*. 227, 1021-3
- 124 Czernilofsky, A. P. *et al.* (1980) Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature*. 287, 198-203
- 125 Stehelin, D. *et al.* (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 260, 170-3
- 126 Huebner, R. J. and Todaro, G. J. (1969) Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 64, 1087-94
- 127 Parsons, S. J. and Parsons, J. T. (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 23, 7906-9

- 128 Bolen, J. B. (1991) Signal transduction by the SRC family of tyrosine protein kinases in hemopoietic cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research.* 2, 409-14
- 129 Martin, G. S. (2001) The hunting of the Src. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2, 467-75
- 130 Brown, M. T. and Cooper, J. A. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica et biophysica acta.* 1287, 121-49
- 131 Tatosyan, a G. and Mizenina, O. a (2000) Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry. Biokhimiia.* 65, 49-58
- 132 Kaplan, J. M. *et al.* (1990) The src protein contains multiple domains for specific attachment to membranes. *Molecular and cellular biology.* 10, 1000-9
- 133 Kaplan, K. B. *et al.* (1992) Association of p60c-src with endosomal membranes in mammalian fibroblasts. *The Journal of cell biology.* 118, 321-33
- 134 Superti-Furga, G. and Courtneidge, S. A. (1995) Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* 17, 321-30
- 135 Rickles, R. J. *et al.* (1995) Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 92, 10909-13
- 136 Xing, Z. *et al.* (1994) Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Molecular biology of the cell.* 5, 413-21
- 137 García-Martínez, J. M. *et al.* (2010) A non-catalytic function of the Src family tyrosine kinases controls prolactin-induced Jak2 signaling. *Cellular signalling.* 22, 415-26
- 138 Yeatman, T. J. (2004) A renaissance for SRC. *Nature reviews. Cancer.* 4, 470-80
- 139 Rubbi, L. *et al.* (2011) Global phosphoproteomics reveals crosstalk between Bcr-Abl and negative feedback mechanisms controlling Src signaling. *Science signaling.* 4, ra18
- 140 Cao, X. *et al.* (1996) Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Molecular and cellular biology.* 16, 1595-603
- 141 Yu, C. L. *et al.* (1995) Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science (New York, N.Y.).* 269, 81-3
- 142 Silva, C. M. (2004) Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene.* 23, 8017-23
- 143 Olayioye, M. a *et al.* (1999) ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry.* 274, 17209-18
- 144 Chin, H. *et al.* (1998) Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood.* 91, 3734-45
- 145 Lund, T. C. *et al.* (1999) The Src-family kinase Lck can induce STAT3 phosphorylation and DNA binding activity. *Cellular signalling.* 11, 789-96

- 146 Bromberg, J. F. *et al.* (1998) Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Molecular and cellular biology*. 18, 2553-8
- 147 Kazansky, A. V. and Rosen, J. M. (2001) Signal transducers and activators of transcription 5B potentiates v-Src-mediated transformation of NIH-3T3 cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 12, 1-7
- 148 Okutani, Y. *et al.* (2001) Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signaling pathway. *Oncogene*. 20, 6643-50
- 149 Kazansky, a V. *et al.* (1999) Differential effects of prolactin and src/abl kinases on the nuclear translocation of STAT5B and STAT5A. *The Journal of biological chemistry*. 274, 22484-92
- 150 Boerner, J. L. *et al.* (2005) Estrogen negatively regulates epidermal growth factor (EGF)-mediated signal transducer and activator of transcription 5 signaling in human EGF family receptor-overexpressing breast cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 19, 2660-70
- 151 Raccurt, M. *et al.* (2002) High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *The Journal of endocrinology*. 175, 307-18
- 152 Zhu, T. *et al.* (2005) Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone. *Cancer research*. 65, 317-24
- 153 Vonderhaar, B. K. (1999) Prolactin involvement in breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 6, 389-404
- 154 Mukhina, S. *et al.* (2004) Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 15166-71
- 155 Leong, P. L. *et al.* (2002) Differential function of STAT5 isoforms in head and neck cancer growth control. *Oncogene*. 21, 2846-53
- 156 Koppikar, P. *et al.* (2008) Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 5 contributes to tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, and resistance to epidermal growth factor receptor targeting. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 14, 7682-90
- 157 Tan, S.-H. *et al.* (2008) Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer research*. 68, 236-48
- 158 Shide, K. *et al.* (2008) Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 22, 87-95
- 159 Harir, N. *et al.* (2008) Oncogenic Kit controls neoplastic mast cell growth through a Stat5/PI3-kinase signaling cascade. *Blood*. 112, 2463-73
- 160 Goss, V. L. *et al.* (2006) A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. *Blood*. 107, 4888-97
- 161 Ben-Neriah, Y. *et al.* (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science (New York, N.Y.)*. 233, 212-4

-
- 162 Nelson, E. a *et al.* (2011) The STAT5 inhibitor pimoziide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood*. 117, 3421-9
- 163 Ilaria, R. L. and Van Etten, R. a (1996) P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *The Journal of biological chemistry*. 271, 31704-10
- 164 Hoelbl, A. *et al.* (2006) Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood*. 107, 4898-906
- 165 Hoelbl, A. *et al.* (2010) Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO molecular medicine*. 2, 98-110
- 166 Nyga, R. *et al.* (2005) Activated STAT5 proteins induce activation of the PI 3-kinase/Akt and Ras/MAPK pathways via the Gab2 scaffolding adapter. *The Biochemical journal*. 390, 359-66
- 167 Harir, N. *et al.* (2007) Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood*. 109, 1678-86
- 168 Poincloux, R. *et al.* (2007) Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells. *Journal of cellular physiology*. 213, 212-20
- 169 Meyn, M. a *et al.* (2006) Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *The Journal of biological chemistry*. 281, 30907-16
- 170 Danhauser-Riedl, S. *et al.* (1996) Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer research*. 56, 3589-96
- 171 Wilson, M. B. *et al.* (2002) Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. *Oncogene*. 21, 8075-88
- 172 Klejman, A. *et al.* (2002) The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *The EMBO journal*. 21, 5766-74
- 173 Wu, J. *et al.* (2008) Lyn regulates BCR-ABL and Gab2 tyrosine phosphorylation and c-Cbl protein stability in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*. 111, 3821-9
- 174 Hu, Y. *et al.* (2004) Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nature genetics*. 36, 453-61
- 175 Shah, N. P. *et al.* (2004) Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science (New York, N.Y.)*. 305, 399-401
- 176 Li, G. *et al.* (2010) Effective targeting of STAT5-mediated survival in myeloproliferative neoplasms using ABT-737 combined with rapamycin. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 24, 1397-405
- 177 Masson, K. and Rönstrand, L. (2009) Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cellular signalling*. 21, 1717-26
- 178 Walter, M. *et al.* (2007) The 2.7 Å crystal structure of the autoinhibited human c-Fms kinase domain. *Journal of molecular biology*. 367, 839-47
-

8 Literaturverzeichnis

- 179 Rocnik, J. L. *et al.* (2006) Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood*. 108, 1339-45
- 180 Choudhary, C. *et al.* (2007) Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood*. 110, 370-4
- 181 Obermann, E. C. *et al.* (2010) Expression of pSTAT5 predicts FLT3 internal tandem duplications in acute myeloid leukemia. *Annals of hematology*. 89, 663-9
- 182 Schmidt-Arras, D. *et al.* (2009) Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood*. 113, 3568-76
- 183 Bunting, K. D. *et al.* (2007) Cytoplasmic localization of phosphorylated STAT5 in human acute myeloid leukemia is inversely correlated with Flt3-ITD. *Blood*. 110, 2775-6
- 184 Robinson, L. J. *et al.* (2005) Src family tyrosine kinases are activated by Flt3 and are involved in the proliferative effects of leukemia-associated Flt3 mutations. *Experimental hematology*. 33, 469-79
- 185 Okamoto, M. *et al.* (2007) Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 21, 403-10
- 186 Ziegler, P. and Manz, M. G. (2007) Mouse models for human hemato-lymphopoiesis. *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]*. 2, Unit2.13
- 187 Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 29, e45
- 188 Herrmann, A. *et al.* (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of persistently activated STAT3. *Journal of cell science*. 120, 3249-61
- 189 Herrmann, A. *et al.* (2004) STAT3 is enriched in nuclear bodies. *Journal of cell science*. 117, 339-49
- 190 Kamps, M. P. and Sefton, B. M. (1986) Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine-295 in the ATP-binding site of p60src. *Molecular and cellular biology*. 6, 751-7
- 191 Buss, J. E. *et al.* (1986) The absence of myristic acid decreases membrane binding of p60src but does not affect tyrosine protein kinase activity. *Journal of virology*. 58, 468-74
- 192 Kalderon, D. *et al.* (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*. 39, 499-509
- 193 Baumgartner, C. *et al.* (2009) Expression of activated STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V. *The American journal of pathology*. 175, 2416-29
- 194 Manabe, N. *et al.* (2006) Src transduces signaling via growth hormone (GH)-activated GH receptor (GHR) tyrosine-phosphorylating GHR and STAT5 in human leukemia cells. *Leukemia research*. 30, 1391-8
- 195 Giepmans, B. N. G. *et al.* (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science (New York, N.Y.)*. 312, 217-24

- 196 Köster, M. *et al.* (2005) Nucleocytoplasmic shuttling revealed by FRAP and FLIP technologies. *Current opinion in biotechnology*. 16, 28-34
- 197 Masi, A. *et al.* (2010) Optical methods in the study of protein-protein interactions. *Advances in experimental medicine and biology*. 674, 33-42
- 198 Swameye, I. *et al.* (2003) Identification of nucleocytoplasmic cycling as a remote sensor in cellular signaling by databased modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 1028-33
- 199 Dong, F. *et al.* (1998) Stimulation of Stat5 by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is modulated by two distinct cytoplasmic regions of the G-CSF receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 161, 6503-9
- 200 Chipoy, C. *et al.* (2007) Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5 and p53. *Oncogene*. 26, 6653-64
- 201 Wakao, H. *et al.* (1992) Mammary gland-specific nuclear factor is present in lactating rodent and bovine mammary tissue and composed of a single polypeptide of 89 kDa. *The Journal of biological chemistry*. 267, 16365-70
- 202 Arlinghaus, R. B. (2002) Bcr: a negative regulator of the Bcr-Abl oncoprotein in leukemia. *Oncogene*. 21, 8560-7
- 203 Warsch, W. *et al.* (2011) High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 117, 3409-20
- 204 Parada, Y. *et al.* (2001) BCR-ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *The Journal of biological chemistry*. 276, 23572-80
- 205 Mitina, O. *et al.* (2007) Src family tyrosine kinases phosphorylate Flt3 on juxtamembrane tyrosines and interfere with receptor maturation in a kinase-dependent manner. *Annals of hematology*. 86, 777-85
- 206 Meyn, M. A. *et al.* (2006) Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *The Journal of biological chemistry*. 281, 30907-16
- 207 Sun, J. *et al.* (2009) The D816V mutation of c-Kit circumvents a requirement for Src family kinases in c-Kit signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 284, 11039-47
- 208 Carroll, M. *et al.* (1997) CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood*. 90, 4947-52
- 209 Deininger, M. W. N. and Druker, B. J. (2003) Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacological reviews*. 55, 401-23
- 210 Deininger, M. *et al.* (2005) The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 105, 2640-53
- 211 Kantarjian, H. *et al.* (2010) Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 362, 2260-70

- 212 An, X. *et al.* (2010) BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leukemia research*. 34, 1255-68
- 213 O'Hare, T. *et al.* (2009) AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer cell*. 16, 401-12
- 214 Chan, W. W. *et al.* (2011) Conformational control inhibition of the BCR-ABL1 tyrosine kinase, including the gatekeeper T315I mutant, by the switch-control inhibitor DCC-2036. *Cancer cell*. 19, 556-68
- 215 Tatton, L. *et al.* (2003) The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*. 278, 4847-53
- 216 Krebs, D. L. and Hilton, D. J. (2000) SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *Journal of cell science*. 113 (Pt 1, 2813-9
- 217 Mallette, F. a *et al.* (2007) Myc down-regulation as a mechanism to activate the Rb pathway in STAT5A-induced senescence. *The Journal of biological chemistry*. 282, 34938-44
- 218 Wierenga, A. T. J. *et al.* (2010) Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation. *Blood*. 115, 4367-76
- 219 Yamashita, T. *et al.* (1998) Differentiation inducers modulate cytokine signaling pathways in a murine erythroleukemia cell line. *Cancer research*. 58, 556-61
- 220 Fagerlund, R. *et al.* (2002) Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *The Journal of biological chemistry*. 277, 30072-8
- 221 Jove, R. and Hanafusa, H. (1987) Cell transformation by the viral src oncogene. *Annual review of cell biology*. 3, 31-56
- 222 David-Pfeuty, T. *et al.* (1993) Differential localization patterns of myristoylated and nonmyristoylated c-Src proteins in interphase and mitotic c-Src overexpresser cells. *Journal of cell science*. 105 (Pt 3, 613-28
- 223 Mancini, M. *et al.* (2009) 14-3-3 ligand prevents nuclear import of c-ABL protein in chronic myeloid leukemia. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 10, 637-47
- 224 Díaz-Moreno, I. *et al.* (2009) Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding. *Nature structural & molecular biology*. 16, 238-46
- 225 Morrison, D. K. (2009) The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in cell biology*. 19, 16-23
- 226 Tzivion, G. *et al.* (2001) 14-3-3 Proteins; Bringing New Definitions To Scaffolding. *Oncogene*. 20, 6331-8
- 227 Deininger, M. W. *et al.* (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 96, 3343-56
- 228 Peng, C. (1997) Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science*. 277, 1501-1505

- 229 Kawashima, T. *et al.* (2006) Rac1 and a GTPase-activating protein, MgcRacGAP, are required for nuclear translocation of STAT transcription factors. *The Journal of cell biology.* 175, 937-46
- 230 Kawashima, T. *et al.* (2009) A Rac GTPase-activating protein, MgcRacGAP, is a nuclear localizing signal-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. *Molecular and cellular biology.* 29, 1796-813

Danksagung

Herrn Professor Dr. Gerhard Müller-Newen danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Interesse am Fortschritt des Projektes und der Möglichkeit sich zu entfalten.

Herrn Universitätsprofessor Dipl. Ing. Dr. Werner Baumgartner danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Michael Vogt für die Weitergabe seiner Erfahrung insbesondere am konfokalen Laser *Scanning* Mikroskop.

Ich danke ganz herzlich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern von Labor 13:

Andrea Küster, Anne Schmitt, Anton Martincuks, Dieter Schwache, Natalie Rinis, Sara Zafarnia, Tamas Domoszlai und Tobias Recker.

Besonderer Dank gilt Hildegard Schmitz-Van de Leur für die Unterstützung bei aufwendigen Klonierungsarbeiten.

Dank gilt auch Dirk Fahrenkamp für thematische Diskussionen und die Weiterführung interessanter Projekte.

Außerdem danke ich auch allen anderen Arbeitskollegen auf der 3. Etage des Flures 42.

Meiner Familie danke ich für ihre Anteilnahme und seelische Unterstützung.

Meiner Frau Evelina danke ich, da sie immer für mich da ist, mir das Leben versüßt und mich in jeder Lebenslage unterstützt. Ich danke meiner Tochter Julie für ihre Liebe.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Chatain
Vorname:	Nicolas
Geburtstag:	20.10.1980
Geburtsort:	Rheinbach
Konfession:	keine
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Akademische Ausbildung:

ab 2008	Promotion am Institut für Biochemie und Molekularbiologie (UK Aachen) der RWTH Aachen
ab 2001 bis 2008	Studium der Biologie an der RWTH-Aachen Abschluss: Diplom

Wehrersatzdienst:

ab 2000 bis 2001	Zivildienst im Marien-Hospital Euskirchen
------------------	---

Schulbildung:

ab 1987 bis 1991	Grundschule Sürster Weg in Rheinbach
ab 1991 bis 2000	Gymnasium Marienschule in Euskirchen Abschluss: Abitur