

**Identifikation und Charakterisierung der dynamischen
O-GlcNAc Modifikation von Stat5a**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt
beim Fachbereich 14
(chemische und pharmazeutische Wissenschaften)
Frankfurt am Main

von
Christina Gewinner
aus
Krumbach (Schwaben)

Frankfurt am Main
2001

(D F 1)

vom Fachbereich.....der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:.....

Gutachter:.....

Datum der Disputation:.....

C'est le désir qui
crée le désirable,
et le projet qui
pose la fin.

(Simone de Beauvoir)

Acknowledgements

I would like to thank Prof. Dr. Bernd Groner for giving me the opportunity to work in his group on a very interesting project, our many discussions and also for his support concerning the collaboration with the lab of Prof. Dr. Gerald Hart.

I also would like to thank Prof. Dr. H. Fasold for his supervision during my studies, his interest in my work and for his spontaneous acceptance as a supervisor for my PhD thesis.

Special thanks to the group: Sarah Abrell, Andrea Belaus, Nadine Böcher, Boris Brill, Claudia Bürger, Nahomi Castro-Palomino Laria, Christian “Sylvester” Kunz, Kerstin Nagel, Irina Plosonovska, Carrie Shemanko and Ilka Wittig for critical reading of my manuscript and their support. They showed a lot of patience, while listening to glycosylation papers in my lab seminars.

Many thanks also to Carrie Shemanko for improving my English, the many discussions which were not only about lab work, and for not getting tired of reading my English manuscripts. Also, I would like to thank Edith Pfitzner and Barbara Schnierle for helpful discussions and their practical philosophy.

Nadine was always a great help in the lab and I could always count on her. And not to forget the fun I had together with Andrea, Boris, Claudia, Carrie, Christian, Kerstin und Nahomi: we were and are such a great team. Drinking sparkling wine against frustrating results is a helpful medicine.

Many thanks also to Klaus Lehmen who helped me to battle with the computers and the printers in the institute.

I also don't want to forget the help from Jerry Hart and the discussions within his group, especially Natasha Zachara, Lance Wells and Keith Voseller. I will never forget the great and comprehensive time I had in their lab.

In the end, I want to thank Robin and my parents for cheering me up and always having an open ear for good and bad news.

And also many thanks to the chocolate industry which probably gained a “golden nose” because of my sweet tooth. For that, Bernd was right in giving this chocolate-dependent PhD student a project dealing with glycosylation.

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
ACN	Acetonitril
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CE	Zytoplasmatischer Extrakt
DAPI	4',6-diamidin-2'-phenylidol, dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreithol
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EMSA	Electromobility shift assay
Epo	Erythropoietin
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gal	Galaktose
GH	Growth hormone
Glc	Glukose
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GST	Gluthation S Transferase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl,beta-D-thiogalactosid
Jak	Janus Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria broth
M	Mol
MALDI-MS	Matrix assisted laser deonisation-mass spectrometry
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
moi	Multiplicity of infection
MOPS	N-(3-Sulfopropyl Morpholin) CAS
NE	Kernextrakt
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OSM	Onkostatine M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNGaseF	Peptid-N-Glycosidase F
Prl	Prolaktin
PUGNAc	O-(acetymido-2-deoxy-D-gluco-pyranosyliden)amino-N-phenylcarbamate
R	Rezeptor
RE	Response element
RP-HPLC	Reverse phase-high performance liquid chromatography
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
SDS	Natrium Dodecylsulfat
Stat	Signal transducer and activator of transcription
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Tpo	Trombopoietin
UDP	Uridin-diphospho
UV	Ultraviolett

Zusammenfassung

Die Stat-Proteine liegen als latente Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma vor, und spielen eine wichtige Rolle in der Übertragung von Zytokinsignalen von der Zellmembran in den Nukleus. Nach ligandeninduzierter Aktivierung der Zytokinrezeptoren phosphorylieren sich die assoziierten Jak-Kinasen selbst, die intrazellulären Domänen der Rezeptoren und die Mitglieder der Stat-Proteinfamilie. Nach Tyrosinphosphorylierung dimerisieren die Stat Proteine, indem sie Homo- oder Heterodimere bilden und wandern in den Zellkern. Dort können sie spezifische DNA-Sequenzen von Zielgenen binden und deren Transkription steuern.

Posttranslationale Modifikationen spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Proteinen, Interaktion mit Kofaktoren und in der Proteintranslokation. An einigen zytoplasmatischen und nukleären Proteinen wie Transkriptionsfaktoren, RNA Polymerase II, Onkoproteinen, Kernporenpoteinen und viralen Proteinen wurde eine O-Verknüpfung von einzelnen N-Acetylglukosamin Zuckerresten an Threoninen und Serinen nachgewiesen. Die Rolle dieser posttranslationalen Modifikation beinhaltet unter anderem den Schutz vor Proteolyse, Einfluß auf den Kerntransport, Regulation der Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung und Transkriptionskontrolle.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Modifikation von Stat5a mit einem einzelnen O-verknüpften N-Acetylglukosamin (O-GlcNAc) zu identifizieren, und die Funktion dieser Modifikation für Stat5 zu charakterisieren. Es wurde eine O-GlcNAc Modifikation von Stat5a nur im Zellkern nach Zytokinstimulation nachgewiesen. Es konnte auch gezeigt werden, daß andere Stat-Proteine, wie Stat1, Stat3, Stat5b und Stat6, mit O-GlcNAc modifiziert sind, und daß Stat5a auch in Krebs- und Leukämiezelllinien glykosyliert vorliegt. Für die Analyse der Glykosylierungsstellen im Massenspektrum und für die weiteren funktionellen Experimente wurde phosphoryliertes, Stat5a rekombinant mit dem Baculovirussystem in Insektenzellen exprimiert. Hierfür wurden die Insektenzellen mit Jak2- und Stat5a-Baculoviren koinfiziert, und die Lysate anschließend chromatographisch aufgereinigt. Es konnte ein O-GlcNAc modifiziertes Peptid am N-Terminus von Stat5a identifiziert werden. Dieses Peptid trägt zwei potentielle Glykosylierungsstellen, Threonin 92 und

Threonin 97. Die potentielle Glykosylierungsstelle Threonin 92 wurde zu einem Alanin mutiert (Stat5a-T92A) und in funktionellen Experimenten mit glykosyliertem und nicht glykosyliertem Stat5a verglichen. Um den möglichen Einfluß der Stat5a-Glykosylierung auf den Kerntransport zu analysieren, wurden HC11-Zellen mit dem O-GlcNAcase Inhibitor PUGNAc und den Vorstufen von N-Acetylglukosamin, Glukose und Glukosamin, inkubiert. Dadurch wurde der allgemeine Glykosylierungsstatus der Proteine und auch von Stat5a erhöht, und die Kerntranslokation von Stat5a vor und nach Zytokinstimulation untersucht. Dabei konnte kein Unterschied in der Kerntranslokation von Stat5a im Vergleich von behandelten zu unbehandelten Zellen beobachtet werden.

Da bekannt ist, daß die O-GlcNAc Modifikation die DNA-Bindung und die Protein-Protein Interaktionen von großen Proteinkomplexen beeinflusst, wurde der Einfluß der Stat5-Glykosylierung auf die DNA-Bindung und auf bekannte Stat5a-Interaktionspartner, wie den Glukokortikoid Rezeptor, den Korepressor der Transkription N-CoR (nuclear corepressor receptor) und den Koaktivator der Transkription CBP (CREB binding protein), untersucht. Die *in vitro* DNA-Bindung am β -Casein Oligomer zeigte keinen Unterschied hervorgerufen durch die Glykosylierung oder die Mutation von Threonin 92 von Stat5a auf. Die Interaktion mit N-CoR und mit dem Glukokortikoid Rezeptor wurde durch die Stat5a-Glykosylierung nicht beeinflusst, doch CBP interagiert bevorzugt mit glykosyliertem Stat5a. Die Interaktion mit CBP war nach Mutation der potentiellen Glykosylierungsstelle in Stat5a-T92A aufgehoben. In Luciferase-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß Stat5a-T92A keine Transaktivierungsaktivität im Vergleich zu Wildtyp Stat5a am β -Casein Promotor besitzt. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Glykosylierungsstelle von Stat5a durch die Mutation des Threonins 92 am N-Terminus zerstört wurde, und daß die fehlende Interaktion mit CBP die Transkription von Zielgenen negativ beeinflusst.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1-26
1.1 Zytokine und Rezeptorfamilien	1
1.2 Signaltransduktion	2
1.2.1 Der Jak-Stat Signaltransduktionsweg	3
1.2.1.1 Die Jak-Kinasen	3-4
1.2.1.2 Die Stat-Proteine	5-6
1.2.2 Negative Regulatoren des Jak-Stat Signaltransduktionsweges	7-8
1.2.3 Entdeckung und Funktion von Stat5	9
1.2.4 Interaktion von Stat5 mit anderen Transkriptionsfaktoren	10-13
1.3 Posttranslationale Modifikationen	14-24
1.3.1 Kohlenhydrat-Peptid Verknüpfungsgruppen	15-16
1.3.1.1 Die N-Verknüpfung	15
1.3.1.2 Die O-Verknüpfung	16
1.3.2 Die dynamische O-glykosidische Verknüpfung (O-GlcNAc) von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen	16-19
1.3.2.1 Enzyme der O-GlcNAc Modifikation: Die O-GlcNAc Transferase und O-GlcNAcase	20
1.3.2.2 Beispiele der O-GlcNAc Modifikation und Funktion	21-24
1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit	24-26

2. Methoden und Materialien	27-51
2.1 Methoden	27-49
2.1.1 Gentechnische Methoden	27
2.1.1.1 Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i> Zellen	27
2.1.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	27
2.1.1.3 Elektroporation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	27
2.1.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> nach Qiagen	28
2.1.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.1.1.6 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	28
2.1.1.7 Agarosegelelektrophorese	29
2.1.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.1.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.1.1.10 Einführung von Punktmutationen mit PCR-Mutagenese	30-31
2.1.1.11 "Overlap extension" PCR	31
2.1.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA	32
2.1.2 Methoden der Zellbiologie	32-34
2.1.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen	32
2.1.2.2 Induktion von Stat-Proteinen	33
2.1.2.3 Trypanblau-Färbung von eukaryontischen Zellen	34
2.1.2.4 Das Baculovirus-Expressionssystem	34-36
2.1.2.4.1 Kultivierung von Insektenzellen	34
2.1.2.4.2 Plaque-Assay zur Virusaufreinigung und Titerbestimmung	35
2.1.2.4.3 Infektion zur Virusvermehrung	35
2.1.2.4.4 Infektion zur Gewinnung rekombinanten Proteins	35
2.1.2.4.5 Zellextrakte aus Insektenzellen	36

2.1.2.5	Reinigung von Proteinen	36-39
2.1.2.5.1	Kopplung eines polyklonalen Antikörpers an Sepharose A (Immunoaffinitätssäule)	36-37
2.1.2.5.2	Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels einer Antikörper-Affinitätssäule	37
2.1.2.5.3	Immunoaffinitätschromatographie mit Antikörpern	37-38
2.1.2.5.4	Lektin-Affinitätschromatographie	38
2.1.2.5.5	NH ₄ -Fällung	38
2.1.2.5.6	Aceton-Fällung	39
2.1.2.6	Methoden zur Expression von Proteinen	39-41
2.1.2.6.1	Transiente Transfektion von Säugerzellen	39
2.1.2.6.2	Luciferase- und β -Galaktosidase-Assay	40
2.1.2.6.3	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen	40-41
2.1.2.6.4	<i>In vitro</i> -Transkription und Translation von Proteinen	41
2.1.2.7	Charakterisierung von Proteinen	41-42
2.1.2.7.1	Proteinextraktion	41
2.1.2.7.2	Gesamtzellextraktion	41
2.1.2.7.3	Zytoplasma- und Kernlyse	41-42
2.1.2.8	Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	42
2.1.2.9	SDS-PAGE	42
2.1.2.10	Coomassieblau-Färbung	43
2.1.2.11	Western Blot	43
2.1.2.11.1	Imunoblot	43-44

2.1.2.12	Strippen von Blotmembranen	44
2.1.2.12.1	Strippen von Blotmembranen mittels Urea	44
2.1.2.12.2	Strippen von Blotmembranen mittels β -Mercaptoethanol	44
2.1.2.13	Untersuchungen zur biologischen Aktivität	44-47
2.1.2.13.1	Galaktosyltransferase-Assay	44-46
2.1.2.13.2	Ko-Immunoaffinitätschromatographie	46
2.1.2.13.3	Gelretardierungsexperimente (EMSA)	46
2.1.2.13.4	ABCD-Assay	47
2.1.2.13.5	Verstärkung der dynamischen Glykosylierung von Proteinen	47-48
2.1.2.13.5.1	Verstärkung der Glykosylierung mittels PUGNAc	47
2.1.2.13.5.2	Verstärkung der Glykosylierung mittels Glukose und Glukosamin	48
2.1.2.13.5.3	Verstärkung der Glykosylierung mittels Streptozotocin	48
2.1.2.13.6	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	49
2.1.2.13.6.1	Trypsin-Verdau von Proteinen im SDS-PAGE	49-50
2.1.2.13.6.2	Reverse-phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) radioaktiv markierter Peptide	50
2.1.2.13.6.3	Massenspektrometrische Analyse von Peptiden im MALDI-TOF	51
2.1.2.13.6.4	Manuelle Edman-Sequenzierung von Proteinen	51

2.2 Materialien	52-58
2.2.1 Bakterienstämme und Kulturbedingungen	52
2.2.2 Zelllinien und Zellkultur	53
2.2.3 Verwendete Antibiotika und Konzentrationen	54
2.2.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	54
2.2.5 Puffer	55
2.2.6 Antikörper	56
2.2.7 Plasmide	57
2.2.8 Sequenzen verwendeter DNA-Oligomere	58
2.2.8.1 Oligonukleotide für DNA-Bindungsversuche	58
2.2.8.2 Primer für die PCR	58
3. Ergebnisse	59-93
3.1 Identifizierung der dynamischen O-verknüpften Glykosylierung	59-64
3.1.1 Identifizierung der dynamischen O-verknüpften Glykosylierung von Stat5a mittels des Galaktosyltransferase-Assays	59-60
3.1.2 Untersuchung der Glykosylierung von Stat5 in Abhängigkeit von Zytokinstimulation	61-62
3.1.3 Untersuchung der anderen Stat Proteine auf Glykosylierung	62-63
3.1.4 Nachweis der Stat5-Glykosylierung in Krebs- und Leukämiezelllinien	63-64
3.2 Expression von Stat5 und Jak2 mit dem Baculovirus-System	65-69
3.2.1 Rekombinante Expression von phosphoryliertem Stat5a in Sf9 Insektenzellen	65
3.2.2 <i>In vitro</i> -DNA Bindung von rekombinantem Stat5a in Gelretardierungsexperimenten	66-68
3.2.3 Reinigung von rekombinantem Stat5a	68

3.2.4 Nachweis der Glykosylierung von rekombinantem Stat5a aus Insektenzellen	69
3.3 <i>In vitro</i> -DNA Bindung von glykosyliertem, rekombinantem Stat5a im ABCD-Assay	70-71
3.4 Identifizierung der spezifischen Glykosylierungsstelle von Stat5a	71-76
3.4.1 Markieren der Stat5a-Glykosylierungsstelle mittels des Galaktosyltransferase-Assays	71-72
3.4.2 Auftrennung der tryptischen Stat5a-Peptide mittels reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)	72-74
3.4.3 Detektion der Glykosylierungsstelle von Stat5a in der massenspektrometrischen Analyse	75-76
3.5 Charakterisierung der Funktionalität der Stat5a-Glykosylierung	77-82
3.5.1 Untersuchung des Einflusses des spezifischen O-GlcNacase Inhibitors PUGNAc und Glc/GlcN auf den Glykosylierungsgrad von Stat5a	77-78
3.5.2 Einfluß der Glykosylierung auf die Kernlokalisierung von Stat5a	78-80
3.5.3 Einfluß der Streptozotocin-Behandlung von HC11-Zellen auf den Glykosylierungsgrad nukleärer Proteine	81-82
3.6 Untersuchung der Wechselwirkung von glykosyliertem Stat5a mit dem Glukokortikoid Rezeptor	82-84
3.7 Untersuchung der Wechselwirkung von glykosyliertem Stat5a mit dem Korepressor N-CoR	84-85
3.8 Untersuchung der Wechselwirkung von glykosyliertem Stat5a mit dem Koaktivator CBP	86-87
3.9 Erzeugung einer Stat5a-Mutante mit einer Punktmutation an der potentiellen Glykosylierungsstelle Threonin 92	87-88
3.10 <i>In vitro</i> DNA-Bindung der Stat5a-T92A Mutante im ABCD-Assay	88-89

3.11 Charakterisierung der transkriptionellen Regulation durch glykosyliertes Stat5a	89-91
3.12 Untersuchung der Wechselwirkung von mutiertem Stat5a (Stat5a-T92A) mit dem Koaktivator CBP	92-93
4. Diskussion	94-116
4.1 Identifizierung und Dynamik der O-GlcNAc Modifikation von Stat5a	95-98
4.2 Rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen und die O-GlcNAc Modifikation	98-101
4.3 Untersuchungen zur Funktionalität der Glykosylierung im Stat5a-Kerntransport	101-104
4.4 Identifikation der potentiellen Stat5a-Glykosylierungsstellen	105-106
4.5 Glykosylierung anderer Stat-Proteine und Glykosylierung von Stat5a in Krebszelllinien	107-108
4.6 Mutation der potentiellen Glykosylierungsstelle Threonin 92 und Untersuchungen zur DNA-Bindung in Abhängigkeit der Stat5a-Glykosylierung	108-109 109-110
4.7 Protein-Protein Interaktionen mit Stat5a in Abhängigkeit der O-GlcNAc Modifikation	110-115
4.7.1 Stat5a - Glukokortikoid Rezeptor Wechselwirkung	110-111
4.7.2 Stat5a - N-CoR Wechselwirkung	111-112
4.7.3 Stat5a - CBP Wechselwirkung	113-115
4.8 Einfluß der Mutation des Threonins 92 auf die transriptionelle Regulation von Stat5a	115
4.9 Ausblick	115-116

5. Literaturverzeichnis	117-136
6. Veröffentlichungen	137-138
7. Lebenslauf	139-141
8. Erklärung	142

1. Einleitung

Die Entwicklung und das Überleben von mehrzelligen und hochorganisierten Lebewesen erfordert ein hohes Maß an koordinierten Vorgängen zwischen einer Vielzahl verschiedenartiger Zellen. Jede einzelne Zelle besitzt die Fähigkeit ihre Entwicklung und Funktion an die verschiedenen äußeren Bedingungen anzupassen, und sich mit den umgebenden Zellen zu synchronisieren. Die Teilung und Differenzierung einer Zelle muß jedoch mit dem gesamten Organismus koordiniert werden. Die einzelnen Zellen müssen daher miteinander kommunizieren können, wie zum Beispiel über direkte Zellkontakte oder durch Sekretion von Botenstoffen. Auf diese Weise werden Signale weitergeleitet, die für Zellen das Signal zur Umstellung des Genexpressionsmusters darstellen.

1.1 Zytokine und Rezeptorfamilien

Zytokine sind von Zellen sekretierte kleine Glykoproteine, die als Botenstoffe die Kommunikation der Zellen im multizellulären Organismus regulieren. Die Zytokine werden als lösliche Faktoren definiert, die unter anderem über hämatopoietische Zytokinrezeptorsuperfamilien wirken können (Nicola, 1989). Die Ausschüttung von Zytokinen wird spezifisch durch eine Immunantwort, wie bei einer Entzündung oder Infektion verstärkt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung und ihr Hauptziel sind die hämatopoietischen Stammzellen (Duschl and Sebald, 1996) (Ihle et al., 1995).

Die Stimulation mit Zytokinen führt zur Differenzierung, Aktivierung, Wachstum oder Überleben von Zellen. Ihre charakteristische Eigenschaften sind die hohe Redundanz und Pleiotropie in biologischen Prozessen. So kann ein Zytokin ein anderes Mitglied der Zytokinsuperfamilie kompensieren, und verschiedene Zelltypen können durch dasselbe Zytokin beeinflusst werden. Diese Beobachtung führte zu der Theorie, daß verschiedene Zytokine gemeinsame intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen miteinander teilen (Ihle et al., 1996).

Die Zytokine und ihre Rezeptoren können in verschiedene Klassen, basierend auf ihre strukturellen und biologischen Ähnlichkeiten, unterteilt werden. Diese Einteilung beruht auf den Signaltransduktionsmechanismen und biologischen Rollen, die von allen Mitgliedern dieser Subklassen geteilt werden (Abbildung 1) (Ihle, 1995).

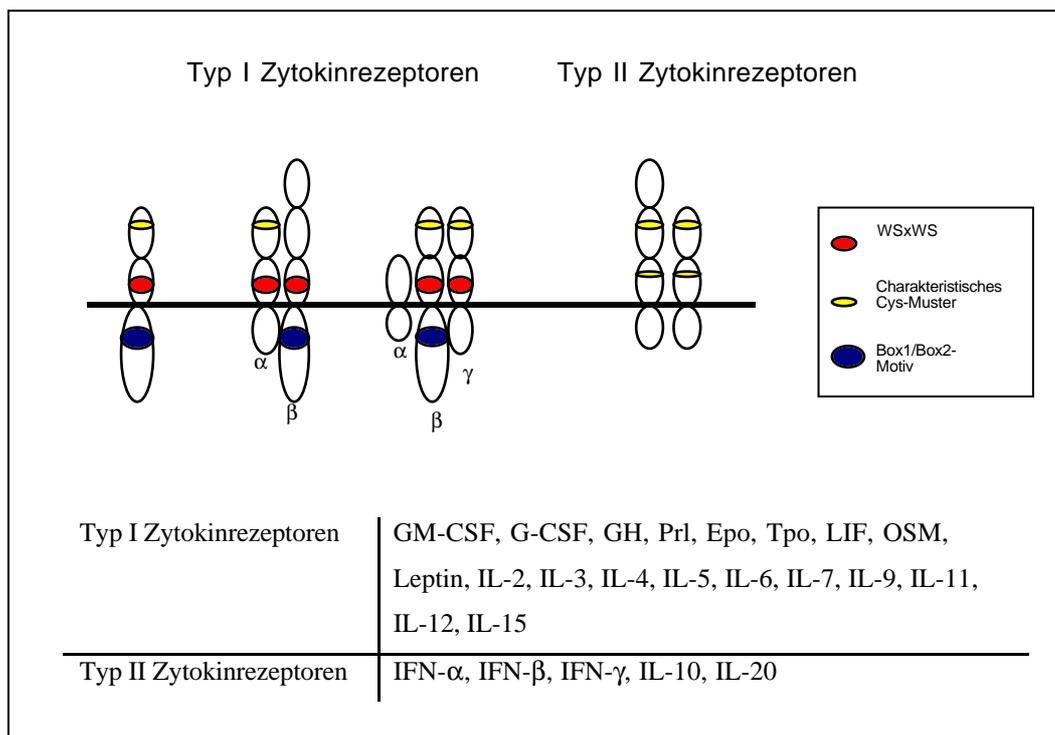


Abbildung 1: Darstellung der Superfamilie der hämatopoetischen Zytokinrezeptoren.

Die hämatopoetischen Zytokinrezeptoren können aus einer oder mehreren Ketten bestehen und gemäß der strukturellen Beschaffenheit der Ketten in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Typ1-Rezeptorketten besitzen ein WSxWS-Motiv (Tryptophan-Serin x Tryptophan-Serin, x steht für jede beliebige Aminosäure) in der extrazellulären Domäne und ein prolinreiches Box1/Box2-Motiv zur Bindung der Jak-Kinasen im Zytoplasma. Ein charakteristisches Cysteinmuster in der extrazellulären Domäne wurde in beiden Rezeptortypen gefunden (Jiang et al., 1996).

1.2 Signaltransduktion

Die Zytokine binden an einen Zelloberflächenrezeptor, wodurch eine oder mehrere Proteinkinasen aktiviert werden. So besitzen die Rezeptoren für TGFβ (transforming growth factor beta) und die für die Zytokine eine intrinsische Kinaseaktivität. Die aktivierten Proteinkinasen phosphorylieren sowohl Rezeptor- als auch Effektormoleküle.

Die Kette der Signalübertragung läuft über zahlreiche weitere intrazelluläre Komponenten, die jeweils durch Phosphorylierung aktiviert werden. Am Ende der Signaltransduktionskette steht oft ein Transkriptionsfaktor, der an bestimmte Zielgene bindet und deren Transkription bewirkt (Pawson, 1995) (Gadina et al., 2001). Einer dieser Signaltransduktionswege ist der Jak-Stat Signaltransduktionsweg.

1.2.1 Der Jak-Stat Signaltransduktionsweg

Nachdem Zytokine an ihre spezifischen Rezeptoren gebunden haben, gelangen die mit den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors assoziierten Jak-Kinasen in unmittelbare Nachbarschaft. Diese phosphorylieren sie sich gegenseitig und die Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, welche Bindungsstellen für die Stat-Proteine darstellen. Die Stat-Proteine werden aus dem Zytoplasma an den Rezeptor rekrutiert und gelangen in die Nähe der Jak-Kinasen. Durch diese werden die Stat-Proteine an spezifischen Tyrosinresten am C-Terminus phosphoryliert. Anschließend dimerisieren sie über reziproke Interaktion zwischen der SH2-Domäne (src-homology domain 2) und dem Phosphotyrosin und wandern in den Nukleus. Im Kern binden die Stat-Proteine an Promotorelemente verschiedener Zielgene und aktivieren deren Transkription, indem sie Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat aufnehmen.

1.2.1.1 Die Jak-Kinasen

Die hämatopoietischen Zytokinrezeptoren haben keine intrinsische Kinaseaktivität und rekrutieren zur Signalübertragung die Jak (janus kinase) Tyrosin-Kinasen aus dem Zytoplasma. Es sind 4 verschiedene Jak-Kinasen bei Säugetieren bekannt: Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk-2 (tyrosine kinase-2). Sie besitzen alle ein Molekulargewicht von etwa 120-140 kDa (Leonard, 2001). Die unterschiedlichen Zytokine aktivieren jeweils verschiedene Jak-Kinasen (Tabelle 1) und die aktivierten Jak-Kinasen phosphorylieren die zytoplasmatischen Zytokinrezeptordomänen. An den so entstandenen

Phosphotyrosinresten können Proteine mit SH2-Domänen (src-homology domain 2, Phosphotyrosin-bindende Domäne) binden und dienen den Jaks als weiteres Substrat (Darnell, 1997), (Bromberg and Darnell, 2000). Durch ligandeninduzierte Rezeptorassoziation werden die Jak-Kinasen in enge Nachbarschaft zueinander gebracht und phosphorylieren sich gegenseitig. Nur Jak2 kann sich autophosphorylieren, zur Aktivierung der anderen Jak-Kinasen müssen jeweils zwei verschiedene Jak-Kinasen an den zumeist heteromeren Rezeptorstrukturen vorliegen. In ihrer Struktur weisen die Jaks eine Tyrosin Kinasedomäne am Karboxylterminus auf. Dieser Domäne ist eine Pseudo-Kinasedomäne vorangestellt (Tandem-Kinasedomäne). Es sind keine SH2-, SH3- PH- (pleckstrin homology) oder Phosphotyrosin-Interaktionsdomänen bekannt.

Das Tyrosinkinase-Homolog in *Drosophila*, *hopscotch*, spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung der Segmentierung (Yan et al., 1996). Auch in *X.laewis*, *C.elegans* und in Fischen wurden Jak-Kinasen gefunden (Pellegrini and Dusanter-Fourt, 1997).

Zytokin	Aktivierte Jak-Kinase	Aktiviertes Stat Protein
IL-2	Jak1, Jak3	Stat3, Stat5
IL-4	Jak1, Jak3	Stat6
IL-7	Jak1, Jak3	Stat5
IL-13, IL-14	Jak1, Tyk2	Stat6
IL-3	Jak2	Stat5, Stat6
IL-5	Jak1, Jak2	Stat1, Stat5
IL-10	Jak2, Tyk2	Stat1, Stat3
IL-12	Jak2, Tyk2	Stat3, Stat4
IL-6	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat1, Stat3
IFN α/β	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat2
IFN γ	Jak1, Jak2	Stat1
Tpo	Jak2	Stat1, Stat3
Epo	Jak2	Stat5
Prolaktin	Jak2	Stat5
Growth Hormone	Jak2	Stat3, Stat5

Tabelle 1: Überblick über die zytokinstimulierte Aktivierung von Stat-Proteinen durch die Jak-Kinasen

Einige SH2-Domänen-haltige Signalmoleküle haben die Fähigkeit, direkt an die Phosphotyrosin-Reste der Zytokinrezeptoren nach Ligandenbindung andocken zu können (Schindler, 1998). Dies sind die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 oder das Adapterprotein GRB2, die eine Rolle in der Regulation des Ras-Raf Signaltransduktionsweges spielen (Ali, 1998).

1.2.1.2 Die Stat-Proteine

An die distalen Phosphotyrosinreste der Zytokinrezeptorketten werden Stat-Proteine (signal transducer and activator of transcription), latente Transkriptionsfaktoren, rekrutiert. Die Stat-Proteine binden den Rezeptor an ihrer SH2-Domäne. Es sind 7 verschiedene Stat-Proteine (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b und Stat6) bekannt, wobei immer eine bestimmte Gruppe an Stat-Proteinen als Antwort auf verschiedene Zytokine aktiviert wird (Taniguchi, 1995) (Bromberg, 2001) (Leonard, 2001). Die Stat-Proteine haben eine Größe von 750 und 850 Aminosäuren und setzen sich aus verschiedenen Domänen zusammen (Abbildung 2): Die DNA-bindende Domäne liegt im Zentrum des Proteins neben der SH2-Domäne, und die Transaktivierungsdomäne liegt am C-Terminus der Stat-Proteine (Pellegrini and Dusanter-Fourt, 1997). Ein anderes Charakteristikum des Stat-Proteins ist ein aktiv phosphoryliertes Tyrosin, das um die Aminosäure 700 gelegen ist. Die SH2-Domäne vermittelt spezifische Interaktionen der Stat-Faktoren mit dem zytoplasmatischen Teil der Zytokinrezeptoren. Für die Dimerisierung der Stat-Proteine wird der Phosphotyrosinrest des Dimerisierungspartners gebunden. Die Stat-Dimere bilden sich nach der Tyrosinphosphorylierung durch die Jak-Kinasen, und translozieren in den Kern. Im Nukleus können sie dann spezifische DNA-Sequenzen in den Promotoren von Zielgenen binden (Abbildung 3).

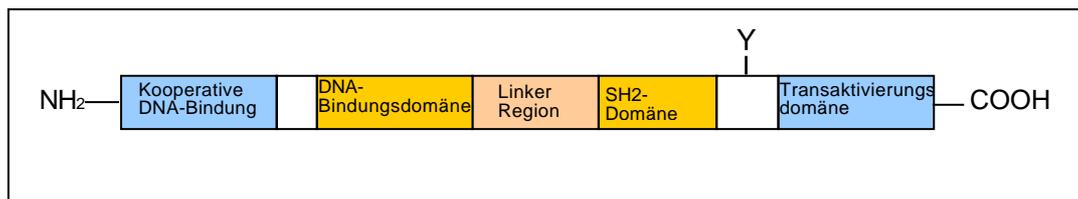


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen funktionellen Domänen der Stat-Proteine. Karboxyterminal der SH2-Domäne befindet sich ein konservierter Tyrosinrest, der bei Aktivierung des Stat-Proteins phosphoryliert wird.

Vor kurzem wurden die Kristallstrukturen von Stat1, Stat3 und Stat4 veröffentlicht (Chen et al., 1998), (Vinkemeier et al., 1998). Die Struktur von Stat1 ist sehr ähnlich zu der Struktur des Stat3b-Homodimer-DNA Komplex (Becker et al., 1998). Die Struktur der Aminotermini läßt vermuten, daß zwei Stat4 Dimere über diese Interaktionsdomänen Tetramere bilden, die an die DNA binden. DNA-Bindung durch Tetramerisierung wird auch für andere Stats wie Stat5 beschrieben (Verdier et al 1998). Die Stat-Proteine übertragen spezifisch Zytokin-, Wachstum- oder Hormonsignale während der Entwicklung oder der Immunantwort. Dies wurde durch Knockout-Experimente in Mäusen für Stat1, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b und Stat6 gezeigt (Durbin et al., 1996) (Takeda et al., 1998) (Teglund et al., 1998) (Akira, 1999).

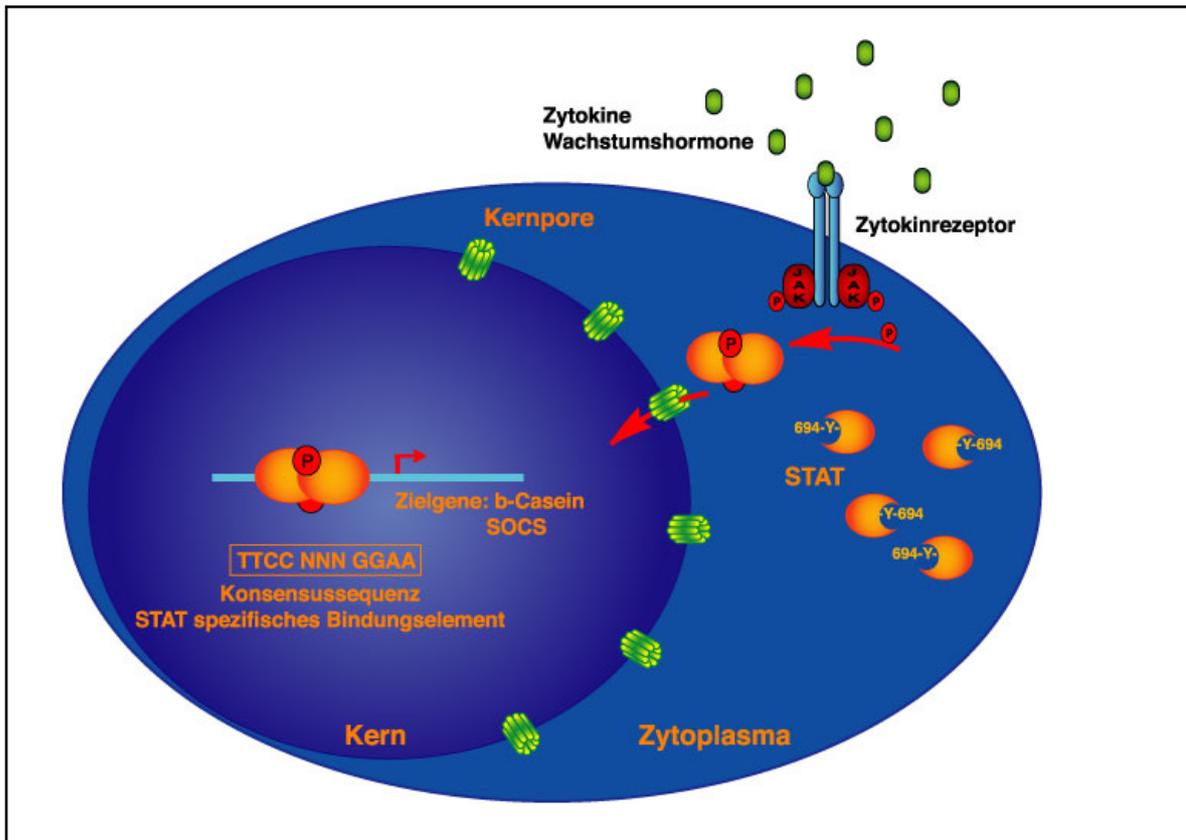


Abbildung 3: Schematische Übersicht über den Jak-Stat Signaltransduktionsweg

Durch Ligandenbindung dimerisieren zwei Zytokinrezeptoren. Dadurch gelangen die zytoplasmatisch gebundenen Jak-Kinasen in unmittelbare Nachbarschaft und aktivieren sich durch gegenseitige Phosphorylierung und phosphorylieren charakteristische Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, an die die Stat-Proteine binden können. Diese werden an charakteristischen Tyrosinresten durch die Jaks phosphoryliert, die dann dimerisieren und in den Kern translozieren. Dort aktivieren sie die Transkription von Zielgenen.

1.2.2 Negative Regulatoren des Jak-Stat Signaltransduktionsweges

Die Aktivität von tyrosinphosphorylierten Proteinen kann durch Proteintyrosinkinassen (PTK) (Kim and Maniatis, 1996), wie durch Proteintyrosinphosphatasen (PTPase) reguliert werden (Berchtold et al., 1998). In vielen Zellen ist die Aktivierung der Stat-Proteine transient, und eine Deaktivierung der Stat-Proteine wird somit durch spezifische Komponenten vermittelt. So konnte in Studien gezeigt werden, daß Natrium-Orthovanadat, ein PTPase-Inhibitor, die Aktivität der Stat-Proteine positiv reguliert (David et al., 1995).

Der Ubiquitin-Proteasomweg bewirkt die Degradierung vieler Proteine, die in fundamentale zelluläre Prozesse, wie der Transkriptionskontrolle, der Proteinfaltung und -translokation, Apoptose und Zellzyklusregulation involviert sind. So induziert IFN- γ die Ubiquitinylierung von Stat1, wobei die Phosphorylierung von Stat1 hierfür eine wichtige Voraussetzung darstellt (Kim and Maniatis, 1996).

Ein anderer Mechanismus der negativen Regulation stellen die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2 (Src-Homology Protein Tyrosine Phosphatasen) dar. Sie interagieren mit dem intrazytoplasmatischen Teil der Zytokinrezeptoren und dephosphorylieren die Jak-Kinasen. In SHP1- und SHP2-defizienten Mäusen konnte eine verlängerte Aktivierung der Stat-Proteine gezeigt werden (David et al., 1995).

Kürzlich wurde eine weitere Familie spezifischer Zytokin-induzierbarer Inhibitoren identifiziert, die den Jak-Stat Signaltransduktionsweg negativ regulieren. Diese inhibitorischen Proteine wurden unabhängig von 3 verschiedenen Forschergruppen entdeckt und werden SOCS (suppressor of cytokine signaling) (Starr et al., 1997), JAB (Jak Binding) (Endo et al., 1997) oder SSI (Stat-induced Stat Inhibitor) (Naka et al., 1997) genannt. Im Fall von SOCS1 und SOCS3 wird durch deren Bindung an die Jak-Kinasen deren Kinase-Aktivität inhibiert, indem sie wahrscheinlich als Pseudosubstrat dienen. Der SOCS-Promotor wird dabei durch die Stat-Dimere selbst aktiviert, so daß hier ein negativer Rückkopplungsmechanismus vorliegt (Shuai, 1999), (Krebs and Hilton, 2000).

Zusätzlich zu den SHP's und den SOCS Proteinen wurde eine weitere Gruppe von Inhibitoren identifiziert: die PIAS (Protein Inhibitor of Activated Stats) Proteine. Diese können *in vitro* die DNA Bindung von phosphorylierten, dimerisierten Stat-Proteinen (gezeigt für Stat1 und Stat3) blockieren (Liu et al., 1998), (Chung et al., 1997). Eine Überexpression von PIAS1 und PIAS3 inhibiert die Transkription von Stat1- und Stat3-spezifischen Zielgenen. Kürzlich konnte in 46% aller primärer hepatozellulären Karzinome eine Deletion des SOCS1 Gens auf Chromosom 16p identifiziert werden (Koyama et al., 1999). Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Negativregulation der Stat-Proteine in der Krebsentstehung hin.

1.2.3 Entdeckung und Funktion von Stat5

Stat5 wurde zuerst in den Brustdrüsen laktierender Ratten und Rinder identifiziert und MGF (mammary gland factor) genannt (Schmitt-Ney et al., 1992), (Wakao et al., 1992). Das MGF aus dem Schaf wurde kloniert und dessen Funktion als Schlüsselregulator der Prolaktin-vermittelten β -Casein Genaktivierung in Brustdrüsenzellen beschrieben. Anhand der Sequenzhomologie wurde MGF der Stat-Familie zugeordnet und Stat5 genannt (Wakao et al., 1994). Je zwei verschiedene Stat5-Gene wurden aus Mensch, Maus und Ratte kloniert: Stat5a mit 794 Aminosäuren und Stat5b mit 783 Aminosäuren. Sie weisen eine 96%ige Homologie auf (Liu et al., 1995), und unterscheiden sich in der Nähe des Phosphotyrosinrestes und in der Transaktivierungsdomäne. Stat5a und Stat5b können Homo- und Heterodimere bilden. In welchen Funktionen sie sich allerdings kompensieren können ist noch nicht genau bekannt.

Stat5 kann die Produktion milchbildender Proteine (Caseine) in den Brustdrüsen anregen und wird in fast allen Körpergeweben gefunden. Stat5 wird von den hämatopoetischen Zytokinen IL (Interleukin)-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor), Epo (Erythropoietin), GH (growth hormone), Prl (prolactin) und Tpo (trombopoietin) aktiviert. Bis jetzt sind nur einige Zielgene von Stat5 bekannt, wie zum Beispiel β -Casein (Gouilleux et al., 1995), β -IL-2 Rezeptor (Lecine et al., 1996), CDK-Inhibitor p21 (Matsumura et al., 1997), Cyclin D1 (Matsumura et al., 1999), Onkostatin M (Yoshimura and Arai, 1996), Serinprotease Inhibitor 2.1 (Wood et al., 1997), Bcl-x (Dumon et al., 1999) und das CIS-Protein (Verdier et al., 1998). Stat5 bindet auch in den Promotorregionen der Gene für den IgG-Rezeptor (Fc γ R1) und IRF1 (interferon-regulatory factor).

Da Stat5a und Stat5b Doppelknockout-Mäuse größere Einschränkungen im Wachstum und in der Entwicklung als Stat5a^{-/-} - oder Stat5b^{-/-} -Mäuse aufweisen, zeigt, daß Stat5a in vielen Funktionen von Stat5b ersetzt werden kann und umgekehrt (Teglund et al., 1998). Zudem wurde beobachtet, daß Stat5a^{-/-} - und Stat5b^{-/-} -Mäuse an fötaler Anämie leiden, und daß

eine direkte Rolle von Stat5a und Stat5b in der Bcl-x Induktion besteht (Socolovsky et al., 1999). Stat5a^{-/-} Mäuse haben einen Defekt in der Entwicklung des Brustdrüsengewebes und haben keine Milchsekretion. Dagegen weist der Verlust von Stat5b auf ein defektes sexuelles, dimorphes Wachstum und auf eine GH-abhängige Regulation der Genexpression in der Leber (Gadina et al., 2001).

Beide Stat5-Proteine werden zwar auch durch Epo und Tpo, sowie durch weitere Zytokine aktiviert, haben hier jedoch nur redundante Funktionen (Teglund et al., 1998). Dagegen ist Stat5 bei der Signalleitung durch den GH- und Prl-Rezeptor essentiell.

1.2.4 Interaktion von Stat5 mit anderen Transkriptionsfaktoren

Werden Zellen mit mehreren Zytokinen stimuliert, können verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden. Die in den Zellkern vermittelten Informationen, die synergistische und antagonistische Effekte hervorrufen können, müssen auf transkriptioneller Ebene integriert werden, um eine sinnvolle physiologische Wirkung zu erzielen. Viele Proteine sind in großen Komplexen mit anderen Proteinen organisiert. Für die Zelle ist es dabei wichtig, daß jeder Proteinkomplex effizient gebildet wird, und daß die Formation von Partialkomplexen, die mit den Gesamtkomplexen interferieren können, auf ein Minimum reduziert wird. Die beschriebenen Koaktivatoren und Korepressoren von Stat5 beeinflussen auch andere Signaltransduktionswege in ihrer Transkriptionsregulation. Durch ihre positive oder negative regulatorische Funktion werden verschiedene Wege der Signaltransduktion, die unterschiedliche biologische Effekte hervorrufen, vernetzt. Die transkriptionellen Kofaktoren wirken so als integrative Elemente zwischen den verschiedenen Stimulationen, die eine Zelle von Außen erhält .

Nachdem Stat-Dimere an spezifische DNA-Sequenzen gebunden haben, können sie die Transkription von Zielgenen aktivieren. Dabei spielen verschiedene *cis*-regulatorische Elemente eine wichtige Rolle. In der Promotorregion des Stat5-Zielgens β -Casein sind Bindungsstellen für viele Transkriptionsfaktoren zu finden. Viele transkriptionelle

Aktivatoren wie die Mitglieder der C/EBP-Familie (CCAAT enhancer binding protein), TBP (TAATA box binding protein) oder die OCT-Transkriptionsfaktoren können im β -Casein Promotor binden (struktureller Aufbau des β -Casein Promoters siehe Abbildung 4) (Doppler et al., 1995), (Raught et al., 1995).

So interagiert Stat1 mit Sp1 am ICAM-Promotor (Look et al., 1995), und Stat3 β assoziiert mit c-Jun (Schaefer et al., 1995). Es konnte auch gezeigt werden, daß ERK1 und ERK2 Stat5 in der Transaktivierungsdomäne nach Stimulation mit dem Wachstumshormon (GH) binden können (Dinerstein-Cali et al., 2000), (Pircher et al., 1999). Der Glukokortikoidrezeptor interagiert mit Stat3 (am α -Macroglobulin Promotor), Stat5a, Stat5b (am β -Casein Promotor) und Stat6 (Stoecklin et al., 1997), (Zhang et al., 1997), (Cella et al., 1998).

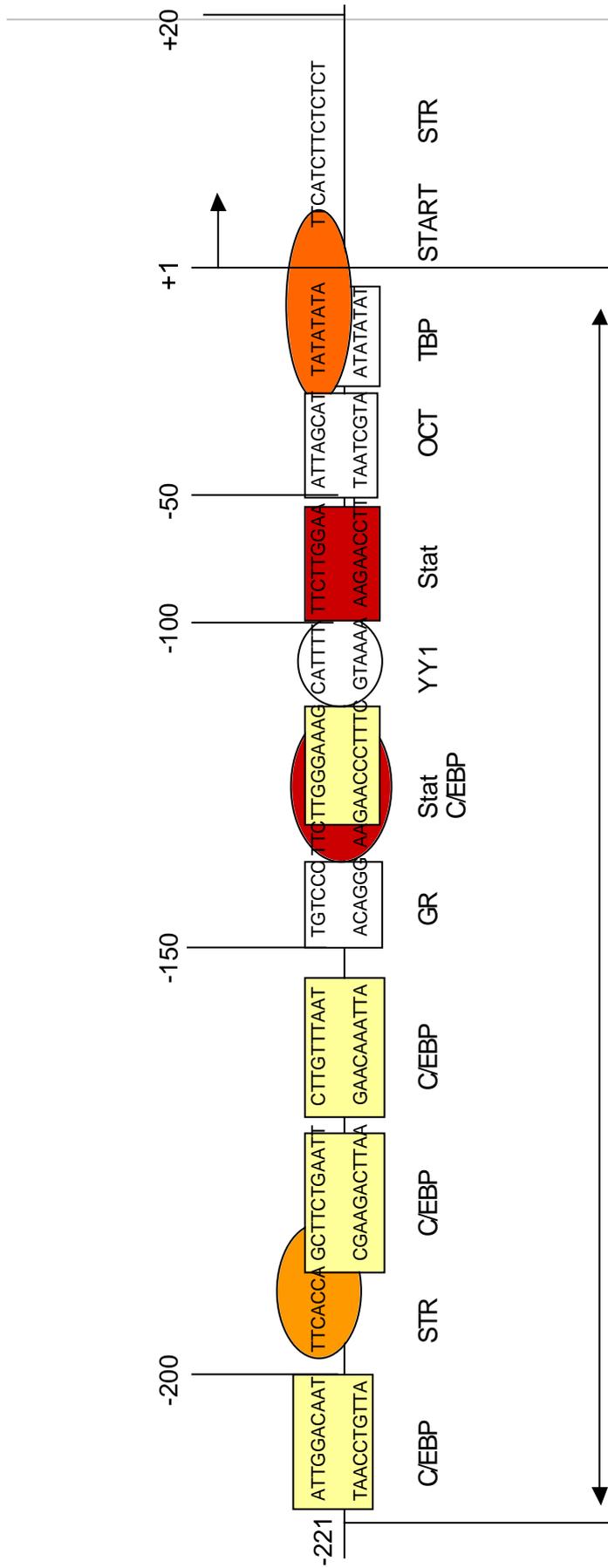
Die Koaktivatoren der Transkription mit potenter HAT (histone acetyltransferase)-Aktivität, die der Transkriptionsaktivierung dient, und die mit Stat-Proteinen interagieren, sind p300 und CBP (CREB binding protein). Mit pCAF (p300/CBP-associated factor) zusammen bilden sie einen Teil eines großen Multipolypeptidkomplexes. CBP und p300 können an die Karboxyltermini von Stat3, Stat5a, Stat5b und Stat6 binden (Pfitzner et al., 1998), (Zhang et al., 1996), (Zhu et al., 1999), (Gingras et al., 1999), (McDonald and Reich, 1999). Zusätzlich ist die N-terminale Domäne von Stat1 in die Interaktion mit dem Koaktivator CBP/p300 involviert (Zhang et al., 1996). p300 und CBP sind ubiquitäre Regulatoren der Transkription in höheren Eukaryonten. Diese Koaktivatoren interagieren mit Transkriptionsfaktoren, die DNA sequenzspezifisch binden, und assistieren bei der Transkriptionsaktivierung von spezifischen Zielgenen.

Die Bindung der N-terminalen Domäne von Stat5b und Stat1 mit dem Nmi-Protein (n-Myc interacting protein) verstärkt die Verbindung mit dem Koaktivator CBP/p300, und somit die Transkription spezifischer Zielgene (Zhu et al., 1999).

Prolaktin, Insulin und Glukokortikoide kooperieren in der Regulation der Transkription von Milchproteingenen. Zwei der Transkriptionsfaktoren, der Glukokortikoid Rezeptor und Stat5, die bei der Kontrolle des β -Casein Promoters partizipieren, sind gut charakterisiert. Diese beiden Faktoren präsentieren die Endpunkte der Signaltransduktionsweges in

Brustepithelzellen. Der Glukokortikoid Rezeptor transduziert dabei das Glukokortikoid Hormonsignal in den Nukleus und nimmt direkt an der Genregulation teil. In dem Glukokortikoid Signalweg interagiert das Steroidhormon mit dem Rezeptor im Zytoplasma. Allosterische Veränderungen erlauben dann dem Hormonrezeptorkomplex an spezifische DNA-Sequenzen zu binden (GRE, glucocorticoid response element), und die Transkription der Zielgene zu verändern. Der Glukokortikoid Rezeptor kann hierbei als Koaktivator der Transkription für Stat5 wirken, und die Transkription von Stat5-Zielgenen verstärken. Stat5 bildet hierbei einen Komplex mit dem Glukokortikoid Rezeptor, und bindet unabhängig von dem GRE die DNA (Stoecklin et al., 1997), (Doppler et al., 2001).

Für Stat5 konnte die spezifische Interaktion mit dem Korepressor der Transkription N-CoR (nuclear receptor co-repressor) und SMRT (silencing mediator for retinoic and thyroid hormone receptors) (Maurer et al. 2001) gezeigt werden (persönliche Mitteilung Alexander Maurer und Thorsten Heinzel). N-CoR ist in einem großen Repressorkomplex unter anderem mit SMRT organisiert (Li et al., 2000). Das Rekrutieren von SMRT und N-CoR an einen Promotor resultiert daher in einer starken Repression der basalen Promotoraktivität. N-CoR besitzt viele Repressionsdomänen, durch welche die Histone Deacetylasekomplexe (HDAC) 1, 2 und 3 rekrutiert werden können (Cohen et al., 2000). Durch ihre Möglichkeit mit einer Vielfalt von Transkriptionsfaktoren interagieren zu können, und somit transkriptionelle Repression von Zielgenen zu bewirken, spielen die Korepressoren N-CoR und SMRT eine fundamentale Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und Tumorentstehung (Aranda and Pascual, 2001), (Kramer et al., 2001).



Minimalpromotor induzierbar mit den Milchhormonen Prolaktin, Dexamethason und Insulin

Abbildung 4: Schematischer Aufbau des β -Casein Promotors. Der β -Casein Minimalpromotor und wichtige Sequenzelemente. Die gezeigte Region umfaßt die Nukleotide -221 bis +1 relativ zum Transkriptionsstart (+1), und ist durch die Milchhormone Prolaktin, Insulin und Dexamethason reguliert. Box A und B enthalten Bindungsstellen (invertierte Wiederholungen) für Stat5a und Stat5b. Zwischen Box A und Box B liegt eine YY1-Bindungsstelle, die in diesem Zusammenhang als transkriptioneller Repressor funktioniert. Box C wird von einigen nicht weiter charakterisierten Komplexen gebunden, die essentiell für die Transkription sind und beinhaltet eine Octamer Bindungsstelle in reverse Orientierung. Vier C/EBP (CCAAT box enhancer binding protein) Bindungsstellen wurden identifiziert, die abhängig von den bindenden C/EBP Mitgliedern, als Aktivator- oder Repressorstellen wirken können. Es gibt auch zwei Bindungsstellen für einen Transkriptions- (zwischen -200 und -150) und posttranslationalen Repressorkomplex (zwischen +1 und +20), der STR (single strand RNA binding protein) genannt wird. Der Glukokortikoid Rezeptor (GR) wurde von Stöcklin et al. als Kofaktor für Stat5a beschrieben, und eine halbe GR-Bindungsstelle innerhalb des β -Casein Promotors wurde in Footprint Analysen verifiziert.

1.3 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen sind wichtige Regulationsmechanismen, die Signaltransduktion, Wachstum und Transformation von Zellen kontrollieren. Sie können die Proteinfunktionalität verändern, Proteine zu ihrem Zielort dirigieren, deren Degradierung beeinflussen und die dynamische Interaktion mit anderen Proteinen regulieren. Die meisten Signalkaskaden involvieren Phosphorylierungsereignisse (Krishna and Wold, 1993), (Parekh and Rohlf, 1997).

Proteine mit gebundenen Kohlehydraten, Glykoproteine genannt, sind ubiquitär, und in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Diese Proteine, die mit Monosacchariden, Oligosacchariden oder Polysacchariden von unterschiedlichster Struktur kovalent verknüpft sind, sind die häufigsten Produkte der ko- oder posttranslationalen Modifikation von Proteinen in allen lebenden Organismen. Eine charakteristische Eigenschaft der Glykoproteine ist die Heterogenität der Glykane, die im Kontrast zu der Uniformität der Polypeptidkette steht, an die sie gebunden sind. Glykoproteine werden in Säugetieren, wie auch in Pflanzen, Pilzen und Archaeobakterien gefunden (Rademacher et al., 1988) (Odenthal-Schnittler et al., 1993) (Helenius and Aebi, 2001). Die Zahl der Glykoproteine beinhaltet zahlreiche biologisch aktive Moleküle, wie Enzyme, Antikörper, Hormone, Zytokine, Rezeptoren und auch zytoplasmatische und nukleäre Proteine.

Der Kohlenhydratanteil der Glykoproteine kann weniger als 1% wie in einigen Kollagenen oder über 99% betragen, wie am Beispiel des Glykogen. Die Glykosproteine unterscheiden sich auch in ihrer Kohlenhydratzusammensetzung, die gelegentlich aus Monosacchariden, Disacchariden oder häufiger Polysacchariden besteht und sind linear oder verzweigt. In einem Glykoprotein sind die Kohlehydrateinheiten in der Polypeptidkette an bestimmten Stellen kovalent verknüpft. Die Struktur der Glykane wechselt während des Wachstums, der Differenzierung, der Entwicklung und Pathogenese, einschließlich der malignen Transformation (Malette and Bleau, 1993) (Dennis et al., 1999) (Boehmelt et al., 2000) (Burchell et al., 2001) (Schachter, 2001). Dies zeigt die wichtige Rolle der Kohlenhydrate in

der Funktion eines Organismus auf.

Die Monosaccharide sind am häufigsten in den Glykoproteinen präsentiert und können in zwei Gruppen eingeteilt werden: häufig vertretene (Galaktose, Mannose und N-Acetylglukosamin) und seltene Monosaccharide.

1.3.1 Kohlenhydrat-Peptid Verknüpfungsgruppen

Die Verknüpfung der Kohlenhydrate an Proteine findet in drei verschiedenen Verknüpfungsarten statt:

- 1) N-glykosidisch, zwischen dem reduzierten Zucker und der Aminogruppe eines Asparaginrestes (N-Glykan).
- 2) O-glykosidisch, zwischen dem Zucker und der Hydroxylgruppe meist von Serin- und Threoninresten (O-Glykan).
- 3) über Ethanolaminphosphat, zwischen dem C-Terminus des Proteins und einem Oligosaccharid, das mit einem Phosphatidylinositol verknüpft ist (GPI-Anker).

1.3.1.1 Die N-Verknüpfung

Die häufigste N-Verknüpfung ist die von N-Acetylglukosamin und Asparagin (GlcNAc-Asn). Die N-verknüpfte Proteinglykosylierung in Eukaryonten kann in zwei verschiedene Prozesse unterteilt werden: (1) Die Zusammensetzung des Lipid-verknüpften Oligosaccharids an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), und den spezifischen Transfer dieses Oligosaccharids von dem Lipid-Anker Dolicholpyrophosphat auf ein Asparagin einer wachsenden Polypeptidkette. Das Asparagin ist hierbei Teil der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (wobei X für jede Aminosäure außer Prolin stehen kann). (2) Die weitere Glykosylierung und Prozessierung der N-Glykane findet posttranslational im ER und im Golgi-Apparat statt, und man unterscheidet zwischen

Mannose-reichen, komplexen und Hybridstrukturen (Rademacher et al., 1988), (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

1.3.1.2 Die O-Verknüpfung

In Glykoproteinen wurde eine große Vielfalt an O-glykosidischen Verknüpfungen zwischen Kohlenhydraten und Polypeptiden gefunden. Die häufigste Verknüpfungsgruppe, die in zahlreichen tierischen Glykoproteinen gefunden wurde, ist die GalNAc-Ser/Thr Verknüpfung (Dennis et al., 1999).

Diese O-glykosidische Verknüpfung findet im Golgi-Apparat statt. Einige Hundert verschiedene O-Glykanstrukturen wurden bis heute beschrieben, wobei nur wenig über ihre Funktion bekannt ist. Die Genexpression der O-verknüpften Glykoproteine ist zellspezifisch und häufig in der malignen Transformation verändert (Burchell et al., 2001). Zudem beeinflusst das Proteinrückgrat die Glykosylierung, und eine strukturelle Veränderung der Proteine in der Krebsentstehung kann in einer Veränderung des Glykosylierungsmusters resultieren (Couldrey and Green, 2000).

1.3.2 Die dynamische O-glykosidische Verknüpfung (O-GlcNAc) von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen

Lange Zeit wurde angenommen, daß die Proteinglykosylierung nur auf komplexe Glykane an Proteinen oder Lipiden, die an der Zelloberfläche oder in den lumenalen Zellkompartimenten der Zellorganellen wie des Golgi-Apparats oder des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, begrenzt ist. Seit Ende der 80er Jahre wurde ein neuer Typ der O-Glykosylierung beschrieben, der beinahe exklusiv im Zytoplasma und im Kern vertreten ist (Ausnahme: α -verknüpfte O-GlcNAc Saccharide in Schleimpilzen) (Comer and Hart, 2000). Seitdem wurde die O-verknüpfte Glykosylierung

an vielen Proteinen nachgewiesen (Tabelle 2). Sie ist vertreten in allen untersuchten Eukaryonten, einschließlich Protozoen und Pilze, wie auch Viren (Fenouillet et al., 1996) (Whitford and Faulkner, 1992) (Gupta et al., 1999).

Nukleäre Proteine	Kernporenproteine RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktoren (p53, c-myc, Sp1) v-Erb-a Onkoprotein SV40 T Antigen Tyrosinphosphatasen Chromatinprotein Östrogenrezeptor DNA-bindende Proteine in Fungi
Zytoskeletproteine	Zytokeratine 8, 13, 18 Neurofilamente H, M, L Humanes Erythrozytenband 4.1 Synapsin I Synaptische Vesikel Proteine MAP Proteine Tau Talin Vinculin AP3 Aplasia α -Cristalline
Sonstige Proteine	92kDa SER Proteine p43/hnRNP Adenovirus Fiber HCMV UL32 Rotavirus NS26 Baculovirus gp41 Tegument P67 translationsregulierendes Protein Diverse Malaria Proteine Trypanosomenproteine <i>Gardia</i> Proteine <i>Entamoeba histologica</i> Proteine <i>Schistosoma</i> Proteine β -Amyloid Vorläufer

Tabelle 2: Bekannte O-GlcNAc-modifizierte Proteine

Diese Proteine sind dynamisch an den Hydroxylgruppen der Serin- und Threoninreste durch einen einzelnen N-Acetylglucosamin Zuckerrest modifiziert (O-GlcNAc). Das O-GlcNAc wird hierbei in einer β -Verknüpfung mit dem Protein verbunden

(Hart et al., 1989). Die O-GlcNAc Verknüpfung wurde das erste Mal 1984 als Hauptform der intrazellulären Glykosylierung in Maus-Lymphozyten beschrieben (Kearse and Hart, 1991). Die O-GlcNAc Modifikation wurde durch das Verwenden der Milch-Galaktosyltransferase vom Rind in einem Versuchsaufbau identifiziert. Eine radioaktiv markierte Uridine-diphospho-Galaktose (UDP-Gal) wird dabei spezifisch mit endständigen N-Acetylglukosaminresten (GlcNAc) verknüpft (Abbildung 5) (Roquemore et al., 1994).

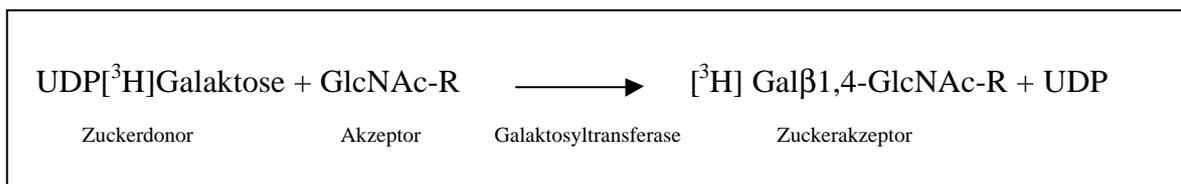


Abbildung 5: Das Prinzip des Galaktosyltransferase-Assays

An terminale GlcNAc-Zuckerreste wird mit Hilfe des Galaktosyltransferase Enzyms eine Galaktose geknüpft. Ist die verwendete Galaktose radioaktiv markiert, können spezifisch Proteine mit terminalen GlcNAc-Zuckerresten nachgewiesen werden.

Mit dieser Methode konnte die O-GlcNAc Modifikation im Zytoplasma und in allen anderen subzellulären Organellen, außer den Mitochondrien, nachgewiesen werden (Du et al., 2000). Die höchste Konzentration (Mol Zucker pro Mol Protein) an O-GlcNAc modifizierten Proteinen wurde an der Kernmembran nachgewiesen. Die größte Anzahl von O-GlcNAc modifizierten Proteinen wurde auch im Nukleoplasma gefunden (Dinter and Berger, 1995).

Eine weitere Nachweismethode von terminalen N-Acetylglukosamin Zuckerresten stellt die spezifische Interaktion von Lektinen mit Zuckern dar. Der Name 'Lektin' stammt aus dem Lateinischen und bedeutet „aussuchen/wählen“, und steht für eine Gruppe von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen. Lektine konnten von Viren, Bakterien, Pflanzen und vielen Geweben von Säugetieren isoliert werden (Goldstein and Hayes, 1978). Die Lektine sind weder Kohlenhydrat-gekoppelte Proteine, noch Antikörper. Jedes Lektin hat eine spezifische Affinität für besondere Kohlenhydrate, und stellt somit ein wichtiges Werkzeug

in der Charakterisierung von Zelloberflächen und Zuckerketten dar. Ihre Struktur ist unterschiedlich und ihr Molekulargewicht kann von 30-60 kDa variieren (Sharon and Lis, 1989). Das Lektin Weizenkeimagglutinin (WGA = wheat germ agglutinin) hat eine hohe Affinität für N-Acetylglukosamine und Sialylsäuren (Allen et al., 1973).

Mit diesen Methoden konnte unter anderem gezeigt werden, daß in humanen Erythrozyten das Zytoskelettprotein Band 4.1, das das Spektrin/Aktin-Zytoskelett mit dem zytoplasmatischen Schwanz des Glykophorins verbindet, mit O-GlcNAc modifiziert ist (Holt et al., 1987). Und auch die Polythänchromosomen von Drosophila-Larven sind in hohem Maße mit O-GlcNAc glykosyliert. Die O-GlcNAc Modifikation der Chromatin-assoziierten Proteine scheint hierbei an transkriptionell aktiven Stellen stark reduziert zu sein (Kelly and Hart, 1989).

Obwohl diese Proteine eine hohe funktionelle Diversität aufweisen, haben sie zwei gemeinsame Eigenschaften: 1) Sie werden phosphoryliert, und 2) sie bilden reversible multimere Komplexe mit anderen Polypeptiden oder Strukturen, wobei die Interaktion oft über die Phosphorylierung reguliert wird (Hart et al., 1996). Die Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung der abwechselnden Phosphorylierung und Glykosylierung von modifizierten Proteinen mit den involvierten Enzymen.

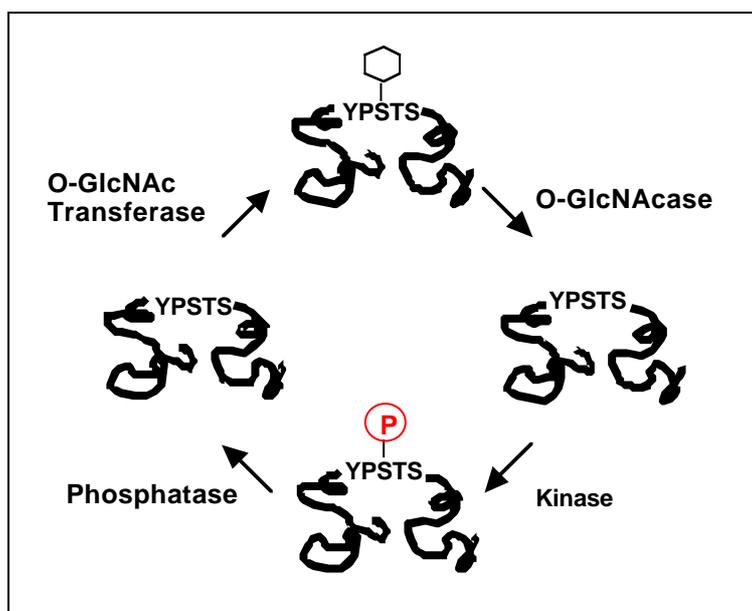


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Zusammenhangs und Aktion von O-GlcNAc Transferase, Kinasen, Phosphatasen und O-GlcNAcase.

1.3.2.1 Enzyme der O-GlcNAc Modifikation: Die O-GlcNAc Transferase und O-GlcNAcase

Es wurden bisher zwei O-GlcNAc modifizierende Enzyme identifiziert: Die O-GlcNAc Transferase, die einzelne GlcNAc-Zuckerreste an Proteine anfügt, und die O-GlcNAcase, die diese entfernt.

Die O-GlcNAc Transferase oder OGT (Uridin Diphospho-N-Acetylglukosamin:Polypeptid β -N-Acetylglukosamintransferase) wurde in Extrakten des Retikulozytenlysates identifiziert, und aus der Rattenleber isoliert (Haltiwanger et al., 1992). OGT wurde aus der Ratte, *Caenorhabditis elegans* und Mensch kloniert und ist nukleär wie zytoplasmatisch lokalisiert (Akimoto et al., 1999). OGT besitzt keine offensichtliche Verwandtschaft zu anderen Transferasen, und ist hochkonserviert von *C.elegans* bis zum Menschen (Lubas and Hanover, 2000). In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, daß ein funktionelles OGT essentiell für die Lebensfähigkeit von embryonalen Stammzellen und für die Mausembryonalentwicklung ist (Shafi et al., 2000). Konsistent mit der essentiellen und funktionellen Rolle von O-GlcNAc im Organismus existieren diverse Mechanismen, die die O-GlcNAc Transferase in ihrer Aktivität kontrollieren. OGT besitzt 11 Tetratricopeptid-Repeats am N-Terminus, die die Trimerisierung der katalytischen Untereinheiten wie auch Interaktionen von anderen Proteinen mit OGT vermitteln. Die Tetratricopeptid Repeat Domäne scheint auch eine wichtige Rolle in der Substratselektivität zu spielen.

Das Enzym, das die Protein-gebundenen O-GlcNAc Zuckerreste entfernt, ist die N-Acetylglukosaminidase (O-GlcNAcase). Sie ist spezifisch für GlcNAc, und kann mit GlcNAc-Analogen gehemmt werden. Sie trennt nur endständige Zucker ab, und kann keine Protein-gebundenen GlcNAc-Reste, die mit einer β ,1-4-Galaktose als „Cap“ verknüpft sind, entfernen. Das kürzlich isolierte Enzym ist sowohl im Zytoplasma wie im Zellkern lokalisiert, und ist ubiquitär in allen Geweben vertreten (Dong and Hart, 1994), (Gao et al., 2001).

1.3.2.2 Beispiele der O-GlcNAc Modifikation und Funktion

Viele nukleäre und zytosolische Proteine sind mit einzelnen O-verknüpften N-Acetylglukosaminen (O-GlcNAc) modifiziert. Diese Modifikation ist essentiell für die Signaltransduktion, die Zytoskelettarchitektur, Transkription und den Kerntransport (Wells et al., 2001), (Holt et al., 1987), (Hart et al., 1996), (Lubas et al., 1995). Die O-GlcNAc Modifikation ist dynamisch und der Glykosylierungsgrad verändert sich als Antwort auf verschiedene Stimuli. Die Funktion und die subzelluläre Verteilung der O-GlcNAc modifizierten Proteine deutet auf eine wichtige Rolle in der Koordination verschiedenster Zellantworten auf einen einzigen Stimulus hin. Dies wird dadurch bestätigt, daß bestimmte Krankheiten, einschließlich der Alzheimer Krankheit, Diabetes und spezieller Krebsarten mit einem ungewöhnlichem O-GlcNAc Glykosylierungsmuster assoziiert sind (Arnold et al., 1996), (Akimoto et al., 2001), (Liu et al., 2000). Die Modifikation kann hierbei die Proteinfunktion beeinflussen: so können diese Monosaccharide die Proteinstabilität beeinflussen. Viele Proteine enthalten eine sogenannte PEST-Domäne, die ihren Abbau mit dem 26S-Proteasoms steuert. Die Glykosylierung dieser PEST-Domäne des Östrogenrezeptors und des Transkriptionsfaktors SRF (serum response factor) stabilisiert diese Proteine, indem die Funktion der PEST-Domäne gehemmt wird (Cheng and Hart, 2001), (Reason et al., 1992). Auch die hypoglykosylierte Isoform des Transkriptionsfaktors Sp1, die durch einen niedrigen Glukosespiegel und die Aktivierung von cAMP (cyclic Adenylate Monophosphate) verursacht wird, ist Ziel des Proteasomenkomplexes (Han and Kudlow, 1997).

Die O-GlcNAc Modifikation kann auch Lektin-ähnliche Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Viele O-GlcNAc Proteine sind in großen Proteinkomplexen mit anderen Glykoproteinen organisiert (z.B. Zytoskelett, RNA Polymerase II Transkriptionskomplex, Kernporenkomplex). Das Anfügen eines N-Acetylglukosamins an Keratine, Talin, Vinculin, Erythrozyten Band 4.1, Synapsin und die Neurofilamente kann deren Eingliederung in das Zytoskelett und die Zusammensetzung der Filamente beeinflussen (Ku and Omary, 1995),

(Hagmann et al., 1992), (Cole and Hart, 1999), (Dong et al., 1993). Und der Transkriptionsfaktor Sp1 wird durch Glykosylierung spezifisch in der Oligomerisierung *in vitro* gehemmen (Roos et al., 1997).

O-GlcNAc kann auch als regulatorischer Schalter zur Aktivierung oder Reprimierung der Proteinfunktion analog zur Phosphorylierung agieren. Die Glykosylierung von Synapsin I, einem synaptischen Vesikelprotein, scheint eine direkte Rolle in der Modulation der Proteinfunktion zu haben (Cole and Hart, 1999). Dagegen beeinflusst die Glykosylierung des Onkoproteins c-myc und p53 die Funktion des Proteins, indem es die Phosphorylierung hemmt. Die Hauptglykosylierungsstelle von c-myc liegt in der Aktivierungsdomäne. Dieser Bereich ist häufig in verschiedenen Lymphomas mutiert, und kann somit phosphoryliert werden (Chou et al., 1995), (Chou et al., 1995).

Die Koordination von Glykosylierung und Phosphorylierung hat großen Einfluß auf die Regulation der Aktivität vieler Proteine. Da die meisten O-GlcNAc modifizierten Proteine phosphoryliert werden, kann die Reziprozität zwischen Glykosylierung und Phosphorylierung als ein üblicher Regulationsmechanismus angesehen werden. In der Abbildung 7 sind die zellulären Prozesse, in denen O-GlcNAc involviert ist, schematisch dargestellt.

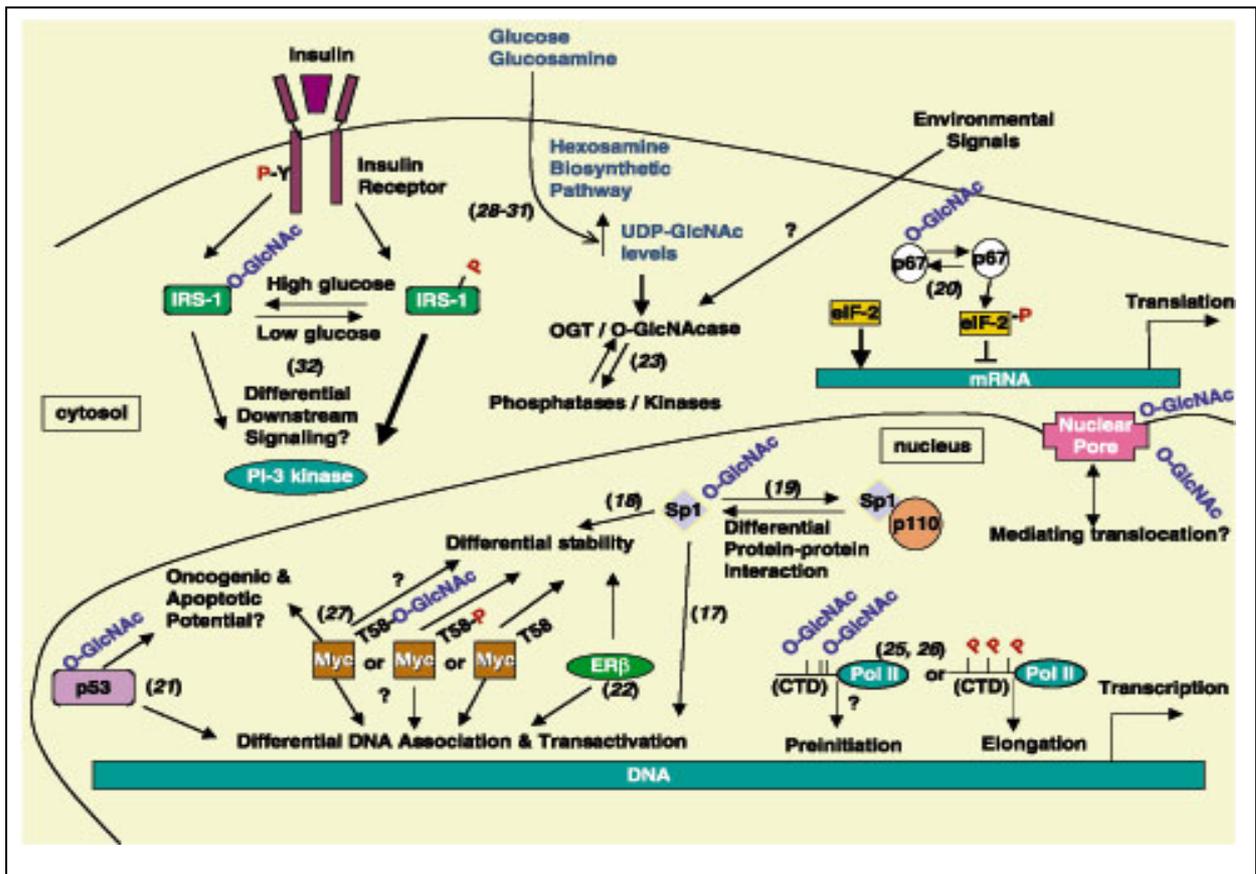


Abbildung 7: Zelluläre Prozesse in denen O-GlcNAc involviert ist. Es sind O-GlcNAc modifizierte Proteine gezeigt, für die eine Funktion der Glykosylierung beschrieben wurde. Proteine, deren Aktivität durch das Wechselspiel von Phosphorylierung und Glykosylierung reguliert werden, sind hier besonders hervorgehoben. Die mit Fragezeichen markierten Wege zeigen nicht publizierte Daten oder Spekulationen der Autoren des Artikels, aus dem diese Abbildung entnommen wurde (Wells et al., 2001).

Stat-Proteine besitzen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion als Antwort auf Zytokinstimulation. Zusätzlich zu ihrer Rolle in der normalen Signaltransduktion wurde gezeigt, daß Onkoproteine spezifisch Stat-Proteine, insbesondere Stat3 und Stat5, aktivieren können, und so tragen die konstitutiv-aktiven Stat Proteine direkt zur Onkogenese bei (Bowman et al., 2000). Als Folge der konstitutiven Aktivierung der Stats wird die Proliferierung der Zellen stimuliert und deren Apoptose verhindert. Da die Stat-

Proteine direkt die Genexpression regulieren, impliziert deren Aktivierung in der Onkogenese eine Veränderung des genetischen Programms. So könnte eine Modifikation der Stats mit einem GlcNAc-Zuckerrest deren Aktivität oder Protein-Protein Interaktionen beeinflussen, und somit die Expression der Zielgene. Vor kurzem konnte für Stat1 eine Arginin-Methylierung nachgewiesen werden, die in der Interferonantwort von Stat1 eine wichtige Rolle spielt (Mowen et al., 2001). Die Glykosylierung spielt für die regulatorischen Ereignisse in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund sollten die Stat-Proteine, hier explizit Stat5a auf eine O-GlcNAc Modifikation untersucht werden, um die Regulation der Stat-Proteine besser zu verstehen.

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Stat5 spielt eine wesentliche Rolle in der Zytokin-induzierten Signalübertragung von der Zellmembran in den Nukleus. Viele intrazelluläre Faktoren stehen mit Stat5 in Wechselwirkung, indem sie es aktivieren, inaktivieren oder auf transkriptioneller Ebene als Kofaktoren oder Repressoren wirken. Posttranslationale Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung und die dynamische O-verknüpfte Glykosylierung können die Proteinaktivität oder Protein-Protein Interaktionen modulieren. Diese sekundären Proteinmodifikationen stellen neben der Phosphorylierung ein zusätzliches regulatives Element dar, das die Funktion von Proteinen beeinflusst. Für die dynamische O-GlcNAc Modifikation wurden Hinweise einer Funktion an verschiedenen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren und Enzymen gezeigt. Diese reicht von der Blockierung der Proteinphosphorylierung bis zur Inhibition der Proteinkomplexbildung.

Ziel im ersten Teil der Arbeit war es, die O-GlcNAc Modifikation von Stat5a zu identifizieren. Es sollte zudem der Stimulus charakterisiert werden, der das Anfügen der O-GlcNAc Modifikation auslöst, und ob die Glykosylierung im Wechselspiel mit der Tyrosinphosphorylierung von Stat5a steht.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Funktion der dynamischen O-GlcNAc Modifikation *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurde phosphoryliertes Stat5a rekombinant im Baculovirus-Insektenexpressionssystem exprimiert, da gezeigt werden konnte, daß Proteine in diesem Expressionssystem posttranslational modifiziert werden. Zudem zeichnet es sich durch hohe Proteinausbeuten aus. Große Proteinmengen werden unter anderem für die Bestimmung der Glykosylierungsstellen von Stat5a benötigt, die im Massenspektrum identifiziert werden sollten. Die identifizierten Glykosylierungsstellen sollten anschließend durch Punktmutagenese mutiert werden, und die mutierten Stat5a-Konstrukte in den funktionellen Experimenten mit dem Wildtyp Stat5a verglichen werden.

Die Stat-Proteine haben eine doppelte Rolle als Signalmoleküle einerseits und Transkriptionsfaktoren andererseits. Im Kern binden die Stat-Proteine an Promotorelemente verschiedener Zielgene und aktivieren deren Transkription, indem sie Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat aufnehmen. Eine Modulation der Interaktion könnte die Transkription von Stat5a-Zielgenen und deren Expression beeinflussen. So sollte in Ko-Immunoprecipitationen der Einfluß der Stat5a Glykosylierung auf die Wechselwirkung mit bekannten Interaktionspartnern wie den Glukokortikoid Rezeptor, den Korepressor der Transkription N-CoR und den Koaktivator der Transkription CBP gezeigt werden. Desweiteren sollte die DNA-Bindung von O-GlcNAc modifiziertem Stat5a an den β -Casein Oligomer, und das Transaktivierungspotential der Stat5a-Glykosylierungsmutanten in Luciferase-Experimenten analysiert werden.

Zur Kerntranslokation benötigen Proteine ein Kerntranslokationssignal (NLS, nuclear localization signal). Für Stat-Proteine wurde eine solche Sequenz bisher nur für Stat1 dokumentiert, nicht aber für die anderen Stat-Familienmitglieder. Es wurde gezeigt, daß die dynamische O-Glykosylierung den Kerntransport beeinflussen kann. Hierfür sollte der Glykosylierungsstatus von Stat5a mit dem Inhibitor der O-GlcNAcase, PUGNAc, oder durch Inkubation mit den N-Acetylglukosamin-Vorstufen, Glukose/Glukosamin, erhöht werden. Das Stat5a-Kerntranslokationsverhalten sollte anschließend in Abhängigkeit der Zytokinstimulation untersucht werden.

Die Stat-Proteine weisen eine hohe Homologie zueinander auf, die auf ihre stammesgeschichtliche Entstehung zurückzuführen ist. Dieser hohe Homologitätsgrad läßt vermuten, daß auch andere Stat-Proteine neben Stat5a glykosyliert sind. Deshalb sollte die Glykosylierung anderer Stat-Familienmitglieder in Abhängigkeit der Zytokinstimulation untersucht werden. In vielen Krebs und Leukämiearten liegt Stat5 konstitutiv aktiv vor, weshalb die Glykosylierung von Stat5a in diesem Zusammenhang am Beispiel von der Brustkrebszelllinie SKBR3 und der Erythroleukämiezelllinie K562 analysiert werden sollte.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Gentechnische Methoden

2.1.1.1 Herstellung chemokompetenter *E.coli* Zellen

500 ml Bakterienkultur wurden in LB-Medium bis zu einer OD₅₉₅ von 0.48-0.5 angezogen und anschließend bei 4°C für 10 Minuten bei 2200 rpm in einem JA-10 Rotor abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 170 ml eiskalter Lösung 1 (150 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM CoAc, 10 mM CaCl₂, 13% Glycerin, pH 5.8, sterilfiltriert) resuspendiert und 50 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Suspension wie oben beschrieben zentrifugiert und das Zellpellet in 12.5 ml eiskalter Lösung 2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 13% Glycerin, pH 7.0, sterilfiltriert) resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots zu 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

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

Chemokompetente *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 1 µl Plasmid-DNA, bzw. des Ligationsansatzes/PCR-Mutageneseansatzes vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 60 Sekunden bei 42°C mit anschließender 2 minütiger Inkubation auf Eis. Den Transformationsansätzen wurden 200µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.1.1.3 Elektroporation von Plasmid-DNA in *E.coli*

1µl Plamid-DNA oder die Hälfte des Ligationsansatzes wurden in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und 100µl elektrokompetenter *E.coli* Bakterien hinzupipettiert. Der Ansatz wurde unverzüglich einem elektrischen Puls mit den folgenden Parametern ausgesetzt: 2500 Volt, 250 µF und 100 Ohm. Nach dem Puls wurde zu dem Elektroporationsansatz 500µl 37°C warmes LB-Medium hinzugegeben, und der Ansatz bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die transformierten Bakterien auf LB-Platten mit der dem Plasmid entsprechenden Antibiotika-Resistenz ausplattiert und in einem 37°C-Schrank bebrütet.

2.1.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* nach Qiagen

250-300ml über Nacht-Kultur wurden 10 Minuten bei 3500rpm bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml Puffer P1 resuspendiert, und anschließend nach Zugabe von 10ml Puffer P2 für 5 Minuten bei RT lysiert. Durch Zugabe von 10ml Puffer P3 wurde das Zellysat neutralisiert, und dann für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelldebris wurden durch eine Zentrifugation bei 20.000xg bei 4°C für 30 Minuten entfernt. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Die Lösung durchläuft die Säule mittels der Gravitationskraft. Die Säule wurde mit 2x 30ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0.7 Volumen 100% Isopropanol (RT) präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 9.000 rpm bei 4°C pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 70% Ethanol p.A. (RT) gewaschen. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 200-500µl destilliertem H₂O resuspendiert.

2.1.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA-Lösungen wurde diese photometrisch bei 260nm und 280nm vermessen. OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei 50µg/ml Doppelstrang-DNA, 40µg/ml Einzelstrang-DNA oder 20µg/ml Oligonukleotid. Der

Quotient aus OD_{260} und OD_{280} gibt Aufschluß über Verunreinigungen wie Proteinen oder Phenol, die bei 280nm stärker absorbieren. Bei einer reinen DNA-Lösung ist der Quotient größer als 1,8.

2.1.1.6 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Bei einer Restriktionsspaltung, auch Restriktionsverdau genannt, wird die DNA durch Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen geschnitten. Die gespaltene DNA zeigt im Agarosegel ein reproduzierbares Restriktionsmuster. In Folge des Spaltungsvorgangs der DNA entstehen stumpfe oder überhängende DNA-Enden.

Der Restriktionsverdau wird nach den von dem Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Pro Verdau wurden 1-5 U der erforderlichen Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 bis 2 Stunden, und die Inkubationstemperatur richtete sich nach dem Temperaturoptimum der Restriktionsendonuklease.

2.1.1.7 Agarosegelelektrophorese

Beim Agarosegel handelt es sich um ein kontinuierliches Trennverfahren, mit dem DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Agarose bildet beim Erhitzen spezifische Polymerstrukturen aus, ein molekulares Sieb. DNA-Restriktionsfragmente und PCR-Produkte, wie Plasmide wurden elektrophoretisch je nach DNA-Größe in 0.75-2%igen TAE-gepufferten Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 Volt/cm Gellänge in TAE-Puffer. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 1/10 Volumen Bromphenolblau (BPB) vermischt. Das BPB enthält Succrose und erhöht die spezifische Dichte der Probe, so daß die eingefüllte DNA-Probe in der Geltasche verbleibt. Das BPB diente zur Orientierung der Wanderung der DNA im Gel während der Gelelektrophorese. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid

versetzt und zur Visualisierung der DNA auf einem UV-Tisch (366 nm) bestrahlt.

Gewünschte DNA-Fragmente wurden mit dem Qiagen Gel Extraction Kit eluiert. Die Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und entsprechend den Angaben des Herstellers behandelt.

2.1.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurde Vektor-DNA und DNA-Insert in einem molaren Verhältnis von ca. 1:10 eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht in einem möglichst kleinem Volumen mit dem vom Hersteller gelieferten T4-DNA-Ligasepuffer und 1 Weiss-Einheit an T4-DNA-Ligase (New England Biolabs). Die Ligationsansätze wurden anschließend zur Transformation in chemokompetente *E.coli* verwendet.

2.1.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die DNA-Fragmente wurden in einem Perkin-Elmer 9600 Thermocycler amplifiziert. Das Reaktionsvolumen betrug 50µl bestehend aus der DNA-Matrize, DNA-Polymerasepuffer, je 125 ng der entsprechenden Oligonukleotidprimer (sense und antisense), 200 µM eines Desoxyribonukleotid-Mix und 2.5 U DNA-Polymerase. Die Denaturierung der DNA-Matrize erfolgte für 1 Minute bei 94°C. Die „Annealing“-Temperatur der Primer wurde jeweils 3°C niedriger als deren berechnete Schmelztemperatur gewählt, und für 1 Minute durchgeführt. Für die Zeit der Polymerasereaktion wurden 2 Minuten per Kilobasenpaar berechnet. Denaturiert wurde das DNA-Templat bei 95°C für 1 Minute. Die aufgeführten Schritte wurden jeweils für 25 Zyklen durchgeführt.

2.1.1.10 Einführung von Punktmutationen mittels PCR-Mutagenese

Der *in vitro*-Mutagenese liegt das Prinzip der PCR zugrunde. Die Mutation (hier: Austausch einer Aminosäure) wurde mit Hilfe von Primern eingeführt. Die Länge der Primer betrug 28-35bp und der 5'-Primer, wie der 3'-Primer enthielten in ihrer Mitte die

gewünschte Mutation. Die optimale Schmelztemperatur der Primer lag bei 80°C, und sollte diese nicht übersteigen. Die Schmelztemperatur der Primer wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (C + G) \times 4^\circ\text{C}$$

Die PCR wurde nach den folgenden Bedingungen durchgeführt:

30 Sekunden 94°C

1 Minute 55°C („Annealing“ der Primer)

16 Minuten 68°C (DNA-Strangsynthese)

Die Zeit für die Strangsynthese richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Plasmids und betrug 1,5 Minuten pro kb DNA. Die PCR wurde für 16 Zyklen durchgeführt, und anschließend mit der Restriktionsendonuklease Dpn I geschnitten. Diese Restriktionsendonuklease erkennt nur methylierte DNA. Da nur die parentalen DNA-Stränge methyliert sind, wird somit nur die nicht-mutierte Matrize geschnitten. Daraufhin wurden die Plasmide in XL-1 blue superkompetente Zellen transformiert. Und auf LB-Platten mit der entsprechenden Antibiotika-Resistenz ausplattiert, und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die so erhaltenen Kolonien wurden mittels Sequenzierung auf die eingefügte Mutation geprüft.

2.1.1.11 „Overlap extension“ PCR

Die „Overlap extension“ PCR beruht auf dem Prinzip des „Zusammennähens“ zweier amplifizierter DNA-Fragmente, die eine mittels spezifischer Primer eingefügte Mutation tragen. Die Mutation befindet sich hierbei an den überhängenden Enden der DNA-Fragmente, die in einer dritten PCR-Reaktion miteinander verbundene werden. Das erhaltene Fragment kann dann mittels eingefügter Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3'-Ende des DNA-Fragments in einen beliebigen Expressionsvektor kloniert werden.

2.1.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung wurde von der Servicabteilung des Georg-Speyer-Hauses (Margot Landersz) durchgeführt. Es wurde die Dideoxy-Methode nach Sanger angewendet. Je Kilobase Vektor wurde 0.5 µg DNA benötigt. Die Sequenzierung wurde mit 20pmol/µl T7-Primern oder eigenen Primern durchgeführt.

2.1.2 Methoden der Zellbiologie

2.1.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C in einem Inkubator mit 5% CO₂ kultiviert.

Adhärente Zelllinien wurden zum Vereinzeln mit PBS gewaschen, und anschließend mit Trypsin (2ml pro 10cm Zellkulturschale) bei 37°C auf einem Wärmeblock von der Zellkulturschale abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen und auf vorbereitete Zellkulturschalen verteilt.

Suspensionszellen wurden mit PBS gewaschen indem die Zellen pelletiert wurden. Durch das Waschen wurden die toten Zellen von den lebenden Zellen durch Absaugen des Überstands entfernt. Die Zellen wurden dann gezählt, und eine angemessene Zellzahl pro Zellkulturflasche ausgesät.

Zelllinie	Kulturmedium
Cos7	DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
HC11	RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 10µg/ml EGF (Maus), 5µg/ml Insulin
K562	RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
HeLa	DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
Sf9	TC-100 mit 2mM L-Glutamin (Serum-frei)
SKBR3	DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

2.1.2.2 Induktion von Stat-Proteinen

Stat1:

HC11 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro 10cm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wuchsen nach ca. 3-4 Tagen zu einem dichten „Zellrasen“, und wurden über Nacht in RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin kultiviert („Hungern“ der Zellen). Anschließend wurden die HC11 Zellen mit 50ng/ml Medium rekombinantem Interferon-γ für 30 Minuten induziert. Von den Zellen wurden daraufhin Zellextrakte angefertigt und diese analysiert.

Stat3:

HC11 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro 10cm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wuchsen nach ca. 3-4 Tagen zu einem dichten „Zellrasen“, und wurden 3 Stunden in RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin kultiviert („Hungern“ der Zellen). Anschließend wurden die Zellen mit 10µg/ml EGF (Maus) für 30 Minuten induziert. Von den Zellen wurden daraufhin Zellextrakte angefertigt und diese analysiert.

Stat5a und Stat5b:

HC11 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro 10cm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wuchsen nach ca. 3-4 Tagen zu einem dichten „Zellrasen“, und wurden für 2 Tage in RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin kultiviert („Hungern“ der Zellen). Anschließend wurden die Zellen mit 10⁻⁶M Dexamethason, 5µg/ml Insulin (Rind) und 5µg/ml Prolaktin (Schaf) für 30 Minuten induziert. Von den Zellen wurden daraufhin Zellextrakte angefertigt und diese analysiert.

Stat6:

HC11 Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro 10cm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wuchsen nach ca. 3-4 Tagen zu einem dichten „Zellrasen“, und wurden für 3 Stunden in RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin kultiviert („Hungern“ der Zellen). Anschließend wurden die HC11 Zellen mit 10 U/ml Interleukin-4 (Maus) für 35 Minuten induziert. Von den Zellen wurden daraufhin Zellextrakte angefertigt und diese analysiert.

2.1.2.3 Trypanblau-Färbung von eukaryontischen Zellen

Um tote Zellen zu detektieren, wurde Trypanblau verwendet. Dieser Farbstoff färbt nur tote Zellen an, da ihre Zellmembran zerstört ist. Die Trypanblau-Lösung wurde 1:1 mit Suspensionszellen oder frisch trypsinisierten, adhären Zellen vermischt, und anschließend der Prozentsatz toter Zellen ermittelt.

2.1.2.4 Das Baculovirus-Expressionssystem

2.1.2.4.1 Kultivierung von Insektenzellen

Sf9 Insektenzellen wurden adhären in Zellkulturflaschen oder als Suspensionskultur in Spinnerflaschen bei 27°C mit Excell 400 Medium serumfrei , bzw. mit TC100 Medium und 10% hitzeinaktiviertem FCS gehalten. Alle 2 Tage wurde die adhären Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und 1:4 verdünnt. Suspensionskulturen wurden jeden 3. Tag 1:4 verdünnt und mit frischem Medium versorgt. Die langzeitige Aufbewahrung der Sf9 Zellen erfolgte in Excell 400 Medium, bzw. TC100 Medium mit 1% hitzeinaktiviertem FCS und 20% DMSO in flüssigem Stickstoff.

2.1.2.4.2 Plaque-Assay zur Virusaufreinigung und Titerbestimmung

Wildtyp-Baculoviren mit intaktem LacZ-Gen können mit einer X-Gal Färbung detektiert werden. Dazu wurden in 3.5 cm Kuturschalen ca. 30% konfluente Sf9 Zellen mit je 100 µl einer Virusverdünnungsreihe inokuliert. Nach 2h Inkubation bei 27°C wurden die Zellen mit 3ml einer im Verhältnis 1:1 gemischten Suspension bestehend aus Excell 400 Medium, bzw. TC100 Medium und 2%iger niedrig schmelzender Agarose überschichtet. Nach 5-6 Tagen wurden je 1ml mit 25 µl 2%igem X-Gal in Dimethylformamid versetztem ExCell 400 Medium oder TC100 Medium und 3h später je 1 ml 0.03% Neutralrot in PBS dazugegeben und 1h lichtgeschützt inkubiert. Mit Wildtyp-Baculoviren infizierte Zellen erschienen blau, Plaques rekombinanter Baculoviren waren als farblose Flecken vor dem Hintergrund hellrot gefärbter Zellen zu erkennen. Zur Virustiterbestimmung wurden die Plaques ausgezählt, und zur Reinigung rekombinanter Baculoviren wurden die Viren aus den weißen Plaques isoliert. Mit diesen isolierten Viren wurde der Plaques-Assay wiederholt, bis keine Wildtyp-Kontamination mehr zu erkennen war.

2.1.2.4.3 Infektion zur Virusvermehrung

Zu 60% konfluenten Sf9 Zellen in Kuturschalen oder in Suspensionskultur bei einer Zelldichte von 1.5×10^6 Zellen/ml wurden mit einer moi (multiplicity of infection) von 0.5 pfu/ml (plaques forming units/ml) mit den jeweiligen Baculoviren infiziert. Nach 6 Tagen wurde das Kulturmedium mit den vermehrten Viren abgenommen, und der Virustiter mittels Plaques-Assay bestimmt.

2.1.2.4.4 Infektion zur Gewinnung rekombinanten Proteins

Zu ca. 60% konfluenten Sf9 Zellen in Kulturschalen oder 3×10^6 Zellen/ml in Suspensionskultur wurden die rekombinanten Baculoviren mit einer moi von 5 pfu/ml infiziert. 48-72 h nach der Infektion wurden die Zellen abgeschabt oder abzentrifugiert (10 Minuten bei 2000rpm, 4°C) und Zellextrakte hergestellt.

2.1.2.4.5 Zellextrakte aus Insektenzellen

Die geernteten Zellen wurden 2x mit PBS bei 2000 rpm, 4°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in NP-40 Lysispuffer (400 mM KCl, 10 mM Phosphatpuffer pH 7.4, 10% Glycerin, 1% NP-40) mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt lysiert und die Zelldebris 10 Minuten bei 9000 rpm, 4°C abgetrennt. Der Überstand enthielt das rekombinant exprimierte Protein, und wurde sofort aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.1.2.5 Reinigung von Proteinen

2.1.2.5.1 Kopplung eines polyklonalen Antikörpers an SepharoseA (Immunoaffinitätssäule)

In dieser Methode werden Antikörper kovalent an Sepharose A-Kügelchen („beads“) gekoppelt. Die Antikörpermoleküle werden mittels der F_C-Domäne mit der Matrix gekoppelt. Die Bindungsstelle des Antikörpers ist hierbei korrekt für eine maximale Interaktion mit dem Antigen angeordnet.

Zur Kopplung wurden 100µg des Hase anti-Maus Stat5a Antikörpers (Zymed) auf 0.5 ml SepharoseA-Sepharose verwendet. Hierbei konnte die direkte Kopplungsmethode angewendet werden: Der Antikörper wurde für 1 Stunde bei RT mit der vorgequollenen SepharoseA (Amersham/Pharmacia) auf dem Drehrad inkubiert. Die Sepharose A wurde 2x mit 10-fachen Volumen 0.2M Natriumborat pH 9.0 gewaschen. Die Sepharose wurde anschließend in einem 10-fachen Volumen 0.2M Natriumborat pH 9.0 resuspendiert und ein Äquivalent von 10µl Sepharosekügelchen entnommen. Daraufhin wurde festes Dimethylpimelimidat in einer Endkonzentration von 20mM hinzugefügt, und 30 Minuten bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Es wurde nach der Kopplungsreaktion wieder ein Äquivalent von 10µl Sepharosekügelchen entnommen. Die Kopplungsreaktion wurde durch Waschen der Sepharose in 0.2M Ethanolamin pH 8.0, und anschließender Inkubation der Sepharose in 0.2M Ethanolamin pH 8.0 für 2

Stunden auf dem Drehrad bei RT gestoppt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose in PBS mit 0.01% Natrium-Azid resuspendiert. Die Effizienz der Kopplung des Antikörpers an die SepharoseA- Kügelchen wurde durch Aufkochen der entnommenen Sepharose vor und nach der Kopplungsreaktion in Laemmli-Proteinladepuffer überprüft. Ein Äquivalent von 1µl und 9µl Sepharose wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Blue angefärbt. Eine gute Kopplung des Antikörpers mit der Sepharose A zeichnet sich dadurch aus, daß die schwere Kette des Antikörpers vor, aber nicht nach der Kopplungsreaktion sichtbar wird.

2.1.2.5.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels einer Antikörper-Affinitätssäule

Der Sf9-Zellextrakt wird für 1 bis 2 Stunden mit der Antikörper-Affinitätssäule bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Sepharose der Affinitätssäule wurde kurz bei 2000rpm bei 4°C für 1 Minute abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Säule mit NP-40 Lysispuffer, 10mM LiCl/100mM Tris pH7.5 und 100mM Tris pH 7.5 gewaschen. Alle Waschpuffer wurden mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt. Die an die Affinitätssäule gebundenen Proteine wurden mit 0.1M Glycin pH 2.5 eluiert, und das Eluat neutralisiert. Die Affinitätssäule wurde extensiv mit 100mM Tris pH 7.5 gewaschen und in 100mM Tris pH 7.5 und 0.05% Natrium-Azid resuspendiert gelagert. Die Ausbeute wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft.

2.1.2.5.3 Immunoaffinitätschromatographie mittels Antikörper

In einer Immunpräzipitation (IP) werden spezifisch Proteine mittels eines Antikörpers der an Sepharose-Kügelchen bindet angereichert. Zu der Affinitätsaufreinigung wurden SepharoseA verwendet, die IgG₁ Antikörper mit ihrer schweren Kette zu binden vermag. Es wurden mindestens 100-200µg Gesamtprotein in einer Immunpräzipitation eingesetzt. Dem Zellextrakt wurde 0.5 bis 1µg Antikörper hinzugefügt, und das Endvolumen der IP auf 500µl mit TBS-Tween angeglichen. Diese Protein-Antikörper

Lösung wurde für 1 Stunde bei 4°C in einem Drehrad inkubiert. Daraufhin wurden 50µl mit 2% BSA abgesättigte Sepharose A-Kügelchen hinzugegeben, und wiederum für 1 Stunde bei 4°C in einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen mit den daran gebundenen Antikörper-Protein Komplexen durch Zentrifugation (2 Minuten bei 3.000rpm bei 4°C) 3x mit TBS-Tween gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde sämtlicher Überstand von den Sepharose-Kügelchen abgesaugt, und die Kügelchen in 30-50µl destilliertem Wasser resuspendiert. Die Proteine wurden durch 5 Minuten Inkubation bei 100°C von den SepharoseA eluiert (denaturierende Elution), und der Überstand zur weiteren Analyse verwendet.

2.1.2.5.4 Lektin-Affinitätschromatographie

Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine mit einer Affinität zu spezifischen Zuckerresten. Lektine spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion einzelner Zellen von Pflanzen und Mikroorganismen. Der Lektin-Affinitätschromatographie liegt das Grundprinzip einer Immunpräzipitation zugrunde. In den gezeigten Experimenten wurde das Weizenkeimagglutinin (wheat germ agglutinin), isoliert aus *Tritium vulgare* verwendet. Dieses Lektin hat bei RT eine hohe Affinität zu terminalen N-Acetylglucosamin-Zuckerresten. Zu mindestens 2mg Gesamtproteinextrakt wurden 50µl gewaschene WGA-Agarose (kovalent gebunden von Amersham/Pharmacia) dazugegeben, und für 1 Stunde bei RT in einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Agarose Kügelchen 3x mit TBS-Tween bei RT gewaschen (Zentrifugation 2 Minuten bei 2.000rpm). Die angereicherten glykosylierten Proteine wurden anschließend entweder denaturierend durch Aufkochen, oder nativ durch Inkubation für 10 Minuten bei RT in einer 1M GlcNAc-Lösung eluiert.

2.1.2.5.6 NH₄-Fällung

Der Proteinlösung wurden 8 Volumen gesättigtes Ammoniumsulfat zugesetzt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine bei 4°C, 14.000rpm für 30 Minuten pelletiert, das Pellet luftgetrocknet und in destilliertem Wasser resuspendiert.

2.1.2.5.6 Aceton-Fällung

Die Proteinlösung wurde mit 80% -20°C kaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Die Menge an zu fällenden Protein mußte mindestens 10µg betragen, um nicht allzu große Verluste während des Fällvorgangs zu erhalten. Die gefällten Proteine wurden bei 4°C bei 14.000rpm in einer Eppendorf-Kühltschzentrifuge 30 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das weiße Proteinpellet wurde mit 1 ml 75%igem eiskaltem Aceton gewaschen und das Pellet getrocknet. Das Proteinpellet wurde in 40-50µl destilliertem Wasser bei 37°C 10 Minuten unter leichtem Schütteln resuspendiert.

2.1.2.6 Methoden zur Expression von Proteinen

2.1.2.6.1 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Die transiente Transfektion von COS-7 Zellen wurden mit der Methode der Kalziumphosphatfällung durchgeführt. Zur Transfektion wurden 1-10µg Plasmid-DNA und Lachs-Sperma DNA ad 20 µg Gesamt-DNA mit 50 µl 2.5 M CaCl₂-Lösung in 500 µl destilliertem Wasser vorgelegt und 500 µl 2x HBS (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.01) hinzupipettiert. Nach 2-3 Minuten war ein Präzipitat erkennbar, und die Suspension wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 6-12h Inkubation wurde das Präzipitat mit PBS von den Zellen gewaschen und frisches Kulturmedium zugesetzt. Im Falle der Induktion mit Prolaktin wurde das Medium für 12h mit 5 µg Prolaktin/ml versetzt. Die transfizierten Plasmide wurden für 48-72h exprimiert, und anschließend Zellextrakte hergestellt oder ein Luziferase-Assay durchgeführt.

2.1.2.6.2 Luciferase- und β -Galactosidase-Assay

Die Enzymaktivität wurde ca. 40 Stunden nach der Transfektion analysiert. Die Zellen wurden 2x in PBS gewaschen und das Zellpellet mit 100 μ l Luciferase-Lysispuffer (1% Triton X-100, 25mM Glycylglycin, 15mM Magnesium Sulphat, 4mM EGTA, 1mM DTT) pro Zellkulturschale lysiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 14.000rpm für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert, und 10 μ l des Überstands für die Luciferase-Reaktion, 3 μ l für die β -Galactosidase-Reaktion verwandt. Für den β -Galactosidase-Reaktion wurde der Überstand 30 Minuten bei RT und in Dunkelheit in je 33 μ l Reaktionspuffer (200 μ l 0.5M Na₃PO₄ pH 8.0, 10 μ l 100x Galacton, 1 μ l 1M MgCl₂, 789 μ l destilliertes Wasser) inkubiert. Die Luziferasemaschine fügte automatisch ca. 60 μ l Luziferase-Substrat ((20ml 0.2M Tricine), 104mg Mg(CO₃)₄xMg(OH)₂x5 H₂O, 2ml 10mM EDTA pH 8.0, 1g DTT, ad 160ml mit destilliertem Wasser auf pH 7.8, +212 μ l 0.5M ATP, 40mg Coenzym A, 26mg Luciferin, ad 200ml mit destilliertem Wasser, Sterilfiltration) zu der Luziferase-Reaktion, und die gleiche Menge an Amplifier-Lösung (400 μ l 5M NaOH, 1ml Emerald Tropic, 8.6ml destilliertes Wasser) der β -Galactosidase-Reaktion hinzu. Die Luziferase-Daten wurden in Triplikaten ermittelt und mit den Ergebnissen der β -Galactosidase-Reaktion normalisiert.

2.1.2.6.3 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die pGEX Plasmidderivate, die für die entsprechenden GST-Fusionproteine kodieren, wurden in den *E.coli* Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert. Bei einer OD₆₀₀=0.6-0.7 wurde die Proteinexpression in den Bakterien mit 0.5 mM IPTG und Inkubation bei RT induziert, und die Zellen 3h später abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 50mM Tris pH 8.0, 250mM NaCl, 1% Triton X-100 versetzt mit Protease-Inhibitoren mittels Ultraschall aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 20.000xg wurden die Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand bei -20°C gelagert.

Zur Reinigung der GST-Fusionsproteinlösungen wurden diese im „Batch“-Verfahren mit einer aufgeschlämmten Glutathion Sepharose 4B Matrix (Amersham/Pharmacia,

Freiburg) 30-60 Minuten inkubiert. Zur Sedimentierung der Matrix wurde diese bei 1500 rpm abzentrifugiert und 3x mit 1x PBS gewaschen. Die gebundenen GST-Proteine wurden durch Aufkochen von der Sepharose eluiert.

2.1.2.6.4 *In vitro*-Transkription und Translation von Proteinen

In vitro Translationen wurden mit dem TNT Coupled Reticulocyte Lysate-System von Promega (Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktionen wurden in Anwesenheit von [³⁵S] Methionin durchgeführt und nach anschließendem SDS-PAGE durch Autoradiographie analysiert.

2.1.2.7 Charakterisierung von Proteinen

2.1.2.7.1 Proteinextraktion

2.1.2.7.2 Gesamtzellextraktion

Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4°C und 2.500 rpm in einer Eppendorf-Kühltschzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die geernteten Zellen wurden dann mit X-400 Puffer (20mM HEPES, 20% Glycerin, 400mM NaCl, 1mM DTT, 1mM Pefabloc, 5µg/ml Leupeptin) versetzt (40µl pro 10cm Zellkulturschale). Die Zellen wurden in dem Extraktionspuffer resuspendiert und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 4°C und 14.000rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, und der Gesamtzellextrakt bei -80°C gelagert.

2.1.2.7.3 Zytoplasma- und Kernlyse

Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4°C und 2.500 rpm in einer Eppendorf-Tischkühlzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden darauf 10 Minuten auf Eis in einem zytoplasmatischen Extraktionspuffer (10%

Glycerin, 20mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 0.2% NP-40 und Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) lysiert und die Zelldebris und die Nuklei 2 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytoplasmatischen Proteine und wurde bei -80°C gelagert.

Das Pellet bestehend aus Zelldebris und Nuklei wurden in Kernextraktionspuffer (10% Glycerin, 20mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 400mM NaCl, 0.2% NP-40 und Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) resuspendiert und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Kernextrakt bei -80°C gelagert.

2.1.2.8 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung von Proteinen wurde nach der Methode von Bradford mit dem Farbkonzentrat der Firma Biorad (München) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Proteine erfolgte zusätzlich densitometrisch nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung im Vergleich zu einem BSA-Standard.

2.1.2.9 SDS-PAGE

Das SDS-Polyacrylamidgel ist ein diskontinuierliches Trennverfahren und trennt Proteine mit hohem Auflösungsvermögen auf. Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer (nach Laemmli) denaturiert und durch das SDS in Polyanionen überführt. Die Trennung der Proteine erfolgt in SDS-Gelen aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte, und dient der Ermittlung der molekularen Masse von Proteinen. Durch die denaturierenden Bedingungen werden die konstituierenden Polypeptidketten voneinander getrennt.

Zur Auftrennung von Proteinen werden Trenngele aus Acrylamid, meist mit einer Acrylamidkonzentration von 8-15% und Sammelgele mit einer Acrylamidkonzentration von 5% verwendet. Zur Proteinauftrennung wurden die Mini-Protean II Kammern von Biorad verwendet.

2.1.2.10 Coomassieblau-Färbung

Die Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei 0.1-2µg Protein pro Bande.

Das Gel wurde aus der Gelapparatur genommen und in eine Schale mit Coomassie-Färbelösung (0.1% Coomassie G250, 40% Ethanol, 10% Eisessig) gelegt. Der Färbevorgang fand bei RT unter leichtem Schütteln statt und dauerte 30 Minuten. Zum Entfärben des SDS-PAGE wurde die Coomassie-Lösung abgegossen und das Gel in eine Entfärbelösung (25% Ethanol, 10% Eisessig) gegeben. Die Entfärbung fand bei RT unter leichtem Schütteln statt. Es wurde solange entfärbt, bis der Hintergrund des Gels nur noch leicht bläulich erschien, und die Proteinbanden gut zu erkennen waren.

2.1.2.11 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in Halbtrockenblotkammern von Froebel (Lindau) auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher und Schüll) bei 1 mA/cm² Membranfläche für 1-2h übertragen. Der Blotaufbau war von der Anode zur Kathode wie folgt: 3 Lagen Whatman 3MM Papier in Anodenpuffer 1, 3 Lagen Whatman Papier in Anodenpuffer 2, Nitrocellulosemembran, SDS-Polyacrylamidgel, 3 Lagen Whatman Papier in Kathodenpuffer). Die Membran wurde kurz vor Verwendung in destilliertem Wasser geschwenkt. Anschließend wurde der Western Blot einer Immunofärbung unterzogen.

2.1.2.11.1 Immunoblot

Nach dem Blotten wurde die Membran mit den daran gebundenen Proteinen für 30 Minuten in 3% fettfreiem Milchpulver in TBS-Tween geblockt, um eine unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu vermeiden. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 60 Minuten, die Inkubation mit dem zweiten, HRP (horse raddish peroxidase)-konjugierten Antikörper erfolgte für 30 Minuten. Zwischen den Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern und vor der Nachweisreaktion wurde die Membran 3-5x 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen. Die Bindung der HRP-

konjugierten Antikörper wurde mit dem ECL-Chemolumineszenzsystem von Amerham/Pharmacia nachgewiesen. Dabei wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren.

2.1.2.12 Strippen von Blotmembranen

2.1.2.12.1 Strippen von Blotmembranen mittels Urea

Die Nitrocellulosemembran wurde mit einer 8M Urea in PBS Lösung, pH 7.5 versetzt, und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran gut mit PBS gewaschen. Dann wurde die Membran zu einem weiteren Immunostaining blockiert oder auf 3MM Whatman-Papier getrocknet.

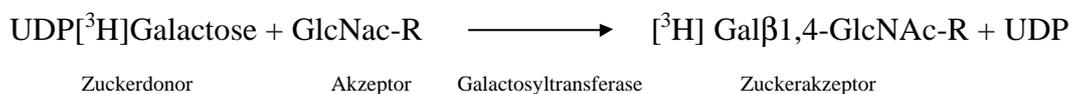
2.1.2.12.2 Strippen von Blotmembranen mittels β -Mercaptoethanol

Die Blotmembran wurde mit 20 ml „Stripping“-Puffer in einem 50ml Falcon-Fläschchen versetzt und für 30 Minuten bei 60°C in einem Hybridisierungsöfen inkubiert. Anschließend wurde die Membran intensiv mit destilliertem Wasser, PBS und TBS-Tween gewaschen. Die Membran wurde für ein weiteres Immunostaining blockiert oder auf 3MM Whatman-Papier getrocknet.

2.1.2.13 Untersuchungen zur biologischen Aktivität

2.1.2.13.1 Galaktosyltransferase-Assay

Dieses Experiment wurde speziell dazu entwickelt O-verknüpfte N-Acetylglukosamin Reste (O-GlcNAc) nachzuweisen (nach Holt et al.). Die in diesem Experiment verwendete Galaktosyltransferase katalysiert die folgende Reaktion:



Die radioaktiv markierten Produkte wurden anschließend nach ihrer Verknüpfungart (N- oder O-verknüpft) untersucht. Der verwendete Proteinextrakt sollte in einer Lösung mit geringer ionischen Stärke (0.2M) und frei von EDTA, das die für das Enzym wichtigen Mangan-Ionen cheliiert, resuspendiert sein. In allen Proteinlösungen werden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren verwendet. Als Positivkontrolle für das Markierungsexperiment, wie auch die Abspaltung der N-verknüpften Zuckerketten wurde Ovalbumin (Fraktion V von Sigma) verwendet. Ovalbumin enthält einen hohen Anteil terminaler GlcNAc-Zuckerreste, die mit dem Protein N-glykosidisch verknüpft sind.

Zu 50µl Proteinextrakt oder Kontrolle wurden 100mU autogalaktosylierte Galaktosyltransferase (Sigma) in 10µl 10x Markierungspuffer (100mM HEPES-NAOH pH 7.3, 100mM Galaktose, 50mM MnCl₂) gegeben. Dazu wurden 2-4µCi UDP[³H]Galaktose (Amersham/Pharmacia) gelöst in 10µl 25mM 5'-AMP-Lösung hinzugegeben, und das Endvolumen der Reaktion auf 100µl angeglichen. Die Probe wurde bei 37°C für 1-2 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 11µl 10x Stop-Lösung (0.1M EDTA, 10% (w/v) SDS) beendet. Um die nicht inkooperierte Radioaktivität von dem markierten Protein zu trennen, wurde die Probe in einer Sephadex G-50 Säule (Amersham/Pharmacia) fraktioniert. Es wurden 400µl Fraktionen gesammelt, und ein Anteil jeder Fraktion gemessen. Die Fraktionen mit radioaktiv markierten Proteinen wurden vereint und mit 8 Volumen eiskaltem Aceton bei -20°C über Nacht präzipitiert.

Produktanalyse:

O-verknüpfte GlcNAc-Zuckerreste sind resistent gegenüber dem Enzym PNGase F. Dieses Enzym spaltet spezifisch nur N-verknüpfte Oligosaccharide direkt am Protein-„Rückgrat“.

Die Hälfte der in Aceton präzipitierten Probe wurden in 100µl PNGase F-Puffer A (1% SDS, 1% 2-Mercaptoethanol) resuspendiert, für 5 Minuten gekocht und anschließend auf RT abgekühlt. Dazu wurden 200µl PNGase F-Puffer B (150mM Na-Phosphat pH

8.6, 15mM EDTA, 5% (v/v) Nonident P-40) hinzugegeben und die Probe gut gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100-500mU PNGase F (Roche) zu jeder Probe gestartet. Die Proben wurden bei RT für 48 Stunden inkubiert, wobei nach 24 Stunden nochmals 100mU PNGase F Enzym zugegeben wurde. Die Reaktion wurde mit 300µl destilliertem Wasser und 60µl 20% SDS gestoppt. Die abgespaltene Radioaktivität wurde von den noch markierten Proteinen mittels einer Sephadex G-50 Säule getrennt, und die Fraktionen mit dem PNGase F-resistenten Material vereint und mit Aceton präzipitiert. Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und in einem SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt. Die markierten Proteine wurden mit Amplify (Amersham/Pharmacia) imprägniert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.1.2.13.2 Ko-Immunoaffinitätschromatographie

Der Ko-Immunoaffinitätschromatographie liegt das Prinzip der einfachen Immunpräzipitation von Proteinen mittels Antikörper und Sepharose A zu Grunde. Zusätzlich zu dem mit dem Antikörper immunpräzipitierenden Protein wird ein Proteinextrakt zugefügt, der auf Interaktion mit dem immunpräzipitierten Protein analysiert wird. Anschließend wird im Western Blot das interagierende Protein detektiert.

2.1.2.13.3 Gel Retardierungsexperimente (EMSA)

Die Proteinextrakte wurden für 30 Minuten mit einem γ - ^{32}P ATP-markierten Oligonukleotid in Bindungspuffer (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1% NP-40, 5% Glycerin, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.02mM Pefabloc, 0.1 µg/µl Poly-dIdC) zur Reaktion gebracht. Für Supershift-Untersuchungen wurde 1µl des entsprechenden Antikörpers dazugegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einem 4%igem nativen Polyacrylamidgel bei 200V in 0.25% TBE (1x TBE: 90mM Tris-Borat pH 8.0, 2 mM EDTA) aufgetrennt, das Gel getrocknet und autoradiographisch entwickelt.

2.1.2.13.4 ABCD-Assay

Eine weitere Methode zur Analyse der DNA-Bindung von Proteinen ist der ABCD-Assay. Dem ABCD-Assay liegt das Prinzip einer Immunpräzipitation zugrunde. Mindestens 100µg Proteinextrakt werden mit einem biotinyliertem Oligomer mit spezifischen Proteinbindungssequenzen für 2 Stunden bei 4°C in einem Drehrad inkubiert. Anschließend werden gewaschene und mit 2% BSA gesättigte Streptavidin-Kügelchen hinzugegeben, und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Kügelchen werden 3x mit TNE-T Puffer (140mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5, 1% Triton-X) gewaschen (Zentrifugation bei 3.000rpm für 2 Minuten, 4°C). Die an den DNA-Oligomer gebundenen Proteine wurden denaturierend mittels Aufkochen der Probe eluiert, und in einem SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die gebundenen Proteine wurden dann in einem Immunoblot nachgewiesen.

2.1.2.13.5 Verstärkung der dynamischen Glykosylierung von Proteinen

2.1.2.13.5.1 Verstärkung der Glykosylierung mittels PUGNAc

O-(acetymido-2-deoxy-D-Glucopyranosyliden)amino-N-phenylcarbamat (PUGNAc) ist ein potenter Inhibitor des O-GlcNac entfernenden Enzyms O-GlcNAcase. Durch Zugabe von PUGNAc zu dem Zellkulturmedium (CarboChem, Zürich) wird es von den Zellen aufgenommen und inhibiert die Aktivität der O-GlcNAcase. Somit ergibt sich eine Verstärkung der Glykosylierung von zytosolischen und nukleären Proteinen.

HC11 Zellen wurden kultiviert wie oben beschrieben. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt und 2 Tage inkubiert. Anschließend wurde dem Medium 40mM PUGNAc zugesetzt, und die Zellen wurden weitere 16 Stunden inkubiert. Danach wurde von den Zellen Proteinextrakte angefertigt.

2.1.2.13.5.2 Verstärkung der Glykosylierung mittels Glukose und Glukosamin

Durch die Anreicherung des Mediums mit Glukose und Glukosamin steigt die Konzentration an Glukose/Glukosamin auch in den Zellen an. Dies führt zu einer vermehrten Glykosylierung von Proteinen.

HC11 Zellen wurden kultiviert wie oben beschrieben. Die Zellen wurden dann in RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt und 2 Tage inkubiert. Anschließend wurde dem Medium 5mM Glukose und 7mM Glukosamin zugesetzt, und die Zellen weitere 16 Stunden inkubiert. Danach wurde von den Zellen Proteinextrakte angefertigt.

2.1.2.13.5.3 Verstärkung der Glykosylierung mittels Streptozotocin

Streptozotocin ist ein GlcNAc-Analog, und blockiert spezifisch das die O-GlcNAc Modifikation-entfernende Enzym, die O-GlcNAcase. Zudem wird die O-Verknüpfung zwischen dem Zucker und der Hydroxylgruppe von Serinen und Threoninen permanent verknüpft, so daß der Zucker nicht mehr enzymatisch abgespalten werden kann. Dies hat zur Folge, daß der Glykosylierungsstatus aller Zellproteine erhöht ist. HC11 Zellen wurden wie oben unter Punkt xxx beschrieben ausgesäht und kultiviert. Die Zellen wurden mit den folgenden Konzentrationen 1.5, 3.0, und 4.5 x 10⁻⁵ g/ml Medium STZ für 4, 8 und 12 Stunden behandelt. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte von den Zellen angefertigt.

2.1.2.13.6 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

2.1.2.13.6.1 Trypsin-Verdau von Proteinen im SDS-PAGE

Trypsin ist ein proteolytisches Enzym isoliert aus dem Pankreassaft, das hochspezifisch Polypeptide auf der Karboxylseite von Arginin- und Lysinresten hydrolysiert.

Die mit Coomassie Blau G-250 angefärbte Proteinbande wurde aus dem SDS-PAGE ausgeschnitten und in 1x1 mm große Stücke geschnitten.

Entfärben der Gelstücke:

Es wurden 50mM Ammoniumbicarbonat und Acetonitril in einem Verhältnis 1:1 dem Gelstück hinzugefügt und für 10 Minuten bei RT inkubiert, und der Überstand anschließend verworfen. Diese Prozedur wurde wiederholt, und die Gelstücke dann in 25µl 50mM Ammoniumbicarbonat resuspendiert.

Dehydratisieren der Gelstücke:

Der Puffer wurde verworfen und die Gelstücke in 100µl Acetonitril resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Trypsinverdau:

Die Gelstücke wurden in 25µl 50mM Ammoniumbicarbonat mit 10ng/µl Trypsin (Roche) resuspendiert und auf Eis für 45-60 Minuten inkubiert. Der Überschuss an Trypsin wurde verworfen und die Gelstücke mit ca. 25µl 50mM Ammoniumbicarbonat-Lösung bedeckt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Extraktion der tryptischen Peptide:

Die Gelstücke wurden abzentrifugiert und der Überstand in einem Eppendorfgefäß aufbewahrt. Die folgenden Schritte wurden jeweils für mindestens 20 Minuten bei RT durchgeführt, und die Probe dabei gelegentlich geschwenkt. Die Überstände wurden vereint und in einem Eppendorfgefäß aufbewahrt.

Inkubation in 25µl 25mM Ammoniumbicarbonat. Dreimal in 50µl 50% Acetonitril/5% Ameisensäure. Die Überstände wurden in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und in dem gewünschten Volumen resuspendiert.

2.1.2.13.6.2 Reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) radioaktiv markierter Peptide

Radioaktiv markierte Peptide wurden mit der Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) aufgereinigt. Hierbei wurde eine Serie verschiedener Gradienten benützt. Die Verwendung der RP-HPLC zur Lokalisierung der Glykosylierungsstelle wird dadurch vereinfacht, daß die Zuckerstruktur nur wenig Einfluß auf die Elutionszeit der meisten Glykopeptide hat (N- und O-verknüpft).

Die Peptide wurden mit steigendem Acetonitril (ACN)-Gradienten mit einer C₁₈-Säule eluiert, und 1 ml Fraktionen gesammelt. Ein Anteil der Fraktionen wurde im Szintillationsmeßgerät gemessen, und die Fraktionen mit einem hohen Anteil an radioaktiven Peptiden wurden im Massenspektrum analysiert. Das Peptid-Peaks der Proben wurden bei 214nm gemessen.

Die genauen Bedingungen des RP-HPLC Laufs waren wie folgt:

Puffer A: 0.05% TFA in MilliQ-Wasser

Puffer B: 0.045% TFA, 85% ACN in MilliQ-Wasser

Fließrate: 100µl/min

Konzentration B: 0% für 10 Minuten

Injektion der Probe

Konzentration B: 50% in 40 Minuten

Konzentration B: 50% für 5 Minuten

Konzentration B: 100% in 10 Minuten

Konzentraion B: 100% für 5 Minuten

2.1.2.13.6.3 Massenspektrometrische Analyse von Peptiden im Maldi

Die Fraktionen mit radioaktiv markierten Peptiden wurden lyophilisiert und im Massenspektrometer (hier: Voyager Maldi-MS) auf die O-GlcNac Modifikation untersucht.

Als Matrix zum Auftragen auf die Platin-Platte wurde α -Cyano-4-Hydroxycinnamsäure (α CHCA) verwendet.

2.1.2.13.6.4 Manuelle Edman-Sequenzierung von Proteinen

Diese Methode wird dazu verwendet, die O-GlcNac-modifizierten Stellen in Peptiden zu identifizieren. Die Technik ist optimal bei kurzen Peptiden die mindesten 5000 cpm Tritium aufweisen. Es wurde ein kommerziell erhältlicher Kit von Millipore verwendet. Jeder Zyklus der manuellen Edman Degradierung wurde auf den Tritium-Gehalt analysiert. Zyklen mit hohem Tritium-Gehalt korrelieren mit Glykosylierungsstellen des Peptids.

2.2 Materialien

2.2.1 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
XL-1 blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ⁻ , F'(traD36, <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacIP</i> , <i>lacZ</i> ΔM15)	Hanahan et al., 1983
HB 101	F <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1D(gpt-proA)62</i> <i>rpsL20</i> (Str ^r) <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recA13</i> , Δ(<i>mcrC-mrr</i>), <i>hsdS20</i> (r _N -m _N .)	Sambrook et al., 1989
BL-21(DE3)pLysS	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (δ <i>cIts857</i> , <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7</i> gene 1)	Sambrook et al., 1989

Die Abkürzung der Genotypen bezieht sich auf die Nomenklatur von B. Bachmann. Plasmidhaltige Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 200 rpm in LB-Medium mit entsprechender Antibiotikaresistenz angezogen. Die langfristige Lagerung der plasmidhaltigen Stämme erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 50% Glycerin.

2.2.2 Zelllinien und Zellkultur

Zelllinie	Herkunft/Eigenschaft	ATTC-Nr./Referenz
Cos-7	Nierenzellen der Grünen Meerkatze, SV-40 transformiert	CRL 1555
293T	Maus-Fibroblastenzellen	-
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen mit HVP 18 DNA Kopien	CCL2
HC11	Maus-Mammabrustepithelzelllinie, Subklon von COMMA-1D Zellen von tragenden Balb/C-Mäusen	Ball etal. (1988)
SkBr3	Humane Brust-Karzinomzelllinie aus einem Adeno-Karzinom, hohe ErbB-2 Expression	HTB-30
K562	Humane Leukämiezelllinie mit konstitutiv aktivem Stat5 und einer BCR-ABL Translokation	-
Sf9	Insektenzelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i> , Ovariengewebe	ACC 125

Zellkulturmedien, Glutamin, Trypsin/EDTA-Lösung und Antibiotika für die Zellkultur wurden von den Firmen Serva, Biowhittaker und Biozol (Eching) geliefert. Das fötale Kälberserum (Biowhittaker, Verviers, Belgien) wurde vor Gebrauch für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

2.2.3 Verwendete Antibiotika und Konzentration

Antibiotikum	Stammlösung	Lagerung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100mg/ml	-20°C	100µg/ml
Kanamycin	100mg/ml	-20°C	100µg/ml
Chloramphenicol	50mg/ml	-20°C	50µg/ml

2.2.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Zytokine lieferten Sigma (Deisenhofen) und Becton-Dickinson (Heidelberg). Die Molekulargewichtsmarker für Proteine und die DNA-Marker stammen von New England Biolabs und Biorad (München).

Die verwendeten Chemikalien lieferten die Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg). Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham/Pharmacia (Braunschweig) bezogen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Protein Assay Kit von Biorad (München) benutzt. Zur Plasmid DNA-Isolierung, Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Lösung und Agarosegelen und die Minipräparationen wurden Kits der Firma QIAGEN (Eggstein) und Macherie und Nagel verwendet. Chromatographiesäulen und chromatographische Medien zur Proteinaufreinigung lieferte die Firmen Amersham/Pharmacia und Millipore.

Plastikwaren und Filtersysteme für das Labor und die Zellkultur wurden von den Firmen Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Schleicher & Schuell (Dassel), Becton Dickinson (Heidelberg) oder Nalgene (Rochester, NY, USA) bezogen.

2.2.5 Puffer

PBS	137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
Proteinladepuffer für SDS- PAGE	125mM Tris pH 6.8, 2.5% SDS, 10% Glycerin, 0.1% Bromphenolblau, 1% β-Mercaptoethanol
Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE	30% Methanol, 10% Essigsäure, 0.25% Coomassie Brilliant Blue G250
Entfärber für SDS-PAGE	30% Methanol, 10% Essigsäure
Anodenpuffer I	300mM Tris pH 10.4, 20% Methanol
Anodenpuffer II	25mM Tris pH 10.4, 20% Methanol
Kathodenpuffer	25mM Tris pH 10.4, 40mM ε-Aminohexansäure, 20% Methanol
TBS	10mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl
TBS-Tween	TBS + 0.05% Tween20
„Stripping“-Puffer	62.5mM Tris pH 6.7, 2% SDS, 1.8% β- Mercaptoethanol
TAE-Puffer	40mM Tris pH 8.0, 2mM EDTA
10x DNA-Ladepuffer	50% Glycerin, 0.4% Xylenglycol, 0.4% Bromphenolblau

Weitere in dieser Arbeit verwendete, spezielle Puffer und Lösungen sind in den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.2.6 Antikörper

Folgende Primärantikörper wurden in Immunoblots, bei Immunopräzipitationen, in ABCD-Assays und Gel Retardationsversuche (EMSA) verwendet:

Spezifität	Ursprung	Hersteller
Stat5	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
Stat5a, C-Terminus	polyklonal (Kaninchen)	N. Hynes, FMI, Basel
Stat5a, C-Terminus	polyklonal (Kaninchen)	Zymed Laboratories Inc.
Stat5b, C-Terminus	polyklonal (Kaninchen)	N. Hynes, FMI, Basel
Stat5-PTyr	monoklonal (Maus)	Zymed Laboratories Inc.
Stat1	monoklonal (Maus)	Zymed Laboratories Inc.
Stat1, N-Terminus	monoklonal (Maus)	Zymed Laboratories Inc.
Stat3	monoklonal (Maus)	Santa Cruz Biotechnology
Stat6	monoklonal (Maus)	Santa Cruz Biotechnology
Phosphotyrosin (PY69)	monoklonal (Maus)	Santa Cruz Biotechnology
CBP	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
GR	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
RL-2	monoklonal (Maus)	Transduction Laboratories
GST	polyklonal (Kaninchen)	Gao Cheng, Johns Hopkins University, Baltimore, USA

Folgende mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Sekundärantikörper wurden im Immunoblotverfahren eingesetzt:

Spezifität	Ursprung	Hersteller
Kaninchen Ig-HRP	polyklonal (Ziege)	Amersham/Pharmacia
Protein A-HRP	Protein A aus <i>Staph. aureus</i>	Amersham/Pharmacia
Maus Ig-HRP	polyklonal (Schaf)	Amersham/Pharmacia

2.2.7 Plasmide

Name	Verwendungszweck	Herkunft/Referenz
pCMX-GFP	GFP mit konstitutiv aktivem CMX (cauliflower mosaic virus) Promotor	S. Hashemolhosseini, Freiburg
pXM-mStat5a	Expressionsvektor mit Stat5a aus Maus	Gouilleux et al. (1994)
pXM-mStat5b	Expressionsvektor mit Stat5b aus Maus	Gouilleux et al. (1994)
pcDNA-mStat5a-T92A	Expressionsvektor mit Stat5a aus Maus mit Mutation an aa 92	C. Gewinner
PsDNA-mStat5a-Δ100	Expressionsvektor mit Stat5a aus Maus, Deletionskonstrukt	C. Gewinner
PcDNA-PrIR	Expressionsvektor mit Prolaktin Rezeptor	Gouilleux et al. (1994)
PZZ1	Luciferase-Reporterkonstrukt mit β-Casein Promotor	
Beta-galactosidase	Beta-Galactosidase	Amersham-Pharmacia
pVL 1392	Expressionsvektor Baculovirus	PharMingen
Jak2 pVL 1392	Expressionsvektor für Jak2	Quelle et al. (1994)
Stat5a pVL 1392	Expressionsvektor für Stat5a	Beisenherz et al. (2001)
Stat5 pVL 1392	Expressionsvektor für Stat5b	Beisenherz et. al. (xx)
pGEX-3X	<i>E.coli</i> Expressionsvektor für GST-Fusions-proteine	Pharmacia

2.2.8 Sequenzen verwendeter DNA-Oligomere

2.2.8.1 Oligonukleotide für DNA-Bindungsversuche

β-Casein, Rind 5'-aga ttt cta gga att caa atc-3'

2.2.8.2 Primer für die PCR

Name	Sequenz
5A-seq1	5'-gCT gCA gAA gAA ggC ggA gCA CCA g-3'
5A-seq2-S	5'-gCA gCT gCT gCg gAA gCA gCA gAC C-3'
5AseqNT-S	5'-ggA gCA CCA ggT gg-3'
5A-XBA-AS	5'-CgA gTC Tag ATC Agg ACA ggg AgC-3'
Statgly1-S	5'-gAA gCC ATT CgT AgT Acg AgA TTT CTC-3'
StatGly1-AS	5'-gAg AAA TCT CgT ACT Acg AAT ggC TTC-3'
5A-mut2-S	5'-gCA Cag CTC Cag AAC gCg TAT gAC CgC TgT CCC Atg-3'
5A-mut2-AS	5'-CAT ggg ACA gCg gTC ATA CgC gTT CTg gAg CTg TgC-3'
Stat5a-1	5'-AAA gTC gAC Atg gCg ggC Tgg ATT C-3'
Stat5a-2	5'-AAA gTC gAC TCA ggA Cag ggA gCT TCT Ag-3'

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung der dynamischen O-verknüpften Glykosylierung

Viele nukleäre und zytosolische Proteine sind mit einzelnen O-verknüpften N-Acetylglukosaminen (O-GlcNAc) modifiziert. Darunter befinden sich auch viele Transkriptionsfaktoren, wie p53, c-myc, serum response factor und Sp1 (Roos et al., 1997), (Shaw et al., 1996), (Chou et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Stat-Proteine mit einem O-GlcNAc modifiziert sind, und diese Glykosylierung von der Stimulation durch Zytokine abhängig ist.

3.1.1 Identifizierung der dynamischen O-verknüpften Glykosylierung von Stat5a mittels Galaktosyltransferase Assays

Zum Nachweis der O-verknüpften Glykosylierung wurden HC11 Zellen mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin stimuliert und Stat5a Protein aus dem Gesamtzellextrakt immunpräzipitiert. Das aufgereinigte Stat5a Protein wurde dann einem *in vitro* Galaktosyltransferase Assay unterworfen. In dieser Enzymreaktion werden endständige N-Acetylglukosamin-Zucker mit einer Tritium-markierten Galaktose durch die Galaktosyltransferase verknüpft (Roquemore et al., 1994). In einer darauf folgenden Enzymreaktion mit PNGase F wurden alle N-verknüpften Zucker(-ketten) entfernt, so daß in der anschließenden Autoradiographie der SDS-PAGE nur die O-verknüpften Zuckerketten mit terminalen GlcNAc detektiert wurden (Abbildung 1). Als Positivkontrolle, sowohl für die Markierungsreaktion, als auch für die Abspaltung der N-verknüpften Zuckerketten durch das Enzym PNGase F, wurde das Protein Ovalbumin verwendet. Ovalbumin besitzt viele Zuckerketten mit

endständigen GlcNAc-Zuckern, die N-verknüpft sind. Wie erwartet ergibt die Markierungsreaktion ein starkes Signal für Ovalbumin, das nach der PNGase F-Reaktion vollständig verschwunden ist. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser eingesetzt, um Signale, die von dem Enzym selbst stammen, ausschließen zu können. Das immunpräzipitierte Stat5a zeigte ein starkes Signal nach der Markierungsreaktion, das nach der PNGase F Behandlung noch vorhanden war. Dies deutet auf eine O-verknüpfte Glykosylierung mit einem endständigem GlcNAc von Stat5a hin.

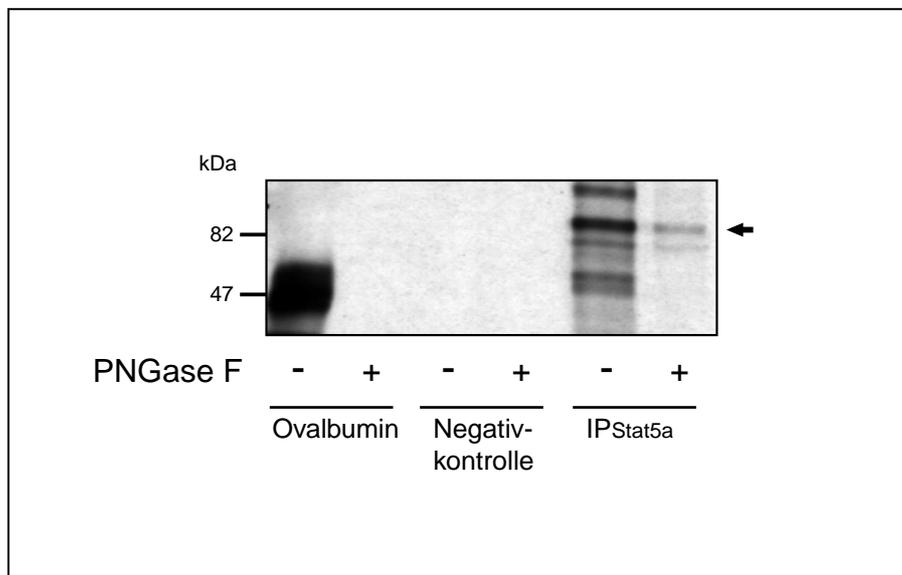


Abbildung 1: Stat5a ist mit O-GlcNAc modifiziert. Stat5a aus HC11 Zellen wurde immunpräzipitiert und einer Galaktosyltransferase-Reaktion mit anschließender PNGase F-Behandlung unterzogen. In der Galaktosyltransferase-Reaktion wurden terminale GlcNAc-Zuckerreste mit einer Tritium-marktierten Galaktose markiert. Als Kontrollen wurden Ovalbumin als Positivkontrolle sowohl für die Markierungsreaktion, als auch für die PNGase F-Reaktion, und destilliertes Wasser als Negativkontrolle eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels einer Autoradiographie

3.1.2 Untersuchung der Glykosylierung von Stat5 in Abhängigkeit von Zytokinstimulation

O-GlcNAc modifizierte Proteine zeigen eine dynamische O-GlcNAc-Modifikation, meist im Wechselspiel mit der Phosphorylierung. In dieser Arbeit sollte diese Dynamik der O-GlcNAc Modifikation von Stat5a in Bezug auf die Induktion durch die Hormone Prolaktin, Insulin und Dexamethason untersucht werden.

HC11 wurden mit Prolaktin, Dexamethason und Insulin stimuliert und zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte angefertigt. Diese Proteinextrakte wurden sowohl einer Lektin-Affinitätschromatographie als auch einer gegen Stat5a gerichteten Immunpräzipitation unterworfen. In der Lektinaffinitätschromatographie wurde das Lektin Weizenkeimagglutinin

(wheat germ agglutinin, WGA) eingesetzt, das eine hohe Affinität für endständige N-Acetylglukosamine (GlcNAc) aufweist. Die angereicherten Proteine wurden anschließend in einem SDS-PAGE gemäß dem Molekulargewicht aufgetrennt und im Immunoblot konnte Stat5a detektiert werden (Abbildung 2). In nicht induzierten Zellen befanden sich die Stat5a Proteine hauptsächlich im Zytoplasma, nur geringe Mengen konnten im Kern detektiert werden. Nach Zytokininduktion dagegen befindet sich der Großteil der Stat5a Proteine im Kern, und nur noch ein kleiner Anteil kann im Zytoplasma nachgewiesen werden. Das im Nukleus detektierte Stat5a ist zum größten Teil phosphoryliert und zeichnet sich durch ein höheres Molekulargewicht aus (Reihe 3 und 4, 7 und 8, obere Bande der Doppelbande). Es sind auch geringe Mengen von nicht phosphoryliertem Stat5a zu sehen, die sich durch ein geringeres Molekulargewicht ausweisen (untere Bande der Doppelbande). In der WGA-Affinitätschromatographie wurde die 10-fache Menge an Proteinextrakt eingesetzt wie für die Immunpräzipitation von Stat5a, um dieselbe Intensität des Signals zu erhalten. Es konnte Stat5a nur im Kern, nicht aber im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Menge des Stat5a Proteins entspricht hierbei proportional der Menge an Stat5a, das in der Immunpräzipitation nach Zytokinstimulation in den Kern transportiert wurde.

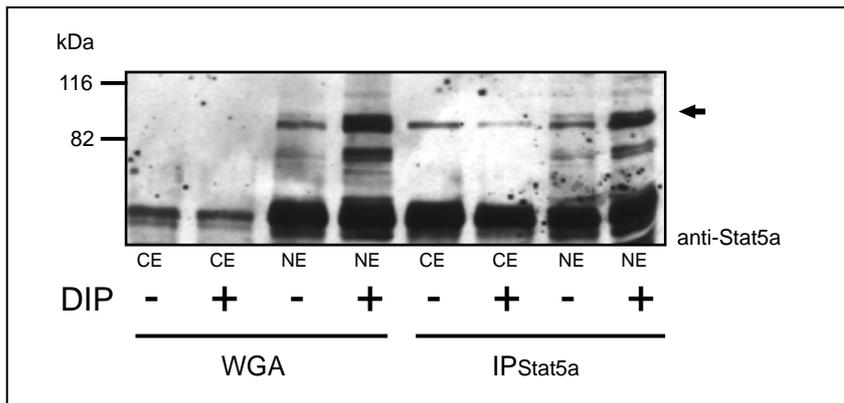


Abbildung 2: Stat5a ist nur im Zellkern nach Zytokinstimulation glykosyliert. Es wurden zytoplasmatische (CE) und nukleäre (NE) Proteinextrakte von Dexamethason, Insulin und Prolaktin (DIP)-stimulierten HC11 Zellen angefertigt und parallel einer WGA-Affinitätschromatographie und einer Stat5a-Immunpräzipitation unterworfen. In der WGA-Affinitätschromatographie wurde fünfmal soviel Proteinextrakt eingesetzt als in der Immunpräzipitation von Stat5a. Die Proteinextrakte wurden im Immunoblot mit einem Stat5a-spezifischen Antikörper getestet.

3.1.3 Untersuchung der anderen Stat-Proteine auf Glykosylierung

Stat1, Stat3, Stat5a, Stat5b und Stat6 weisen eine hohe Homologie zueinander auf, die auf die stammesgeschichtliche Entstehung der Stat Protein zurückzuführen ist (Miyoshi et al., 2001). Der hohe Homologiegrad läßt vermuten, daß auch andere Stat-Proteine außer Stat5a glykosyliert sind. Es wurde hierbei davon ausgegangen, daß eine Glykosylierung anderer Stat-Proteine auch in Zusammenhang mit einer Zytokinstimulation steht. Aus diesem Grund wurden HC11 Zellen mit den jeweils spezifischen Zytokinen stimuliert, um eine Aktivierung der entsprechenden Stat-Proteine zu bewirken: IFN- γ : Stat1, EGF: Stat3, Dexamethason, Insulin und Prolaktin: Stat5b, IL-4: Stat6. Daraufhin wurden von den Zellen Gesamtzellextrakte angefertigt und diese einer WGA-Affinitätschromatographie und einer Immunpräzipitation des jeweiligen Stat-Proteins unterworfen. Für die Lektinchromatographie wurde hier jeweils die 10-fache Menge an Gesamtzellextrakt eingesetzt wie für die Immunpräzipitation. Die Stat Proteine wurden anschließend im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abbildung 3). Hierbei konnte gezeigt werden,

daß sowohl Stat1, Stat3, Stat5b als auch Stat6 nach Zytokinstimulation eine O-GlcNAc Modifikation aufweisen. Die Stärke der Glykosylierung unterscheidet sich hierbei zwischen den verschiedenen Stat-Proteinen.

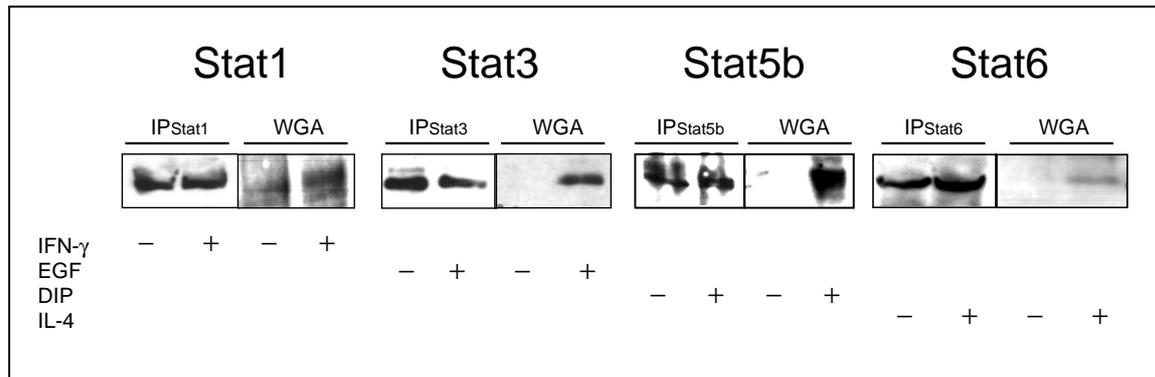


Abbildung 3: O-GlcNAc Modifikation von Stat1, Stat3, Stat5b und Stat6. HC11 Zellen wurden jeweils mit IFN- γ für Stat1, EGF für Stat3, Dexamethason, Insulin und Prolaktin (DIP) für Stat5b, und IL-4 für Stat6 stimuliert und Gesamtzellextrakte angefertigt. Die Proteinextrakte wurden parallel einer WGA-Affinitätschromatographie und einer Immunpräzipitation unterworfen. Im Immunoblot wurde mit dem jeweils spezifischen Antikörper Stat1, Stat3, Stat5b und Stat6 detektiert.

3.1.4 Nachweis der Stat5-Glykosylierung in Krebs- und Leukämiezelllinien

Die Glykosylierung von Proteinen ist abhängig vom Zelltyp und verändert sich in der malignen Transformation von Zellen (Brockhausen, 1999). So können sich die Glykosylierungsstellen, als auch die Intensität der Glykosylierung verändern. Bei vielen Krebserkrankungen liegt Stat5 konstitutiv aktiv vor (Bowman et al., 2000). Das heißt, Stat5 ist permanent Tyrosin-phosphoryliert und zur Transaktivierung befähigt. Beispielhaft wurden die Leukämiezelllinie K562 und die Brustkrebszelllinie SKBR3 auf die O-GlcNAc Modifikation untersucht. K562 Zellen weisen eine BCR/ABL Translokation auf und besitzen somit konstitutiv aktives Stat5 (Grosveld et al., 1986). Von den K562 Zellen wurde ohne Zytokinstimulation Gesamtzellextrakte angefertigt, da diese Zelllinie konstitutiv aktives Stat5 aufweist. Die SKBR3 Zelllinie ist eine Brustkrebszelllinie, die aus einem humanen Adenokarzinom abstammt und dessen

Stat5 mit Prolaktin induzierbar ist (Widschwendter et al., 1999). Die SKBR3 Zellen wurden mit Prolaktin induziert und anschließend Gesamtzellextrakte von den Zellen angefertigt. Der Nachweis der Glykosylierung wurde mittels einer WGA-Affinitätschromatographie erbracht. Parallel wurde ein Teil der Proteinextrakte einer Immunpräzipitation gegen Stat5a unterworfen. Die angereicherten Proteine wurden in einem Immunoblot mit einem spezifischen Stat5a Antikörper nachgewiesen (Abbildung 4). Glykosyliertes Stat5a konnte sowohl in K562 Zellen, als auch in SKBR3 Zellen mit und ohne Zytokinstimulation nachgewiesen werden.

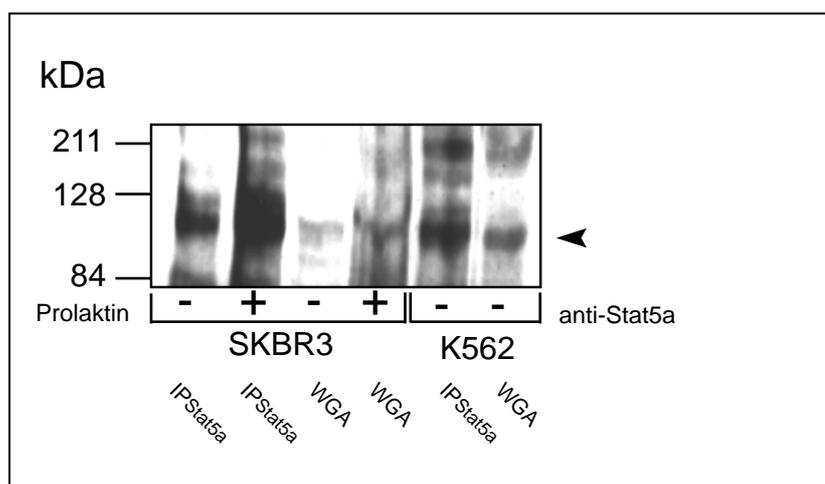


Abbildung 4: Stat5-Glykosylierung in der Krebszelllinie SKBR3 und der Leukämiezelllinie K562. SKBR3 Zellen wurden mit Prolaktin stimuliert und Gesamtzellextrakte angefertigt. K562 Zellen besitzen konstitutiv aktives Stat5 und wurden vor der Ernte nicht stimuliert. Die Proteinextrakte wurden parallel einer WGA-Affinitätschromatographie und einer Stat5a-Immunpräzipitation unterworfen. Im Immunoblot wurden die Proteinextrakte mit einem Stat5a-spezifischen Antikörper getestet.

3.2 Expression von Stat5a und Jak2 mit dem Baculovirus-System

3.2.1 Rekombinante Expression von phosphoryliertem Stat5a in Sf9 Insektenzellen

In der Zelle liegt Stat5 als nicht phosphorylierter latenter Transkriptionsfaktor vor. Erst nach Zytokinstimulation der Zellen wird Stat5 durch Rezeptor-assoziierte Jak2-Kinasen am Tyrosinrest 694 phosphoryliert. Für die folgenden Experimente wurden hohe Mengen an phosphoryliertem Stat5a benötigt, das die O-GlcNAc Modifikation trägt. Als Expressionssystem werden hier Insektenzellen gewählt, da sie Proteine annähernd identisch zu Säugetierzellen modifizieren können (Brockhausen, 1999), (Cheng et al., 2000). Um aktives, rekombinantes Stat5 zu erhalten, wurden Sf9 Insektenzellen mit Stat5a- und Jak2-Baculoviren koinfiziert. Der für Jak2 kodierende Baculovirus wurde freundlicherweise von O. Silvenoinen (Tampere, Finnland) zur Verfügung gestellt. Der für Stat5a und Stat5b kodierende Baculovirus wurde von C. Beisenherz-Huss kloniert und zur Verfügung gestellt (Beisenherz-Huss et al., 2001). Als ideale *moi* (multiplicity of infection) für die Infektion der Insektenzelllinie Sf9 mit Baculoviren wurden 10 pfu (plaque forming unit)/Zelle festgesetzt. 3 Tage nach der Koinfektion mit Jak2- und Stat5a-Baculoviren wurden die Insektenzellen geerntet und zytoplasmatische Extrakte angefertigt. Die erfolgte Expression von rekombinatem, phosphoryliertem Stat5a wurde in einem Immunoblot mit einem Antikörper spezifisch gegen phosphoryliertes Stat5 gerichtet nachgewiesen (Abbildung 5a). Als Negativkontrolle wurde Zellextrakt von nicht infizierten Sf9 Insektenzellen eingesetzt. Im Immunoblot ist eine deutliche Bande in der Größe von phosphoryliertem Stat5 zu sehen. In der Negativkontrolle konnte kein phosphoryliertes Stat5a detektiert werden.

3.2.2 *In vitro* DNA Bindung von rekombinanten Stat5a in Gelretardierungsexperimenten

Sowohl in *Drosophila* als auch in Sf9 *Spodoptera frugiperda*-Zellen wird die Existenz von Stat-Proteinen, bzw. Stat-ähnlichen Proteinen beschrieben, die an Stat5 DNA-RE (response elements) binden können (Sliva and Haldosen, 1996) (Yan et al., 1996). Dieses Stat Homolog konnte nur im Kern der *Spodoptera frugiperda*-Zellen, nicht aber im Zytoplasma nachgewiesen werden. Um eine Interferenz des Insekten-Stats mit dem rekombinant exprimierten Stat5 Protein zu vermeiden, wurde von den Sf9 Insektenzellen eine zytoplasmatische Lyse angefertigt, die kein endogenes Insekten-Stat Protein enthält (persönliche Mitteilung Christian Beisenherz-Huss). Extrakt aus nicht infizierten Zellen wurde hierfür als Negativkontrolle in den Experimenten eingesetzt. In Gelretardierungsexperimenten sollte die DNA-Bindung und somit die Funktionalität des exprimierten rekombinanten Stat5 an den β -Casein Promotor (DNA-Oligomer) untersucht werden. Die Protein-DNA Komplexe migrieren in einem nativen Gel langsamer als die Oligomere alleine ("bandshift"). Der β -Casein-Oligomer wurde für das Experiment radioaktiv mit γ -ATP markiert und die Protein-DNA Bindung in einer Autoradiographie detektiert (Abbildung 5c, Spur 6). Der β -Casein Oligomer-Proteinkomplex wurde durch 100-fache Zugabe von nicht markierten Oligomer kompetitiv verdrängt. In einer weiteren Negativkontrolle wurde Lysat von nicht infizierten Insektenzellen eingesetzt (Abbildung 5c, Spur 4). Hier konnte eine schwache DNA-Bindung beobachtet werden. Die Spezifität der Protein-DNA-Bindung kann durch Zugabe eines Antikörpers gerichtet gegen das Oligomer-bindende Protein gezeigt werden.

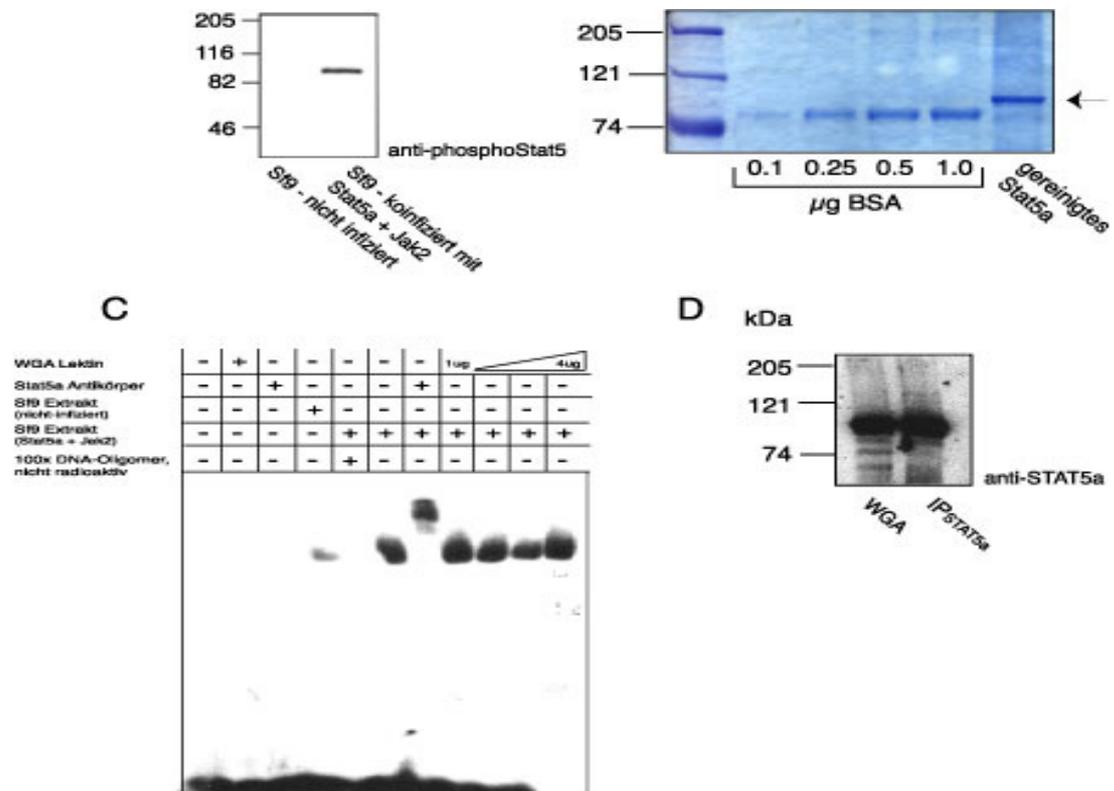


Abbildung 5: In Sf9 Zellen rekombinant exprimiertes und aktiviertes Stat5a ist O-GlcNAc modifiziert und kann in den β -Casein DNA-Oligomer in Gelretardierungsexperimenten binden. Sf9 Zellen wurden mit Stat5a- und Jak2-Baculoviren koinfiziert und nach 3 Tagen geerntet. (A) Zellextrakte wurden im Immunoblot mit einem Phospho-Stat5 Antikörper untersucht. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt von nicht infizierten Sf9 Zellen eingesetzt. (B) Reinigung von rekombinantem Stat5a. Rekombinantes und aktiviertes Stat5a aus Insektenzellen wurde mittels einer Stat5a-Antikörpersäule aufgereinigt und nativ eluiert. Ein Teil des Eluats wurde in einem SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Als Standard wurde 0.1 bis 1.0 μ g BSA eingesetzt. (C) Bindung von rekombinantem Stat5a an das β -Casein Oligomer. Zytoplasmatische Extrakte aus Stat5a und Jak2 koinfizierten Sf9 Zellen wurden in Gelretardationsexperimenten mit [γ - 32 P] markiertem β -Casein Oligomer eingesetzt. Supershiftuntersuchungen wurden mit Stat5a spezifischem Antikörper und WGA-Lektin durchgeführt. (D) Nachweis der O-GlcNAc Modifikation von rekombinantem Stat5a. Zellextrakte von koinfizierten Insektenzellen wurden parallel einer WGA-Affinitätschromatographie und einer Stat5a-Immunpräzipitation unterworfen. Die Zellextrakte wurden im Immunoblot mit einem spezifischen Stat5a-Antikörper analysiert.

Dies führt zur Bildung von Komplexen bestehend aus Antikörper, Stat5 und DNA-Oligomer, die im Gel langsamer wandern als Komplexe bestehend aus Stat5 und DNA-Oligomer und werden als "Supershift" bezeichnet. Rekombinantes Stat5a ergibt mit einem gegen den Karboxylterminus gerichteten Antikörper (rabbit anti-Maus Stat5a, Zymed) einen Supershift. Desweiteren sollte untersucht werden, ob glykosyliertes Stat5 den DNA-Oligomer *in vitro* binden kann. Hierzu wurden Supershift-Experimente mit dem WGA-Lektin durchgeführt. Eine steigende Konzentration von Lektin (1-4 µg) wurde hierfür in der DNA-Bindungsreaktion an Stelle eines spezifischen Antikörpers eingesetzt. Der erwartete Supershift des DNA-Protein-Stat5a-Antikörper Komplexes konnte mit dem WGA-Lektin nicht gezeigt werden.

3.2.3 Reinigung von rekombinatem Stat5a

In den folgenden Experimenten wurden große Mengen an aufgereinigtem, glykosyliertem und phosphoryliertem Stat5a in einem relativ kleinen Volumen benötigt. Um dies zu erreichen, wurde eine Antikörpersäule hergestellt und rekombinant exprimiertes Stat5 Protein mit einer Affinitätschromatographie anhand einer Immunoaffinitätsäule aufgereinigt. Der Immunoaffinitätschromatographie liegt das Prinzip der Immunpräzipitation zu Grunde. Hierfür wurde der Stat5a-Antikörper an Sepharose A-Kügelchen chemisch gekoppelt. Die Stat5a Proteine wurden nach Inkubation des Stat5a-enhaltenden Proteinextrakts mit der Säule nativ mit Glycin und niedrigem pH eluiert. Ein Teil des aufgereinigten Stat5a Proteins wurde anschließend in einem SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine mit Coomassie angefärbt (Abbildung 5b). Als quantitativer Standard wurde BSA verwendet, um die Gesamtproteinmenge von Stat5a im Eluat bestimmen zu können. Im Coomassie-gefärbten Gel ist eine Bande mit dem Molekulargewicht von 92 kDa, das phosphoryliertem Stat5 entspricht, zu sehen. Die Gesamtproteinmenge, die nach Aufreinigung einer 300 ml Flüssigkultur erhalten wurde, betrug 30µg Stat5a.

3.2.4 Nachweis der Glykosylierung von rekombinantem Stat5a aus Insektenzellen

Um sekundäre Modifikationen an Proteinen untersuchen zu können und um hohe Proteinmengen zu erhalten, ist das Insektenexpressionssystem das System der Wahl, da Insektenzellen Proteine annähernd identisch zu Säugetierzellen modifizieren können. Für die dynamische O-GlcNAc Modifikation wurde in früheren Publikationen gezeigt, daß die Glykosylierung exakt an denselben Stellen stattfindet (Greis et al., 1994) (Reason et al., 1992).

Um die erfolgte Glykosylierung des rekombinant exprimierten Stat5 zu zeigen, wurde eine Lektin-Affinitätschromatographie mit dem Weizenkeimagglutinin-Lektin durchgeführt. Parallel hierzu wurde der Stat5a-Gehalt mit Hilfe einer gegen Stat5a gerichteten Immunpräzipitation untersucht. In der Lektin-Affinitätschromatographie wurde 10-fach soviel Proteinextrakt eingesetzt als in der Immunpräzipitation. Die angereicherten Proteine wurden in einem SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt und im Immunoblot Stat5a detektiert (Abbildung 5d). Es ist nachweislich glykosyliertes Stat5a in der Lektin-Affinitätschromatographie zu erkennen. Dadurch, daß 10-fach mehr Proteinextrakt in der Lektin-Affinitätschromatographie als in der Immunpräzipitation eingesetzt wurde, kann die Menge an glykosyliertem Stat5a im Lysat abschätzen. Die Signale im Immunoblot für Stat5a sind in der Stat5a-angereicherten Fraktion wie in der angereicherten, glykosylierten Fraktion etwa gleich stark. Das rekombinant exprimierte Stat5a Protein soll später in der Analyse der Glykosylierungsstelle mittels Massenspektrometrie und für Ko-Immunoaffinitätschromatographien eingesetzt werden.

3.3 *In vitro* DNA-Bindung von glykosyliertem, rekombinantem Stat5a im ABCD-Assay

Der Einfluß der Glykosylierung von rekombinantem Stat5a auf die DNA-Bindung an den β -Casein Oligomer wurde im ABCD (avidin-biotin complex DNA-binding assay)-Assay untersucht. In Gelretardierungsexperimenten (Punkt 3.2.2) konnte kein Supershift mit dem WGA-Lektin gezeigt werden. Um größere Mengen an rekombinant exprimierten Stat5-Proteins einsetzen zu können, und um die Protein-DNA Bindung unter weniger stringenten Bedingungen testen zu können, wurde ein ABCD-Assay durchgeführt. Hierfür wurde glykosyliertes Stat5a von dem nicht glykosylierten Stat5a mit Hilfe einer Lektin-Affinitätschromatographie getrennt. Der Überstand der Lektin-Affinitätschromatographie enthielt überwiegend nicht glykosyliertes Stat5a und wurde als nicht glykosylierte Stat5a-Fraktion definiert. Das an das Lektin gebundene Stat5a-Protein wurde nativ mit einer 1M N-Acetylglukosamin-Lösung eluiert und als glykosylierte Stat5a-Fraktion definiert. Im ABCD-Assay wurde an Stelle eines radioaktiv markierten β -Casein Oligomers ein biotinyliertes β -Casein Oligomer eingesetzt, das zusammen mit den daran gebundenen Proteinen mittels Streptavidin-gekoppelter Kügelchen isoliert werden kann. Die an das β -Casein Oligomer gebundenen Proteine werden anschließend in einem denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und Stat5a im Immunoblot detektiert (Abbildung 6). Als Negativkontrolle für die unspezifische Bindung von Stat5 an die Streptavidin-gekoppelten Kügelchen wurde Proteinextrakt und Streptavidin-Kügelchen ohne β -Casein Oligomer eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle zur unspezifischen Oligomerbindung von nicht phosphoryliertem Stat5a durchgeführt. Hierbei konnte keine unspezifische Bindung von nicht aktiviertem Stat5a an den β -Casein Oligomer gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Jeweils 50% des für das Experiment verwendeten Proteinextraktes wurde im SDS-PAGE aufgetragen, um die Verwendung gleicher Mengen an Stat5a zu belegen. In dem Immunoblot gegen Stat5a konnte DNA-Bindung sowohl von nicht glykosyliertem als auch von glykosyliertem Stat5a gezeigt werden.

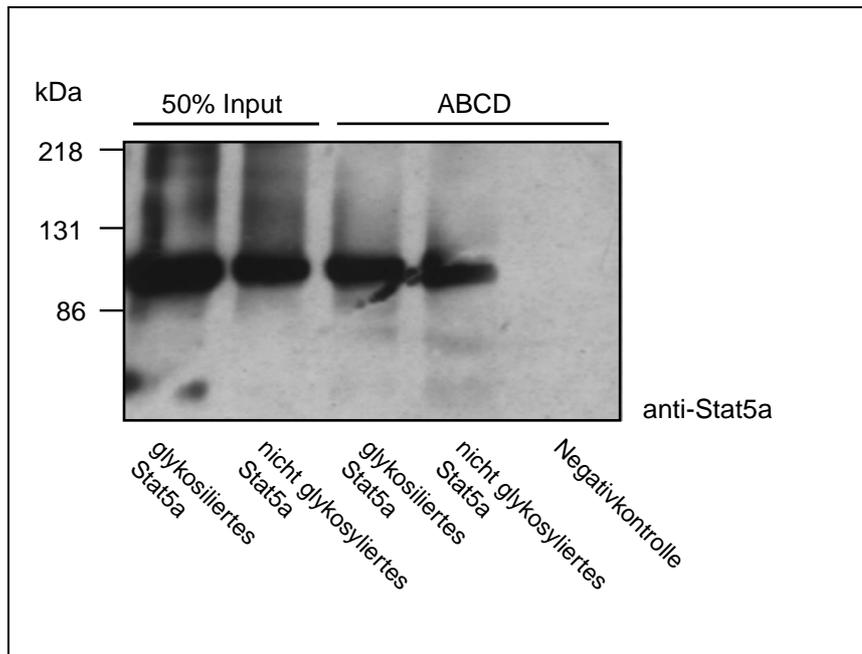


Abbildung 6: Rekombinantes, glykosyliertes Stat5a bindet DNA *in vitro*. Rekombinantes, aktiviertes Stat5a aus Insektenzellen wurde mittels einer WGA-Affinitätschromatographie in eine glykosylierte Stat5a-Fraktion und in eine nicht glykosylierte Stat5a-Fraktion aufgeteilt. Die an den biotinylierten β -Casein Oligomer gebundenen Proteine wurden mit Streptavidin-Kügelchen isoliert und im Immunoblot Stat5a detektiert. In der Negativkontrolle wurde Proteinextrakt und Streptavidin-Kügelchen ohne DNA-Oligomer eingesetzt.

3.4 Identifizierung der spezifischen Glykosylierungsstelle von Stat5a

3.4.1 Markieren der Stat5a-Glykosylierungsstelle mittels Galaktosyltransferase Assays

Da die Identifizierung der genauen Glykosylierungsstelle Rückschlüsse auf die mögliche Funktion der Glykosylierung bei Stat5a zulässt, wurde das Stat5a Protein einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Für die massenspektrometrische Analyse der Glykosylierungsstellen von Stat5a wurde phosphoryliertes Stat5a im Sf9 Insektenexpressionssystem überexprimiert. Die Lysate mit dem rekombinant exprimierten Stat5a wurden anschließend mit einer Stat5a-Immunoaffinitätssäule aufgereinigt, nativ eluiert und glykosyliertes Stat5a mit einer WGA-

Affinitätschromatographie angereichert. Um die glykosylierten Peptide nach dem tryptischen Verdau in der RP-HPLC von den nicht glykosylierten trennen zu können, wurden das aufgereinigte Stat5a an den O-GlcNAc Zuckerresten in einem *in vitro* Galaktosyltransferase-Assay radioaktiv markiert. In dieser Enzymreaktion werden endständige GlcNAc-Zuckerreste mit einer Tritium-markierten Galaktose durch die Galaktosyltransferase verknüpft. Als Positivkontrolle für die Markierungsreaktion wurde das Protein Ovalbumin verwendet. Ovalbumin besitzt viele Zuckerketten mit endständigen GlcNAc-Zuckern. Anschließend wurde nicht radioaktive ("kalte") UDP-Galaktose und zusätzliches Galaktosyltransferase Enzym der Reaktion zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser Vorgang, "cold dilution" genannt, ist wichtig, um die Markierungsreaktion zu vervollständigen. Nur wenn der größte Teil der modifizierten Peptide markiert vorliegt, kann die O-GlcNAc Modifikation im Massenspektrum identifiziert werden. Die markierte Proteinlösung wurde anschließend in einer Sephadex-Säule nach Molekulargewicht fraktioniert, um die nicht inkooperierte Radioaktivität von dem markierten Proteinen zu trennen. Die einzelnen Fraktionen wurden im Szintillationsmeßgerät auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht, und die Fraktionen, die markiertes Protein enthielten, lyophilisiert. Ein kleiner Teil der Markierungsreaktion wurde in einem SDS-PAGE aufgetragen, um die Effizienz der Markierungsreaktion mittels einer Autoradiographie analysiert (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Auftrennung der tryptischen Stat5a-Peptide mittels reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Das mit radioaktiver Galaktose markierte Stat5a Protein wurde nach der Markierungsreaktion mit Trypsin verdaut. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das hochspezifisch Polypeptide auf der Karboxylseite von Arginin- und Lysinresten

hydrolysiert. Die so verdauten Proteine wurden anschließend in einer RP-HPLC (reverse phase-high pressure liquid chromatography) in einem ansteigenden Azetonitril-Gradienten (0-50% Acetonitril) nach Hydrophobizität aufgetrennt. Die Peptide absorbieren bei 620 nm und können somit chromatographisch erfaßt werden. Das erhaltene HPLC-Chromatogramm wurde dann mit einem Trypsin-Enzym-Leerwert (Selbstverdau des Trypsins) verglichen, um die Effizienz des Trypsinverdaus einschätzen zu können. Ein Beispiel eines solchen HPLC-Chromatogramms ist in Abbildung 6 zu sehen. Es sind deutlich die Peptidsignale, die von dem verdauten Stat5a stammen, von den Peptidsignalen des Selbstverdaus des Trypsin-Enzyms zu unterscheiden. Die einzelnen Fraktionen dieses RP-HPLC Laufs sind anschließend in einem Szintillationsmeßgerät auf Radioaktivitätsgehalt überprüft worden, die Radioaktivität-enthaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert und im Massenspektrum auf O-GlcNAc modifizierte Peptide analysiert.

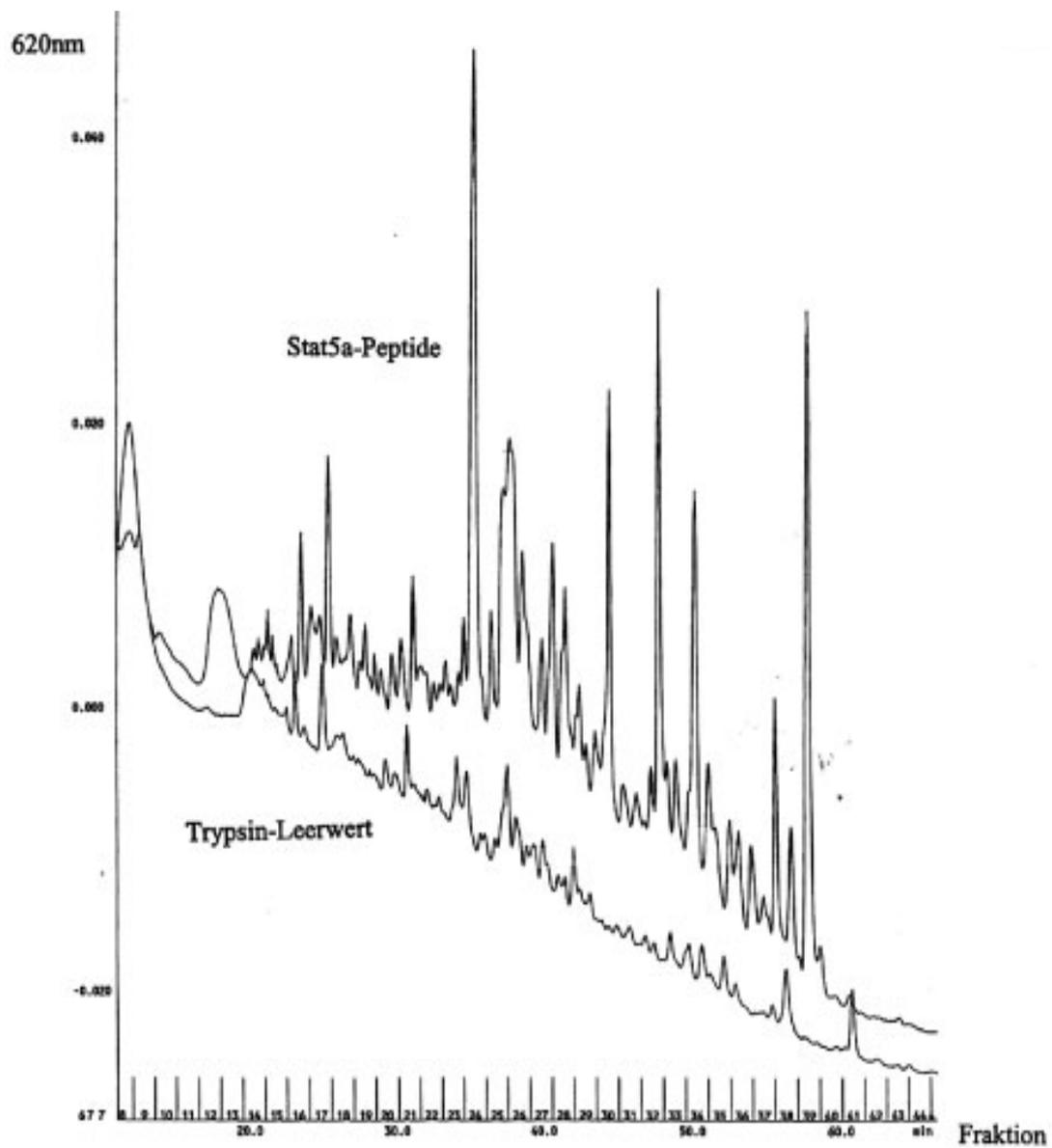


Abbildung 7: Auftrennung tryptischer Peptide von Stat5a in der RP-HPLC. In einer Galaktosyltransferase-Reaktion markiertes aufgereinigtes Stat5a wurde mit Trypsin verdaut und die tryptischen Peptide in einer RP-HPLC mit einem steigenden Acetonitril-Gradienten nach Hydrophobizität aufgetrennt. Das erhaltene Chromatogramm (gemessen bei 620nm) wurde mit dem Lauf des Trypsin-Leerwertes verglichen. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht, und die radioaktiven Peptidfraktionen im Massenspektrum auf modifizierte Peptide untersucht.

3.4.3 Detektion der Glykosylierungsstelle von Stat5a in der massenspektrometrischen Analyse

Die Radioaktivität-enthaltenen RP-HPLC Fraktionen wurden hier in einem Voyager MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) analysiert. Als Matrix zum Auftragen der Peptid-Proben auf den Platinträger wurde α -Cyano-4-Hydroxycinnamsäure (α CHCA) verwendet. Das Massenspektrometer wurde vor Gebrauch mit einer definierten Peptidmischung intern geeicht. Die mit dem Laser unter Vakuum beschossene Stat5a-Peptidprobe zeigte ein spezifisches "Peak"-Muster das in Abbildung 8 zu sehen ist. Die erhaltenen Massen wurden anschließend mit dem Computerprogramm Expasy/FindMod mit den potentiell möglichen Peptidmassen von Stat5a nach einem Trypsinverdau verglichen. Das Computerprogramm analysierte zudem die erhaltenen Peptidmassen, die nicht mit den möglichen Peptidmassen von Stat5a übereinstimmten auf potentielle sekundäre Modifikationen. Auf diesem Weg wurde ein tryptisches Peptid mit der Masse von 2873.4217 erhalten. Dieses Peptid entspricht der Aminosäuresequenz LGHYATQLQNTYDRCPMELVR (aa 87 bis aa 107), und enthält zwei potentielle Glykosylierungsstellen: Threonin 92 und Threonin 97.

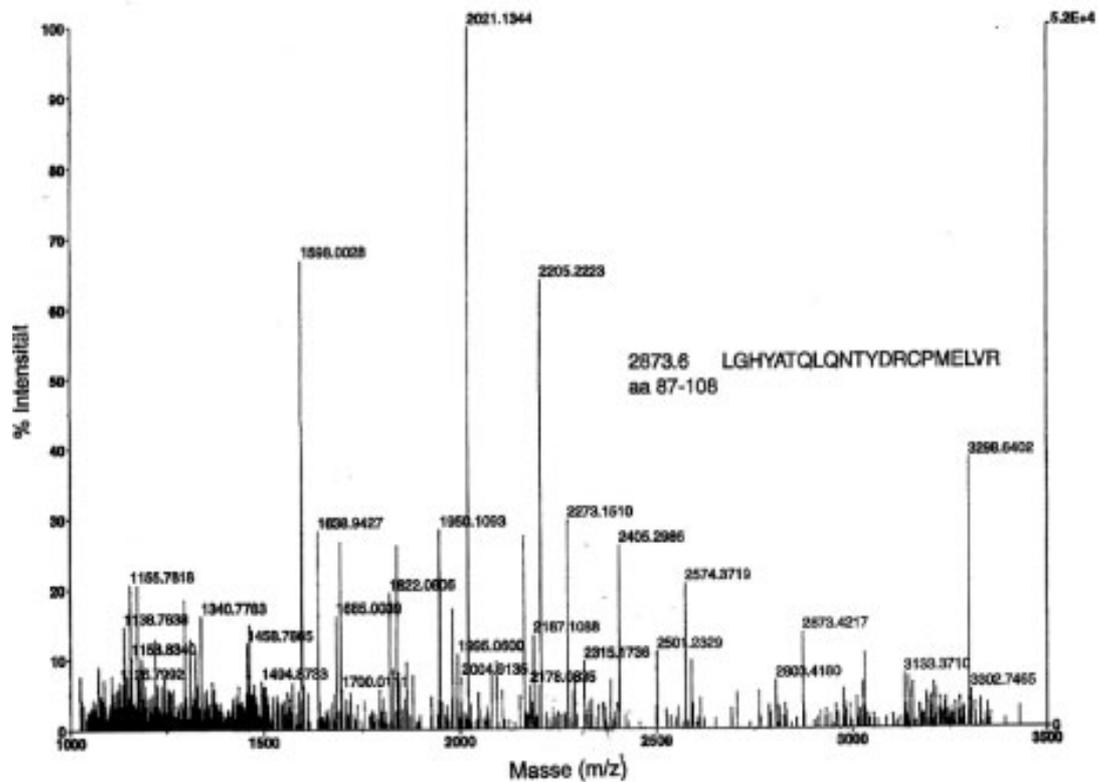


Abbildung 8: Massenspektrometrische Analyse der tryptischen Peptide von Stat5a und Identifizierung eines O-GlcNAc-modifizierten Peptids. Radioaktiv markierte Peptide von aufgereinigtem Stat5a wurden einer massenspektrometrischen Analyse im MALDI unterzogen. Hier wurde die Fraktion Nr.14 des RP-HPLC analysiert. Die erhaltenen Massen der einzelnen Peptide wurden in dem Computerprogramm Expsy/FindMod auf eine O-GlcNAc-Modifikation analysiert. Dargestellt ist ein Stat5a-Peptid, das zwei potentielle Glykosylierungsstellen enthält.

3.5 Charakterisierung der Funktionalität der Stat5a-Glykosylierung

3.5.1 Untersuchung des Einflusses des spezifischen O-GlcNAcase Inhibitors PUGNAc und Glc/GlcN auf den Glykosylierungsgrad von Stat5a

Um den Einfluß der Glykosylierung von Stat5a auf den Kerntransport untersuchen zu können, wurde die Maus-Mammaepithelialzelllinie HC11 mit verschiedenen Inhibitoren der O-GlcNAcase und mit Zuckervorstufen kultiviert.

PUGNAc (O-(acetymido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)amino-N-phenylcarbamid, CarboChem, Zürich) ist ein potenter Inhibitor des O-GlcNAc entfernenden Enzyms O-GlcNAcase (Haltiwanger et al., 1998). Durch das Blockieren der O-GlcNAcase Aktivität ergibt sich eine Verstärkung der Glykosylierung von zytosolischen und nukleären Proteinen. Eine Verstärkung des Glykosylierungsgrades kann auch mit der Zugabe von Glukose (Glc) und Glukosamin (GlcN) in das Zellkulturmedium erreicht werden (Hanover et al., 1999). Dies führt zur verstärkten Bildung von aktivierten Zuckern (UDP-Glc/UDP-GlcNAc) und somit zu einer stärkeren Glykosylierung der Proteine. Zunächst wurde untersucht, ob die Maus Mammaepithelialzelllinie HC11 sensitiv gegenüber einer PUGNAc- oder Glc/GlcN-Behandlung ist. Die mit Glc/GlcN oder PUGNAc behandelten HC11 Zellen wurden mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin induziert und anschließend zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte angefertigt. In einem SDS-PAGE wurden gleiche Mengen an Kernproteinextrakten eingesetzt und im Immunoblot die glykosylierten Kernproteine mit dem RL-2 Antikörper detektiert (Abbildung 9a). Der RL-2 Antikörper erkennt Proteine mit endständigen N-Acetylglukosaminresten (Sayeski and Kudlow, 1996). Er erkennt hierbei nur einen Teil der GlcNAc-modifizierten Proteine, da dessen Epitop zu dem O-GlcNAc Zuckerrest eine kurze Aminosäuresequenz beinhaltet, die als Erkennungsmotif zusätzlich zu dem O-GlcNAc für die Transferase gilt. Nur die Hälfte aller O-GlcNAc modifizierten Proteine beinhalten diese Sequenz an der

Glykosylierungsstelle, so daß nur diese von dem Antikörper erkannt werden. Stat5 kann von diesem Antikörper nicht erkannt werden (Daten nicht gezeigt). In den Kernextrakten der Glc/GlcN- oder PUGNAc-behandelten Zellen ist ein 2-facher Anstieg des allgemeinen Glykosylierungsgrades der Proteine im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu erkennen (Abbildung 9a).

Aufgrund dieser Beobachtung, daß der allgemeine Glykosylierungsgrad von Proteinen nach Glc/GlcN- oder PUGNAc-Behandlung gesteigert werden konnte, sollte erwartet werden, daß auch Stat5a vermehrt glykosyliert wird. Dazu wurden Glc/GlcN- und PUGNAc-behandelte HC11-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin stimuliert, Gesamtzellextrakte angefertigt und die Proteinextrakte einer WGA-Affinitätschromatographie unterworfen. Die aufgereinigten Proteine wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot Stat5a detektiert (Abbildung 9b). Stat5a zeigte hier einen starken Anstieg der Glykosylierung gegenüber unbehandelten Zellen, die den normalen Glykosylierungsgrad von Stat5a widerspiegeln.

3.5.2 Einfluß der Glykosylierung auf die Kerntranslokation von Stat5a

Bereits publizierte Daten belegen, daß die Funktion und die subzelluläre Verteilung der O-GlcNAc modifizierten Proteine auf eine wichtige Rolle in der Koordination verschiedenster Zellantworten auf einen Stimulus deutet. So verändert sich der Glykosylierungsgrad der modifizierten Proteine als Antwort auf verschiedene Stimuli (Wells et al., 2001). Für die Stat-Proteine wurde zusätzlich zu ihrer Rolle in der normalen Signaltransduktion gezeigt, daß Onkoproteine spezifische Stat Proteine, insbesondere Stat3 und Stat5, aktivieren können. Konstitutiv-aktive Stat Proteine können so direkt zur Onkogenese beitragen (Bowman et al., 2000). Einige Hinweise sprechen für eine Einfluß der O-GlcNAc Modifikation im Kerntransport von

Proteinen. So wurde artifiziell glykosyliertes BSA in den Kern transportiert, dagegen verbleibt nicht glykosyliertes BSA im Zytoplasma (Duverger et al., 1996). Das Kernporenprotein p62 spielt eine wichtige Rolle im Kerntransport von Proteinen und in der Zusammensetzung und Auflösung des Kernporenkomplexes (Lubas et al., 1995). Hier sollte ein möglicher Zusammenhang der O-GlcNAc Modifikation von Stat5a und dessen Kerntransport nach Zytokinstimulation untersucht werden.

Es wurde gezeigt, daß die Behandlung von HC11 Zellen mit den Zuckervorstufen von N-Acetylglukosamin (GlcNAc), Glukose (Glc) und Glukosamine (GlcN), eine Verstärkung der Stat5-Glykosylierung bewirkt (Abbildung 9). Um das Kernlokalisationsverhalten von Stat5a untersuchen zu können, wurden HC11-Zellen für 16 Stunden mit Glukose und Glukosamin behandelt, und anschließend mit Prolaktin, Dexamethason und Insulin (DIP) stimuliert. Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von Stat5a wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert. Stat5a wurde mit einem zweiten Antikörper rot gefärbt, und der Kern der untersuchten Zellen mit DAPI sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop wurde der Kerntransport von Stat5a in DIP-stimulierten und nicht stimulierten HC11-Zellen verglichen., wobei die Kernfärbung mit DAPI die Identifizierung der Stat5a-Lokalisation erleichterte.

Im Vergleich zeigten Glc/GlcN-behandelte und nicht behandelte HC11-Zellen keinen Unterschied im Kerntranslokationsverhalten von Stat5a (Abbildung 9c). Ein verstärkter Kerntransport von Stat5a nach Glc/GlcN-Behandlung konnte nicht beobachtet werden. Nukleär vorkommendes Stat5a scheint hierbei nicht gleichmäßig über den ganzen Zellkern verbreitet zu sein, sondern ist verstärkt am Zellkernrand angereichert. Die Negativkontrolle, in der nur der zweite Antikörper verwendet wurde, zeigte nur eine schwache unspezifische Färbung der Zellen. Die Glykosylierung von Stat5a scheint somit nicht dessen Translokation in den Kern zu beeinflussen.

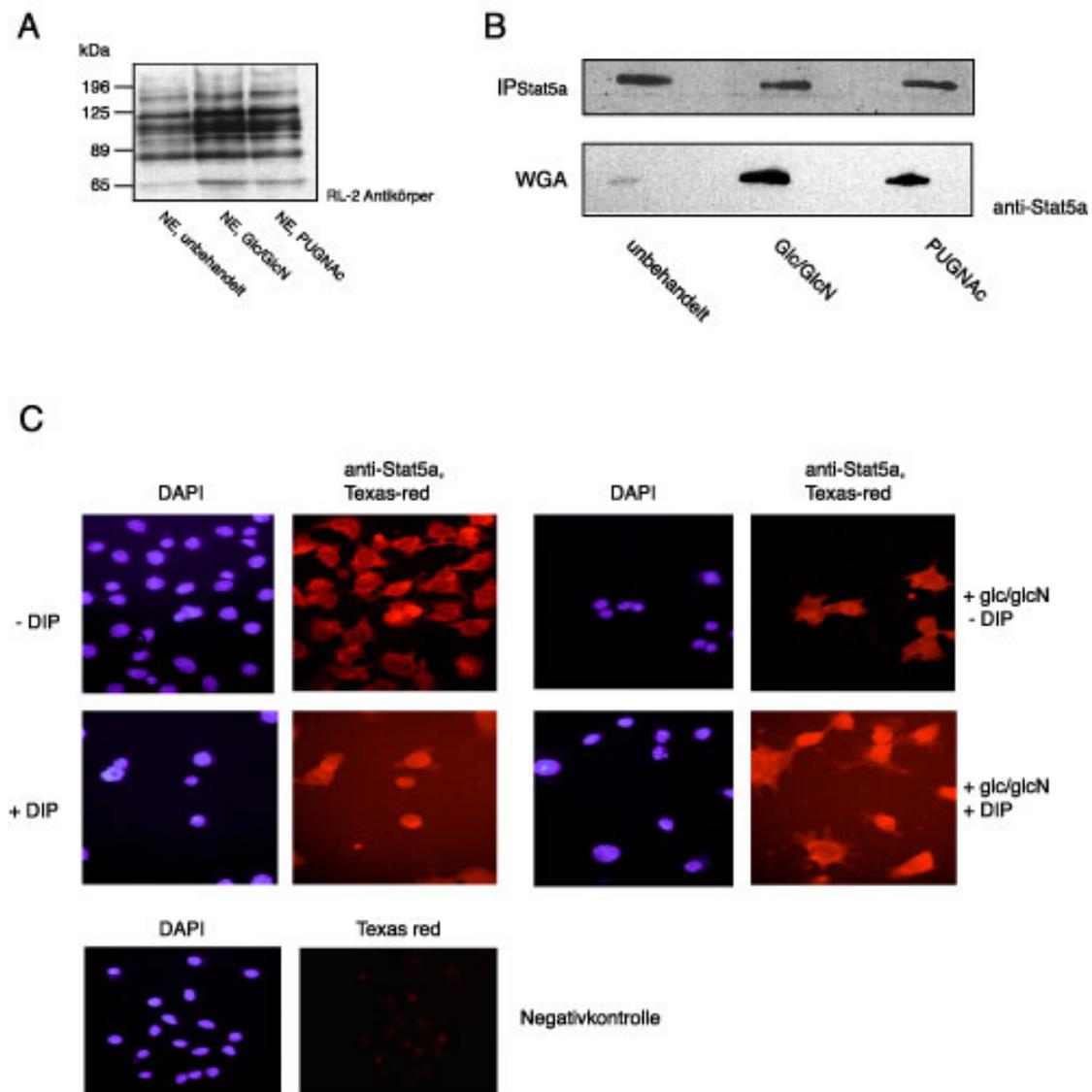


Abbildung 9: Anstieg der Stat5a-Glykosylierung nach PUGNac- und Glukose/Glukosamin-Behandlung von HC11 Zellen. HC11 Zellen wurden mit PUGNac oder Glc/GlcN behandelt, mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin stimuliert, und Proteinextrakte angefertigt. Zellextrakte wurden in Immunoblots analysiert. (A) Immunoblot von nukleären Proteinextrakten (NE) mit dem GlcNac spezifischen RL-2 Antikörper. (B) Gesamtproteinextrakte wurden parallel einer WGA-Affinitätschromatographie und einer Stat5a-Immünpräzipitation unterworfen, und im Immunoblot Stat5a detektiert. (C) Immunfluoreszenz von Glc/GlcN-behandelten HC11 Zellen nach Stimulation mit Dexamethason, Insulin und Prolaktin (DIP). Der Nukleus ist in blau (DAPI) und Stat5a in rot (Rhodamin) dargestellt.

3.5.3 Einfluß der Streptozotocin-Behandlung von HC11-Zellen auf den Glykosylierungsgrad nukleärer Proteine

Streptozotocin (STZ) ist bekannt durch Studien an beta-Zellen in den Langerhans'schen-Inseln im Pankreas (Konrad et al., 2001), (Liu et al., 2000). Durch Behandlung der Zellen, bzw. von Tieren mit STZ kann Diabetes Typ II (Insulinresistenz) in den beta-Zellen induziert werden. Streptozotocin ist ein GlcNAc-Analog und blockiert spezifisch das die O-GlcNAc Modifikationen entfernende Enzym, die O-GlcNAcase. Die O-Verknüpfung zwischen dem Zucker GlcNAc und der Hydroxylgruppe von Serinen oder Threoninen wird zudem permanent verknüpft, so daß der Zucker nicht mehr durch die O-GlcNAcase entfernt werden kann. Dies hat zur Folge, daß der Glykosylierungsstatus der Proteine permanent erhöht ist. HC11 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen Streptozotocin in einem Zeitraum von 4, 8 und 16 Stunden behandelt. Anschließend wurden Kernextrakte angefertigt und gleiche Proteinmengen im SDS-PAGE geladen. Im Immunoblot wurden die mit GlcNAc-modifizierten Proteine mit dem RL-2 Antikörper detektiert. Hier kann man einen leichten Anstieg der Proteinglykosylierung nach 4 Stunden Behandlung mit 1.5×10^{-5} g/ml Streptozotocin erkennen. Eine höhere Konzentration von Streptozotocin zeigt keinen weiteren Effekt bei 4 stündiger Inkubation. Ein weiterer Anstieg der Proteinglykosylierung zeigte sich nach 8 Stunden Inkubation mit 4.5×10^{-5} g/ml Streptozotocin, die mit einer längeren Inkubation der Zellen mit Streptozotocin noch weiter gesteigert werden konnte. Streptozotocin zeigte in diesen Experimenten einen stärkeren Effekt auf den allgemeinen Glykosylierungsstatus von Kernproteinen, als eine PUGNAc- und Glc/GlcN-Behandlung von HC11 Zellen.

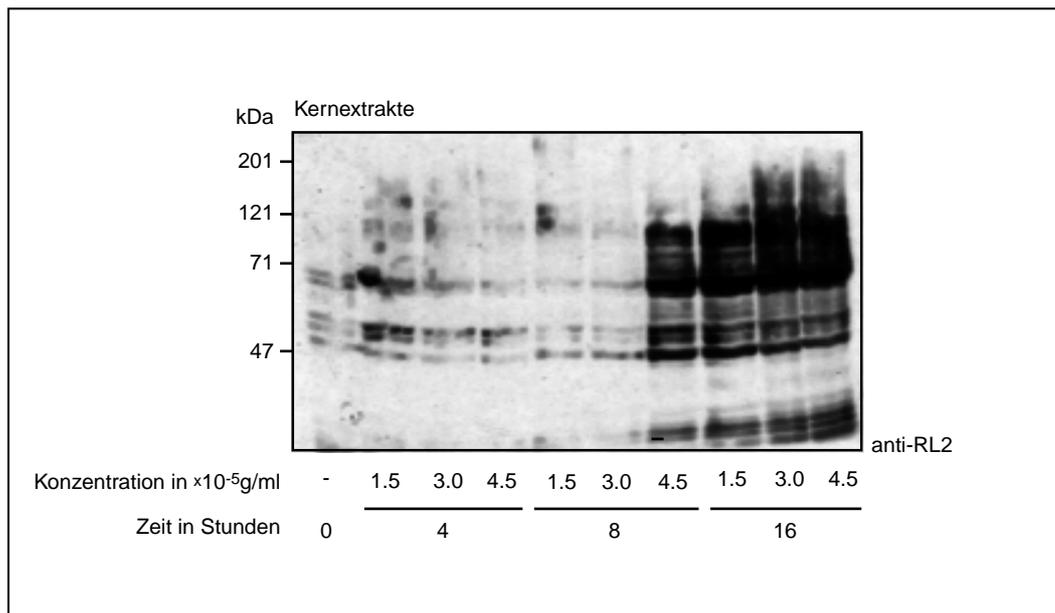


Abbildung 10: Anstieg der allgemeinen Proteinglykosylierung nach Streptozotocin-Behandlung von HC11-Zellen. HC11 Zellen wurden mit den Konzentrationen 1.5, 3.0 und 4.5×10^{-5} g/ml für 0, 4, 8, 16 Stunden mit Streptocotozin behandelt und Kernextrakte angefertigt. Im Immunoblot wurden Proteine mit terminalen GlcNAc-Zuckerresten mit dem RL-2 Antikörper detektiert.

3.6 Untersuchung der Wechselwirkung von glykosyliertem Stat5a mit dem Glukokortikoid Rezeptor

Eine weitere Untersuchung der Funktionalität der Stat5a Glykosylierung analysiert den Einfluß der Glykosylierung auf die Interaktion mit bekannten Stat5a Intraaktionspartnern wie den Glukokortikoid Rezeptor (GR). Prolaktin, Insulin und Glukokortikoide kooperieren in der Regulation der Transkription von Milchproteingenen. Der Glukokortikoid Rezeptor bindet dabei nicht nur in der Promotorregion des β -Casein Gens, sondern ist auch ein bekannter Koaktivator von Stat5. Durch die Interaktion mit dem Stat5 Protein wird die Stat5-abhängige Transkription durch den synergistisch Effekt des GR verstärkt (Stoecklin et al., 1997), (Stocklin et al., 1996). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die

Glykosylierung von Stat5a die Interaktion mit dem GR beeinflusst.

Als Quelle für den GR wurde Gesamtzellextrakt von 293T Zellen verwendet, da diese Zelllinie den GR endogen exprimiert. Das rekombinant exprimierte Stat5a aus Insektenzellen wurde mittels einer WGA-Affinitätschromatographie in eine sogenannte "glykosylierte Stat5a-Fraktion" und eine "nicht glykosylierte Stat5a-Fraktion" aufgeteilt. Die Stat5a Fraktionen wurden mit dem Gesamtzellextrakt der 293T Zellen inkubiert, und die Interaktion von glykosyliertem, bzw. nicht glykosyliertem Stat5a mit dem GR untersucht. Die Ko-Immunoaffinitätschromatographie wurde mit einem gegen den GR gerichteten Antikörper durchgeführt und im Immunoblot anschließend der Interaktionspartner des GR Stat5a detektiert (Abbildung 11 unten). Es wurden jeweils 50% der verwendeten Proteinextrakte im SDS-PAGE aufgetragen. In der Negativkontrolle sollte die unspezifische Bindung von Stat5a an die Sepharose A-Kügelchen untersucht werden, indem SepharoseA mit den Proteinextrakten ohne den Antikörper inkubiert wurden. In dem Stat5a-Immunoblot ist eine Interaktion sowohl von glykosyliertem als auch von nicht glykosyliertem Stat5a mit dem GR zu erkennen. Wie im Input des 293T Extraktes zu sehen ist, exprimieren auch 293T Zellen Stat5a Protein. Das rekombinant exprimierte Stat5a Protein ist phosphoryliert, und hat somit ein höheres Molekulargewicht, als das nicht phosphorylierte Stat5a Protein in den 293T Zellen. Die mit dem GR interagierenden Stat5a Proteine in der Ko-Immunoaffinitätschromatographie zeichnen sich durch ein höheres Molekulargewicht aus und sind somit phosphoryliert. So kann die Aussage getroffen werden, daß sowohl phosphoryliertes, glykosyliertes und nicht glykosyliertes Stat5a mit dem GR interagieren. Im oberen Teil der Abbildung 11 wurde im selben Immunoblot der Glukokortikoid Rezeptor detektiert, um eine gleiche Ladung des GR in der Ko-Immunoaffinitätschromatographie darzustellen.

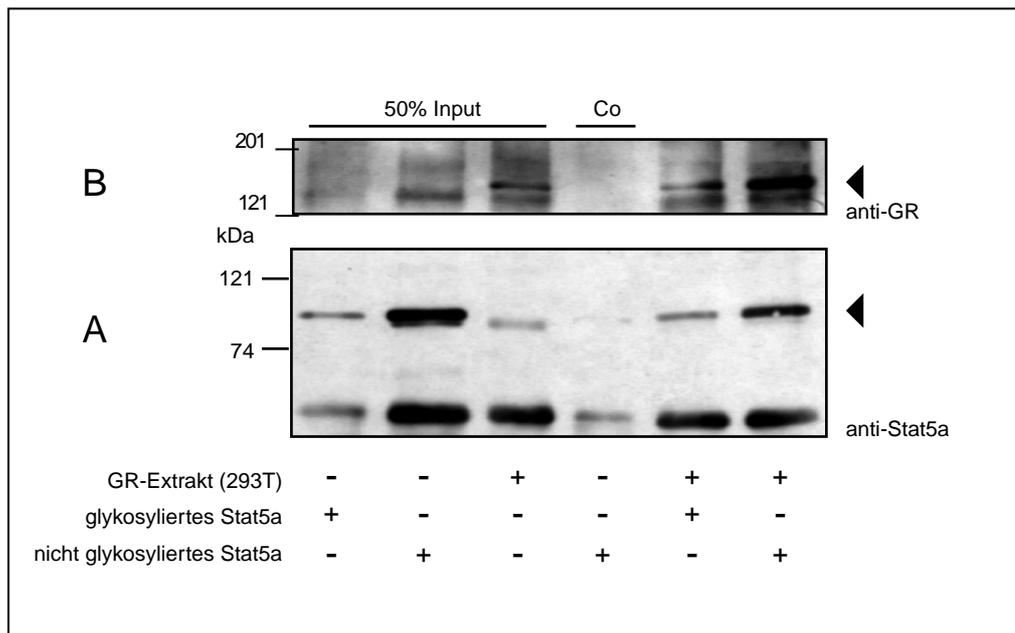


Abbildung 11: Glykosyliertes und nicht glykosyliertes Stat5a interagieren mit dem Glukokortikoid Rezeptor. Rekombinantes, aktiviertes Stat5a aus Insektenzellen wurde mittels einer WGA-Affinitätschromatographie in eine glykosylierte Stat5a-Fraktion und in eine nicht glykosylierte Stat5a-Fraktion aufgeteilt. Diese Stat5a-Fraktionen wurden jeweils mit Glukokortikoid Rezeptor (GR)-enthaltenem 293T Proteinextrakt inkubiert und die Ko-Immunoaffinitätschromatographie mit einem GR-Antikörper durchgeführt. Die Negativkontrolle ist mit Co angezeigt. (A) Der Immunoblot wurde mit einem spezifischen Stat5a-Antikörper durchgeführt. (B) Der Immunoblot wurde mit einem GR-spezifischen Antikörper reanalysiert.

3.7 Untersuchung der Wechselwirkung von glykosyliertem Stat5a mit dem Korepressor N-CoR

N-CoR (nuclear corepressor receptor) ist in einem großen Repressorkomplex unter anderem mit SMRT (silencing mediator for retinoic and thyroic hormone response) organisiert. Für Stat5 konnte eine spezifische Interaktion mit dem Korepressor der Transkription N-CoR gezeigt werden (persönliche Mitteilung Alexander Maurer und Thorsten Heinzel). Das Rekrutieren von SMRT und N-CoR an einen Promotor resultiert daher in einer starken Repression der basalen Promoteraktivität (Downes et al., 2000), (Li et al., 2000).

N-CoR wurde in 293T Zellen transfiziert und überexprimiert, um hohe Proteinmengen in dem verwendeten Proteinextrakt zu erzielen. Nach 48 Stunden Expression wurden die Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte angefertigt. Der Gesamtzellextrakt von 293T Zellen mit dem überexprimierten N-CoR Protein wurde jeweils mit rekombinantem glykosyliertem und nicht glykosyliertem Stat5a Proteinextrakt inkubiert. Die Interaktion von Stat5a mit N-CoR wurde anschließend mittels einer Ko-Immunoaffinitätschromatographie gegen N-CoR analysiert. In der gezeigten Negativkontrolle wurde die unspezifische Bindung von Stat5a an Sepharose A untersucht. Im SDS-PAGE wurden jeweils 25% des Inputs von glykosyliertem und nicht glykosyliertem Stat5a Proteinextrakt aufgetragen und im Immunoblot anschließend Stat5a detektiert (Abbildung 12). Im Immunoblot ist deutlich eine Interaktion von rekombinantem glykosyliertem und nicht glykosyliertem Stat5a mit N-CoR zu erkennen. In der Negativkontrolle ist eine schwache Stat5a-Bande zu erkennen, die eine geringe unspezifische Bindung von Stat5a an die Sepharose A aufzeigt.

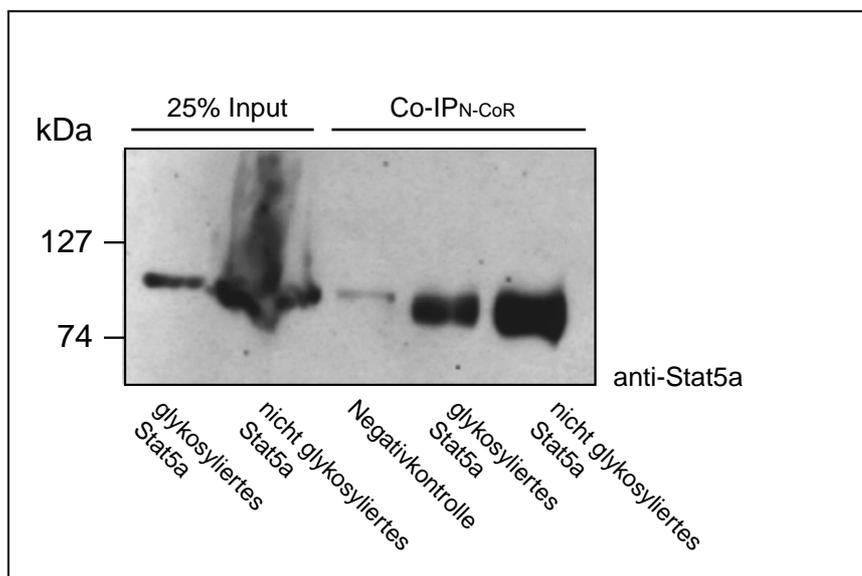


Abbildung 12: Glykosyliertes und nicht glykosyliertes Stat5a interagiert mit dem Korepressor der Transkription N-CoR. Rekombinantes, aktiviertes Stat5a aus Insektenzellen wurde mittels einer WGA-Affinitätschromatographie in eine glykosylierte Stat5a-Fraktion und in eine nicht glykosylierte Stat5a-Fraktion aufgeteilt. Diese Stat5a-Fraktionen wurden jeweils mit N-CoR-enthaltenem 293T Proteinextrakt inkubiert und die Ko-Immunoaffinitätschromatographie mit einem N-CoR spezifischen Antikörper durchgeführt. Im Immunoblot wurde die Interaktion von Stat5a mit N-CoR mit einem spezifischen Antikörper für Stat5a detektiert.

3.8 Untersuchung der Wechselwirkung von glykosyliertem Stat5a mit dem Koaktivator CBP

Neben Korepressoren wie N-CoR interagiert Stat5a auch mit Koaktivatoren der Transkription mit potenter Histonacetyltransferase-Aktivität, wie CBP und p300. Zusammen mit pCAF bilden sie einen Teil eines großen Multipolypeptidkomplexes und assistieren bei der Transkriptionsaktivierung von spezifischen Zielgenen (Pfitzner et al., 1998), (Biola et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte diese Interaktion in Abhängigkeit vom Stat5-Glykosylierungsstatus untersucht werden.

Als Quelle des CBP Proteins wurde Gesamtzellextrakt von 293T Zellen verwendet, die CBP endogen exprimieren. Dieser Proteinextrakt wurde jeweils mit rekombinantem, glykosyliertem Stat5a und nicht glykosyliertem Stat5a Proteinextrakt inkubiert und in einer Ko-Immunoaffinitätschromatographie die Interaktion mit CBP analysiert. In der Negativkontrolle (Co) wird die unspezifische Bindung von Stat5a an Sepharose A untersucht. Es wurden jeweils 50% des Inputs an Proteinextrakten im SDS-PAGE aufgetragen. Der Input wurde hier jeweils einer Immunpräzipitation mit dem entsprechenden Antikörper unterworfen. Im Immunoblot wurde anschließend Stat5a detektiert (Abbildung 13, unterer Teil). Im Westernblot ist eine bevorzugte Interaktion von glykosyliertem Stat5a mit dem Koaktivator CBP zu erkennen. Demgegenüber konnte keine Interaktion von nicht glykosyliertem Stat5a mit CBP festgestellt werden. Die Negativkontrolle zeigte keine unspezifische Bindung von Stat5a an Sepharose A. In demselben Blot wurde nach Entfernen der Antikörper ("Strippen") CBP Protein detektiert (oberer Teil der Abbildung 13), das eine gleiche Ladung von CBP-Proteinextrakt in der Ko-Immunoaffinitätschromatographie aufzeigt. Im folgenden Versuch konnte eine Interaktion des Koaktivators der Transkription CBP nur mit glykosyliertem Stat5a gezeigt werden. Dagegen konnte für nicht glykosyliertes Stat5a keine Wechselwirkung aufgezeigt werden.

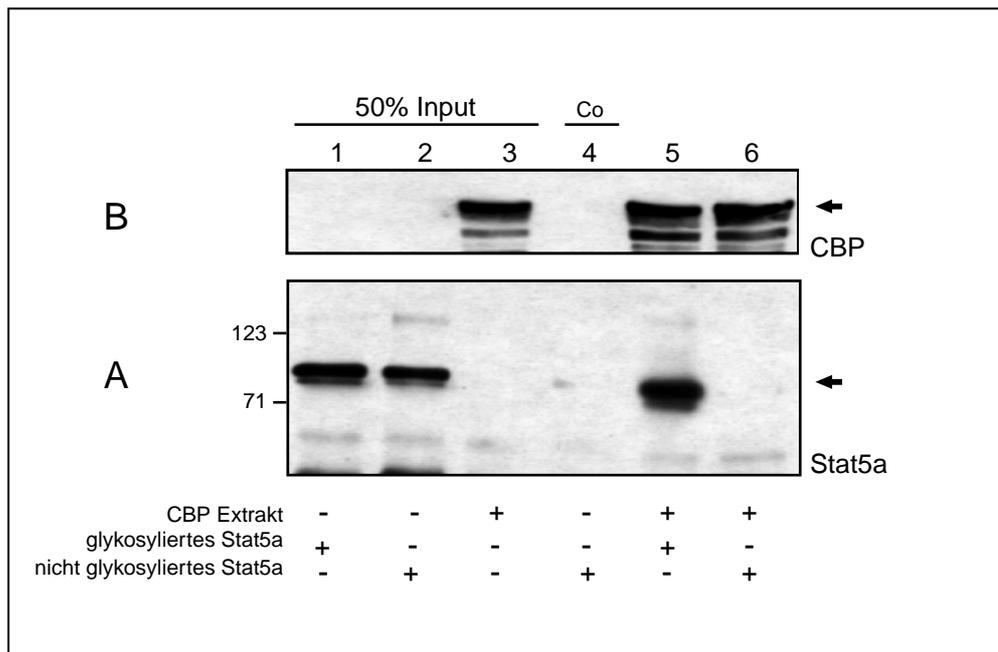


Abbildung 13: Glykosyliertes Stat5a interagiert bevorzugt mit dem Koaktivator der Transkription CBP. Rekombinantes, aktiviertes Stat5a aus Insektenzellen wurde mittels einer WGA-Affinitätschromatographie in eine glykosylierte Stat5a-Fraktion und in eine nicht glykosylierte Stat5a-Fraktion aufgeteilt. Diese Stat5a-Fraktionen wurden jeweils mit CBP-enthaltenem 293T Proteinextrakt inkubiert und die Ko-Immunoaffinitätschromatographie mit einem CBP spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Negativkontrolle ist mit Co angezeigt. (A) Der Immunoblot wurde mit einem spezifischen Stat5a Antikörper durchgeführt. (B) Der Immunoblot wurde mit einem CBP Antikörper reanalysiert.

3.9 Erzeugung einer Stat5a-Mutante mit einer Punktmutation an der potentiellen Glykosylierungsstelle Threonin 92

In der massenspektrometrischen Analyse von tryptischen Stat5a-Peptiden wurde ein mit einem O-GlcNAc modifiziertes Peptid identifiziert. Dieses Peptid (Aminosäuren 87 bis 107) liegt am N-Terminus von Stat5a und enthält zwei potentielle Glykosylierungsstellen: Threonin 92 und Threonin 97. Das Threonin 92 wurde durch eine Punktmutation in ein Alanin umgewandelt. So sollte eine O-GlcNAc-Modifikation dieser potentiellen Glykosylierungsstelle blockiert werden (Abbildung 14). Die Primer der durchgeführten PCR-Mutagenese wurden nach den folgenden

Kriterien ausgewählt: (1) Die Mutation sollte genau in der Mitte der Primer positioniert sein, und (2) die Mutation sollte mit mindestens 15 Basenpaaren zu jeder Seite flankiert sein. Die Mutagenese wurde gemäß den im Material und Methoden-Teil beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die erfolgte Änderung in der Aminosäuresequenz von Stat5a wurde in einer Sequenzierung mit spezifischen Primern bestätigt.

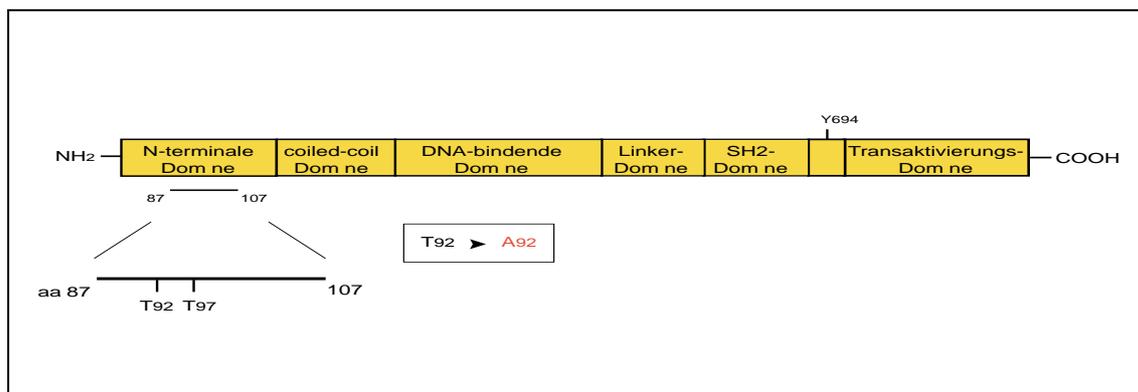


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Stat5a und der potentiellen Glykosylierungsstellen. In der massenspektrometrischen Analyse wurde ein O-GlcNAc modifiziertes Peptid am N-Terminus von Stat5a identifiziert. Dieses Peptid beinhaltet zwei potentielle Glykosylierungsstellen, von denen Threonin 92 in einer PCR-Mutagenese zu einem Alanin mutiert wurde.

3.10 *In vitro*-DNA-Bindung der Stat5a-T92A Mutante im ABCD-Assay

Im Luciferase-Assay konnte keine Aktivierung der Transkription der Stat5a Mutante Stat5a-T92A am β -Casein Promotor gezeigt werden. Um sicher zustellen, daß die Mutation des Threonins 92 am N-Terminus von Stat5a (Stat5a-T92A) die DNA-Bindung nicht aufhebt, sondern nur die Transkriptionsaktivität beeinflusst, wurde ein ABCD-Assay durchgeführt. Hierfür wurden HeLa Zellen jeweils mit Wildtyp Stat5a, der Stat5a Mutante (Stat5a-T92A) und dem Prolaktin Rezeptor transfiziert. Die Zellen wurden vor der Ernte mit Prolaktin stimuliert, um phosphoryliertes Stat5a zu erhalten. Als DNA-Oligomer wurde der biotinylierte β -Casein Promotor eingesetzt,

der mit den daran gebundenen Proteinen mittels Streptavidin-Kügelchen isoliert werden kann. In einem anschließenden SDS-PAGE wurden die an den Promotor gebundenen Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt und im Immunoblot Stat5a detektiert (Abbildung 15a). Als Negativkontrolle für die unspezifische Bindung von Stat5a an die Streptavidin-gekoppelten Kügelchen wurde Proteinextrakt und Sepharose ohne den DNA-Oligomer eingesetzt. Jeweils 50% des für das Experiment verwendeten Proteinextraktes wurde im SDS-PAGE aufgetragen, um die Verwendung gleicher Proteinmengen zu belegen. Es konnte keine unspezifische DNA-Bindung von Stat5a an den β -Casein Oligomer festgestellt werden. Im Immunoblot gegen Stat5a konnte DNA-Bindung sowohl mit dem Wildtyp Stat5a, als auch mit der Mutante Stat5a-T92A gezeigt werden.

3.11 Charakterisierung der transkriptionellen Regulation durch glykosyliertes Stat5a

Das in der massenspektrometrischen Analyse identifizierte Stat5a-Peptid wurde mittels einer Punktmutation am Threonin 92 zu einem Alanin mutiert und sollte nun in einem Luciferase-Assay auf Transaktivierung geprüft werden. Die Funktionalität der Stat5a-T92A Mutante in der Transkriptionsaktivierung sollte hier im Vergleich mit dem Wildtyp Stat5a untersucht werden. Hierfür wurden 293T Zellen jeweils mit Wildtyp Stat5a oder der Stat5a-T92A Mutante zusammen mit dem Prolaktin Rezeptor, dem Luciferase-Gen und einem β -Galactosidase Expressionsvektor kotransfiziert. Das Luciferase-Gen ist unter Kontrolle des β -Casein Promotors und kann somit spezifisch von Stat5a aktiviert werden.

Sowohl Zellen, die mit Wildtyp Stat5a, als auch mit Stat5a-T92A transfiziert waren, wurden mit Prolaktin stimuliert und die Transaktivierung des β -Casein Promotors im Luciferase-Assay gemessen (Abbildung 15b). Die Normalisierung der Luciferase-Werte erfolgte durch Verrechnung mit den im β -Galactosidase Assay erhalten Werten.

Die Stimulation von Wildtyp Stat5a mit Prolaktin resultierte in einer 8-fachen Induktion der Transaktivierung des Luciferase-Gens gegenüber nicht stimulierten Zellen. Dagegen konnte nach Prolaktin-Stimulation von Stat5a-T92A transfizierten Zellen keine Transaktivierung mehr nachgewiesen werden. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß die Mutation der potentiellen Glykosylierungsstelle Threonin 92 im Stat5a-Protein das Potential der Transaktivierung zerstört. Im Gegensatz zu Wildtyp Stat5a konnte keine Induktion des β -Casein Promotor-Luciferase Konstruktes mehr beobachtet werden.

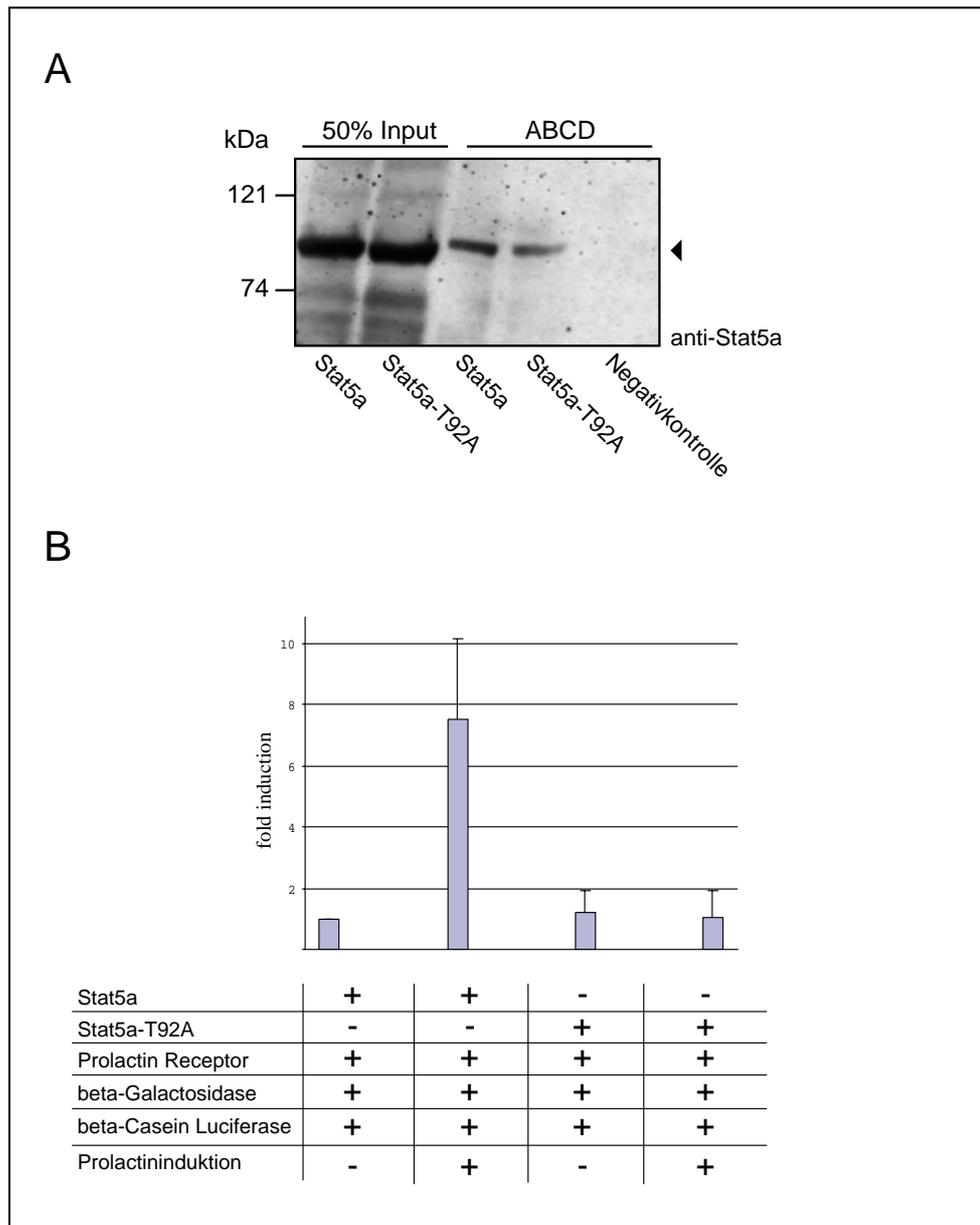


Abbildung 15: Die Mutation des Threonins 92 zu Alanin beeinflusst nicht die DNA-Bindung von Stat5a *in vitro*, aber die Transkriptionaktivität im Luciferase-Assay. (A) Luciferase-Assay von HeLa Zellen koinfiziert mit Stat5a, Stat5a-T92A, Prolaktin Rezeptor und einem Luciferase Reporterkonstrukt. Die Zellen wurden jeweils mit Prolaktin stimuliert und die transkriptionelle Aktivierung des Luciferase-Reporterkonstruktes gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. (B) HeLa Zellen kotransfiziert mit Wildtyp Stat5a, Stat5a-T92A und dem Prolaktin Rezeptor wurden mit Prolaktin stimuliert und Gesamtzellextrakte hergestellt. Die jeweiligen Extrakte wurden mit dem biotinylierten β -Casein Oligomer inkubiert, und die daran gebundenen Proteine mit Streptavidin-Kügelchen isoliert. Im Immunoblot wurde mit einem spezifischen Antikörper Stat5a detektiert.

3.12 Untersuchung der Wechselwirkung von mutiertem Stat5a (Stat5a-T92A) mit dem Koaktivator CBP

Die N-terminale Stat5a Mutante Stat5a-T92A zeigte im ABCD-Assay DNA-Bindung an das β -Casein Oligomer, aber keine Transaktivierung im Luciferase-Assay. Ein möglicher Grund für die fehlende Transaktivierung von Stat5a-T92A im Luciferase-Assay könnte eine fehlende Interaktion mit dem Koaktivator der Transkription CBP sein. Dazu wurde die Interaktion von Stat5a-T92A mit CBP in einer Ko-Immunoaffinitätschromatographie untersucht. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit der Stat5a Mutante Stat5a-T92A und dem Prolaktin Rezeptor transfiziert. Die Zellen wurden mit Prolaktin stimuliert und anschließend Gesamtzellextrakte angefertigt. Als Quelle des CBP Proteins wurde Gesamtzellextrakt von 293T Zellen verwendet, die CBP endogen exprimieren. Dieser Proteinextrakt wurde jeweils mit rekombinatem, glykosyliertem Stat5a und nicht glykosyliertem Stat5a Proteinextrakt, sowie mit HeLa Extrakt mit überexprimierten, phosphoryliertem Stat5a-T92A inkubiert. In der Ko-Immunoaffinitätschromatographie wurde anschließend die Interaktion mit CBP untersucht. In der Negativkontrolle (Co) wird die unspezifische Bindung von Stat5a an die Sepharose A untersucht, und es wurden jeweils 50% des Inputs der Proteinextrakte im SDS-PAGE aufgetragen. Der Input wurde jeweils einer Immunpräzipitation mit dem entsprechenden Antikörper unterworfen.

Das Ergebnis der preferentiellen Interaktion von glykosyliertem Stat5a mit CBP von Punkt 3.8 konnte hier bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion der Stat5a-Mutante Stat5a-T92A mit CBP mehr nachgewiesen werden. Dieser Versuch belegt, daß die Interaktion von CBP durch die Mutation des Threonins 92 am N-Terminus von Stat5a aufgehoben wird.

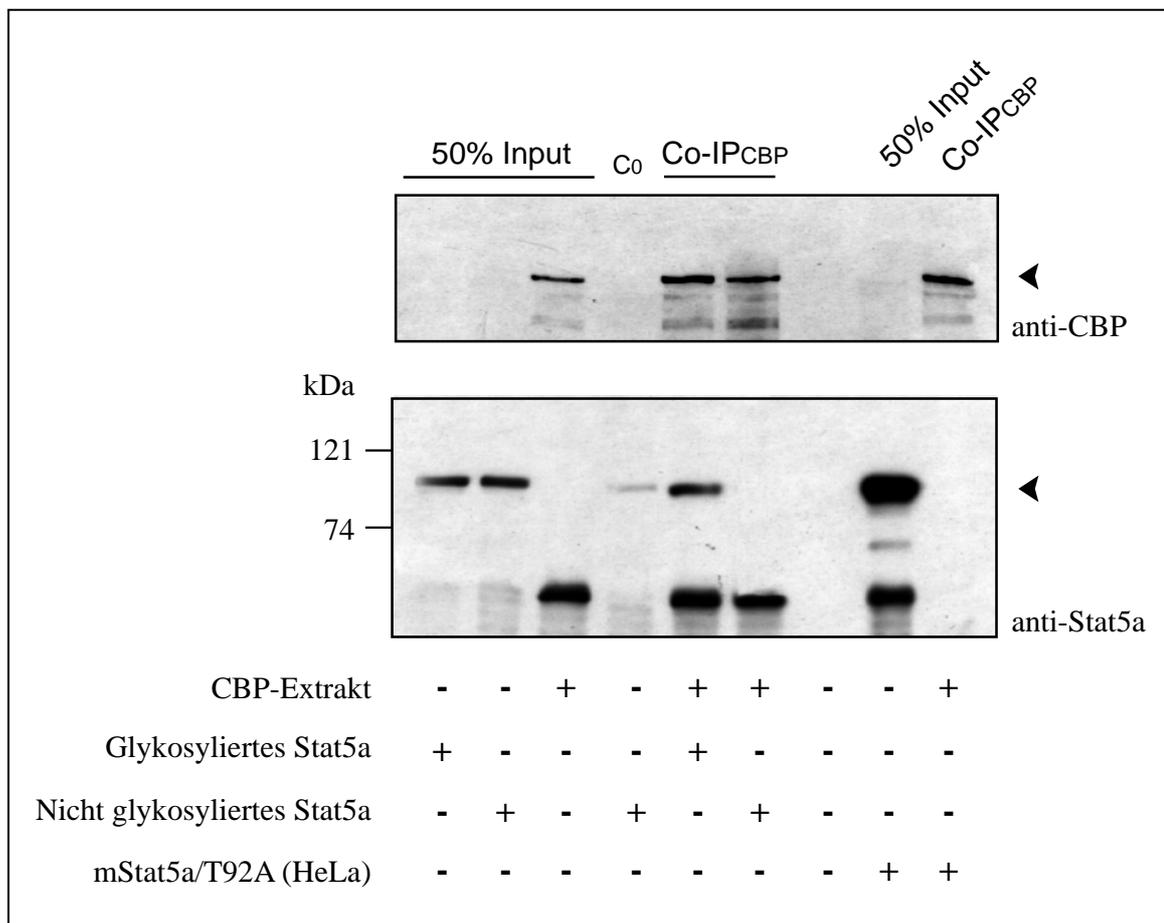


Abbildung 16: Stat5a-T92A interagiert nicht mit dem Koaktivator der Transkription CBP. HeLa Zellen kotransfiziert mit Wildtyp Stat5a, Stat5a-T92A und dem Prolaktin Rezeptor wurden mit Prolaktin stimuliert und Gesamtzellextrakte hergestellt. Rekombinantes Stat5a aus koinfizierten Insektenzellen wurde mittels einer WGA-Affinitätschromatographie in eine glykosylierte Stat5a-Fraktion und in eine nicht glykosylierte Stat5a-Fraktion aufgeteilt. Diese Stat5a-Fraktionen wurden jeweils mit CBP-enthaltenem 293T Proteinextrakt inkubiert und die Ko-Immunoaffinitätschromatographie mit einem CBP spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Negativkontrolle ist mit Co angezeigt. (A) Der Immunoblot wurde mit einem spezifischen Stat5a Antikörper durchgeführt. (B) Der Immunoblot wurde mit einem CBP Antikörper reanalysiert.

4. Diskussion

Stat5 spielt eine wesentliche Rolle in der Zytokin-induzierten Signalübertragung von der Zellmembran in den Nukleus. Die Phosphorylierung von Stat5a am Tyrosinrest 694 ist eine essentielle Voraussetzung für die biologische Aktivität, also für die spezifische DNA-Bindung und die Transaktivierung von Zielgenen. In den letzten Jahren wurde neben der Phosphorylierung die Signifikanz anderer posttranslationaler Modifikationen, wie die Acetylierung, der Methylierung und der Glykosylierung erkannt. Die dynamische O-GlcNAc Modifikation von Proteinen fand zunehmend Interesse, da sie ähnlich der Phosphorylierung die Proteinaktivität zu beeinflussen scheint, und somit ein zusätzliches regulatorisches Element darstellt (Pazin and Kadonaga, 1997) (Munshi et al., 2001) (Mowen et al., 2001). In vielen Krebs- und Leukämiearten liegt Stat5 konstitutiv aktiv vor, weshalb die Analyse des Einflusses der Glykosylierung auf Stat5 von großer Bedeutung ist.

Um ein umfassendes Verständnis über die posttranslationalen Modifikationen von Stat5 zu erhalten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die dynamische O-verknüpfte Glykosylierung an Stat5 identifiziert und dessen Funktion im Jak-Stat Signaltransduktionsweg untersucht werden.

Anhand eines Galaktosyltransferase Assays konnte die O-GlcNAc Modifikation am Stat5 Protein identifiziert, und die Dynamik der Glykosylierung nach Zytokinstimulation mit einer Lektin-Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Mit dem im Sf9 Insektenzellsystem überexprimierten und aufgereinigten, phosphorylierten Stat5a wurde im Massenspektrum ein O-GlcNAc modifiziertes Peptid am N-Terminus von Stat5a identifiziert. Eine der zwei potentiellen Glykosylierungsstellen am N-Terminus von Stat5a wurde mutiert (mStat5a-T92A) und die Auswirkung der Mutation in funktionellen Experimenten untersucht. Der Einfluß der Glykosylierung im Zusammenhang des Jak-Stat Signaltransduktionsweges wurde mit DNA-Bindungsexperimenten, dem Kerntranslokationsverhalten und mit Protein-Protein Wechselwirkungen von Stat5a mit dem Koaktivator der Transkription

CBP (CREB binding protein), dem Glukokortikoid Rezeptor (GR) und dem Korepressor der Transkription N-CoR (nuclear co-repressor receptor) analysiert. Mit dem Inhibitor der O-GlcNAcase PUGNAc wurde der Kerntransport von Stat5a in der Maus-Mammaepithelialzelllinie HC11 untersucht. Die Translokation von Stat5a in den Nukleus wurde dabei durch die Erhöhung der Stat5-Glykosylierung nicht beeinflusst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bevorzugt glykosyliertes Stat5a mit dem Koaktivator der Transkription CBP interagiert. Dagegen wurde keine Interaktion des nicht glykosylierten Stat5a mit CBP beobachtet. Das Ergebnis konnte mit der Stat5a-Mutante (Stat5a-T92A) bestätigt werden. So konnte in Ko-Immunoaffinitätschromatographien mit Stat5a-T92A keine Interaktion mehr mit CBP nachgewiesen werden. Luciferase-Experimente mit dem β -Casein Luciferase-Reporterkonstrukt zeigten, daß das Transaktivierungspotential von Stat5a-T92A im Vergleich zum Wildtyp Stat5a nach Prolaktinstimulation aufgehoben war.

4.1 Identifizierung und Dynamik der O-GlcNAc Modifikation von Stat5a

Zu Beginn der Arbeit sollte die dynamische O-GlcNAc Modifikation von Stat5a identifiziert, und die Dynamik der Modifikation analysiert werden. Zur Identifizierung der O-GlcNAc Modifikation wurde das direkte Nachweisverfahren des *in vitro* Galaktosyltransferase Assays gewählt (Roquemore et al., 1994). Dabei wird in einer Enzymreaktion eine aktivierte, radioaktiv markierte Galaktose spezifisch an endständige N-Acetylglukosamine geknüpft (Palcic and Hindsgaul, 1991). In dieser Reaktion werden alle Zuckerketten, ob N- oder O-verknüpft, mit terminalen GlcNAc-Zuckern markiert. Um die Kohlenhydrat-Peptid Verknüpfungsgruppe bestimmen zu können, wurden die markierten Proteine einer PNGaseF (Peptid-N-Glycosidase F) Behandlung unterzogen (Kitajima et al., 1995), (Suzuki et al., 1994). Anschließend sind nur noch Proteine markiert, die O-verknüpfte Zuckerketten mit terminalen

GlcNAc-Zuckerresten tragen. Es bietet den Vorteil, daß direkt am Protein die Analyse der Glykosylierung stattfindet, und diese in einer Autoradiographie ausgewertet werden kann. Zudem sind durch eine vorhergehende Denaturierung des Proteins alle Zucker(-ketten) der Galaktosyltransferase zugänglich. Als Zellsystem wurde hier die Maus-Mammaepithelialzelllinie HC11 gewählt, da sie von allen Zelllinien den Bedingungen des *in vivo* Maus-Mammaepithelialgewebes am ehesten entspricht und nicht transformiert ist. HC11 Zellen können nach Stimulation mit den Milchhormonen Dexamethason, Insulin and Prolaktin (DIP) differenzieren, und Milchproteine wie β -Casein exprimieren (Ball et al., 1988) (Wartmann et al., 1996). Zudem werden den HC11 Zellen stammzellähnliche Eigenschaften zugesprochen, da sie nach Implantierung in Wirtstiere wieder ein funktionelles Brustgewebe aufbauen können (Medina, 1996) (Cella et al., 1996) (Brandt et al., 2001). Im Autoradiogramm konnte gezeigt werden, daß die radioaktive Markierung von Stat5a resistent gegenüber der PNGaseF Behandlung war. Da Transkriptionsfaktoren weder das Endoplasmatische Retikulum, noch den Golgi-Apparat, in denen die klassische O- und N-verknüpfte Glykosylierung stattfindet (Rademacher et al., 1988), durchlaufen, kann angenommen werden, daß es sich bei Stat5a um eine dynamische O-verknüpfte Glykosylierung mit einem N-Acetylglukosamin (GlcNAc) Monosaccharid handelt.

Bekannte O-GlcNAc modifizierte Proteine zeigen eine Dynamik der Glykosylierung, meist im Wechselspiel mit der Phosphorylierung ("Yin-Yang"-Beziehung) (Comer and Hart, 2000). Die Glykosylierungsstelle dieser Proteine liegt somit in der unmittelbaren Nähe der Phosphorylierungsstelle, oder die Glykosylierung findet an derselben Stelle statt wie die Phosphorylierung. Dadurch, daß das Protein nur glykosyliert oder phosphoryliert vorliegen kann, stellt die Entfernung die O-GlcNAc Modifikation ein zusätzliches Element zur Aktivierung, bzw. das Anfügen zur Reprimierung der Proteinaktivität dar. Hier sollte die dynamische O-GlcNAc Modifikation von Stat5a in Abhängigkeit einer Zytokinstimulation untersucht werden. Es wurden HC11 Zellen

mit Milhhormonen induziert, und die cytoplasmatischen und nukleären Extrakte einer Stat5a-Immunoaffinitätschromatographie und einer Lektin-Affinitätschromatographie mit Weizenkeimagglutinin (wheat germ agglutinin, WGA) unterworfen. WGA hat eine hohe Affinität spezifisch für N-Acetylglukosamin Zuckerreste und Sialylsäuren (Yamamoto et al., 1981). Eingesetzt in eine Affinitätschromatographie wurden so nur Proteine angereichert, die mit terminalen Sialylsäuren oder terminalen GlcNAc-Zuckerresten modifiziert waren. Da Stat-Proteine nicht das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat durchlaufen, ist eine Modifikation mit Sialylsäuren unwahrscheinlich. So kann angenommen werden, daß das in der WGA-Affinitätschromatographie angereicherte Stat5a mit terminalem GlcNAc modifiziert ist.

Das Enzym O-GlcNAc Transferase (OGT) katalysiert die Verknüpfung eines einzelnen GlcNAc-Zuckerrestes an die Hydroxylgruppe von Serinen und Threoninen. Da OGT nukleär wie zytoplasmatisch lokalisiert ist (Akimoto et al., 1999), ist sowohl eine Glykosylierung im Zytoplasma wie auch im Kern möglich. Es konnte hier nur nukleäres, nicht aber zytoplasmatisches Stat5a in der WGA-Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Eine Glykosylierung von Stat5 scheint somit im Nukleus oder während des Transports in den Kern aufzutreten. Möglicherweise spielt die Stat5a-Dimerbildung für die O-GlcNAc Transferase eine wichtige Rolle. Eine Änderung der dreidimensionalen Struktur von Stat5a mag hier ein Erkennungsmotiv offenlegen, das als Stat5a-Monomer der OGT nicht zugänglich ist. Für Stat5a konnte im Kern parallel eine Phosphorylierung als auch eine Glykosylierung festgestellt werden, wenn auch nur ein Teil des im Nukleus vorliegenden phosphorylierten Stat5a die O-GlcNAc Modifikation trägt. Phosphoryliertes Stat5a im Kern zeichnet sich durch ein höheres molekulares Gewicht aus als dephosphoryliertes Stat5a. Da sowohl phosphoryliertes, wie auch dephosphoryliertes Stat5a in den Kernextrakten der WGA-Affinitätschromatographie detektiert wurden, ist eine Beeinflussung der Phosphorylierung des Tyrosins 694

durch die Stat5a-Glykosylierung auszuschließen. O-GlcNAc scheint somit nicht, als "regulatorischer Schalter" zur Aktivierung oder Reprimierung der Stat5a-Proteinfunktion analog zur Phosphorylierung zu agieren.

In der Stat5a-Immunoaffinitätschromatographie konnte gezeigt werden, daß Stat5a vor Zytokinstimulation hauptsächlich im Zytoplasma vorkommt, und nach Zytokinstimulation in den Kern transportiert wurde. Es ist allerdings schon eine geringe Menge an Stat5a im Kern ohne Zytokinstimulation detektierbar. Ein Grund hierfür mögen Faktoren im Serum sein, mit dem das Medium zur Kultivierung der Zellen versetzt ist. Diese im Serum enthaltenen Faktoren könnten über andere Rezeptoren Signaltransduktionswege anschalten, die wiederum Stat5a aktivieren. So wäre eine leichte Aktivierung von Stat5a in nicht induzierten HC11-Zellen erklärbar.

4.2 Rekombinante Proteinexpression in Insektenzellen und die O-GlcNAc Modifikation

Für die Expression rekombinanter Stat-Proteine wurde ein Expressionssystem gesucht, das die Produktion genügend großer Mengen an rekombinantem Protein ermöglicht. Zudem sollten die posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung möglichst ähnlich der endogen exprimierten Stat-Proteine sein, da die rekombinant exprimierten Proteine unter anderem für massenspektrometrische Analysen verwendet wurden. Die Proteinexpression in Säugerzellen wie COS-7, CHO- oder Myeloma-Zellen führt zu relativ geringen Proteinausbeuten, und da die Glykosylierung Zell- und Gewebe-spezifisch ist (Rademacher et al., 1988), läuft man Gefahr, daß dasselbe Protein von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich glykosyliert wird. Für das Baculovirusexpressionssystem wurde gezeigt, daß die O-GlcNAc Modifikation ähnlich derer endogen exprimierter Proteine ist, und stellt somit eine gute Alternative zur Expression rekombinanter

Proteine in Säugerzellen dar (Greis et al., 1994), (Reason et al., 1992). Die Vorteile sind die einfache Kultivierung und die schnellere Wachstumsgeschwindigkeit der Insektenzellen. Außerdem führt die Verwendung des starken Baculovirus-Polyhedrinpromotors in der Regel zu guten Ausbeuten an rekombinantem Protein (Choi et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde für die Expression von phosphoryliertem Stat5a-Protein aufgrund der genannten Vorteile das Baculovirussystem gewählt. Für die Expression rekombinanter Proteine im kleinen Maßstab wurden Insektenzellen adhärent in Kulturflaschen gehalten und mit Baculoviren infiziert. Für größere Infektionsansätze wurden bis zu 300 ml Insektenzellen in Suspensionskultur gehalten und mit Viren infiziert. Um phosphoryliertes, rekombinantes Stat5a zu erhalten, wurden die Insektenzellen mit Jak2- und Stat5a-Viren koinfiziert (Beisenherz-Huss et al., 2001). Das rekombinante Stat5a-Protein wurde gut in Insektenzellen exprimiert, und mit einem spezifischen Phospho-Stat5 Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Zur weiteren Reinigung des rekombinanten Stat5a wurde eine Stat5a-Immunoaffinitätssäule hergestellt, mit der das exprimierte Stat5a aus Insektenzellen aufgereinigt werden konnte. Insektenzellen exprimieren ein Stat-Homolog, das eine wichtige Funktion in der Entwicklung besitzt (Yan et al., 1996). Dieses Stat-Homolog befindet sich in Sf9 Insektenzellen vor allem im Kern, weshalb nur eine zytoplasmatische Lyse nach der Expression von Stat5 durchgeführt wurde (Sliva and Haldosen, 1996). Dies führt unweigerlich zu einem Verlust der Stat5a-Ausbeute, da ein Teil des rekombinant exprimierten Stat5a in den Kern transportiert wird und in der zytoplasmatischen Lyse verloren geht.

Zur Amplifizierung der rekombinanten Baculoviren wurden jeweils nur sehr geringe Mengen einer frühen Viruspassage eingesetzt, um möglichst eine spontane Rückentwicklung der rekombinanten Viren in Wildtyp-Viren zu vermeiden. Die Verwendung hoher *moi* (multiplicity of infection) in der Virusvermehrung kann zudem in der Produktion defekter Virusnachkommen resultieren.

Die Phosphorylierung eines spezifischen konservierten Tyrosinrestes ist in allen bekannten Stat-Proteinen der Initiator zur Dimerbildung, und damit zur Aktivierung zu einem aktiven Transkriptionsfaktor (Darnell, 1997) (Silvennoinen et al., 1996). In Bandshift-Experimenten wurde die DNA-Bindung von rekombinantem, phosphoryliertem Stat5a mit dem β -Casein Oligomer analysiert. Mit einem Antikörper konnte die Stat5a-spezifische DNA-Oligomerbindung anhand eines Supershifts sichtbar gemacht werden. Der Supershift mit dem Stat5a-Antikörper zeigt deutlich die spezifische DNA-Bindung an den β -Casein Oligomer von rekombinantem, phosphoryliertem Stat5a nachgewiesen werden. Es wurde auch versucht, durch Zugabe ansteigender Mengen von Weizenkeimagglutinin-Lektin (WGA) die DNA-Bindung von glykosyliertem Stat5a zu zeigen. Aber eine spezifische DNA-Bindung von rekombinantem, glykosyliertem Stat5a nach Zugabe des WGA-Lektins konnte nicht gezeigt werden. Hierfür gibt es folgende Erklärungen: Entweder ist das rekombinant exprimierte Stat5a nicht glykosyliert, oder das glykosylierte Stat5a ist nicht fähig, DNA zu binden. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Konzentration von glykosyliertem Stat5a nicht ausreicht, im Bandshift-Experiment ein Signal zu ergeben. Das Lysat von nicht-infizierten Insektenzellen ergab in den Gelretardierungsexperimenten eine schwache Bande in der Höhe des β -Casein Promotor-Protein-Komplexes. Da in Western Blot-Experimenten kein phosphoryliertes Stat5 in nicht infizierten Sf9-Zellen nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß die schwache Bande eine unspezifische DNA-Oligomer Bindung und nicht eine Kontamination mit dem Insekten Stat-Homolog darstellt.

Für Sf9 Insektenzellen wurde gezeigt, daß sie posttranslationale Modifikationen, wie die Tyrosinphosphorylierung von Stat5 oder die dynamische O-GlcNAc Modifikation, zum Beispiel von den Keratinen 8, 13 und 18 und des Östrogenrezeptors, ausführen können (Greis et al., 1994) (Cheng et al., 2000) (Beisenherz-Huss et al., 2001). Um die Glykosylierung des rekombinant exprimierten

Stat5a nachzuweisen, wurde eine Lektin-Immunoaffinitätschromatographie mit Weizenkeimagglutinin durchgeführt, und im Westernblot anschließend Stat5a detektiert. In der Lektinaffinitätschromatographie wurde etwa 10-fach mehr Lysat eingesetzt, als in der parallel durchgeführten Immunopräzipitation von Stat5a. Im Immunoblot können bei der WGA-Immunoaffinitätschromatographie und in der Immunpräzipitation etwa gleiche Mengen an Stat5a detektiert werden. Somit kann die Aussage getroffen werden, daß rekombinant, exprimiertes Stat5a aus Insektenzellen glykosyliert wird, *in vitro* DNA-bindet, und daß etwa 10 Prozent der Stat5a-Moleküle glykosyliert vorliegen.

4.3 Untersuchungen zur Funktionalität der Glykosylierung im Stat5a-Kerntransport

Die O-GlcNAc Modifikation ist dynamisch und der Glykosylierungsgrad verändert sich als Antwort auf verschiedene Stimuli. Die Funktion und die subzelluläre Verteilung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine deutet auf eine wichtige Rolle in der Koordination verschiedenster Zellantworten auf einen einzigen Stimulus hin (Hanover et al., 2001). Stat-Proteine besitzen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion als Antwort auf Zytokinstimulationen. Zusätzlich zu ihrer Funktion in der normalen Signaltransduktion wurde gezeigt, daß Onkoproteine spezifische Stat-Proteine, insbesondere Stat3 und Stat5, aktivieren können. So können konstitutiv aktive Stat-Proteine direkt zur Onkogenese beitragen (Garcia et al., 1997) (Liu et al., 1999) (Bowman et al., 2000).

Einige Hinweise sprechen für einen Einfluß von O-GlcNAc im Kerntransport von Proteinen. So konnte gezeigt werden, daß artifiziell O-GlcNAc modifiziertes BSA in den Kern transportiert wurde, aber nicht glykosyliert in Zytoplasma verblieb

(Duverger et al., 1996). Für Stat5a ist bekannt, daß die Phosphorylierung des Tyrosins 694 wichtig für die Dimerbildung und den anschließenden Kerntransport ist. Der Mechanismus des Kerntransportes ist allerdings nicht aufgeklärt. So wird angenommen, daß die Tyrosinphosphorylierung und der Kerntransport durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert wird (Ali, 1998).

Hier wurde der Einfluß der O-GlcNAc Modifikation auf den Kerntransport von Stat5a untersucht, indem der allgemeine Glykosylierungsstatus der Proteine, und somit auch von Stat5a, verstärkt wurde. Um eine Verstärkung der Stat5a-Glykosylierung zu erreichen, wurden HC11 Zellen entweder mit Glukose/Glukosamin, PUGNAc oder Streptozotocin behandelt, induziert und mittels Immunofluoreszenz der Kerntransport von Stat5a analysiert.

PUGNAc (o-(Acetylmido-2-deoxy-D-gluco-pyranosyliden)amino-N-phenyl-carbammat) ist ein potenter Inhibitor des O-GlcNAc entfernenden Enzyms O-GlcNAcase (Haltiwanger et al., 1998). Durch das Blockieren der O-GlcNAcase-Aktivität ergibt sich eine Verstärkung der Glykosylierung von zytosolischen und nukleären Proteinen. Ein Anstieg des allgemeinen Glykosylierungsstatus von Proteinen kann auch durch Zugabe von Glukose (Glc) und Glukosamin (GlcN) in das Zellkulturmedium erreicht werden. Dies führt vermehrt zur Bildung von aktivierten Zuckern (UDP-Glc/UDP-GlcNAc), und somit zu einer verstärkten Glykosylierung der Proteine (Akimoto et al., 2001), (Sayeski and Kudlow, 1996). Streptozotocin (STZ) ist bekannt durch Studien an beta-Zellen in den Langerhans'schen Inseln im Pankreas. Durch Behandlung der Zellen, bzw. von Tieren mit STZ kann Diabetes Typ II (Insulinresistenz) in den beta-Zellen induziert werden. Durch die permanente Verknüpfung der Zuckerreste mit den Proteinen wird eine ständige Erhöhung des Proteinglykosylierungsstatus erreicht (Konrad et al., 2001).

In Untersuchungen zum allgemeinen Glykosylierungsstatus der Kernproteine konnte im Immunoblot ein mindestens zweifacher Anstieg der O-GlcNAc Modifikation nach Glc/GlcN- oder PUGNAc-Behandlung nachgewiesen werden. WGA-

Affinitätschromatographien zeigen auch einen starken Anstieg der Stat5a-Glykosylierung. Die Glykosylierung durch eine STZ-Behandlung fiel stärker aus als mit Glc/GlcN oder PUGNAc. Aufgrund seiner starken zytotoxischen Wirkung wurde STZ allerdings nicht für die weiteren Experimente in Betracht gezogen. Mit dem starken Anstieg des allgemeinen Glykosylierungsstatus der Gesamtproteine und Stat5a konnte gezeigt werden, daß HC11-Zellen sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Glukose/Glukosamin und PUGNAc, bzw. Streptozotocin sind.

Um das Kernlokalisationsverhalten von Stat5a zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzen von Glukose/Glukosamin-behandelten HC11-Zellen angefertigt. Hierfür wurden die Zellen mit Prolaktin, Dexamethason und Insulin (DIP) stimuliert, und die Stat5a-Translokation mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Der Vergleich der Glc/GlcN-behandelten und nicht behandelten HC11-Zellen zeigte keinen Unterschied im Kerntranslokationsverhalten. Dies läßt den Schluß zu, daß eine verstärkte Glykosylierung von Stat5a keinen Einfluß auf die Kerntranslokation hat. Nach Induktion der Zellen konnte man auch erkennen, daß Stat5a nicht in allen Zellen in den Kern transportiert wurde.

4.4 Identifikation der potentiellen Stat5a-Glykosylierungsstellen

Da kein spezifisches Erkennungsmotiv für die O-GlcNAc Transferase bekannt ist, wurde die Glykosylierungsstelle von Stat5a mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse bestimmt (Hansen et al., 1998) (Jung et al., 1997). Zur Identifikation der Glykosylierungsstelle wurde rekombinantes, phosphoryliertes Stat5a chromatographisch aufgereinigt und nativ eluiert. Glykosyliertes Stat5a wurde anschließend mit einer Weizenkeimagglutinin (WGA)-Affinitätschromatographie angereichert. Um die mit O-GlcNAc modifizierten Peptide nach dem Trypsinverdau von den nicht-modifizierten unterscheiden zu können, wurde das aufgereinigte, glykosylierte Stat5a einem *in vitro* Galaktosyltransferase-Assay unterworfen. In dieser Enzymreaktion wurden endständige GlcNAc-Zuckerreste mit einer Tritium-

markierten Galaktose markiert (Roquemoire et al., 1994). Anschließend wurden die mit Trypsin verdauten Proteine in einer RP-HPLC (reverse phase-high performance liquid chromatography) mit ansteigendem Azetonitril-Gradienten nach Hydrophobizität aufgetrennt. Nur die Fraktionen, die Radioaktivität enthielten, wurden im Massenspektrum auf O-GlcNAc modifizierte Peptide analysiert. In der MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) Analyse wurde ein tryptisches Peptid identifiziert (aa 87 bis aa 107), das am N-Terminus von Stat5a liegt und zwei potentielle Glykosylierungsstellen, Threonin 92 und Threonin 97, enthält. Aufgrund der ermittelten Masse in der massenspektrometrischen Analyse kann nur eines der beiden Threonine mit einem O-GlcNAc modifiziert sein. In dieser Untersuchung konnte nur dieses eine Peptid als O-GlcNAc modifiziertes Stat5a-Peptid verifiziert werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß Stat5a weitere Glykosylierungsstellen besitzt, die Einfluß auf die Funktion oder Aktivität von Stat5a haben können, da weitere Radioaktivität-haltige RP-HPLC Fraktionen erhalten wurden. Die Analyse dieser Fraktionen ergab allerdings kein eindeutiges Ergebnis. Ein Grund hierfür mag die geringe Signalstärke der modifizierten Peptide gegenüber den nicht-modifizierten Peptiden in diesen Fraktionen sein. Es ist auch möglich, daß die modifizierten Peptide unter die Detektionsgrenze fielen, oder deren Markierung im Galaktosyltransferase-Assay nicht vollständig war.

Transfektionsexperimente mit N-terminalen und C-terminalen Deletionsmutanten von Stat5a mit anschließender WGA-Affinitätschromatographie ergaben das Ergebnis, daß in COS7-Zellen die überexprimierten, phosphorylierten Stat5a-Konstrukte trotz fehlender N-terminaler Glykosylierungsstelle glykosyliert waren (Daten nicht gezeigt). Ein Grund dafür mag ein verändertes Glykosylierungsmuster in der Überexpression oder der Wechsel des Zellsystems sein, wie es schon für Krebszellen gezeigt wurde (Brockhausen, 1999), (Burchell et al., 2001). Oder es existieren weitere Glykosylierungsstellen im Stat5a-Protein, die weiterhin modifiziert werden konnten.

4.5 Glykosylierung anderer Stat-Proteine und von Stat5a in Krebszelllinien

Die Stat-Proteine Stat1, Stat3, Stat5b und Stat6 zeichnen sich durch eine hohe Homologität zueinander aus, die auf die stammesgeschichtliche Entstehung der Stat-Proteine zurückzuführen ist (Imada and Leonard, 2000), (Miyoshi et al., 2001). Dieser hohe Homologitätsgrad läßt vermuten, daß auch andere Stat-Proteine neben Stat5a glykosyliert sind. Dazu wurden HC11 Zellen mit den entsprechenden Zytokinen stimuliert, und die Gesamtproteinextrakte jeweils einer Immunoaffinitätschromatographie des jeweiligen Stat-Proteins und einer WGA-Affinitätschromatographie unterworfen. Im Immunoblot konnte bei allen untersuchten Stats nach Zytokinstimulation eine O-GlcNAc Modifikation festgestellt werden, so daß die Glykosylierung der Stat-Proteine als allgemeine Modifikation nach Zytokinstimulation angesehen werden kann. Da ein Peptid mit zwei potentiellen Glykosylierungsstellen am N-Terminus von Stat5a in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert worden ist, wurde eine Datenbanksuche von den N-Termini aller untersuchter Stat-Proteine durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß nur in Stat5b die zwei potentiellen Glykosylierungsstellen, Threonin 92 und Threonin 97, vorkommen, nicht in den anderen Stat-Proteinen. Die Glykosylierung der anderen Stat-Mitglieder findet somit an unterschiedlichen Stellen statt und kann verschiedene Funktionen abhängig von der modifizierten Domäne ausüben. In den Lektin-Affinitätschromatographien der verschiedenen Stats wurde jeweils 10-fach mehr Proteinextrakt eingesetzt als in der parallel durchgeführten Immunochromatographie gegen die Stat-Proteine. Im Immunoblot wurden unterschiedliche Mengen an glykosylierten Stats detektiert, so daß man davon ausgehen kann, daß die Stat-Proteine verschieden stark in HC11-Zellen glykosyliert werden.

Da in vielen Krebs- und Leukämiearten Stat5 konstitutiv aktiv vorliegt (Bowman et al., 2000) (Danial and Rothman, 2000), sollte die Glykosylierung von Stat5a in diesem Zusammenhang näher untersucht werden. Es wurde als Beispiel einer Brustkrebszelllinie SKBR3 Zellen aus einem humanem Adenokarzinom gewählt. Stat5

liegt hier nicht konstitutiv aktiv vor und kann mit Prolaktin induziert werden. Die Erythroleukämiezelllinie K562 besitzt eine BCR/ABL-Translokation, und somit konstitutiv aktives Stat5 (Grosveld et al., 1986). Von beiden Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte angefertigt, und diese einer Stat5a-Immunochemographie und einer WGA-Affinitätschromatographie unterworfen. Es konnte gezeigt werden, daß Stat5a sowohl in der Brustkrebszelllinie SKBR3 als auch in der Leukämiezelllinie K562 glykosyliert vorliegt. Interessanterweise ist auch in nicht induzierten SKBR3-Zellen glykosyliertes Stat5a nachweisbar. Möglicherweise liegt in SKBR3-Zellen eine konstitutive Stat5a-Glykosylierung vor, welches die Proteinaktivität beeinflussen könnte. So wurde für c-myc (Chou et al., 1995), RNA Polymerase II (Comer and Hart, 2001) und Östrogen Rezeptor (Cheng and Hart, 2001) gezeigt, daß durch die Glykosylierung die Protein-Protein Interaktion, die Proteinaktivierung durch Phosphorylierung oder die Halbwertszeit des Proteins beeinflußt wird. Im Fall von c-myc liegt die O-GlcNAc Modifikation in der Transaktivierungsdomäne und verhindert dessen Phosphorylierung. Die Glykosylierungsstelle liegt in einer Region mit hoher Mutationsrate, und Mutationen an dieser Stelle werden häufig in Burkitt Lymphomas gefunden (Chou et al., 1995). Für das Protein Tau in der Alzheimer Krankheit wurde gezeigt, daß eine fehlende Glykosylierung zu einer Hyperphosphorylierung von Tau führt, und dieses dann in der Zelle Aggregate bildet. In diesem Fall wird eine nicht funktionelle O-GlcNAcase als Grund der Hypoglykosylierung vermutet [Arnold, 1996 #53]. So mag eine konstitutive Glykosylierung von Stat5a in der Brustkrebszelllinie SKBR3 Auswirkungen auf dessen Aktivität haben.

4.6 Mutation der potentiellen Glykosylierungsstelle Threonin 92 und Untersuchungen zur DNA-Bindung in Abhängigkeit der Stat5a-Glykosylierung

Um die eigentliche Glykosylierungsstelle bestimmen zu können, wurde Threonin 92 zu einem Alanin mit einer Punktmutagenese verändert (Stat5a-T92A). In Transfektionsexperimenten wurde die Expression des mutierten Stat5a-Konstruktes getestet und mit Wildtyp-Stat5a verglichen. Die Expressionslevel des Wildtyp-Stat5a Expressionsvektors und des Stat5a-T92A Expressionsvektors waren ähnlich stark, so daß das Stat5a-T92A Konstrukt in den folgenden Experimenten eingesetzt werden konnte.

O-GlcNAc kann ein regulatorischer Schalter zur Aktivierung oder Reprimierung der Proteinfunktion analog zur Phosphorylierung agieren (Hart, 1997). So wird zum Beispiel bei dem Onkoprotein p53 die DNA-Bindung des Proteins durch dessen Glykosylierung unterbunden (Shaw et al., 1996).

Da Gelretardierungsexperimente nicht die geeignete Methode waren, DNA-Bindung von glykosyliertem Stat5a zu untersuchen, wurde die DNA-Bindung in ABCD (avidin-biotin complex DNA-binding assay)-Experimenten analysiert. Es wurde das ABCD-System gewählt, da mit der Methode der Einsatz einer größeren Menge an Proteinextrakt möglich war. In diesem Experiment wurde biotinyliertes β -Casein Oligomer eingesetzt, das mit den an ihn gebundenen Proteinen mit Streptavidin-Kügelchen aufgereinigt wurde. In einem anschließenden Immunoblot wurde die DNA-Bindung von Stat5a mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Es konnte kein Unterschied in der DNA-Bindung zwischen glykosyliertem und nicht glykosyliertem Stat5a, mit dem β -Casein Oligomer beobachtet werden. Die Glykosylierungsstelle von Stat5a kann folglich nicht in der DNA-Bindungsdomäne liegen, wie dies für den Tumorsuppressor p53 gezeigt werden konnte (Shaw et al., 1996). Hier verhinderte die O-GlcNAc Modifikation des Tumorsuppressors die DNA-Bindung, und somit die

Transkription von Zielgenen. Auch die Dimerbildung von Stat5a scheint nicht von der Glykosylierung betroffen zu sein, da sonst eine DNA-Bindung nicht möglich oder schwächer wäre. Die *in vitro* DNA-Bindungsexperimente zeigen zudem, daß die Glykosylierung des Proteins nicht die Phosphorylierung des Tyrosins 694 von Stat5a verhindert. Das Tyrosin 694 von Stat5a spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung, der darauffolgenden Dimerisierung und im Kerntransport von Stat5a (Gouilleux et al., 1994), (Darnell, 1997).

Um gewährleisten zu können, daß eventuelle Effekte in den folgenden Experimenten nicht auf eine fehlende DNA-Bindung beruhen, wurde auch das DNA-Bindungsverhalten der Stat5a-T92A Mutante analysiert. In DNA-Bindungsexperimenten mit dem biotinyliertem β -Casein Oligonukleotid konnte deutlich gezeigt werden, daß kein Unterschied im Bindungsverhalten von Stat5a-T92A gegenüber dem Wildtyp Stat5a bestand. Die Threonin- zu Alanin-Mutation scheint somit die DNA-Bindung von Stat5a nicht aufzuheben.

4.7 Protein-Protein Interaktionen mit Stat5a in Abhängigkeit der O-GlcNAc Modifikation

Die O-GlcNAc Modifikation kann auch Lektin-ähnliche Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Chou et al., 1995) (Rudd et al., 2001). Viele O-GlcNAc Proteine sind in großen Proteinkomplexen mit anderen Glykoproteinen organisiert (z.B. Zytoskelett, RNA-Polymerase II Transkriptionskomplex, Kernporenkomplex). So beeinflusst das Anfügen eines GlcNAc an Keratine, Talin, Vinculin, Synapsin und die Neurofilamente deren Eingliederung in das Zytoskelett und die Zusammensetzung der Filamente (Lubas et al., 1995), (Cole and Hart, 1999), (Ku and Omary, 1995). Ein weiteres Beispiel ist die O-GlcNAc Modifikation von Sp1, die die Oligomerisierung des

Transkriptionsfaktors *in vitro* blockierte (Roos et al., 1997).

In dieser Arbeit wurde der Einfluß der Stat5a-Glykosylierung auf die Interaktion mit bekannten Interaktionspartnern wie den Glukokortikoid Rezeptor (GR) (Stocklin et al., 1996), das CREB binding protein (CBP) (Pfitzner et al., 1998) und den Korepressor der Transkription nuclear corepressor receptor (N-CoR) (persönliche Mitteilung Alexander Maurer und Thorsten Heinzel) untersucht.

4.7.1 Stat5a - Glukokortikoid Rezeptor Wechselwirkung

Prolaktin, Insulin und Glukokortikoide kooperieren in der Regulation der Transkription von Milchproteingenen. Der Glukokortikoid Rezeptor (GR) bindet dabei nicht nur in der Promotorregion des β -Casein Gens, sondern ist auch ein bekannter Koaktivator von Stat5. Durch die Interaktion mit dem Stat5-Protein wird die Stat5-abhängige Transkription durch den synergistischen Effekt des GR verstärkt (Stoeklin et al., 1997). Ob diese Protein-Protein Interaktion in Abhängigkeit der O-GlcNAc Modifikation stattfindet, sollte in Ko-Immunoaffinitätschromatographie Experimenten untersucht werden. Hierfür wurde glykosyliertes und nicht-glykosyliertes Stat5a jeweils mit GR-enhaltendem Proteinextrakt inkubiert, und anschließend Stat5a im Immunoblot detektiert.

Der GR interagiert mit Stat5a in dem Bereich der Coil-Coiled Domäne und der DNA-Bindungsdomäne, in der Nähe der zwei potentiellen Stat5a-Glykosylierungsstellen. Da kein Unterschied in der Protein-Protein Interaktion mit dem GR zu erkennen war, scheint die Stat5a-Glykosylierungsstelle nicht die Interaktion mit dem GR zu behindern. Der GR interagiert auch bevorzugt mit phosphoryliertem Stat5a. So ist zwar eine schwache Stat5a-Bande in der Spur mit dem eingesetzten GR-Extrakt zu sehen, diese repräsentiert allerdings nicht-phosphoryliertes Stat5a. Dies ist ersichtlich, da es ein geringeres Molekulargewicht aufweist als der eingesetzte rekombinante

phosphorylierte Stat5a-Proteinextrakt aus den Insektenzellen. Daraus kann geschlossen werden, daß bevorzugt phosphoryliertes Stat5a mit dem GR in der Ko-Immunoaffinitätschromatographie interagiert. Die synergistische Wirkung des GR als Koaktivator von Stat5 scheint somit nicht durch dessen Glykosylierung beeinflusst zu sein.

4.7.2 Stat5a – N-CoR Wechselwirkung

Für Stat5 konnte die spezifische Interaktion mit dem Korepressor der Transkription N-CoR (nuclear co-repressor receptor) gezeigt werden (persönliche Mitteilung Alexander Maurer und Thorsten Heinzel). N-CoR ist in einem großen Ko-Repressorkomplex unter anderem mit SMRT (silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors) organisiert (Li et al., 2000) (Maurer et al. 2001), und interagiert mit der DNA-Bindungsdomäne und der Linker-Domäne von Stat5. Das Rekrutieren von SMRT und N-CoR an einen Promotor resultiert in einer starken Repression der basalen Promotoraktivität. Durch ihre Möglichkeit mit einer Vielfalt von Transkriptionsfaktoren interagieren zu können, und somit transkriptionelle Repression von Zielgenen zu bewirken, spielen die Korepressoren N-CoR und SMRT eine fundamentale Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und Tumorentstehung (Aranda and Pascual, 2001).

Um einen möglichen Unterschied in der Wechselwirkung von glykosyliertem und nicht-glykosyliertem Stat5a mit N-CoR zu untersuchen, wurde in Ko-Immunoaffinitätschromatographie Experimenten die Interaktion von aufgereinigtem, glykosyliertem und nicht glykosyliertem Stat5a mit N-CoR enthaltenden Proteinextrakt untersucht. Es konnte kein Unterschied in der Interaktion von N-CoR mit glykosyliertem oder nicht glykosyliertem Stat5a festgestellt werden. Trotz der Nähe des Interaktionsbereichs von N-CoR zu den zwei potentiellen

Glykosylierungsstellen von Stat5a, scheint die Wechselwirkung von N-CoR mit Stat5a nicht von der O-GlcNAc Modifikation beeinflusst zu werden. Die Möglichkeit der Regulation der N-CoR Interaktion durch die O-GlcNAc Modifikation und einer möglichen Repression der Stat5a-Zielgene in Abhängigkeit der Glykosylierung scheint somit ausgeschlossen.

4.7.3 Stat5a – CBP Wechselwirkung

Neben Repressoren der Transkription wie N-CoR und SMRT interagiert Stat5a auch mit Koaktivatoren der Transkription wie CBP und p300 (Pfitzner et al., 1998). Diese Koaktivatoren besitzen eine potente Histonacetyltransferase-Aktivität und bilden zusammen mit pCAF einen Teil eines großen Multipolypeptidkomplexes und assistieren bei der Transkriptionsaktivierung von spezifischen Zielgenen (Gingras et al., 1999). Ob diese Protein-Protein Interaktion in Abhängigkeit der O-GlcNAc Modifikation stattfindet, sollte in Ko-Immunoaffinitätschromatographie Experimenten untersucht werden. Hierfür wurde aufgereinigtes, glykosyliertes und nicht-glykosyliertes Stat5a und Proteinextrakt mit mutiertem Stat5a, Stat5a-T92A, jeweils mit CBP-enhaltenden Proteinextrakt inkubiert, und im Immunoblot Stat5a detektiert. Glykosyliertes Stat5a interagiert hier bevorzugt mit CBP, jedoch nicht nicht glykosyliertes Stat5a. Stat5a-T92A zeigte in den Ko-Immunoaffinitätschromatographien, eine Aufhebung der CBP-Interaktion.

Die Interaktion des Koaktivators CBP mit Stat5 wurde für die Transaktivierungsdomäne gezeigt (Pfitzner et al., 1998). Die Transaktivierungsdomäne liegt am C-Terminus des Stat5a-Proteins und die mutierte potentielle Glykosylierungsstelle, Threonin 92, liegt am Stat5a N-Terminus. Es scheint somit ein Widerspruch zu sein, daß die Interaktion von Stat5a mit CBP durch die Mutation des Threonin 92 aufgehoben wurde. Es ist allerdings bekannt, daß ein weiteres Protein, das

Nmi (N-myc interacting protein), mit dem N-Terminus von Stat5 in der Coil-Coiled Domäne interagiert (Bannasch et al., 1999). Nmi verstärkt die transkriptionelle Aktivität von CBP. Somit besteht die Möglichkeit einer Interaktion von Stat5a und Nmi in Abhängigkeit der Stat5a-Glykosylierung. Durch eine fehlende Interaktion mit Nmi könnte somit die Interaktion mit CBP schwächer ausfallen. Die Transaktivierungsdomäne von Stat5a scheint bei der physikalischen Interaktion mit CBP wichtig zu sein, wobei die Modifikation von Stat5a mit O-GlcNAc die Affinität von CBP zu Stat5a zu erhöhen scheint. Es können auch andere nicht bekannte mit dem N-Terminus von Stat5a interagierende Proteine für die fehlende Wechselwirkung mit CBP verantwortlich sein.

Protein-Kohlenhydrat Interaktionen und der Einfluß des Kohlenhydratanteils auf die Protein-Protein Interaktion wurden in der Literatur vielfach beschrieben. Die Aufhebung der CBP-Interaktion nach Mutation des Threonins 92 läßt vermuten, daß eine potentielle Glykosylierungsstelle am N-Terminus von Stat5a gefunden und zerstört wurde. Diese Theorie wird durch die erhaltenen massenspektrometrischen Daten bestätigt, da nur eine der beiden potentiellen Glykosylierungsstellen, Threonin 92 oder Threonin 97, mit einem O-GlcNAc Zuckerrest modifiziert sein kann.

Die Reversibilität der Stat5a-Induktion in der Genexpression ist übereinstimmend mit der doppelten Rolle von CBP. Im Zusammenhang mit dem Interferon- β Promotor bewirkt die Histon-Acetylaseaktivität von CBP durch die Acetylierung des Lysins 71 des HMGI(Y) (high mobility group I protein) Proteins eine Stabilisierung des transkriptionsverstärkenden Komplexes. Die folgende Acetylierung des Lysins 65 dagegen inhibiert die DNA-Bindung und destabilisiert den Transkriptionskomplex (Munshi et al., 2001).

4.8 Einfluß der Mutation des Threonins 92 auf die transkriptionelle Regulation von Stat5a

In Ko-Immunoaffinitätschromatographie Experimenten mit Stat5a-T92A konnte keine Wechselwirkung mit CBP beobachtet werden. Aus diesem Grund sollte die Funktionalität der Stat5a-T92A Mutante in der Aktivierung der Transkription am β -Casein Promotor im Vergleich mit Wildtyp Stat5a in einem Luciferase-Assay untersucht werden. Hierfür wurden 293T Zellen jeweils mit Wildtyp Stat5a oder Stat5a-T92A, dem Prolaktin Rezeptor, einem Expressionsvektor für β -Galaktosidase und einem Luciferase-Reporterkonstrukt kotransfiziert. Die Zellen wurden mit Prolaktin stimuliert, und anschließend in einem Luciferase-Assay die Transaktivierung des β -Casein Gens gemessen. Nach Prolaktinstimulation von Wildtyp Stat5a konnte eine 8-fache Induktion der Transaktivierung des Luciferasegens gegenüber nicht stimulierten Zellen beobachtet werden. Dagegen konnte keine Transaktivierung mehr nach Prolaktinstimulation von Stat5a-T92A gezeigt werden. DNA-Bindungsexperimente belegten keine Veränderung des Bindungsverhaltens im Vergleich von Stat5a-T92A zu Wildtyp Stat5a. Eine aufgehobene DNA-Bindung kann somit nicht als Grund für die fehlende Transaktivierung angesehen werden. In Westernblot Experimenten konnte auch kein Unterschied im Expressionsniveau von Stat5a-T92A und Wildtyp Stat5a beobachtet werden, und kann auch nicht als Ursache für die fehlende Transaktivierung angesehen werden (Daten nicht gezeigt). Luciferase-Daten mit N-terminalen Deletionsmutanten von Stat5a weisen auch ein Fehlen des Transaktivierungspotentials auf. So scheint der N-Terminus von Stat5a eine wichtige Rolle in der Transaktivierung von Stat5a zu spielen. Da Stat5a-T92A nicht mehr in der Lage ist, mit CBP zu interagieren, mag der Grund für die fehlende Transaktivierung des β -Casein Promotors die aufgehobene Interaktion von glykosyliertem Stat5a mit dem Koaktivator CBP sein.

Es ist bekannt, daß der Stat5 N-Terminus wichtig für die Dimer:Dimer Formation ist. Eine weitere Erklärung der fehlenden Wechselwirkung von Stat5a-T92A mit CBP mag ein Defekt in der Tetramerisierung sein. Es ist nicht untersucht, ob CBP mit Stat5a-Dimeren oder -Tetrameren interagiert, so daß möglicherweise die Wechselwirkung mit CBP durch eine fehlende Tetramerisierung von Stat5a aufgehoben wurde. Dies würde bedeuten, daß durch die Punktmutation an Threonin 92 die Tetramerisierung von Stat5a aufgehoben würde. Eine wahrscheinlichere Erklärung aber stellt die Zerstörung der Glykosylierungsstelle am N-Terminus von Stat5a, und die daraus resultierende Aufhebung der CBP-Interaktion und des Transaktivierungspotentials von Stat5a am β -Casein Promotor dar. Die Tatsache, daß nur 10 Prozent der Stat5a-Proteine nach Zytokinstimulation im Kern glykosyliert vorliegt, unterstützt die Theorie von der O-GlcNAc Modifikation als ein zusätzliches regulatorisches Element in der Stat5a-Aktivität.

Andere Beispiele für solche reversiblen Modifikationen sind Stat1 und NF κ B. Die O-Acetylierung der RelA-Untereinheit von NF κ B fördert die Bindung zu I κ B α , und führt somit zu einem I κ B α -abhängigen Export des Komplexes aus dem Nukleus (Chen et al., 2001). Die Arginin-Methylierung von Stat1 durch die Protein-Arginin Methyltransferase PRMT1 verhindert die transkriptionelle Aktivierung von Stat1, und durch die Methylierung wird die Interferon-vermittelte Induktion der Transkription und der antiproliferative Effekt von Stat1 beeinträchtigt.

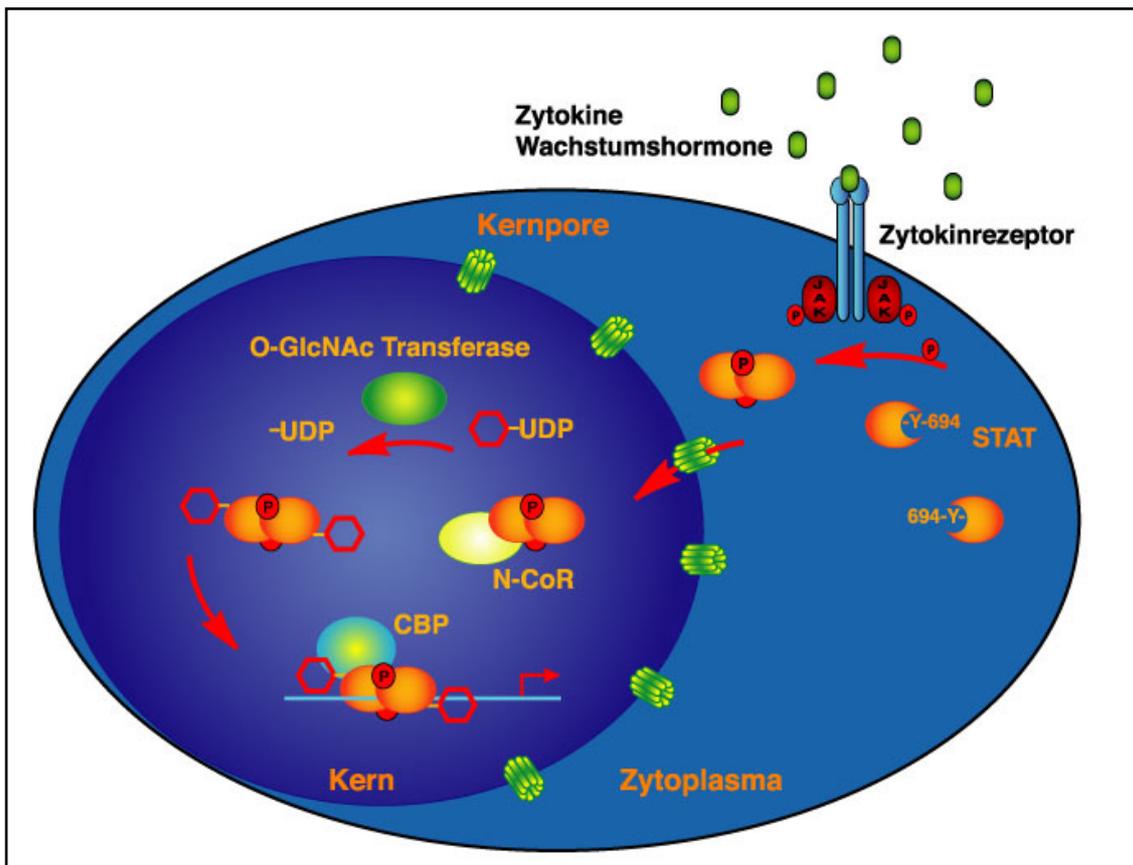


Abbildung 17: Der Jak-Stat5 Signaltransduktionsweg und die potentielle Regulation der Stat5-Zielgene durch die Stat5-Glykosylierung. Für den Koaktivator der Transkription CBP konnte nur eine Interaktion mit glykosyliertem Stat5 gezeigt werden, dagegen wurde kein Unterschied in der Interaktion mit dem Korepressor der Transkription N-CoR in Abhängigkeit des Stat5-Glykosylierungsgrades festgestellt. Die mögliche Regulation der Interaktion von Stat5 mit N-CoR oder CBP wird in diesem Modell dargestellt.

4.9 Ausblick

In den letzten Jahren wurde neben der Phosphorylierung die Signifikanz anderer posttranslationaler Modifikationen, wie der Acetylierung, der Methylierung und der Glykosylierung erkannt. Die dynamische O-GlcNAc Modifikation von Proteinen fand zunehmend Interesse, da sie ähnlich der Phosphorylierung die Proteinaktivität zu beeinflussen scheint, und somit ein zusätzliches regulatorisches Element in der Signaltransduktion darstellt. Zudem wurde ein Zusammenhang der O-GlcNAc Modifikation in verschiedenen Krankheiten wie dem Burkitt Lymphoma, Diabetes

und der Alzheimer Krankheit gezeigt. Da in vielen Krebs- und Leukämiearten Stat5 konstitutiv aktiv vorliegt, wäre es interessant, einen möglichen Zusammenhang der Stat5-Glykosylierung in der malignen Transformation aufzuklären.

Für Studien zur Identifikation und Wirkungsweise posttranslationaler Modifikationen sind im Baculovirus-Insektenexpressionssystem rekombinant exprimierte Proteine sehr nützlich, da sie ähnlich wie in Säugerzellen modifiziert und in hohen Mengen exprimiert werden. So könnten glykosylierungsdefiziente Stat5-Varianten im Insektenexpressionssystem exprimiert und in *in vitro*-Studien näher auf ihre defekten Funktionen untersucht werden. Desweiteren kann in Gelretardierungsexperimenten unter Verwendung unterschiedlicher Promotoren von Stat5-Zielgenen der Einfluß der potentiellen Stat5a-Glykosylierungsstelle am N-Terminus auf die Dimer- und Tetramerbildung analysiert werden.

Die massenspektrometrischen Analysen in dieser Arbeit ergaben zwei potentielle Glykosylierungsstellen am N-Terminus von Stat5a. Es wäre interessant, mögliche weitere Stat5-Glykosylierungsstellen oder Glykosylierungsstellen anderer Stat-Familienmitglieder zu identifizieren, und deren Funktion zu charakterisieren.

Da der Korepressor der Transkription N-CoR im Gegensatz zu dem Koaktivator der Transkription CBP nicht von der Stat5-Glykosylierung beeinflusst wird, mag die Interaktion mit Stat5 eine Frage der Affinität und der Menge an exprimierten Korepressor, bzw. Koaktivator sein. Die mögliche Regulation der Interaktion und der damit verbundenen Transkriptionsaktivierung oder Repression von Stat5-Zielgenen wäre zudem interessant näher zu untersuchen (Abbildung 17).

Es könnten weitere Interaktionspartner außer dem Koaktivator der Transkription CBP durch die O-GlcNAc Modifikation von Stat5 in ihrer Wechselwirkung beeinflusst sein, und nicht zuletzt, wäre die Etablierung einer "Knock in"-Zelllinie, die anstelle von Wildtyp-Stat5 glykosylierungsdefizientes Stat5 exprimiert, für die weitere Aufklärung der Funktion der Glykosylierung im Zusammenhang des Jak-Stat5 Signaltransduktionswegs sehr nützlich.

Literaturverzeichnis

Akimoto, Y., Kreppel, L. K., Hirano, H., and Hart, G. W. (2001). Hyperglycemia and the O-GlcNAc transferase in rat aortic smooth muscle cells: elevated expression and altered patterns of O-GlcNAcylation. *Arch Biochem Biophys* 389, 166-75.

Akimoto, Y., Kreppel, L. K., Hirano, H., and Hart, G. W. (1999). Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas. *Diabetes* 48, 2407-13.

Akira, S. (1999). Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17, 138-46.

Ali, S. (1998). Prolactin receptor regulates Stat5 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation by two separate pathways. *J Biol Chem* 273, 7709-16.

Allen, A. K., Neuberger, A., and Sharon, N. (1973). The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem J* 131, 155-62.

Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-304.

Arnold, C. S., Johnson, G. V., Cole, R. N., Dong, D. L. Y., Lee, M., and Hart, G. W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271, 28741-4.

Ball, R. K., Friis, R. R., Schoenenberger, C. A., Doppler, W., and Groner, B. (1988). Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo J* 7, 2089-95.

Bannasch, D., Weis, I., and Schwab, M. (1999). Nmi protein interacts with regions that differ between MycN and Myc and is localized in the cytoplasm of neuroblastoma cells in contrast to nuclear MycN. *Oncogene* 18, 6810-7.

Becker, S., Groner, B., and Muller, C. W. (1998). Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394, 145-51.

Beisenherz-Huss, C., Mundt, M., Herrala, A., Vihko, P., Schubert, A., Groner, B. (2001). Specific DNA binding and transactivation potential of recombinant, purified Stat5. *Mol Cell Endocrinol*.

Berchtold, S., Volarevic, S., Moriggl, R., Mercep, M., and Groner, B. (1998). Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine phosphatase inhibit prolactin activation of Jak2 (janus kinase 2) and induction of Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5)-dependent transcription. *Mol Endocrinol* 12, 556-67.

Biola, A., Lefebvre, P., Perrin-Wolff, M., Sturm, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2001). Interleukin-2 Inhibits Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activity through a Mechanism Involving STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) but Not AP-1. *Mol Endocrinol* 15, 1062-76.

Boehmelt, G., Wakeham, A., Elia, A., Sasaki, T., Plyte, S., Potter, J., Yang, Y., Tsang, E., Ruland, J., Iscove, N. N., Dennis, J. W., and Mak, T. W. (2000). Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32- deficient cells. *Embo J* 19, 5092-104.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-88.

Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1473, 67-95.

Bromberg, J. (2001). Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays* 23, 161-9.

Bromberg, J., and Darnell, J. E. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468-73.

Burchell, J. M., Mungul, A., and Taylor-Papadimitriou, J. (2001). O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 355-64.

Cella, N., Cornejo-Uribe, R. R., Montes, G. S., Hynes, N. E., and Chammas, R. (1996). The lysosomal-associated membrane protein LAMP-1 is a novel differentiation marker for HC11 mouse mammary epithelial cells. *Differentiation* 61, 113-20.

Cella, N., Groner, B., and Hynes, N. E. (1998). Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol* 18, 1783-92.

Chen, L., Fischle, W., Verdin, E., and Greene, W. C. (2001). Duration of nuclear nf-kappa b action regulated by reversible acetylation. *Science* 293, 1653-7.

Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E., and Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827-39.

Cheng, X., Cole, R. N., Zaia, J., and Hart, G. W. (2000). Alternative O-Glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* 39, 11609

Cheng, X., and Hart, G. W. (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* 276, 10570-5.

Choi, J. Y., Woo, S. D., Je, Y. H., and Kang, S. K. (1999). Development of a novel expression vector system using *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *Mol Cells* 9, 504-9.

Chou, T. Y., Dang, C. V., and Hart, G. W. (1995). Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4417-21.

Chou, T. Y., Hart, G. W., and Dang, C. V. (1995). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270, 18961-5.

Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-5.

Cohen, R. N., Putney, A., Wondisford, F. E., and Hollenberg, A. N. (2000). The nuclear corepressors recognize distinct nuclear receptor complexes. *Mol Endocrinol* 14, 900-14.

Cole, R. N., and Hart, G. W. (1999). Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: O-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. *J Neurochem* 73, 418-28.

Comer, F. I., and Hart, G. W. (1999). O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1473, 161-71.

Comer, F. I., and Hart, G. W. (2000). O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. DYNAMIC INTERPLAY BETWEEN O-GlcNAc AND O-PHOSPHATE [In Process Citation]. *J Biol Chem* 275, 29179-82.

Comer, F. I., and Hart, G. W. (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* *40*, 7845-52.

Couldrey, C., and Green, J. E. (2000). Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res* *2*, 321-3.

Danial, N. N., and Rothman, P. (2000). JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* *19*, 2523-31.

Darnell, J. E. (1997). STATs and gene regulation. *Science* *277*, 1630-5.

David, M., Chen, H. E., Goelz, S., Lerner, A. C., and Neel, B. G. (1995). Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* *15*, 7050-8.

David, M., Petricoin, E., 3rd, Benjamin, C., Pine, R., Weber, M. J., and Lerner, A. C. (1995). Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* *269*, 1721-3.

Dennis, J. W., Granovsky, M., and Warren, C. E. (1999). Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* *21*, 412-21.

Dinerstein-Cali, H., Ferrag, F., Kayser, C., Kelly, P. A., and Postel-Vinay, M. (2000). Growth hormone (GH) induces the formation of protein complexes involving stat5, erk2, shc and serine phosphorylated proteins. *Mol Cell Endocrinol* *166*, 89-99.

Dinter, A., and Berger, E. G. (1995). The regulation of cell- and tissue-specific expression of glycans by glycosyltransferases. *Adv Exp Med Biol* *376*, 53-82.

Dong, D. L., and Hart, G. W. (1994). Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl- beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem* 269, 19321-30.

Dong, D. L., Xu, Z. S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D. W., and Hart, G. W. (1993). Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J Biol Chem* 268, 16679-87.

Doppler, W., Welte, T., and Philipp, S. (1995). CCAAT/enhancer-binding protein isoforms beta and delta are expressed in mammary epithelial cells and bind to multiple sites in the beta-casein gene promoter. *J Biol Chem* 270, 17962-9.

Doppler, W., Windegger, M., Soratroi, C., Tomasi, J., Lechner, J., Rusconi, S., Cato, A. C., Almlof, T., Liden, J., Okret, S., Gustafsson, J. A., Richard-Foy, H., Starr, D. B., Klocker, H., Edwards, D., and Geymayer, S. (2001). Expression level-dependent contribution of glucocorticoid receptor domains for functional interaction with STAT5. *Mol Cell Biol* 21, 3266-79.

Downes, M., Ordentlich, P., Kao, H. Y., Alvarez, J. G., and Evans, R. M. (2000). Identification of a nuclear domain with deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10330-5.

Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12222-6.

Dumon, S., Santos, S. C., Debierre-Grockiego, F., Gouilleux-Gruart, V., Cocault, L., Boucheron, C., Mollat, P., Gisselbrecht, S., and Gouilleux, F. (1999). IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 18, 4191-9.

Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C., and Levy, D. E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443-50.

Duschl, A., and Sebald, W. (1996). Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. *Eur Cytokine Netw* 7, 37-49.

Duverger, E., Roche, A. C., and Monsigny, M. (1996). N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* 6, 381-6.

Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., and Yoshimura, A. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-4.

Fenouillet, E., Miquelis, R., and Drillien, R. (1996). Biological properties of recombinant HIV envelope synthesized in CHO glycosylation-mutant cell lines. *Virology* 218, 224-31.

Gadina, M., Hilton, D., Johnston, J. A., Morinobu, A., Lighvani, A., Zhou, Y. J., Visconti, R., and O'Shea, J. J. (2001). Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol* 13, 363-73.

Garcia, R., Yu, C. L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K. L., Smithgall, T., Fujita, D. J., Ethier, S. P., and Jove, R. (1997). Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 8, 1267-76.

Gao, Y., Wells, L., Comer, F. I., Parker, G. J., and Hart, G. W. (2001). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem* 276, 9838-45.

Gingras, S., Simard, J., Groner, B., and Pfitzner, E. (1999). p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6. *Nucleic Acids Res* 27, 2722-9.

Goldstein, I. J., and Hayes, C. E. (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 35, 127-340.

Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., and Groner, B. (1994). Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J* 13, 4361-9.

Gouilleux, F., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Wakao, H., Haldosen, L. A., Norstedt, G., Levy, D., and Groner, B. (1995). Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *Embo J* 14, 2005-13.

Greis, K. D., Gibson, W., and Hart, G. W. (1994). Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *J Virol* 68, 8339-49.

Grosveld, G., Verwoerd, T., van Agthoven, T., de Klein, A., Ramachandran, K. L., Heisterkamp, N., Stam, K., and Groffen, J. (1986). The chronic myelocytic cell line K562 contains a breakpoint in bcr and produces a chimeric bcr/c-abl transcript. *Mol Cell Biol* 6, 607-16.

Gupta, R., Jung, E., Gooley, A. A., Williams, K. L., Brunak, S., and Hansen, J. (1999). Scanning the available *Dictyostelium discoideum* proteome for O-linked GlcNAc glycosylation sites using neural networks. *Glycobiology* 9, 1009-22.

Hagmann, J., Grob, M., and Burger, M. M. (1992). The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *J Biol Chem* 267, 14424-8.

Haltiwanger, R. S., Grove, K., and Philipsberg, G. A. (1998). Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N- acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D- glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem* 273, 3611-7.

Haltiwanger, R. S., Blomberg, M. A., and Hart, G. W. (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 267, 9005-13.

Han, I., and Kudlow, J. E. (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* 17, 2550-8.

Hanover, J. A., Lai, Z., Lee, G., Lubas, W. A., and Sato, S. M. (1999). Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta- cells. *Arch Biochem Biophys* 362, 38-45.

Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., and Groner, B. (1994). Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J* 13, 4361-9.

Hanover, J.A. (2001) Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J* 15, 1865-76.

Hart, G. W. (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* 66, 315-35.

Hart, G. W., Haltiwanger, R. S., Holt, G. D., and Kelly, W. G. (1989). Nucleoplasmic and cytoplasmic glycoproteins. *Ciba Found Symp* 145, 102-12.

Hart, G. W., Kreppel, L. K., Comer, F. I., Arnold, C. S., Snow, D. M., Ye, Z., Cheng, X., DellaManna, D., Caine, D. S., Earles, B. J., Akimoto, Y., Cole, R. N., and Hayes, B. K. (1996). O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* 6, 711-6.

Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-9.

Holt, G. D., Haltiwanger, R. S., Torres, C. R., and Hart, G. W. (1987). Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *J Biol Chem* 262, 14847-50.

Ihle, J. N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* 377, 591-4.

Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., and Silvennoinen, O. (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13, 369-98.

Imada, K., and Leonard, W. J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37, 1-11.

Jiang, N., He, T. C., Miyajima, A., and Wojchowski, D. M. (1996). The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta- receptor chimera. *J Biol Chem* 271, 16472-6.

Jung, E., Gooley, A. A., Packer, N. H., Slade, M. B., Williams, K. L., and Dittrich, W. (1997). An in vivo approach for the identification of acceptor sites for O-glycosyltransferases: motifs for the addition of O-GlcNAc in *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry* 36, 4034-40.

Kearse, K. P., and Hart, G. W. (1991). Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1701-5.

Kelly, W. G., and Hart, G. W. (1989). Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N- acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell* 57, 243-51.

Kim, T. K., and Maniatis, T. (1996). Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin- proteasome pathway. *Science* 273, 1717-9.

Kitajima, K., Suzuki, T., Kouchi, Z., Inoue, S., and Inoue, Y. (1995). Identification and distribution of peptide:N-glycanase (PNGase) in mouse organs. *Arch Biochem Biophys* 319, 393-401.

Konrad, R. J., Mikolaenko, I., Tolar, J. F., Liu, K., and Kudlow, J. E. (2001). The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D- glucosaminidase. *Biochem J* 356, 31-41.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-64.

Koyama, M., Nagai, H., Bando, K., Ito, M., Moriyama, Y., and Emi, M. (1999). Localization of a target region of allelic loss to a 1-cM interval on chromosome 16p.13.13 in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 90, 951-6.

Kramer, O. H., Gottlicher, M., and Heinzl, T. (2001). Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab* 12, 294-300.

Krebs, D. L., and Hilton, D. J. (2000). SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113, 2813-9.

Krishna, R. G., and Wold, F. (1993). Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 67, 265-98.

Ku, N. O., and Omary, M. B. (1995). Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. *J Biol Chem* 270, 11820-7.

Lecine, P., Algarte, M., Rameil, P., Beadling, C., Bucher, P., Nabholz, M., and Imbert, J. (1996). Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2 receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* 16, 6829-40.

Leonard, W. J. (2001). Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol* 73, 271-7.

Li, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J. M., Qin, J., and Wong, J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *Embo J* 19, 4342-50.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-31.

Liu, R. Y., Fan, C., Garcia, R., Jove, R., and Zuckerman, K. S. (1999). Constitutive activation of the JAK2/STAT5 signal transduction pathway correlates with growth factor independence of megakaryocytic leukemic cell lines. *Blood* 93, 2369-79.

Liu, K., Paterson, A. J., Chin, E., and Kudlow, J. E. (2000). Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2820-5.

Liu, X., Robinson, G. W., Gouilleux, F., Groner, B., and Hennighausen, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8831-5.

Liu, K., Paterson, A. J., Chin, E., and Kudlow, J. E. (2000). Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2820-5.

Look, D. C., Pelletier, M. R., Tidwell, R. M., Roswit, W. T., and Holtzman, M. J. (1995). Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *J Biol Chem* 270, 30264-7.

Lubas, W. A., and Hanover, J. A. (2000). Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem* 275, 10983-8.

Lubas, W. A., Smith, M., Starr, C. M., and Hanover, J. A. (1995). Analysis of nuclear pore protein p62 glycosylation. *Biochemistry* 34, 1686-94.

Malette, B., and Bleau, G. (1993). Biochemical characterization of hamster oviductin as a sulphated zona pellucida-binding glycoprotein. *Biochem J* 295, 437-45.

Matsumura, I., Ishikawa, J., Nakajima, K., Oritani, K., Tomiyama, Y., Miyagawa, J., Kato, T., Miyazaki, H., Matsuzawa, Y., and Kanakura, Y. (1997). Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5. *Mol Cell Biol* 17, 2933-43.

Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R. G., and Kanakura, Y. (1999). Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *Embo J* 18, 1367-77.

Maurer, A.B., Wichmann, C., Kunkel, H., Heinzl, T., Ruthardt, M., Groner, B., Grez, M. (2001) The Stat5-RAR alpha fusion protein represses transcription and differentiation through interaction with a corepressor complex. *Blood*.

McDonald, C., and Reich, N. C. (1999). Cooperation of the transcriptional coactivators CBP and p300 with Stat6. *J Interferon Cytokine Res* *19*, 711-22.

Medina, D. (1996). The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *1*, 5-19.

Miyoshi, K., Cui, Y., Riedlinger, G., Lehoczky, J., Zon, L., Oka, T., Dewar, K., and Hennighausen, L. (2001). Structure of the mouse stat 3/5 locus: evolution from drosophila to zebrafish to mouse. *Genomics* *71*, 150-5.

Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., and David, M. (2001). Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell* *104*, 731-41.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., and Kishimoto, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* *387*, 924-9.

Nicola, N. A. (1989). Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* *58*, 45-77.

Odenthal-Schnittler, M., Tomavo, S., Becker, D., Dubremetz, J. F., and Schwarz, R. T. (1993). Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii*. *Biochem J* *291*, 713-21.

Palcic, M. M., and Hindsgaul, O. (1991). Flexibility in the donor substrate specificity of beta 1,4- galactosyltransferase: application in the synthesis of complex carbohydrates. *Glycobiology* *1*, 205-9.

Parekh, R. B., and Rohlf, C. (1997). Post-translational modification of proteins and the discovery of new medicine. *Curr Opin Biotechnol* 8, 718-23.

Pawson, T. (1995). Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* 373, 477-8.

Pazin, M. J., and Kadonaga, J. T. (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89, 325-8.

Pellegrini, S., and Dusanter-Fourt, I. (1997). The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 248, 615-33.

Pfitzner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., and Groner, B. (1998). p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* 12, 1582-93.

Pircher, T. J., Petersen, H., Gustafsson, J. A., and Haldosen, L. A. (1999). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Mol Endocrinol* 13, 555-65.

Rademacher, T. W., Parekh, R. B., and Dwek, R. A. (1988). Glycobiology. *Annu Rev Biochem* 57, 785-838.

Raught, B., Liao, W. S., and Rosen, J. M. (1995). Developmentally and hormonally regulated CCAAT/enhancer-binding protein isoforms influence beta-casein gene expression. *Mol Endocrinol* 9, 1223-32.

Reason, A. J., Morris, H. R., Panico, M., Marais, R., Treisman, R. H., Haltiwanger, R. S., Hart, G. W., Kelly, W. G., and Dell, A. (1992). Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor. *J Biol Chem* 267, 16911-21.

Roos, M. D., Su, K., Baker, J. R., and Kudlow, J. E. (1997). O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol* 17, 6472-80.

Roquemore, E. P., Chou, T. Y., and Hart, G. W. (1994). Detection of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on cytoplasmic and nuclear proteins. *Methods Enzymol* 230, 443-60.

Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., and Dwek, R. A. (2001). Glycosylation and the immune system. *Science* 291, 2370-6.

Sayeski, P. P., and Kudlow, J. E. (1996). Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 271, 15237-43.

Schachter, H. (2001). Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci* 58, 1085-104.

Schaefer, T. S., Sanders, L. K., and Nathans, D. (1995). Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9097-101.

Schindler, C. (1998). STATs as activators of apoptosis. *Trends Cell Biol* 8, 97-8.

Schmitt-Ney, M., Happ, B., Hofer, P., Hynes, N. E., and Groner, B. (1992). Mammary gland-specific nuclear factor activity is positively regulated by lactogenic hormones and negatively by milk stasis. *Mol Endocrinol* 6, 1988-97.

Shafi, R., Iyer, S. P., Ellies, L. G., O'Donnell, N., Marek, K. W., Chui, D., Hart, G. W., and Marth, J. D. (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5735-9.

Sharon, N., and Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246, 227-34.

Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. (1996). Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O- glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12, 921-30.

Shuai, K. (1999). The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 405-22.

Silvennoinen, O., Nishigaki, H., Kitanaka, A., Kumagai, M., Ito, C., Malavasi, F., Lin, Q., Conley, M. E., and Campana, D. (1996). CD38 signal transduction in human B cell precursors. Rapid induction of tyrosine phosphorylation, activation of syk tyrosine kinase, and phosphorylation of phospholipase C-gamma and phosphatidylinositol 3- kinase. *J Immunol* 156, 100-7.

Sliva, D., and Haldosen, L. A. (1996). STAT-like DNA-binding activity in *Spodoptera frugiperda* cells. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 562-9.

Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H. F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-91.

Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-21.

Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726-8.

Stoecklin, E., Wissler, M., Moriggl, R., and Groner, B. (1997). Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 17, 6708-16.

Suzuki, T., Seko, A., Kitajima, K., Inoue, Y., and Inoue, S. (1994). Purification and enzymatic properties of peptide:N-glycanase from C3H mouse-derived L-929 fibroblast cells. Possible widespread occurrence of post-translational remodeling of proteins by N-deglycosylation. *J Biol Chem* 269, 17611-8.

Takeda, T., Kurachi, H., Yamamoto, T., Nishio, Y., Nakatsuji, Y., Morishige, K., Miyake, A., and Murata, Y. (1998). Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoid-nuclear receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid. *J Endocrinol* 159, 323-30.

Taniguchi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-5.

Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J. N. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-50.

Verdier, F., Rabionet, R., Gouilleux, F., Beisenherz-Huss, C., Varlet, P., Muller, O., Mayeux, P., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Chretien, S. (1998). A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol* 18, 5852-60.

Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J. E., and Kuriyan, J. (1998). Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279, 1048-52.

Wakao, H., Gouilleux, F., and Groner, B. (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *Embo J* 13, 2182-91.

Wakao, H., Schmitt-Ney, M., and Groner, B. (1992). Mammary gland-specific nuclear factor is present in lactating rodent and bovine mammary tissue and composed of a single polypeptide of 89 kDa. *J Biol Chem* 267, 16365-70.

Wartmann, M., Cella, N., Hofer, P., Groner, B., Liu, X., Hennighausen, L., and Hynes, N. E. (1996). Lactogenic hormone activation of Stat5 and transcription of the beta- casein gene in mammary epithelial cells is independent of p42 ERK2 mitogen-activated protein kinase activity. *J Biol Chem* 271, 31863-8.

Wells, L., Vosseller, K., and Hart, G. W. (2001). Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O- GlcNAc. *Science* 291, 2376-8.

Whitford, M., and Faulkner, P. (1992). A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. *J Virol* 66, 3324-9.

Widschwendter, M., Widschwendter, A., Welte, T., Daxenbichler, G., Zeimet, A. G., Bergant, A., Berger, J., Peyrat, J. P., Michel, S., Doppler, W., and Marth, C. (1999). Retinoic acid modulates prolactin receptor expression and prolactin- induced STAT-5 activation in breast cancer cells in vitro. *Br J Cancer* 79, 204-10.

Wood, T. J., Sliva, D., Lobie, P. E., Goullieux, F., Mui, A. L., Groner, B., Norstedt, G., and Haldosen, L. A. (1997). Specificity of transcription enhancement via the STAT responsive element in the serine protease inhibitor 2.1 promoter. *Mol Cell Endocrinol* 130, 69-81.

Yamamoto, K., Tsuji, T., Matsumoto, I., and Osawa, T. (1981). Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin. *Biochemistry* 20, 5894-9.

Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R., and Darnell, J. E., Jr. (1996). Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* 84, 421-30.

Yoshimura, A., and Arai, K. (1996). Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. *Oncologist* 1, 337-339.

Zhang, J. J., Vinkemeier, U., Gu, W., Chakravarti, D., Horvath, C. M., and Darnell, J. E., Jr. (1996). Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15092-6.

Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J. S., Fuentes, N. L., and Fuller, G. M. (1997). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* 272, 30607-10.

Zhu, M., John, S., Berg, M., and Leonard, W. J. (1999). Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling. *Cell* 96, 121-30.

Veröffentlichungen

Zur Doktorarbeit

Christina Gewinner, Gerald Hart, Natasha Zachara, Robert Cole, and Bernd Groner, (2001) “The coactivator CREB binding protein (CBP) interacts preferentially with the glycosylated form of the transcription factor Stat5“ (submitted to Science).

Zur Diplomarbeit

Eckhard Strauch, Heike Kaspar, Christoph Schaudinn, Petra Dersch, Kazimierz Madela, Christina Gewinner, Stefan Hertwig, Jörg Wecke and Bernd Appel, System. Appl. Microbiol. (2001) “Characterization of enterocolicin, a phage tail like bacteriocin, and its application against a pathogenic *Yersinia enterocolitica* strain *in vitro* and in a cell culture model.“

Bernd Hoffmann, Eckhard Strauch, Christina Gewinner, Herbert Nattermann and Bernd Appel. System. Appl. Microbiol. 21 (1998), “Characterization of Plasmid Regions of foodborne *Yersinia enterocolitica* Biogroup 1A Strains hybridizing to the *Yersinia enterocolitica* Virulence Plasmid“.

Poster

C. Gewinner, G.W. Hart, C. Beisenherz-Huss, and B. Groner (2001) "Glycosylated Stat5 interacts preferentially with the coactivator of transcription CBP", STS-Meeting, Weimar, Germany.

C. Gewinner, C. Beisenherz and B. Groner (2001) "Differential Interaction of Glycosylated Stat5 with the Coactivator of Transcription (CBP)", Nuclear Receptors in Health and Disease, St. Odile, France.

C. Gewinner and Bernd Groner (1999). "Inducible glycosylation of Stat5" FEBS Meeting, Nice, France, Biochimie 81 (1999) s104

C. Gewinner, C. Beisenherz, B. Groner (1998) "Dynamic Glycosylation of Stat5", STS-Meeting 1998, Langen, Germany.

C. Gewinner, E. Strauch and B. Appel (1997) "Characterization of different apathogenic *Yersinia enterocolitica*-strains Biovar 1A", VAAM Meeting, Hamburg, Germany.

Vorträge

February 2001 "Dynamic O-Glcosylation of Stat5 and differential interaction with CBP/p300". DFG (German Research Community), grant application, Bonn, Germany.

September 1999 "Secondary Modification of Stat5". DFG (German Research Community), Germany.

Lebenslauf

Vorname, Christina Anja

Nachname Gewinner

Geburtsdatum und -ort 8. April 1972, Krumbach (Schwaben)

Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung 1978-1982 Rote-Tor Grundschule, Augsburg
1983-1984 Hauptschule Herrenbach, Augsburg
1984-1986 Maria Stern-Gymnasium, Augsburg
1986-1992 Canisius Kolleg, Berlin
1992 Abschluß des Gymnasiums mit dem Abitur,
Benotung: 2,5

Studium 1992-1997 Studium der Biologie an der Freien
Universität, Berlin

Diplomprüfungen

Vordiplom:

Organische Chemie: Prof. Dr. Kurrek , Beurteilung:
"sehr gut"

Physik: bei Prof. Dr. Brewer, Beurteilung: "sehr gut"

Allgemeine Biologie/Mikrobiologie: bei Prof. Dr.
Schönheit, Beurteilung: "sehr gut"

Zoologie: bei Prof. Dr. Graczynski, Beurteilung: " sehr
gut"

Hauptdiplom:

Hauptfach:

Molekularbiologie/Biochemie: bei Prof. Dr. Messer,
Beurteilung: "sehr gut"

Nebenfächer:

Mikrobiologie: bei Prof. Dr. Schönheit, Beurteilung:
"sehr gut"

Tierphysiologie/Verhalten: bei Prof. Dr. Graczynski,
Beurteilung: "sehr gut"

Diplomarbeit

am Robert-Koch-Institut, Fachbereich
Genetik/Gentechnik, Berlin bei Prof. Dr. Bernd Appel.

Thema: "Molekularbiologische Untersuchungen zur
Charakterisierung von Plasmiden aus verschiedenen
Yersinia-Stämmen". Beurteilung: "sehr gut"

Doktorarbeit

Juli 1997 - Oktober 1998 an der Klinik für
Tumorbiologie in Freiburg bei Prof. Dr. Bernd Groner

Oktober 1998 - jetzt am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt
bei Prof. Dr. Groner

Thema der Doktorarbeit

"Identifikation und Charakterisierung der dynamischen
O-GlcNAc Modifikation des Transkriptionsfaktors
Stat5"

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 16. November 2001

Christina Gewinner