

**Inhibierung von Stat5 in Tumoren durch
RNA-Interferenz und spezifische
Interaktion eines Peptidaptamer-
Konstruktes mit der DNA-Bindedomäne**

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich Biowissenschaften

der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main



von

Axel Weber

aus Erfurt

Frankfurt am Main 2013

vom Fachbereich Biowissenschaften der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Groner

Datum der Disputation:

„Es gibt nichts Gutes, außer man tut es“

Erich Kästner

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis.....	XII
Zusammenfassung	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Regulation der zellulären Signalübertragung.....	1
1.1.1 Signaltransduktion.....	2
1.1.2 Die maligne Entartung von Zellen durch deregulierte Signaltransduktionskaskaden.....	4
1.2 Die Familie der Stat-Transkriptionsfaktoren.....	5
1.2.1 Der Jak/Stat-Signalweg.....	9
1.2.2 Die physiologische & pathologische Rolle von Stat-Proteinen im Organismus.....	15
1.3 Stat5	19
1.3.1 Die physiologischen Funktionen von Stat5.....	20
1.3.2 Der Einfluss von Stat5 auf die Tumorgenese.....	25
1.4 Interferenz mit intrazellulären Proteinen durch Peptidaptamere als Ansatz in der Krebstherapie.....	32
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	38
2 Material & Methoden.....	39
2.1 Versuchsmaterial	39
2.1.1 Chemikalien/Reagenzien/biologisches Material.....	39

Inhaltsverzeichnis

2.1.2	Puffer/Lösungen.....	41
2.1.3	Geräte.....	42
2.1.4	Labor-Verbrauchsmaterial.....	44
2.1.5	Labor-Kits.....	45
2.1.6	Plasmide.....	46
2.1.6.1	Hefe-Expressionsvektoren	46
2.1.6.2	Bakterielle Expressionsvektoren	47
2.1.6.3	Eukaryotische Expressionsvektoren.....	48
2.1.7	Oligonukleotide.....	49
2.1.7.1	shRNA gegen das humane Stat5A- & Stat5B-Gen.....	49
2.1.7.2	Peptidaptamer-Expressionsbibliothek (Oligonukleotid-Library)	50
2.1.7.3	Primer für Klonierungen	51
2.1.7.4	Primer für Real-Time-PCR Analysen von Stat5-Zielgenen.....	51
2.1.7.5	Stat5-Enhancer-Element	52
2.1.8	Enzyme.....	53
2.1.9	Antikörper.....	54
2.1.10	Bakterienstämme & Bakterienmedien.....	55
2.1.11	Hefestämme & Hefemedien.....	56
2.1.12	Zelllinien & Zellkulturmedien.....	57
2.2	Methoden.....	61
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	61
2.2.1.1	Plasmid-Transformation in <i>E.coli</i> Zellen.....	61
2.2.1.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.Coli</i> Zellen.....	62

2.2.1.3	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	63
2.2.1.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese	63
2.2.1.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	64
2.2.1.6	DNA-Sequenzanalyse.....	64
2.2.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	65
2.2.1.8	Klonierungsschritte.....	66
2.2.1.8.1	Ausschneiden von DNA-Fragmenten (Restriktionsverdau).....	66
2.2.1.8.2	Ethanol-fällung von DNA	67
2.2.1.8.3	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	67
2.2.1.8.4	Dephosphorylierung von 5'-Enden	68
2.2.1.8.5	Einbau (Ligation) von DNA-Fragmenten in Plasmide	68
2.2.1.8.6	Subklonierung von DNA-Fragmenten über das TOPO-TA-Cloning Kit	69
2.2.1.9	RNA-Isolation & cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	70
2.2.1.9.1	RNA-Isolation	70
2.2.1.9.2	cDNA-Synthese.....	70
2.2.1.10	Real-Time PCR (qPCR).....	71
2.2.2	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast-2-Hybrid System).....	72
2.2.2.1	Plasmid-Transformation in Hefe-Zellen (<i>S.cerevisiae</i>)	73
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe-Zellen (<i>S. cerevisiae</i>)	73
2.2.2.3	Der Hefe-Zwei-Hybrid Screen.....	74
2.2.2.3.1	„Library Scale“-Hefetransformation & Library Screen	75
2.2.2.3.2	Isolation der Vektoren positiv selektionierter Hefe-Klone & DNA-Sequenzierung des Beute-Proteins („Prey“)	76
2.2.2.3.3	Nachweis der Protein-Interaktionsstärke durch das Anfertigen von Tropfplatten..	76

2.2.2.3.4	Nachweis der Protein-Interaktionsstärke über die β -Galactosidase-Aktivität	77
2.2.3	Zellkultur- & virologische Methoden.....	78
2.2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	78
2.2.3.2	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen durch Lipofektion	79
2.2.3.3	Produktion lentiviraler Partikel & lentiviraler Gentransfer	80
2.2.3.3.1	Transiente Transfektion von 293T Zellen durch Calciumphosphat-Präzipitation ...	81
2.2.3.3.2	Aufkonzentrierung lentiviraler Partikel durch Ultrazentrifugation	82
2.2.3.3.3	Titrierung von Viruspartikeln & Transduktion von Zielzellen (Bestimmung des Virustiters)	83
2.2.3.4	Durchflusszytometrische Analyse & Selektionierung von Zellen (FACS-Messung / FACS-Sortierung)	84
2.2.3.4.1	Analyse der Fluoreszenzmarker-Expression.....	84
2.2.3.4.2	Isolation positiv-transduzierter Zielzellen („FACS-Sorting“).....	85
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden (Proteomics).....	85
2.2.4.1	Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine	85
2.2.4.2	Anfertigen von Zelllysaten – Proteinextraktion	87
2.2.4.3	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	89
2.2.4.4	Qualitative Proteinbestimmung.....	89
2.2.4.4.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen (SDS-PAGE)	89
2.2.4.4.2	Coomassieblau-Färbung von Polyacrylamidgelen.....	90
2.2.4.4.3	Immunologischer Proteinnachweis (Western Blot)	90
2.2.4.5	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation	91
2.2.4.6	Nachweis zellulärer Proteine durch Immunfluoreszenz	92

2.2.5	Methoden zur Analyse einer Funktionellen Inhibierung von Stat5	93
2.2.5.1	Analyse der Proliferation und Viabilität von Zellen	93
2.2.5.1.1	Bestimmung von Zellproliferation & -viabilität mit dem XTT-Assay	93
2.2.5.1.2	Bestimmung der kumulativen Zellzahl von Suspensionszellen	94
2.2.5.1.3	Messung apoptotischer Zellen durch Annexin V/7-AAD Färbung	95
2.2.5.2	Inhibierung transkriptioneller Aktivität – Untersuchung der DNA-Bindeaktivität von Stat5	96
2.2.5.2.1	Dual-Luziferase-Reporterassay	96
2.2.5.2.2	Gelshift-Assay (EMSA)	97
3	Ergebnisse	99
3.1	Evaluierung von STAT5 als Zielstruktur für eine therapeutische Intervention in Tumoren	101
3.1.1	Stat5 Expression und Aktivierung in Tumorzellen	101
3.1.2	Validierung der Stat5-Abhängigkeit humaner Tumorzellen durch RNA-Interferenz	109
3.1.2.1	Klonierung lentiviraler shRNA-Expressionsvektoren zur Interferenz mit humaner Stat5A- und Stat5B-mRNA	110
3.1.2.2	Inhibierung der Stat5A/B-Expression durch RNA-Interferenz („Stat5A/B shRNA-Doppel-Knockdown“)	111
3.1.2.2.1	Stat5-Knockdown in K562- & HEL-Zellen	112
3.1.2.2.2	Stat5-Knockdown in Ku812 & Kasumi-1 Zellen	125
3.1.2.2.3	Stat5-Knockdown in soliden Tumorzellen	127
3.2	Isolation einer 12mer Peptidaptamer-Sequenz, welche mit einer funktionellen Domäne des humanen Stat5A-Proteins interagiert	132

3.2.1 Identifikation einer Stat5-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz durch das Hefe-Zwei-Hybrid Verfahren.....	133
3.2.1.1 Die Verwendeten GAL4-DBD-Fusionskonstrukte als Köder für den Peptidaptamer-Screen	133
3.2.1.2 DNA-Zweitstrangsynthese der randomisierten „Hairpin“-Oligonukleotid-Library	134
3.2.1.3 Klonierung der Library-Vektoren für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen (Insertion der Oligonukleotid-Library in das optimierte humane Thioredoxin-Scaffoldprotein)	135
3.2.1.4 Transformation & Amplifikation der klonierten Library-Vektoren	138
3.2.1.5 Hefetransformation & Library Screen	138
3.2.1.6 Validierung der Interaktion zwischen S5-DBD-PA und der DNA-Bindedomäne von Stat5 mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System.....	141
3.2.2 Aufreinigung des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts nach rekombinanter Expression.....	143
3.3 Analyse der S5-DBD-PA Effekte nach lentiviralem Gen-Transfer	147
3.3.1 Validierung der Stat5 – S5-DBD-PA Protein-Interaktion nach endogener Expression.....	148
3.3.2 Analyse des Einflusses einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die transkriptionelle Aktivität von Stat5.....	150
3.3.3 Analyse des Einflusses einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die Viabilität Stat5-abhängiger Tumorzelllinien.....	153
3.3.3.1 Inhibierung der Viabilität von K562- & HEL-Zellen durch S5-DBD-PA.....	153
3.3.3.2 Inhibierung der Viabilität von Ku812- & Kasumi-1-Zellen durch S5-DBD-PA...	162
3.3.3.3 Inhibierung der Viabilität solider Tumorzellen durch S5-DBD-PA	165
3.4 Analyse der S5-DBD-PA Effekte nach Proteintransduktion.....	169

3.4.1	Analyse der zellulären Aufnahme des rekombinant hergestellten, zellpenetrierenden S5-DBD-PA Peptidaptamers.....	169
3.4.2	Analyse der Interaktion mit Stat5 und Inhibierung der Stat5 DNA-Bindeaktivität durch rekombinant hergestelltes S5-DBD-PA.....	173
3.4.3	Inhibierung der Viabilität von Tumorzellen durch rekombinantes S5-DBD-PA.....	177
4	Diskussion	183
4.1	Validierung der Stat5-Abhängigkeit leukämischer und solider Tumorzellen	185
4.1.1	Analyse der Stat5-Abhängigkeit Bcr-Abl exprimierender CML-Zelllinien.....	186
4.1.2	Analyse des Stat5-Einflusses im Falle einer akut myeloischen Transformation durch Jak2(V617F).....	189
4.1.3	Analyse der Stat5-Abhängigkeit AML1-ETO transformierter AML & solider Tumorzellen.....	192
4.2	Effekte einer Interferenz des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts mit der DNA-Bindedomäne von Stat5	197
4.2.1	Isolation der S5-DBD-PA Peptidaptamer-Sequenz mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System	197
4.2.2	<i>in vitro</i> Applizierbarkeit des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts.....	199
4.2.3	Validierung der S5-DBD-PA/Stat5-Interaktion.....	202
4.2.4	Einfluss des S5-DBD-PA Peptidaptamers auf die Stat5-Tyrosinphosphorylierung und nukleäre Translokation.....	203
4.2.5	Inhibierung der DNA-Bindeaktivität von Stat5 durch S5-DBD-PA.....	208
4.2.6	Einfluss von S5-DBD-PA auf die Viabilität und das Wachstum humaner Tumorzellen.....	213
4.3	Ausblick – Therapeutische Anwendbarkeit der Stat5/S5-DBD-PA Peptidaptamer-Interaktion	219

Literaturverzeichnis	223
Abkürzungsverzeichnis	253
Publikationen	257
Originalartikel	257
Vorträge	258
Posterpräsentationen.....	258
Danksagung	261
Eidesstattliche Versicherung.....	263
Curriculum vitae	265

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Die Familie der Stat-Transkriptionsfaktoren.....	8
Abb. 1-2: Der Jak/Stat-Signalweg	14
Abb. 1-3: Der regulatorische Einfluss von Stat-Proteinen im Organismus.....	17
Abb. 1-4: Modell der β -Casein Expressionsregulation durch Interaktion von Stat5 mit transkriptionellen Cofaktoren.	22
Abb. 1-5: Aktivierung von Stat-Proteinen in Tumoren des hämatopoetischen Systems und myeloproliferativen Erkrankungen.	28
Abb. 1-6: Die Peptidaptamer-Struktur	35
Abb. 1-7: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme eines ErbB2-spezifischen Peptidaptamers mit Thioredoxin-Scaffold über eine gekoppelte PTD.....	36
Abb. 3-1: Projektübersicht und Arbeitsablauf.....	100
Abb. 3-2: Aktivierung von Stat5 in humanen Leukämie-Zelllinien	102
Abb. 3-3: Stat5-Aktivierung in transformierten Ba/F3-Zellen	104
Abb. 3-4: Stat5-Aktivierung in soliden humanen Tumorzelllinien	105
Abb. 3-5: Stat5 Induzierbarkeit solider Tumorzellen	107
Abb. 3-6: Klonierung der lentiviralen (SIN)-LeGO-G shRNA-Expressionsvektoren.....	111
Abb. 3-7: Inhibierung der Expression von Stat5A und Stat5B in K562- und HEL-Zellen durch RNA-Interferenz.....	113
Abb. 3-8: Reduktion der Viabilität von K562- und HEL-Zellen durch Stat5A/B-shRNA	114
Abb. 3-9: Reduktion des Wachstums von K562- und HEL-Zellen durch Stat5-A/B shRNA.....	115
Abb. 3-10: Messung des Anteils GFP-exprimierender Zellen und der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität nach shRNA-Transduktion.....	117

Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

Abb. 3-11: Analyse der Apoptose-Induktion in K562- und HEL-Zellen durch Annexin V/7-AAD Färbung 10 Tage nach der Virus-Transduktion	119
Abb. 3-12: Vergleich der Effekte Stat5-spezifischer und unspezifischer Kontroll shRNA auf die Viabilität von K562- und HEL-Zellen.....	122
Abb. 3-13: Einfluss des Stat5-Knockdown auf die Expression von Stat5-Zielgenen in Bcr-Abl positiven K562 und Jak2(V617F)-positiven HEL-Zellen	124
Abb. 3-14: Stat5-Knockdown in Ku812 CML- und Kasumi-1 AML-Zellen.....	127
Abb. 3-15: Inhibierung der Viabilität von A431 und PC-3 Zellen durch Stat5-spezifische shRNA	129
Abb. 3-16: Inhibierung der Viabilität von T-47D Mammakarzinom- und kolorektalen HCT116 Karzinomzellen nach Stat5 Knockdown	131
Abb. 3-17: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen Stat5A-Proteins und der Fragmente welche als Bait-Konstrukte fusioniert mit der GAL4-DBD für den Hefe-2-Hybrid Screen eingesetzt wurden.....	134
Abb. 3-18: Sequenz & Struktur der randomisierten 12mer NNK-„hairpin“-Oligonukleotid-Library	134
Abb. 3-19: Vorbereitung der Oligonukleotid-Library für die Hefe-Zwei-Hybrid Prey-Expressionsvektor Klonierung.....	137
Abb. 3-20: Schematische Darstellung der klonierten Prey-Konstrukte für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen	137
Abb. 3-21: Identifikation von 12mer Peptidaptamer-Sequenzen welche mit funktionellen Domänen des humanen Stat5A-Proteins interagieren.....	140
Abb. 3-22: Validierung der Interaktion zwischen S5-DBD-PA und der DNA-Bindedomäne des humanen Stat5A-Proteins mit dem Hefe-Zwei-Hybrid Tropfplattentest und β -Galactosidase-Assay	142
Abb. 3-23: Domänenstruktur der rekombinanten S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukte	144
Abb. 3-24: Rekombinante Expression, Aufreinigung und Applikation des zellpenetrierenden Stat5-spezifischen Peptidaptamer-Konstrukts S5-DBD-PA.....	146

Abb. 3-25: Integration des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts und der hTRX-Negativkontrolle in den lentiviralen pSiEW-Transfervektor	147
Abb. 3-26: Analyse der Interaktion zwischen S5-DBD-PA und Stat5 in K562-Zellen durch Co-IP	148
Abb. 3-27: Immunfluoreszenz-Analyse der S5-DBD-PA Peptidaptamer-Expression und Stat5 Co-Lokalisation in K562-Zellen nach lentiviralem Gen-Transfer.....	149
Abb. 3-28: Inhibierung der Bindung von Stat5 an die DNA durch S5-DBD-PA	151
Abb. 3-29: Analyse der Stat5-Zielgenexpression nach endogener S5-DBD-PA Expression in Bcr-Abl positiven K562 und Jak2(V617F) positiven HEL-Zellen.....	152
Abb. 3-30: Einfluss einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die Viabilität und das Wachstum von K562- und HEL-Zellen.....	154
Abb. 3-31: Messung des Anteils GFP-exprimierender Zellen und der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität (MFI) nach Infektion der Zielzellen mit SiEW-Vektoren.....	156
Abb. 3-32: Analyse der Apoptose-Induktion nach endogener S5-DBD-PA Expression in K562- und HEL-Zellen durch Annexin V/7-AAD Doppelfärbung	158
Abb. 3-33: Analyse des Einflusses einer endogenen S5-DBD-PA Expression nach FACS-Sortierung positiv transduzierter Zellen.....	160
Abb. 3-34: Einfluss einer kombinatorischen S5-DBD-PA und Imatinib Behandlung auf die Viabilität Bcr-Abl exprimierender K562 und Jak2(V617F) exprimierender HEL-Zellen	161
Abb. 3-35: Einfluss einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die Viabilität von Ku812- und Kasumi-1-Zellen	164
Abb. 3-36: Endogene Expression des S5-DBD-PA Peptidaptamers in T-47D Brustkrebszellen....	166
Abb. 3-37: Einfluss einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die Viabilität von A431 Melanom-, PC-3 Prostatakarzinom und HCT116 kolorektalen Karzinomzellen.....	168
Abb. 3-38: Analyse der zellulären Aufnahme des rekombinant hergestellten, zellpenetrierenden Peptidaptamer-Konstrukts	171
Abb. 3-39: Validierung der Interaktion zwischen Stat5 und dem rekombinant hergestellten S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukt über Co-IP	173

Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

Abb. 3-40: Inhibierung der Stat5 DNA-Bindeaktivität durch rekombinantes S5-DBD-PA	175
Abb. 3-41: Analyse der Stat5-Zielgenexpression in Bcr-Abl positiven K562 und Jak2(V617F) positiven HEL-Zellen nach Inkubation mit rekombinanten S5-DBD-PA.....	177
Abb. 3-42: Inhibierung der Viabilität von Leukämie-Zelllinien durch rekombinantes S5-DBD-PA	179
Abb. 3-43: Inhibierung der Viabilität solider Tumorzellen durch rekombinantes S5-DBD-PA	180
Abb. 4-1: Theoretisches Modell der Stat5-Aktivität und des Stat5-inhibitorischen Einflusses von S5-DBD-PA im Vergleich der Bcr-Abl exprimierenden K562- und Jak2(V617F) exprimierenden HEL-Zelllinie.....	212

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Beispiele von Stat5-Zielgenen	21
Tabelle 1-2: Übersicht der verschiedenen Arten hämatologischer und solider humaner Tumore, in denen eine aberrante und onkogene Stat5-Aktivität nachgewiesen wurde.	31

ZUSAMMENFASSUNG

Die phylogenetisch hochkonservierte Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade repräsentiert eines der zentralen Säulen zellulärer Signalübertragung eukaryotischer Organismen. Ubiquitär im Organismus exprimiert und über eine Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren aktiviert, sind Stat-Transkriptionsfaktoren maßgeblich an dem Erhalt der Physiologie und Homöostase von Organen und Geweben beteiligt. So sind die Mitglieder Stat5A und Stat5B (als homologe Proteine im Verbund als Stat5 bezeichnet) entscheidende Regulatoren des Immunsystems und der Hämatopoese, der Funktion und Entwicklung des Prostata- und Brustdrüsengewebes (Mammogenese) oder bestimmter Funktionen der Leber. Wie auch Stat3, konnten Stat5 Proteine in aberrant aktiver Form in verschiedensten Typen und Stadien humaner Tumore nachgewiesen werden, wo sie über die Expression ihrer Zielgene sowie über weitere nicht-kanonische Funktionen im Zytoplasma und im Zellkern einer fortschreitend malignen Entartung entscheidend beitragen. Als Folge der Unterstützung essentieller Tumorgenese-Mechanismen, wie gesteigertes Zellwachstum, Apoptosehemmung, Migration und Metastasierung, Sauerstoff-unabhängiger Energiestoffwechsel, Angiogenese oder Umgehung der Immunabwehr, entwickeln Tumore häufig eine Abhängigkeit gegenüber der gesteigerten Aktivität dieser Vertreter der Stat-Proteinfamilie und reagieren mit einem Wachstumsstopp und Apoptoseinduktion auf ihre Inhibierung. Perspektivisch stellt die gezielte Interferenz mit aberranten, Tumortyp-spezifischen Stat5-Aktivitäten einen relevanten Ansatz in der personalisierten Therapie Stat5-abhängiger Tumore, vorrangig leukämischen Ursprungs, dar.

Für eine Validierung der Eignung von Stat5 als Zielstruktur in der Krebstherapie, wurden in dieser Arbeit Knockdown-Experimente mit leukämischen und soliden Tumorzelllinien humanen Ursprungs durchgeführt. Hinsichtlich der Überlebensfähigkeit getesteter CML- (K562, Ku812), AML- (HEL, Kasumi-1), Prostata- (PC-3), Mamma (T-47D) und epidermoiden Karzinom- (A431) Zelllinien, ließ der kombinierte lentivirale Transfer Stat5A- und Stat5B-gerichteter shRNA eine deutliche Abhängigkeit von der Stat5-Expression erkennen. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Expressionsanalysen von Stat5-Zielgenen in K562 und HEL Zellen sowie die variierende Präsenz aktiv transkribierender Stat5-Dimere einzelner Zelllinien, verdeutlichte zudem, dass diese Abhängigkeit nicht alleinig aus der transkriptionellen Aktivität von Stat5 resultiert und sich auf weitere essentielle nicht-kanonische Funktionen zurückführen lässt.

Im Gegensatz zu Enzymen oder Membranrezeptoren bieten die Strukturen von Transkriptionsfaktoren, mit einem Mangel an Wirkstoff-zugänglichen hydrophoben Bindetaschen, eine reduzierte Angriffsfläche für eine pharmakologische Intervention mit niedermolekularen Wirkstoffen. Makromolekulare Peptide und Proteine sind aufgrund ihrer

Zusammenfassung

sekundären und tertiären Strukturen jedoch in der Lage mit größeren Grenzflächen bestimmter Proteindomänen spezifisch zu interagieren und in ihrer Funktion zu inhibieren. Als artifiziell modifizierte Fusionsproteine, bestehend aus einer kurzen (10-20 aa) targetspezifischen Peptid-Sequenz, welche in starrer Konformation auf der Oberfläche eines Struktur- und Stabilitätgebendem Gerüst- bzw. Scaffoldproteins präsentiert wird, haben sich Peptidaptamere als eine vielversprechende Variante therapeutisch einsetzbarer Proteine in den vergangenen Jahren hervorgetan. Unter Verwendung einer zuvor bereits im Falle eines Stat3-spezifischen Peptidaptamer-Konstruktes erfolgreich für die Peptidaptamer-Oberflächenpräsentation, Proteinaufreinigung und Zellpenetration eingesetzten, optimierten Variante des humanen Thioredoxin Proteins (hTRX) als Scaffold, konnte in dieser Arbeit eine 12mer Peptidaptamer-Sequenz mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System identifiziert werden, welche spezifisch mit der DNA-Bindedomäne (DBD) von Stat5 interagiert (S5-DBD-PA: Stat5-DBD spezifisches Peptidaptamer). Über die transgene Expression nach lentiviralen Gentransfer sowie über die Zugabe des rekombinant hergestellten, zellpenetrierenden Proteins zum Zellkulturmedium wurden die Effekte einer Interferenz von S5-DBD-PA mit der Stat5-DBD in den Zielzellen analysiert. Mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Aufnahmen und Co-IP Experimenten wurde die Interaktion zwischen Stat5 und S5-DBD-PA validiert. Dass sich die Interaktion von S5-DBD-PA mit der Stat5-DBD auf eine Inhibierung der Stat5 DNA-Bindeaktivität auswirkt, konnte anhand von Gelshift- und Luziferase Reporter-Assays bestätigt werden. Bei der Analyse der S5-DBD-PA Effekte wurde ein verstärkter Fokus auf den Vergleich Bcr-Abl positiver K562 CML- und Jak2(V617F) positiver HEL AML-Zellen gelegt. Die Behandlung mit S5-DBD-PA resultierte in K562 Zellen in signifikanten Reduktionen der Expression von Stat5-Zielgenen, was sich bei genauerer Analyse, neben der Interferenz mit der DNA-Bindeaktivität, auch auf eine Inhibierung der nukleären Translokation von Stat5 durch S5-DBD-PA zurückführen ließ. Weitere inhibierende Effekte der Peptidaptamer-Interaktion in Folge einer Interferenz mit Bcr-Abl-vermittelter Stat5-Tyrosinphosphorylierung oder gesteigerter proteasomaler Degradation erschienen als ebenfalls möglich. Als Resultat einer dominierenden Funktion von Stat5 im Zytoplasma, erwiesen sich Jak2(V617F) positive HEL Zellen als tolerant gegenüber einer Inhibierung der transkriptionellen Stat5-Aktivität durch S5-DBD-PA, was die Bedeutsamkeit einer Tumortyp-abhängigen Interferenz mit spezifischen Stat5-Funktionen unterstrich. Anhand der signifikanten Reduktion von Viabilität und Wachstum der Zelllinien K562, Ku812, PC-3, T-47D und A431 konnte das therapeutische Potential einer Stat5-Inhibierung durch S5-DBD-PA Behandlung verdeutlicht werden, welche zudem synergistisch mit Kinase-Inhibitoren wie Imatinib angewandt werden kann. Über die Nutzung als Leistrukturen für die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren sowie durch weitere Optimierungen der *in vivo*-Applikation, mit dem Einsatz stabiler und tumorspezifischer viraler Vektoren und nicht-viraler Carrier (z.B. Liposome), wird die klinisch-onkologische Anwendung von intrazellulär wirksamen Proteintherapeutika wie S5-DBD-PA zukünftig an großer Bedeutung gewinnen.

1 EINLEITUNG

1.1 REGULATION DER ZELLULÄREN SIGNALÜBERTRAGUNG

Mit Beginn der Evolution mehrzelliger Lebens vor etwa 2 Milliarden Jahren (höhere mehrzellige Organismen – Metazoa vor etwa 700 Mio. Jahren), begann auch die Entstehung neuer komplexer Mechanismen der Signalübertragung innerhalb eines Zellverbundes bzw. Gewebes eines Organismus. Die Zell-Zell-Kommunikation basiert dabei auf der Übertragung extrazellulärer Signale und der intrazellulären Interpretation und Verarbeitung dieser Signale. Diente die chemische Kommunikation zwischen Einzellern (*quorum sensing*) der Vermittlung von Prozessen wie Fortpflanzung (Konjugation), Sporen-Bildung oder Antibiotika-Produktion, entwickelten sich in mehrzelligen Organismen biologische Prozesse welche das Wachstums-, Migrations- & Differenzierungsverhalten sowie den Metabolismus einer Zelle dirigierte. Diese sich im Laufe mehrerer 100 Millionen Jahre nach und nach entwickelnden Prozesse der Zell-Zell-Kommunikation bildeten die Grundlage für die Ausbildung einzelner Gewebe mit definierter Gewebestruktur und definierter Physiologie und ermöglichten die Organisation der Lebenserhaltung und Reproduktion mehrzelliger Lebewesen. Ausgelöst durch spezifische äußere und innere Reize synthetisieren und sezernieren Zellen mehrzelliger Organismen eine Vielzahl an Signalmolekülen, welche auf auto-, para-, juxta- oder endokrinen sowie neuronalem Wege mit Rezeptormolekülen bestimmter Zielzellen interagieren und Informationen bzw. zelluläre Reaktionen vermitteln. Aus chemischer Sicht können einzelne Ionen, Proteine und Peptide, Nukleotide, Steroide, Fettsäuren, Retinoide oder Stickoxide als Signalmoleküle wirken und in Form von Hormonen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmittern zelluläre Reaktionen induzieren. Als Liganden erkennen und binden Signalmoleküle mit hoher Spezifität Rezeptormoleküle und können dabei in geringsten Konzentrationen wirken ($\leq 10^{-8}$ M). In der Mehrheit der Fälle handelt es sich bei den Rezeptoren um Transmembranproteine mit Ligand-spezifischer extrazellulärer Domäne auf der Oberfläche von Zielzellen (Ben-Shlomo et al., 2003). Sind Signalmoleküle aufgrund einer geringen Größe und hohen Hydrophobizität in der Lage die Zellemembran zu passieren, kann es in vereinzelt Fällen auch zu einer Bindung an intrazelluläre Rezeptormoleküle kommen. Die Aktivierung der Rezeptoren nach Ligandenbindung führt zur Initiation komplexer biochemischer Prozesse, welche der intrazellulären Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen dienen und unter dem Begriff „Signaltransduktion“ zusammengefasst werden.

1.1.1 SIGNALTRANSDUKTION

Die innerhalb eines mehrzelligen Organismus wiederum als äußere Reize auf einzelne Zelltypen einwirkenden Signalmoleküle (endogene Signale) können viele verschiedene intrazelluläre Reaktionen hervorrufen, welche das Verhalten der Zelle beeinflussen. Für solche Liganden-spezifischen Reaktionen verfügen Zellen neben verschiedener Proteinrezeptoren über ausgeklügelte intrazelluläre Netzwerke aus interagierenden Proteinen und sogenannten „second messenger“ – Molekülen (z.B. Nukleotide (cAMP, ATP, GTP), Ca^{2+} -Ionen, Inositolphosphate, Stickoxide). Die Bindung des Liganden an seinen zugehörigen Rezeptor induziert eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, welche sich im Falle eines Transmembranrezeptors bis auf den intrazellulären Teil des Rezeptors auswirkt und dadurch eine Signalübertragung ins Innere der Zelle ermöglicht. In der Folge sind aktivierte Rezeptoren in der Lage ein oder mehrere intrazelluläre Signalkaskaden auszulösen. Je nach Mechanismus der Rezeptor-gesteuerten Signalübertragung unterscheidet man dabei drei verschiedene Klassen an membranständigen Rezeptoren. Ionotrope Rezeptoren, welche in Folge elektrischer Impulse oder über die Bindung von Neurotransmittern transmembrane Ionenkanäle öffnen, Rezeptoren mit Enzymfunktion oder Enzym-gekoppelte Rezeptoren, sowie G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche nach Guaninnukleotid-Austausch intrazelluläre Signalkaskaden initiieren (Ben-Shlomo et al., 2003). Die Weiterleitung bzw. Transduktion eines an der Zellmembran ausgelösten Signals zu Effektorproteinen im Zellinneren erfolgt, wie zuvor erwähnt, über ausgeklügelte Netzwerke aus interagierenden Proteinen und second messenger Molekülen. In Abhängigkeit von Signal und Rezeptor werden schrittweise bestimmte Signalproteine aktiviert und deaktiviert. Die Aktivierung und Deaktivierung von Signalproteinen, als einzelne Komponenten einer Signalkaskade, basiert dabei vorwiegend auf enzymatisch regulierten Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsreaktionen. Die Übertragung von Phosphat-Gruppen auf Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste durch Kinasen sowie deren Abspaltung durch Phosphatasen induziert konformationelle Änderungen von Signalproteinen und bestimmt deren Aktivitätszustand. Verfügen Signalproteine, wie das G-Protein, über eine Guanidin-Bindedomäne, so kann die Änderung des Aktivitätszustandes über den enzymatischen Austausch von GDP zu GTP erfolgen. Desweiteren wird die Aktivität einzelner Signaltransduktions-komponenten über die Bindung von second messenger Molekülen wie cAMP oder Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP_3), sowie über direkte Protein-Protein-Interaktionen bestimmter Peptidomänen reguliert. Bei jedem Schritt einer Signalkaskade besteht die Möglichkeit, dass das Signal nur an einen oder aber an mehrere Komponenten weitergegeben werden kann. Wird das Signal an mehrere Komponenten übertragen, welche in der Folge

wiederum in der Lage sind verschiedene Signal- oder Effektorproteine zu aktivieren, so wird das Signal in der Zelle amplifiziert und das Verhalten der Zelle auf verschiedene Weise beeinflusst. Neben den genannten Kinasen, verfügen Zellen hierfür über eine Vielzahl weiterer Proteinfaktoren, welche als modifizierende Enzyme, Adapterproteine oder als Proteine des Zytoskeletts die Interaktion und Aktivierung einzelner Komponenten einer Signalkaskade regulieren (Papin et al., 2005).

Die über Signaltransduktionskaskaden vermittelten Änderungen zellulären Verhaltens betreffen im Wesentlichen die Morphologie und das Migrationsverhalten, das Wachstums und Differenzierungsverhalten sowie den Metabolismus der Zelle. In Abhängigkeit vom Zelltyp und Gewebe, und deren charakteristischen physiologischen Funktionen, finden sich dabei Unterschiede in Häufigkeit und Ausprägung von Signaltransduktionskaskaden und den daraus resultierenden zellulären Reaktionen. Bei den am Ende einer Signalkaskade stehenden Effektorproteinen handelt es sich in der Mehrheit der Fälle um Gen-regulierende Faktoren, welche als Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren oder -repressoren spezifisch Enhancer-Elemente in der Promotorregion von Zielgenen erkennen, Chromatin und Histone modifizieren und im Zusammenspiel mit den GTFs („general transcription factors“) die Expression von Genen regulieren (Maston et al., 2006). Hierbei können Zellen erst nach mehreren Minuten bis Stunden auf extrazelluläre Signale reagieren, da erst nach Abschluss der Expression über die Genprodukte bzw. nach Inhibierung der Expression bestimmter Gene Reaktionen hervorgerufen werden können. Handelt es sich bei den am Ende einer Signalkaskade aktivierten bzw. modifizierten Effektorproteinen um metabolische Enzyme oder Strukturproteine des Zytoskeletts, lassen sich, in Folge einer direkten Vermittlung von Effekten, bereits nach Sekunden Veränderungen phänotypischer Eigenschaften, betreffend der Physiologie und Morphologie der Zelle, feststellen. Das exakte Zusammenspiel und Wirken intrazellulärer Signalkaskaden bildet die Grundvoraussetzung für die zelluläre Kommunikation und Organisation mehrzelliger Organismen. Störungen dieser Homöostase aus extrazellulärer Signalgebung und intrazellulärer Signalübertragung und Reaktion führen zur Entstehung von Krankheiten. Betreffen solche Störungen die präzise Regulation des Differenzierungs- und Proliferationsverhalten von Zellen, mit dem über Signaltransduktionskaskaden genetisch reguliertem Gleichgewicht aus Zellzyklus-Induktion und Apoptose (programmierter Zelltod), können Zellen, in Folge unkontrollierter Teilung, Tumore innerhalb eines Gewebeverbundes und somit eine Krebserkrankung ausbilden.

1.1.2 DIE MALIGNEN ENTARTUNG VON ZELLEN DURCH DEREGULIERTE SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADEN

Der Verlauf einer Krebserkrankung zeichnet sich durch genetische Veränderungen, in Folge einer Akkumulation von Mutationen und epigenetischen Modifikationen aus, welche, häufig ausgehend von nur einer Zelle (Krebs-Stammzelle), über einen undefinierten Zeitraum zu einer fortschreitenden Entartung eines Gewebes führen. Dieser mehrstufige Prozess resultiert in einer unkontrollierten Zellteilung und Umgehung der Apoptose, bei gleichzeitig einsetzender Resistenz gegenüber antiproliferativer Signale, dem Entzug der Kontrolle bzw. der Degradation durch das Immunsystem, einer Eigenversorgung mit Sauer- und Nährstoffen sowie einer Reprogrammierung des Energiestoffwechsels und schlussendlich in einer Verteilung entarteter Zellen im Organismus über Blut und Lymphe (Metastasierung). Diese pathophysiologischen und morphologischen Merkmale neoplastischer Zellen wurden von Douglas Hanahan und Robert Weinberg unter der Bezeichnung „Hallmarks of Cancer“ zusammengefasst (Hanahan & Weinberg, 2011). Die maligne Transformation einer Zelle durch Mutationen und epigenetische Veränderungen erweist sich dabei als Abhängig von einer Aktivierung von Genen welche einen Tumor-Phänotyp, mit zuvor genannten Merkmalen, induzieren (Onkogene), sowie von einer Inaktivierung von Genen welche dem Transformationsprozess entgegen wirken (Tumorsuppressorgene). Aufgrund des Einflusses einer Vielzahl endogener und exogener Stressfaktoren (z.B. Fehler bei der Replikation, Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Exposition durch UV-Strahlung oder chemische Karzinogene) unterliegt das Genom permanenten Mutationen (1×10^3 - 1×10^6 pro Zelle und Tag), welche aufgrund effizienter Kontroll- und Reparaturmechanismen der Zelle jedoch beseitigt werden oder einen Zellzyklusarrest oder Apoptoseprozess einleiten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Manifestierung eines neoplastischen Zustandes von einer Mutation zentraler Komponenten zellulärer Signalgebung abhängt, welche aufgrund ihrer zentralen Rolle in dem komplexen zellulären Netzwerk interagierender und modifizierender Signalmoleküle (Papin et al., 2005; Ravasi et al., 2010) zelltypabhängig entscheidende prokanzerogene Aktivitäten aufweisen (Fearon & Vogelstein, 1990; Weinstein, 2000). Trotz der hohen Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen eines Organismus, mit ebenfalls vielzähligen unterschiedlichen Funktionen, ist nur eine geringe Anzahl von Signaltransduktionskaskaden für deren Produktion bzw. Differenzierung während der Embryonalentwicklung verantwortlich. Hierzu zählen Rezeptor-Tyrosinkinase-Kaskaden (RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ -PKC), der Hedgehog-, Wnt-, TGF β -, Notch- und Jak/Stat-Signalweg sowie nukleäre Hormonrezeptor-Kaskaden (Pires-daSilva & Sommer, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Komponenten dieser Signalkaskaden häufig in Tumoren mutiert sind bzw. in überaktivierter

Form vorliegen und für den Erhalt eines malignen Phänotyps verantwortlich sind (Vogelstein & Kinzler, 2004), weshalb man von einer Abhängigkeit („oncogene addiction“) von Tumoren gegenüber bestimmter Faktoren dieser zentralen Signalkaskaden spricht (Felsner, 2008; Weinstein & Joe, 2008).

1.2 DIE FAMILIE DER STAT-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Die Stat- oder „Signal Transducer and Activator of Transcription“-Proteinfamilie ist eine Familie hochkonservierter, latent im Zytoplasma vorliegender Transkriptionsfaktoren, welche an der Regulation einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind. Stat-Proteine bestehen aus sieben in Säugetierzellen identifizierten Mitgliedern: Stat1, 2, 3, 4, 5A, 5B und 6, welche, mit Ausnahme von Stat4, ubiquitär im Organismus exprimiert werden (Heim, 1999). Außer in Hefen, konnten orthologe Stat-Gene in niederen Eukaryoten wie den Schleimpilzen (*Dictyostelium*), Insekten (*Drosophila*, *Anopheles*), Fischen (Zebrafisch: *Danio rerio*, *Xiphophorus*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) und Gefäßpflanzen (*Kormophyten*) identifiziert werden (Barillas-Mury et al., 1999; Baudler et al., 1999; Kawata et al., 1997; Oates et al., 1999; Peng et al., 1999; Ueno et al., 1997; Yan et al., 1996), was auf ein evolutionsgeschichtlich hohes Alter dieses speziellen Typs zellulärer Signalmoleküle schließen lässt. Als zytoplasmatische Faktoren, welche in Folge einer zellulären Stimulation mit Zytokinen und Hormonen, nach Rezeptor-assoziiierter Phosphorylierung, in den Nukleus translokieren und die Expression responsiver Gene initiieren, wurden Stat-Proteine vor etwa 20 Jahren erstmalig entdeckt und charakterisiert. So geschehen im Falle der Expressionsregulation responsiver Gene in HeLa-Zellen nach Interferon-(α , γ)-Behandlung, der hormongesteuerten Expression von β -Casein in alveolaren Epithelzellen der Brustdrüse während der Laktation sowie der Vermittlung einer Expression von Akut-Phase-Proteinen in Leberzellen nach IL-6 Stimulation (Schindler et al., 1992; Wakao et al., 1992; Wegenka et al., 1993). Bis heute konnten mehr als 50 verschiedene Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren identifiziert werden, welche über eine rezeptorvermittelte Aktivierung von Stat-Proteinen zelluläre Reaktionen hervorrufen. Ein Großteil dieser Liganden ist in verschiedenen Reviews zusammengefasst (Kisseleva et al., 2002; Pauku & Silvennoinen, 2004; Yu et al., 2009). Allein diese Tatsache unterstreicht den hohen biologischen Einfluss von Stat-Proteinen, als zentrale Komponenten zellulärer Signaltransduktion.

Einleitung

Im Genom liegen je mindestens zwei Stat-Gene als Cluster auf drei Chromosomen verteilt vor, was auf eine evolutionäre Duplikation initialer Stat-Gene oder deren Locus schließen lässt (Copeland et al., 1995). Im humanen Genom liegen die Gene für Stat1 und Stat4 auf Chromosom 2, Stat2 und Stat6 auf Chromosom 12 sowie Stat3 und die eng verwandten Stat5A und Stat5B Gene auf Chromosom 17. Mit Auflösung der Kristallstruktur von Stat-Homodimeren, der transkriptionell aktiven Form von Stat-Proteinen, im Jahr 1998 und dem Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen wurde deutlich, dass die sieben Mitglieder der Stat-Familie, trotz ihrer funktionellen Vielseitigkeit, sowohl in ihrer Größe als auch Struktur nur geringe Unterschiede aufweisen (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998; Vinkemeier et al., 1998). Stat-Proteine besitzen 6 konservierte Protein-Domänen, mit einer Gesamtlänge von 750-850 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 90-115 kDa. Eine Domäne aus 8 kurzen hochkonservierten α -Helices (~ aa 1-130) bildet den Stat-N-Terminus. Über die N-terminale Domäne können Stat-Dimere interagieren und bilden einen stabilen Tetramer-Komplex. Die Promotoren vieler Stat-Zielgene weisen eine Tandem-Wiederholung von Stat-Enhancer Elementen auf (~ 20 bp Abstand), welche durch Stat-Tetramere besetzt werden. Die dadurch gesteigerte Affinität und Stabilität zwischen DNA und Stat-Tetramer führt zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität und erweist sich als essentiell für die Expression bestimmter Zielgene (John et al., 1999; Vinkemeier et al., 1996; Zhang & Darnell, 2001). Zusätzlich ist ein regulatorischer Einfluss beim nukleären Im- und Export, der Dephosphorylierung von Stat-Proteinen, der Dimerisierung unphosphorylierter Stat-Monomere sowie der Interaktion mit transkriptionellen Cofaktoren für die N-terminale Domäne beschrieben (Gewinner et al., 2004; Kornfeld et al., 2008; Mao et al., 2005; McBride & Reich, 2003; Meyer et al., 2004; Ota et al., 2004; Strehlow & Schindler, 1998). Im Anschluss befindet sich eine Coiled-Coil-Domäne, bestehend aus 4 gebündelten α -Helices (~ aa 130-315), welche den N-Terminus mit der zentralen DNA-Bindedomäne verknüpft. Die exponierte, größtenteils hydrophile Oberfläche der Coiled-Coil-Domäne erlaubt eine Interaktion mit einer Vielzahl regulatorischer Proteine, wie p48/IRF9, c-Jun, StIP, Nmi (Collum et al., 2000; Horvath et al., 1996; Zhu et al., 1999), dem Corepressor SMRT (Nakajima et al., 2001) oder den negativ regulatorischen PIAS-Proteinen (Borghouts et al., 2010). Über ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), welches mit Importin- α -Komplexen wechselwirkt, ist die Coiled-Coil-Domäne zudem maßgeblich an der nukleären Translokation von Stat-Proteinen beteiligt (Begitt et al., 2000; Ma & Cao, 2006; Ma et al., 2003; Strehlow & Schindler, 1998). Die C-terminal anschließende zentrale DNA-Bindedomäne (DBD) besteht aus mehreren über Schleifen verbundenen β -Faltblattelementen (~ aa 320-490), welche eine Immunglobulin-ähnliche Faltung aufweisen und

strukturell der DBD der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und p53 ähnelt (Chen et al., 1998; Levy & Darnell, 2002). Die DBD von dimeren, transkriptionell aktiven Stat-Proteinen erkennt palindromische DNA-Enhancer-Elemente der Abfolge TTC(N)₂₋₄GAA, welche in Zusammenhang mit ihrer erstmaligen Entdeckung als GAS-Elemente („gamma interferon activated site“) bezeichnet wurden. Die Bindung von Stat-Dimeren bzw. -Tetrameren an die DNA kann sowohl mit der großen als auch mit der kleinen Furche der Doppelhelix erfolgen (Levy & Darnell, 2002). Zudem ist durch die Exposition einer NLS- und NES-Sequenz ein regulatorischer Einfluss für die DBD dimerer Stat-Proteine bei der nukleären Translokation beschrieben (Ma & Cao, 2006; McBride et al., 2002; McBride & Reich, 2003). Eine helikale Linker-Domäne (~ aa 490-580) verbindet die DBD mit der SH2-Dimerisierungsdomäne. Eine regulatorische Funktion des nukleären Im- & Exports ist ebenfalls für diese Domäne beschrieben (Bhattacharya & Schindler, 2003; Marg et al., 2004). Nach reziproker Interaktion Tyrosin-phosphorylierter Stat-Monomere wird zudem der Erhalt einer stabilen dimeren Struktur über die Linker-Domäne vermittelt. Punktmutationen innerhalb der Linker-Domäne des Stat1-Proteins führten zu einer Inhibierung der Zielgen-Expression nach Interferon-Stimulation, was zum einen die stabilisierende Funktion der Linker-Domäne zum Erhalt eines transkriptionell aktiven Stat-Dimers unterstreicht und zum anderen einen Hinweis auf mögliche Cofaktor-Interaktionen darstellt (Yang et al., 1999). Obwohl sich die Struktur der C-terminal nachfolgenden SH2-Domäne im Vergleich zu anderen Proteinen recht deutlich unterscheidet, ist sie innerhalb der Stat-Familie die am stärksten konservierte Domäne (~ aa 580-680). Sie besteht aus einem antiparallelen β -Faltblattelement, welches über zwei flankierende α -Helices eine Taschen-Struktur ausbildet. Ein hochkonservierter Arginin-Rest innerhalb dieser Bindetasche ist verantwortlich für die Phosphat-Interaktion (Kisseleva et al., 2002). Über die Erkennung von Phosphotyrosin-Motiven vermittelt die SH2-Domäne die Interaktion von Stat-Proteinen mit spezifischen Phosphotyrosin-Resten aktivierter Transmembranrezeptoren, Interaktionen mit Janus Kinasen und die Bildung von Homo- und Heterodimeren über reziproke Phosphotyrosin-Interaktion aktivierter Stat-Monomere (Barahmand-Pour et al., 1998; Greenlund et al., 1995; Gupta et al., 1996; Shuai et al., 1994). Der für die Dimer-Bildung über reziproke SH2-Interaktion verantwortliche kritische Tyrosin-Rest befindet sich in einem Bereich, welcher sich C-terminal direkt an die SH2-Domäne anschließt (Stat1: Tyr701; Stat2: Tyr690; Stat3: Tyr705; Stat4: Tyr693; Stat5A: Tyr694; Stat5B: Tyr699; Stat6: Tyr641) (Calo et al., 2003). Die Phosphorylierung dieses Tyrosin-Restes bestimmt daher den Aktivitätszustand von Stat-Proteinen als dimere Transkriptionsfaktoren. Komplettiert werden die Stat-Proteine durch eine Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus. Zwischen den Mitgliedern der Stat-Familie weist die TAD die größte Varianz aller Domänen hinsichtlich

Einleitung

Sequenzhomologie und Länge auf. Diese Varianz ermöglicht eine Stat-spezifische Regulation der Zielgen-Expression, über die Formierung verschiedener Transkriptions-Coaktivator- bzw. Transkriptions-Corepressor-Komplexe. Zusätzlich wird die transkriptionelle Aktivität der Mitglieder der Stat-Familie über die Phosphorylierung eines konservierten Serin-Restes innerhalb der TAD reguliert (Decker & Kovarik, 2000). Eine Interaktion mit der Stat-TAD konnte für verschiedene Transkriptions-regulatorische Cofaktoren wie p100, p300/CBP, c-Jun, MCM5, BRCA1 gezeigt werden (Horvath, 2000; Ouchi et al., 2000; Paukku et al., 2003; Pfitzner et al., 1998). In Folge alternativen mRNA-Spleißens und proteolytischer Prozessierung auftretende, verkürzte Stat β -Isoformen ohne TAD, wirken, trotz Dimerisierung und DNA-Bindung, als dominant-negative Regulatoren ohne transkriptionelle Aktivität (Schindler & Strehlow, 2000), was die Notwendigkeit spezifischer TAD-Cofaktor-Interaktionen unterstreicht. Eine Übersicht der Mitglieder der Stat-Familie, ihrer Länge und Domänenstruktur sowie eine kurze Zusammenfassung der Funktionen einzelner Domänen ist in folgender Abbildung 1-1 dargestellt.

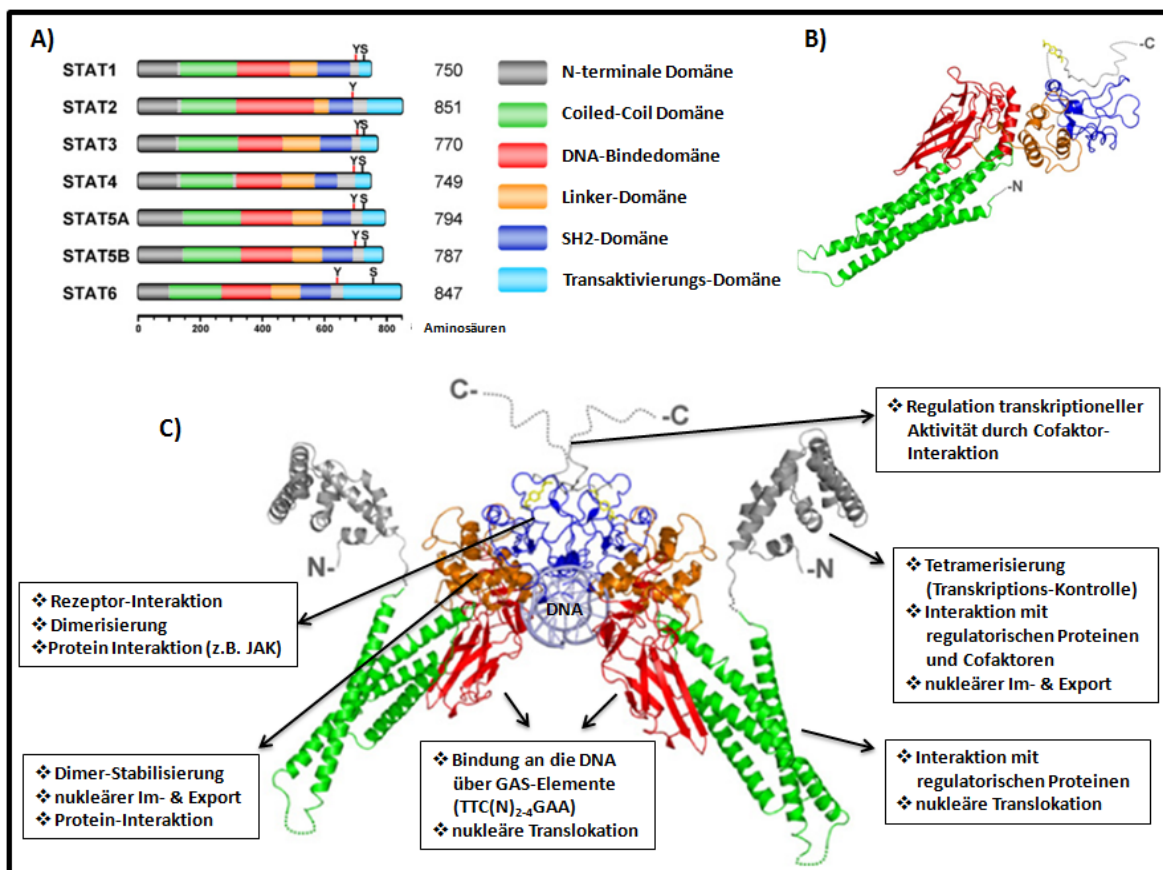


Abb. 1-1: Die Familie der Stat-Transkriptionsfaktoren

A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Stat-Proteinfamilie. Angegeben sind Variationen in der Domänen-Länge einzelner Stat-Proteine, sowie deren Aminosäure-Gesamtlänge und Variationen in der Lokalisation der für die Aktivierung essentiellen Tyrosin- und Serin-Reste. **B)** Kristallstruktur eines Stat-Monomers (Isoform ohne N-terminale Domäne). **C)** Kristallstruktur eines aktiven, Tyrosin-phosphorylierten Stat-Dimers gebunden an die DNA-Doppelhelix. Die Funktionen der einzelnen Stat-Domänen sind als Übersicht in der Darstellung zusammengefasst. modifiziert aus (Mohr et al., 2012).

1.2.1 DER JAK/STAT-SIGNALWEG

Entsprechend ihrer Namensgebung üben Stat-Proteine, als phosphorylierbare zytoplasmatische Signaltransduktoren und nukleäre Transkriptionsfaktoren, eine doppelte und evolutionär einzigartige Funktion in der Zelle aus. Ohne die Notwendigkeit einer Aktivierung sekundärer Signal- oder Effektormoleküle (Kinasen, Adaptorproteine, Transkriptionsfaktoren etc.) ermöglichen Stat-Proteine eine einfache, schnelle und effiziente Weiterleitung Liganden-induzierter Signale in den Zellkern und wandeln diese, über die Expression spezifischer Gene, in phänotypische Merkmalsänderungen bzw. Reaktionen um. Die hohe Anzahl aktivierender Liganden, welches das nahezu komplette Spektrum an Zytokinen sowie Hormone und Wachstumsfaktoren umfasst, bestimmt dabei ihre Vielseitigkeit hinsichtlich der Regulation biologischer Prozesse im zellulären Kontext bestimmter Gewebe. Zytokinrezeptoren wie der gp130-Rezeptor besitzen keine eigene intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Über die Aktivierung von assoziierten Tyrosinkinasen der Januskinase-Familie (Jak) löst die konformationelle Änderung von Zytokinrezeptoren, nach Rezeptor-Liganden-Interaktion, eine Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungsreaktionen aus. Die Familie der Januskinasen besteht in Säugern aus vier Mitgliedern: Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2, welche mit den zytoplasmatischen Domänen von Membranrezeptor-Untereinheiten der meisten Zytokinrezeptoren, aber auch Hormon- und Chemokin-aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, assoziiert vorliegen (Laurence et al., 2012; Luchtefeld et al., 2001; Ortmann et al., 2000; Soriano et al., 2003). In Folge der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von Rezeptor-Untereinheiten werden die Jak-Kinasen in eine räumliche Nähe zueinander gebracht und beginnen sich durch Transphosphorylierung selbst zu aktivieren. Die aktivierten Jak-Kinasen phosphorylieren in der Folge zunächst Tyrosin-Reste des Rezeptors, welche als Andockstellen für die latent im Zytoplasma vorliegenden Stat-Monomere dienen. Über ihre SH2-Domäne erkennen und binden die einzelnen Vertreter der Stat-Familie dabei spezifisch bestimmte Tyrosinreste der jeweiligen Rezeptoren. In der Folge kommt es zu einer Akkumulation monomerer Stat-Proteine an den zytoplasmatischen Rezeptordomänen (Greenlund et al., 1995). Diese werden daraufhin an ihrem kritischen Tyrosin-Rest zwischen der SH2- und Transaktivierungsdomäne durch die Jak-Kinasen phosphoryliert, dissoziieren vom Rezeptor und bilden Dimere im Zytoplasma über reziproke SH2-Phosphotyrosin-Interaktion jeweils 2 aktivierter Monomere (Shuai et al., 1994). Das über Phosphotyrosin formierte Dimer stellt die aktive Form der Stat-Proteine als Transkriptionsfaktoren dar, wobei es sich in der Regel um Stat-Homodimere handelt. Stat2 ist das einzige Mitglied der Stat-Familie, was kein Homodimer bildet. Die Formierung von Stat1/2 sowie Stat1/3 Heterodimeren konnte nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen beobachtet

Einleitung

werden. Zusätzlich können das strukturell eng verwandte Stat5A- und Stat5B-Protein Heterodimere ausbilden (Horvath, 2000).

Strukturanalysen von Stat-Proteinen unstimulierter Zellen ergab deren Fähigkeit, stabile Dimere auch im unphosphorylierten Zustand ausbilden zu können. Dimere inaktiver bzw. unphosphorylierter Stat-Proteine (z.B. Stat1, 3, 4 oder 5) unterscheiden sich dabei deutlich von den nach Rezeptor-Aktivierung über SH2-Phosphotyrosin-Interaktion formierten Dimeren. Über die Interaktion der N-terminalen Domänen sowie über die Interaktion der Coiled-Coil- und DNA-Bindedomäne (DBD) bilden unphosphorylierte Stat-Monomere antiparallele Stat-Dimere aus, deren genaue Funktion bislang ungeklärt ist (Bernado et al., 2009; Haan et al., 2000; Mao et al., 2005; Neculai et al., 2005; Ota et al., 2004). Im Falle der Zytokin-induzierten Stat4-Aktivierung konnte allerdings eine vorherige Assoziation unphosphorylierter Stat4-Dimere mit aktivierten Zytokinrezeptoren als essentieller Prozess identifiziert werden (Ota et al., 2004). Die nukleäre Translokation von Stat-Dimeren erweist sich jedoch, vor allem hinsichtlich der Translokationsgeschwindigkeit, als Abhängig von der Phosphorylierung und der Formierung strukturell paralleler Dimere durch reziproke SH2-Phosphotyrosin-Interaktion. In Folge dieser konformationellen Änderung wird eine Sequenz innerhalb der DBD exponiert, welche als aktives nukleäres Lokalisationssignal (NLS) wirkt und mit Importin- α Adaptorproteinen interagiert. Zusätzlich beinhaltet die Coiled-Coil-Domäne eine NLS-Sequenz (Iyer & Reich, 2008; Ma & Cao, 2006; McBride et al., 2002; McBride & Reich, 2003). Stat-spezifische α -Importine binden ihrerseits Importine der Karyopherin- β Familie, welche als Transporter die Translokation durch den Porenkomplex der Kernmembran ermöglichen (Reich & Liu, 2006). Entgegengesetzt ursprünglicher Beobachtungen das inaktive Stat-Proteine ausschließlich latent im Zytoplasma vorliegen, konnte jedoch gezeigt werden das unphosphorylierte Stat1, Stat3 und Stat5-Monomere durch einen Energie- und Carrier-unabhängigen Mechanismus in der Lage sind, permanent zwischen Zytoplasma und Zellkern zu translokieren. Dieser Mechanismus basiert auf einer Interaktion mit nukleären Porenprotein (z.B. Nup 153 und Nup 214) durch bestimmte Sequenzen innerhalb der Coiled-Coil- und Linker-Domäne (Iyer & Reich, 2008; Liu et al., 2005; Marg et al., 2004). Ein regulatorischer Einfluss der N-terminalen Domäne und C-terminalen Transaktivierungsdomäne wird in diesem Zusammenhang aber auch weiterhin diskutiert.

Über GTP aktiviertes RAN-GTP („RAS-related nuclear protein“) induziert die Dissoziation aktivierter Stat-Dimere vom Importin-Komplex im Nukleus, welche in der Folge GAS-Elemente in der Promotor-Region jeweiliger Zielgene spezifisch erkennen und binden. Nach Interaktion mit der DNA als Dimer oder Tetramer, im Falle einer GAS-Tandem-Wiederholung, rekrutieren Stat's

über ihre C-terminale TAD Coaktivatoren und Corepressoren, wie CBP/p300, p100, MCM5, BRCA1, SMRT oder Nmi-1, welche anschließend wiederum die Expression der Zielgene über epigenetische Modifikationen (primär Histon-Modifikationen) oder die Rekrutierung von Transkriptionsinitiationskomplexen regulieren (Nakajima et al., 2001; Pauku & Silvennoinen, 2004; Pauku et al., 2003; Pfitzner et al., 1998; Zhu et al., 1999). Die Phosphorylierung des konservierten Serin-Restes innerhalb der TAD erweist sich dabei als entscheidende Modifikation der Stat-vermittelten Genexpression durch Cofaktor-Rekrutierung (Decker & Kovarik, 2000; Friedbichler et al., 2010). Desweiteren konnten Zelltyps-abhängige Assoziationen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren gezeigt werden, welche über die Coiled-Coil-, die Linker- oder die N-terminale-Domäne mit Stats interagieren und als Aktivatoren und Repressoren die Genexpression zusätzlich regulieren. Beispiele hierfür sind p48/IRF9, NF- κ B, SMADs, Sp1, c-Jun, PU.1, C/EBP β , Glucocorticoid-Rezeptor (GR), NcoA-1, YY-1 oder TFII-1 (O'Shea et al., 2002; Pauku & Silvennoinen, 2004). Diese Interaktionen müssen nicht zwangsläufig von der Präsenz phosphorylierter, transkriptionell aktiver Stat-Dimere abhängig sein, was u.a. im Falle einer IL-6 stimulierten und P-Stat3(Tyr) (Tyrosin-phosphoryliertes Stat3) vermittelten Erhöhung intrazellulärer Mengen unphosphorylierten Stat3-Proteins gezeigt werden konnte (Yang et al., 2007). Unphosphoryliertes Stat3 bildet einen Komplex mit NF- κ B und ermöglicht die Translokation über seine NLS-Sequenz in den Zellkern, wo Stat3 als Co-Aktivator zusätzlich die Expression von NF- κ B-Zielgenen unterstützt. Diese nicht-kanonische Aktivität verdeutlicht die multiple regulatorische Funktionalität von Stat-Proteinen im Kontext der Genexpression. Abschließend sei im Zusammenhang der Genexpressionsregulation durch Stat's zu erwähnen, dass auch Aktivitäts-regulierende Sekundärmodifikationen von Stat-Aminosäureresten in Form von Acetylierung, Glykosylierung, Methylierung oder SUMOylierung identifiziert und beschrieben worden (Begitt et al., 2011; Gewinner et al., 2004; Kramer & Heinzl, 2010; Mowen et al., 2001).

Über die Expression von Zielgenen wie Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, Survivin, Myc, CyclinD1/D2, VEGF, Hif1- α , c-Fos, Matrix-Metalloproteasen (MMP's) oder verschiedene Interleukine und Interferone regulieren Stat-Proteine eine Vielzahl zellbiologischer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose, Zellbestand („survival“), Regulation von Immunzellreaktionen oder Sauerstoffversorgung (Angiogenese) und Energiemetabolismus (Demaria et al., 2010; Desrivieres et al., 2006; Yu & Jove, 2004; Yu et al., 2009). Die Dephosphorylierung transkriptionell aktiver Stat's durch nukleäre Phosphatasen wie TC45 oder SHP2 (ten Hoeve et al., 2002) führt zu einer Dissoziation dimerer Stat's von der DNA und zu einer erneuten Konformationsänderung, mit der Exponierung eines nukleären Exportsignals (NES)

Einleitung

innerhalb der DBD (McBride & Reich, 2003). Mögliche Leucin-reiche NES-Sequenzen innerhalb der Coiled-Coil- und Linker-Domäne werden aber auch nicht ausgeschlossen (Bhattacharya & Schindler, 2003). Die NES-Sequenz wird durch das Exportin CRM1 erkannt, welches in der Folge das für den Export durch den nukleären Porenkomplex benötigte RAN-GTP an den Stat-CRM1-Komplex koppelt. Nach Hydrolyse von RAN-GTP zu RAN-GDP im Zytoplasma dissoziieren die Stat's als unphosphorylierte Monomere vom Exportkomplex und stehen einer erneuten Aktivierung durch Rezeptor-assoziierte Jak's zur Verfügung (Reich & Liu, 2006).

Eine Aktivierung von Stat-Proteinen, durch Phosphorylierung ihres kritischen Tyrosin-Restes, erfolgt jedoch nicht ausschließlich über Jak-Kinasen. Wachstumsfaktorrezeptoren, wie der EGF- oder PDGF-Rezeptor, besitzen eine eigene intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität, über welche eine direkte oder indirekte Phosphorylierung von Stat-Proteinen erfolgen kann. Im Falle einer indirekten Aktivierung erfolgt die Phosphorylierung von Stat-Proteinen durch Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Src-Kinasefamilie (z.B. Src, Lck, Hck, Lyn, Fyn oder Fgr), wodurch das Spektrum Stat-aktivierender Mechanismen zusätzlich erhöht wird (Olayioye et al., 1999; Pauku & Silvennoinen, 2004; Quesnelle et al., 2007; Shi & Kehrl, 2004; Wang et al., 2000). Bmx, ein Mitglied der Tec-Kinasefamilie, FAK und Fes sind Beispiele weiterer zytoplasmatischer Tyrosinkinasen, welche mit einer physiologischen Aktivierung von Stat-Proteinen in Verbindung gebracht wurden (Park et al., 1998; Saharinen et al., 1997; Xie et al., 2001).

Die transkriptionelle Aktivität von Stat-Proteinen ist durch endogene Negativ-Regulatoren an verschiedenen Stellen des Jak/Stat-Signalwegs strikt reguliert. Zu den zentralen Regulatoren des Jak/Stat-Signalweg zählen die SOCS- und PIAS-Proteine sowie verschiedene Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP'S). Einen klassischen negativen Feedback-Mechanismus nach Liganden-Bindung üben die SOCS-Proteine aus („suppressor of cytokine signaling“), deren Familie in Säugern aus 8 Mitgliedern besteht, SOCS 1-7 und CiSH („Cytokine-inducible SH2-containing protein“), und nur wenige Jahre nach der Entdeckung der Stat-Proteine im Zusammenhang mit der Regulation Zytokin-vermittelter Signaltransduktion identifiziert wurden (Starr et al., 1997). Im Zuge eines klassischen negativen Feedbacks erfolgt die Zytokin-induzierte Expression von SOCS-Proteinen mehrheitlich über Stat-Proteine selbst, weshalb SOCS-Proteine zu den klassischen Zielgenen von Stat-Proteinen zählen (Auernhammer et al., 1999; Croker et al., 2008). SOCS-Proteine bestehen aus einer zentralen SH2-Domäne mit der sie spezifisch phosphorylierte Tyrosin-Reste aktivierter Jak-Kinasen und an zytoplasmatischen Domänen aktivierter Rezeptoren erkennen, maskieren und dadurch die Interaktion mit Stat-Proteinen kompetitiv inhibieren. Über ihre N-terminale KIR-Domäne („kinase inhibitory region“) sind sie

zusätzlich in der Lage die enzymatische Aktivität aktivierter Jak-Kinasen zu inhibieren, indem diese Domäne aus 12 Aminosäuren als eine Art Pseudosubstrat mit dem katalytischen Zentrum von Jak-Kinasen interagiert und blockiert (Sasaki et al., 1999). Desweiteren befindet sich am C-Terminus das sogenannte „SOCS-Box“-Motiv, eine Sequenz welche als Andockstelle für Komponenten zellulärer Ubiquitin-Transferasekomplexe dient und dadurch eine Ubiquitin-Markierung der über die SH2-Domänen von SOCS gebundenen Proteine ermöglicht. Dies beinhaltet die Ubiquitinylierung und proteasomale Degradation von Jak-Kinasen (Frantsve et al., 2001). Eine Ubiquitinylierung von Stat's durch SOCS-Proteine wird ebenfalls vermutet.

Ihrer Namensgebung entsprechend, „protein inhibitor of activated Stat's“, sind Mitglieder der PIAS-Proteinfamilie in der Lage spezifisch mit Stat-Proteinen zu interagieren und in ihrer Aktivität zu inhibieren. In Säugern umfasst die PIAS-Familie 5 Mitglieder: PIAS1, PIAS3, PIASy, PIASx α und PIASx β , welche als Stat-interagierende Proteine in einem Hefe-Zwei-Hybrid System identifiziert und beschrieben wurden (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998a). Heute weiß man, dass PIAS-Proteine die Aktivität von mehr als 60 verschiedenen zellulären Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren regulieren, wozu neben den Stat's auch p53, NF κ B, Smad, c-JUN, LEF1 oder Steroidhormonrezeptoren (AR, GR, PR) zählen (Schmidt & Muller, 2003). Zu den zentralen konservierten Strukturelementen von PIAS-Proteinen gehören, beginnend am N-Terminus, die SAP-Domäne, das PINIT-Aminosäure-Motiv, die mit der RING-Domäne von E3-Ligasen vergleichbare RLD-Domäne („RING-finger-like-zinc-binding domain“) und die AD-Domäne („highly acidic domain“), welche ein SUMO-interagierendes Motiv beinhaltet. PIAS-Proteine besitzen keine SH2-Domäne für eine Phosphotyrosin-spezifische Interaktion mit Zielproteinen. Sowohl inhibierende als auch aktivierende Regulationsmechanismen sind für PIAS-Proteine beschrieben, welche in einem Review von Shuai & Liu zusammengefasst wurden (Shuai & Liu, 2005). Dies beinhaltet die Aktivität von PIAS-Proteinen als SUMO-E3-Ligase, wobei SUMOylierte Transkriptionsfaktoren strukturabhängig mit Corepressor- oder Coaktivator-Komplexen interagieren können, sowie eine eigene Aktivität von PIAS-Proteinen als Coaktivatoren oder Corepressoren, indem sie nach Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor dessen DNA-Bindung inhibieren, ihn in der subnukleären Matrix sequestrieren oder einen Corepressor-Komplex durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen bzw. einen Coaktivator-Komplex durch die Rekrutierung von CBP/p300 bilden. PIAS1 und PIAS3 interagieren mit Stat1 und Stat3 und inhibieren deren Bindung an die DNA (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998a), wobei eine Interaktion der C-terminalen Region von PIAS1 mit der N-terminalen Region von Stat1 beobachtet wurde (Liao et al., 2000). Gleiches gilt für PIAS3 und Stat3, hier konnten die C-terminale AD-Domäne von PIAS3 und die N-terminale Coiled-Coil Domäne von Stat3 als

Einleitung

interagierende Grenzflächen identifiziert werden (Borghouts et al., 2010). Diese Interaktion schließt jedoch auch eine mögliche SUMOylierung über die SUMO-Bindeaktivität der AD-Domäne und E3-Ligaseaktivität der RLD-Domäne nicht aus. Im Falle von Stat1 konnte eine SUMOylierung durch verschiedene PIAS-Proteine gezeigt werden (Ungureanu et al., 2003). Für PIASx ist ein repressorischer Einfluss auf Stat4 durch Histon-Deacetylase-Rekrutierung beschrieben (Arora et al., 2003). Im Gegensatz zu den SOCS-Proteinen werden PIAS-Proteine konstitutiv exprimiert und nur wenig ist hinsichtlich ihrer Expressionsregulation bekannt.

Zusätzlich wird der Jak/Stat-Signalweg durch Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs) sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus negativ reguliert. Dies betrifft die Dephosphorylierung aktivierter Jak-Kinasen durch die PTPs: SHP1, SHP2, CD45, PTP1B und TCPTP, die Dephosphorylierung aktivierter Stat's im Zytoplasma durch die PTPs: SHP2, PTP1B, TCPTP und die Dephosphorylierung aktivierter Stat's im Nucleus durch die PTPs: SHP2 und TC45 (Shuai & Liu, 2003). Protein-Phosphatasen wie SHP2 sind dabei in der Lage sowohl die Phosphat-Gruppe des kritischen Tyrosin-Restes als auch des Transaktivierungs-regulierenden Serin-Restes aktivierter Stat-Proteine zu entfernen (Wu et al., 2002).

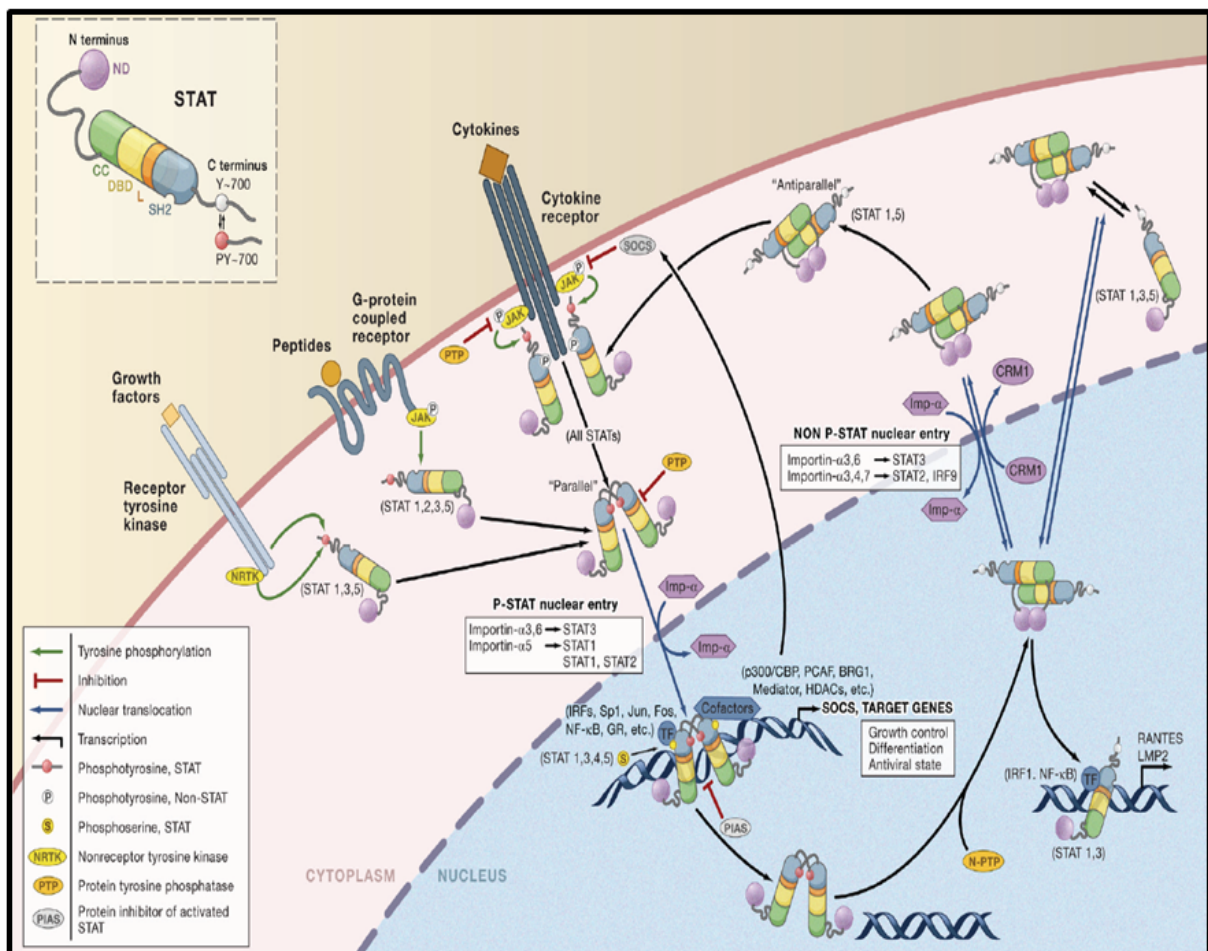


Abb. 1-2: Der Jak/Stat-Signalweg aus (Mertens & Darnell, 2007)

Abbildung 1-2 zeigt eine zusammenfassende schematische Darstellung des Jak/Stat-Signalwegs, der Mechanismen der Stat-Aktivierung nach Liganden-Bindung, der Regulation des nukleären Im- & Exports, der Verteilung und Formierung unphosphorylierter Stat's sowie die Mechanismen der Genexpressionsregulation von Zielgenen durch aktivierte Stat-Dimere und die indirekte Regulation weiterer Gene durch Cofaktor-Assoziation unphosphorylierter Stat's mit Transkriptionsfaktoren.

1.2.2 DIE PHYSIOLOGISCHE & PATHOLOGISCHE ROLLE VON STAT-PROTEINEN IM ORGANISMUS

In Abhängigkeit vom Zelltyp und Gewebe sowie dem Differenzierungsgrad der jeweiligen Zelle vermitteln Stat-Proteine eine Vielzahl, für die Aufrechterhaltung der Homöostase eines Organismus, essentieller Zellreaktionen. Eine Vielseitigkeit, welche sich in einem bestimmten zellulären Kontext aus der enormen Variation Stat-aktivierender Liganden (Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, intrazelluläre Kinasen), der Menge ihrer Zielgene, im Zusammenspiel mit der Interaktion Transkriptions-regulierender Cofaktoren und epigenetischen Modifikationen, zusätzlichen nicht-kanonischen Funktionen phosphorylierter und unphosphorylierter Stat-Proteine sowie möglichen sekundären Modifikationen ergibt. Wie bereits zuvor erwähnt regulieren Stat-Proteine über ihre Zielgene viele zellbiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Zellzyklus und Apoptose, Zellbestand („survival“), Regulation von Immunzellreaktionen oder Sauerstoffversorgung (Angiogenese) und Energiemetabolismus (Demaria et al., 2010; Desrivieres et al., 2006; Levy & Darnell, 2002; Yu & Jove, 2004). Aus diesen Prozessen ergeben sich essentielle und zentrale Funktionen von Stat-Proteinen, welche im Zusammenhang mit Zellwachstumsregulation, Gewebeerneuerung und –Homöostase stehen. Dies beinhaltet unter anderem die Regulation der Embryonalentwicklung (Takeda et al., 1997) und des Körperwachstums (Levy & Darnell, 2002), die Regulation der Hämatopoese (Rane & Reddy, 2002), der Mammogenese (Furth et al., 2011), der Angiogenese (Niu et al., 2002) oder der Erhaltung des Nervensystems (Chiba et al., 2009) sowie die Regulation von Wundheilungsprozessen der Haut und des Haarwachstums (Sano et al., 1999). Über die Expression ihrer Zielgene regulieren Stat-Proteine zusätzlich die Kommunikation zwischen Immunzellen und dem Organismus, wodurch sie Immunantworten in Folge bakterieller oder viraler Infektionen, Akut-Phase-Reaktionen in der Leber und Entzündungsreaktionen entscheidend beeinflussen (Alonzi et al., 2001; O'Shea & Murray, 2008; Shuai & Liu, 2003; Yu et al., 2009). Desweiteren sind sie an der Regulation des Energiehaushalts und

Einleitung

Energiestoffwechsels (Demaria et al., 2010; Yang & Barouch, 2007) sowie der Regulation von DNA-Reparatur-Mechanismen beteiligt (Courapied et al., 2010).

Neben ihrer primären Aktivität als Transkriptionsfaktoren übernehmen unphosphorylierte und phosphorylierte Stat-Proteine zusätzlich vielseitige nicht-kanonische Funktionen in der Zelle, was verschiedene Studien im Verlauf der letzten Jahre immer deutlicher belegen konnten. Die Expression der Stat-Gene wird mehrheitlich über aktivierte Stat-Proteine selbst reguliert, weshalb eine zelluläre Stimulation durch Zytokine wie IL6 auch zu einem rapiden Anstieg der Stat-Expression und der Menge unphosphorylierter Stat-Monomere in der Zelle führt. Unphosphorylierte Stat-Proteine sind in der Lage zwischen Zytoplasma und Nukleus zu translokieren und durch Interaktion mit bestimmten Transkriptionsfaktoren eine co-aktivierende Wirkung auszuüben, wodurch eine Expression zusätzlicher, nicht Stat-spezifischer Gene induziert wird. So konnte gezeigt werden, dass unphosphoryliertes Stat1 die Expression des *LMP2* Gens durch Interaktion mit IRF1 induziert (Chatterjee-Kishore et al., 1998), unphosphoryliertes Stat3 einen transkriptionell aktiven Komplex mit NFκB bildet (Yang et al., 2007) und unphosphoryliertes Stat6 über die Interaktion mit p300 zu einer Expression des *COX-2* Gens führt (Cui et al., 2007a). Einen interessanten Aspekt stellt die essentielle Beteiligung des Ser727-phosphorylierten Stat3-Proteins bei der Regulation der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien dar, wo es mit den Komplexen I und II der Atmungskette interagiert (Wegrzyn et al., 2009). Eine Analyse mitochondrialer Proteine Zytokin-stimulierter Zellen und lymphatischer Leukämiezellen ergab zudem eine Präsenz Tyrosin-phosphorylierter Stat5-Proteine, die mit mitochondrialer DNA und dem Pyruvat-Dehydrogenasekomplex des Citratzyklus assoziiert vorliegen (Chueh et al., 2011; Chueh et al., 2010). Stat5 scheint dabei nach Zytokin-vermittelter Aktivierung in die Mitochondrien zu translokieren, wo es an der Expressionsregulation mitochondrialer Gene beteiligt ist. In *Drosophila* konnte ein regulatorischer Einfluss des Stat5 orthologen Stat92E-Proteins bei der Heterochromatin-Stabilisierung identifiziert werden. Unphosphoryliertes Stat92E liegt dabei in einem Komplex mit dem Heterochromatin Protein 1 (HP1) und Heterochromatin assoziiert vor und stabilisiert dabei dessen kondensierte Struktur, als epigenetischer Regulationsmechanismus der Genexpressions-Inhibierung und Schutz vor genotoxischen Einflüssen (Shi et al., 2008; Yan et al., 2011). In Folge der Aktivierung von Stat92E durch das Jak *Drosophila*-Ortholog Hop kommt es zu einer Auflösung des Komplexes, der Destabilisierung von Heterochromatin und der Formierung transkriptionell aktiven Euchromatins mit der Induktion von Stat92E-Zielgenen. Die Beteiligung unphosphorylierter Stat5-Monomere an der Heterochromatin-Formierung ließe sich auch auf Säugetierzellen übertragen, konnte bislang jedoch nicht belegt werden (Brown & Zeidler, 2008; Li, 2008). Einen mechanistischen

Hinweis lieferte jedoch die Identifikation von Histon-Tyrosinphosphorylierungen durch nukleär aktives Jak2 in humanen hämatopoetischen Zellen, mit dem Resultat der Auflösung kondensierten Heterochromatins nach Dissoziation von HP1 α und der Aktivierung von Stat5-Zielgenen (Dawson et al., 2009). Unphosphorylierte Stat3-Monomere sind zudem an der Regulation zellulärer Migration durch Stabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerks beteiligt, indem sie mit dem Mikrotubuli-abbauenden Stathmin-Protein interagieren und es in seiner Funktion blockieren (Ng et al., 2006; Verma et al., 2009).

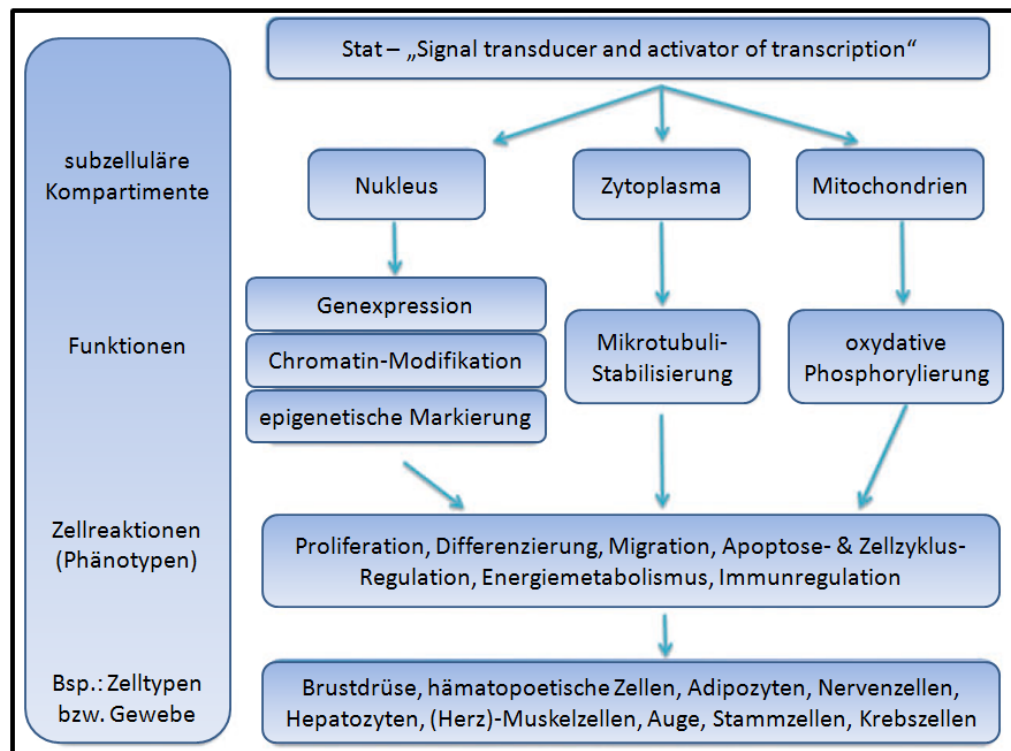


Abb. 1-3: Der regulatorische Einfluss von Stat-Proteinen im Organismus.
 modifiziert aus (Groner & Hennighausen, 2012)

Die Aktivierung von Stat-Proteinen ist ein transients und streng regulierter Prozess. Jedoch wurde in den vergangenen Jahren in einer Vielzahl solider und hämatologischer humaner Tumore eine aberrante Stat-Aktivität, vor allem von Stat3 und Stat5, in Folge erhöhter Protein-Phosphorylierung und Expression nachgewiesen (Bromberg, 2002). Diese Deregulation kann vielerlei Ursachen haben, wobei Mutationen im kodierenden Bereich des Gens, wie im Falle der Aktivierung verschiedener Protoonkogene, äußerst selten sind. Vielmehr bilden aktivierende Genmutationen verschiedener Kinasen, Fusionskinasen und Rezeptoren, welche ihrerseits wiederum an einer Aktivierung von Stat3 und Stat5 beteiligt sind, sowie inaktivierende Genmutationen verschiedener natürlicher Negativregulatoren des Stat-Signalwegs, wie den SOCS- und PIAS-Proteinen, die Hauptursache für eine Deregulation in Tumoren. Zusätzlich beeinflussen Mutationen, mit dem Resultat einer erhöhten Expression und Sekretion

Einleitung

aktivierender Liganden, welche auf die Zelle rückwirken (autokrine Signalübertragung) oder durch umgebende Zellen abgegeben werden (parakrine Signalübertragung), oft einhergehend mit einer Überexpression aktivierender Rezeptoren, die Intensität der Jak/Stat-vermittelten Signalgebung maßgeblich (Yu & Jove, 2004; Yu et al., 2009). Zusammenfassend lässt sich eine aberrante Aktivierung von Stat-Proteinen im Verlauf der Tumorgenese daher mehrheitlich als eine Folge verschiedener zellulärer Veränderungen betrachten und weniger als ein initiales Ereignis zellulärer Transformation. Eine konstitutive Aktivierung von Stat-Proteinen, vor allem von Stat3 und Stat5, trägt aufgrund der zentralen Rolle Jak/Stat-vermittelter zellulärer Signalgebung jedoch einer fortschreitenden Entartung benigner und maligner Tumore entscheidend bei. Über die Expression ihrer Zielgene regulieren sie essentielle Mechanismen der Tumorgenese wie gesteigertes Zellwachstum, Apoptosehemmung, Migration und Metastasierung, Sauerstoff-unabhängiger Energiestoffwechsel, Angiogenese und die Umgehung der antitumoralen Immunabwehr, einhergehend mit der Induktion prokanzerogener Entzündungsherde (Calo et al., 2003; Demaria et al., 2010; Yu & Jove, 2004; Yu et al., 2009). All diese in Folge einer aberranten Stat3 und Stat5 Aktivität induzierten Effekte zählen zu den von Douglas Hanahan und Robert Weinberg postulierten „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan & Weinberg, 2011), weshalb Tumore hinsichtlich ihrer Viabilität häufig eine phänotypische Abhängigkeit gegenüber dieser beiden Transkriptionsfaktoren entwickeln („(non-)oncogene addiction“). Eine Abhängigkeit, welche durch nicht-kanonische Funktionen von Stat3 und Stat5 wie die Aktivität als transkriptionelle Coaktivatoren, die Regulation der oxidativen Phosphorylierung, der Heterochromatin-Formierung und der Mikrotubuli-Stabilisierung zusätzlich beeinflusst wird (Mohr et al., 2012). Obwohl verschiedene Arten von Neoplasien auch eine erhöhte Expression und Aktivität von Stat1 aufweisen und im Verlauf der Leukämogenese auch transformierende Eigenschaften von Stat1 gezeigt werden konnten (Kovacic et al., 2006), wird diesem Mitglied der Stat-Familie in Folge der Induktion antiproliferativer und proapoptotischer Signale sowie der Induktion antitumoraler Immunantworten jedoch eher eine Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben (Haura et al., 2005; Huang et al., 2002b; Sironi & Ouchi, 2004; Yu et al., 2009).

Neben der Ausbildung von Tumoren ist eine deregulierte Aktivität von Stat-Proteinen zudem mit der Induktion chronisch entzündlicher Krankheiten des Darms, wie Morbus Crohn (Lovato et al., 2003), der Atemwege, im Fall von Asthma (Sampath et al., 1999) oder der Haut, im Fall von Psoriasis (Mack et al., 2012) verbunden. Im Fall von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, wird ein Verlust der Stat-Aktivität, v.a. von Stat3, mit einem fortschreitenden Krankheitsbild in Verbindung gebracht (Chiba et al., 2009).

1.3 STAT5

Als zytoplasmatischer Transkriptionsfaktor, welcher in Folge einer Stimulation durch das laktogene Hormon Prolaktin aktiviert wird und die Expression von Milchproteinen wie β -Casein induziert, wurde Stat5 vor etwa 20 Jahren erstmalig durch Bernd Groner und Kollegen unter der Bezeichnung MGF („mammary gland factor“) in Epithelzellen der Brustdrüse säugender Schafe, Rinder und Nagetiere auf Proteinebene entdeckt und dessen cDNA isoliert (Wakao et al., 1994; Wakao et al., 1992). Aufgrund der Gemeinsamkeiten in Funktion und Struktur erfolgte jedoch kurz darauf die Zuordnung zu der „Signal Transducer and Activator of Transcription“ Proteinfamilie und in Zusammenhang mit der Identifizierung eines zweiten nahezu identischen Gens, die Umbenennung in Stat5A und Stat5B (Liu et al., 1995), oder einheitlich, aufgrund der Homologie, Stat5. Orthologe Stat5-Gene konnten zudem in Insekten, Lurche und Fischen identifiziert werden (Pascal et al., 2001; Shi et al., 2008; Sung et al., 2003). Das Molekulargewicht der Stat5A und Stat5B Isoformen beträgt etwa 90 kDa, mit einer Länge von 793 bzw. 786 Aminosäuren, welche eine Sequenzhomologie von etwa 95% aufweisen. Die größte Varianz tritt dabei innerhalb der Transaktivierungsdomäne (TAD) auf, über welche Zelltyp-spezifische Interaktionen mit Coaktivatoren (z.B. CBP/p300 oder p100 (Paukku & Silvennoinen, 2004; Pfitzner et al., 1998)) und Corepressoren (z.B. Ezh2 (Mandal et al., 2011)) vermittelt und Zielgen-Spezifitäten von Stat5A- und Stat5B reguliert werden (Grimley et al., 1999; Kornfeld et al., 2008). Wie essentiell die TAD für die Expressionsregulation von Stat5-Zielgenen ist zeigen Studien mit C-terminalen Stat5-Deletionsmutanten. TAD-Deletionsmutanten sind in der Lage an die DNA zu binden, zeigen jedoch keine transkriptionelle Aktivität und wirken als dominant-negative Stat5-Proteine (Moriggl et al., 1996). Die Aktivierung von Stat5 erfolgt über eine große Bandbreite an Liganden, was wiederum verschiedenste Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren einschließt. Die Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung erfolgt über den kritischen Tyrosinrest 694 des Stat5A- und Tyr699 des Stat5B-Proteins, wobei in der Folge auch Stat5A/B-Heterodimere ausgebildet werden können (Horvath, 2000). Die für die Transaktivierung essentiellen, konservierten Serin-Reste befinden sich an den Positionen 725 und 779 innerhalb der TAD des Stat5A-Proteins und an Position 730 des Stat5B-Proteins und werden Zelltyp-spezifisch u.a. durch EGF-Rezeptoren oder MAP-Kinasen phosphoryliert. Diese Modifikation stellt ein weiteres regulatorisches Element gewebsspezifischer Transaktivierung dar, mit dem Resultat separat Stat5A und Stat5B vermittelter Genexpression (Beuvink et al., 2000; Clark et al., 2005; Decker & Kovarik, 2000). Aber auch über den N-Terminus von Stat5 finden essentielle

Einleitung

Interaktionen mit regulatorischen Proteinen statt, welche über epigenetische Modifikationen und Modifikationen der Chromatinstruktur die transkriptionelle Aktivität von Stat5 zusätzlich bestimmen (Kornfeld et al., 2008). Hierzu zählen die Interaktion der N-terminalen Domäne mit dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) und CBP/p300 als transkriptionelle Coaktivatoren (Engblom et al., 2007; Gewinner et al., 2004; Stocklin et al., 1996) sowie die Interaktion der Coiled-Coil-Domäne mit dem Coaktivator Nmi (Zhu et al., 1999) und dem Corepressor SMRT (Nakajima et al., 2001). Mit 3.000 bis 100.000 Molekülen pro Zelle werden Stat5-Proteine zwar variierend, jedoch ubiquitär in einer großen Menge im Organismus exprimiert (Kornfeld et al., 2008). Obwohl die benachbarten Stat5A- und Stat5B-Gene gemeinsame regulatorische Promotor-Elemente besitzen, lassen sich in bestimmten Geweben Variationen in ihrer Expression aufweisen. So liegt Stat5A vermehrt in der Brustdrüse vor, während Stat5B in einem Überschuss in der Leber und Muskelzellen exprimiert wird (Hennighausen & Robinson, 2008).

1.3.1 DIE PHYSIOLOGISCHEN FUNKTIONEN VON STAT5

Expressionsanalysen und Gen-Knockout-Experimente ergaben essentielle Funktionen von Stat5 in verschiedensten Organen und Geweben. Hierzu zählen das Knochenmark und die Zellen des Blutes, die Brustdrüse, die Prostata, die Leber, das Fettgewebe sowie die Ovarien und Testikel. Eine Vielzahl von Stat5-Zielgenen konnten identifiziert werden, welche auf zellulärer Ebene Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Zellzyklus und Apoptose, Energiemetabolismus und Kohlenhydratstoffwechsel sowie DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur regulieren. Im Gewebeverbund regulieren Stat5-Zielgene Organmorphologie, Hämatopoese & Immunreaktionen, die Mammogenese sowie Funktion und Ausbildung der Prostata, des Nerven- und kardiovaskulären Systems (Ehret et al., 2001; Eilon & Barash, 2009; Nevalainen et al., 2000). In der Leber reguliert Stat5, primär Stat5B, in Kooperation mit dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR), zudem den Geschlechtsdimorphismus und das postnatale Körperwachstum, in Folge Wachstumsfaktor und Steroidhormon (Glucocorticoide, Androgene, Gestagene, Estrogene) vermittelter Genexpression. Dies beinhaltet u.a. die Expression von Cytochrom-p450 Enzymen oder IGFs (Engblom et al., 2007; Park et al., 1999; Tronche et al., 2004). In folgender Tabelle 1-1 findet sich eine Auflistung von Genen, deren Expression Zelltypspezifisch in einem hohen Maße durch Stat5 reguliert wird.

Stat5-Zielgene (von A-Z)	Referenz
β-Casein/β-Lactoglobulin	(Ehret et al., 2001; Grimley et al., 1999; Groner & Gouilleux, 1995)
Bcl-xL, Bcl-2	(Gesbert & Griffin, 2000; Lord et al., 2000)
CiSH/SOCS1-3	(Basham et al., 2008; Davey et al., 1999; Rascle & Lees, 2003)
c-Myc	(Kornfeld et al., 2008; Lord et al., 2000)
CyclinD1/D2	(Magne et al., 2003; Martino et al., 2001; Matsumura et al., 1999)
Foxp3	(Kornfeld et al., 2008; Yao et al., 2007)
Hormon- & GF-Rezeptoren (EGFR, PR)	(Kornfeld et al., 2008)
IL-2R-α	(Ehret et al., 2001)
Mcl1	(Epling-Burnette et al., 2001; Kornfeld et al., 2008)
osm	(Basham et al., 2008; Ehret et al., 2001)
p21	(Matsumura et al., 1997)
Pim1/Pim2	(Basham et al., 2008; Pauku & Silvennoinen, 2004)
TCRγ	(Ehret et al., 2001)
VEGF	(Chien et al., 2008; Yang et al., 2008)

Tabelle 1-1: Beispiele von Stat5-Zielgenen

Einige der Stat5 vermittelten Prozesse im Organismus, wie zum Beispiel die Regulation der Lymphozyten-Aktivität und -Differenzierung, resultiert zusätzlich aus der Aktivität als transkriptioneller Repressor. Nach Bindung an den Promotor bestimmter Gene (z.B. BCL6) vermittelt Stat5 über die Rekrutierung von Corepressoren eine Inhibierung der Genexpression (Mandal et al., 2011; Walker et al., 2007).

Die Regulation der Mammogenese durch Stat5

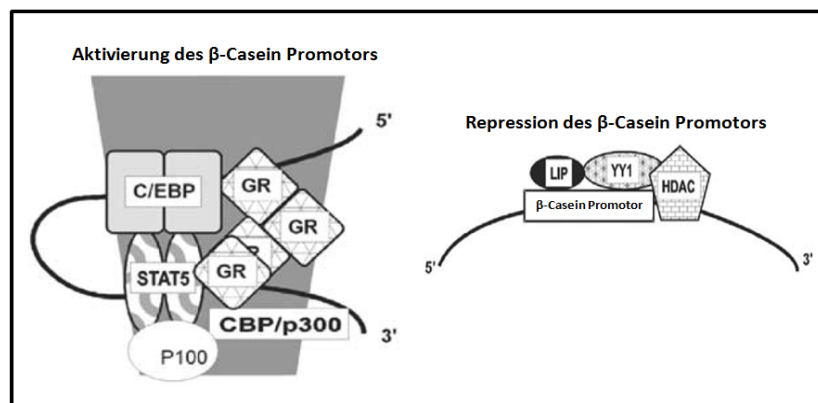
Wie bereits einleitend erwähnt wurde Stat5, oder genau genommen Stat5A, durch seine transkriptionelle Aktivität in der Brustdrüse entdeckt. In Folge der Sekretion laktogener Hormone (Prolaktin, Insulin, Estrogene, Glucocorticoide) und Wachstumsfaktoren (EGF, IGF, TGF-α), während der Schwangerschaft und der Laktationsphase, reguliert aktiviertes Stat5 die Proliferation des luminalen Epithels, die terminale Proliferation und Differenzierung der Brustdrüsen-Alveoli, einhergehend mit der Produktion von Milchproteinen (z.B. β-Casein, β-Lactoglobulin, WAP), sowie den Erhalt der zellulären Viabilität (Cui et al., 2004; Miyoshi et al., 2001). Stat5-Knockout Experimente und die Verwendung konstitutiv aktiver Stat5A-Mutanten

Einleitung

offenbaren dabei eine dominierende Rolle des Stat5A-Proteins (Dong et al., 2010; Vafaizadeh et al., 2010; Yamaji et al., 2009). Als Folge der Inaktivierung von Stat5A durch Gen-Knockout konnten jedoch kompensatorische Effekte des Stat5B-Proteins festgestellt werden (Liu et al., 1998b). Die Aktivierung und Expression von Stat5 in der Brustdrüse wird endogen nach Liganden-Bindung primär über Jak2, c-Src, Akt1, Pak1, β -Integrin und den ELF5-Transkriptionsfaktor reguliert. Eine Inhibierung von Stat5-Signalen im Brustdrüsenepithel erfolgt endogen über SOCS-Proteine (v.a. SOCS1 und SOCS3) und dem Membran-gebundenen Jak-Inhinator Caveolin-1 (Furth et al., 2011). Die komplexen Mechanismen der Liganden-vermittelten Expressionsregulation konnte in diesem Zusammenhang am Beispiel der β -Casein-Expression detailliert aufgeklärt werden (siehe Abb.1-4).

Abb. 1-4: Modell der β -Casein Expressionsregulation durch Interaktion von Stat5 mit transkriptionellen Cofaktoren.

Modifiziert aus (Pauku & Silvennoinen, 2004)



Prolaktin induziert über seinen Rezeptor und Jak2 die Bildung aktiver Stat5A-Dimere, und zu einem geringeren Umfang aktive Stat5A/B-Heterodimere, im Zytoplasma. Nach spezifischer Bindung von Stat5A an GAS-Elemente im β -Casein-Promotor kommt es zu einer Rekrutierung und Interaktion mit den Coaktivatoren GR, CBP/p300, p100 und C/EBP β und zu einer Dissoziation der transkriptionellen Repressoren YY1, HDAC3 und LIP. Über Histon-Acetylierung und -Demethylierung, Chromatin-Remodellierung und die Rekrutierung von Transkriptionsinitiationskomplexen und der RNA-Polymerase II wird die Expression von β -Casein in der Folge induziert (Groner, 2002; Pauku & Silvennoinen, 2004). Im Gegensatz dazu wirkt Progesteron inhibitorisch auf die β -Casein-Expression, mit der Induktion komplett gegenläufiger Effekte. Der intrazellulär durch das Steroidhormon Progesteron aktivierte Progesteronrezeptor (PR) bindet an proximale Promotor und distale Enhancer-Elemente des β -Casein-Gens und blockiert in der Folge die Assoziation der besagten Coaktivatoren, bei gleichzeitiger Verhinderung der Dissoziation der Corepressoren (Buser et al., 2011).

Neben Stat5 sind an der Regulation des kompletten Prozesses der Mammogenese noch weitere Mitglieder der Stat-Familie beteiligt. Während Stat6 die Proliferation alveolärer Progenitorzellen

induziert, vermittelt Stat3 nach Abschluss der Laktation, in der sogenannten Phase der Involution, den Abbau bzw. die Remodellierung des duktales und alveolären Brustdrüsengewebes, durch Induktion pro-apoptotischer Signale, sowie den Stopp der Milchprotein-Expression. Stat3 und Stat5 zeigen dabei reziproke Aktivierungsmuster, mit der Aktivierung von Stat5 und Inaktivierung von Stat3 während Schwangerschaft und Laktation und der Inaktivierung von Stat5 und Aktivierung von Stat3 während der Involution. Diese Modifikation zellulärer Phänotypen im Verlauf der einzelnen Stadien der Mammogenese verdeutlicht die gewebsspezifische Vielseitigkeit von Stat-Proteinen, in der Vermittlung Liganden-induzierter Signale bzw. Funktionen (Groner & Hennighausen, 2012).

Die Regulation der Hämatopoese und Immunreaktionen durch Stat5

Neben der Regulation der Mammogenese ist Stat5, wie auch die anderen Mitglieder der Stat-Familie, zudem ein zentraler Regulator der Hämatopoese und der Immunabwehr. Aktiviert über ein breites Spektrum an Zytokinen und Hormonen vermittelt Stat5 sowohl die Selbsterneuerung bzw. den Erhalt CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen (HSC), als auch die Produktion und Differenzierung sämtlicher Leukozyten, myeloischen und lymphatischen Phänotyps, der Erythrozyten und Thrombozyten (Wang et al., 2009; Wierenga et al., 2008). Vor allem die Produktion und Differenzierung reifer B-, CD4⁺/CD8⁺/CD25⁺-T-Lymphozyten und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) ist in einem hohen Maße von der Präsenz aktiver Stat5-Proteine abhängig, wie Gen-Knockout-Studien in der Maus ergaben (Hoelbl et al., 2006; Yao et al., 2006). Der enorme Einfluss von Stat5 auf die Physiologie des blubildenden Systems konnte zudem anhand der Regulation der Erythropoese und der Funktion von Erythrozyten belegt werden. In Mäusen resultiert ein homozygoter Stat5-Knockout in embryonaler Lethalität in Folge eines gestörten Eisenmetabolismus und einer gestörten Aufnahme von Eisen durch erythroide Zellen des Fötus und der Ausbildung einer Anämie, gepaart mit gesteigerten Apoptoseraten (Kerenyi et al., 2008). Im Gegensatz dazu ermöglicht die Expression einer konstitutiv aktiven Stat5-Mutante in murinen Jak2- und Erythropoetin-Rezeptor (EpoR)-defizienten fötalen Leberzellen eine Erythropoetin-unabhängige Sicherung der Überlebensfähigkeit erythroider Progenitorzellen und die Differenzierung reifer Erythrozyten (Grebien et al., 2008). Weiterhin sind essentielle Funktionen hinsichtlich der Regulation von Immunität und Immunzellreaktionen, wie die Regulation der Aktivität von T-Helfer-, regulatorischen und zytotoxischen T- und NK-Zellen, die Regulation der Aktivität von eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und Megakaryozyten (Thrombozyten) sowie die Regulation der Stress-Erythropoese durch Stat5 belegt (Kornfeld et al., 2008). Über spezifische Cofaktor-Interaktionen und über die Formierung

Einleitung

von Tetramer-Komplexen in der Promotorregion hämatopoetischer Stat5-Zielgene, scheint dabei die N-terminale Domäne von Stat5 entscheidend für die Funktion von Stat5 als ein zentraler Regulator und Transkriptionsfaktor der Hämatopoese zu sein (Li et al., 2007).

Nicht-kanonische Funktionen von Stat5

Zusätzlich zu den genannten essentiellen Funktionen, welche Stat5A & Stat5B als Transkriptionsfaktoren im Nukleus ausüben, konnten in den vergangenen Jahren zusätzliche nicht-kanonische Aktivitäten von Stat5 identifiziert werden, welche sich ebenfalls entscheidend auf die Physiologie und Morphologie von Zellen allgemein und gewebespezifisch auswirken. Unphosphorylierte Stat5-Monomere als auch unphosphorylierte antiparallele Stat5-Dimere, welche über die Interaktion von α -Helices und β -Faltblatt Strukturen der Coiled-Coil- und DNA-Bindedomäne gebildet werden, sind ebenfalls in der Lage sich permanent zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern hin und her zu bewegen und lassen sich in allen Organellen der Zelle detektieren (Iyer & Reich, 2008; Neculai et al., 2005). Dementsprechend konnten zusätzliche Funktionen von Stat5 auch in verschiedenen Zellkompartimenten detektiert werden. Hierzu zählt die Erhaltung von Stabilität und Struktur kondensierten Heterochromatins durch unphosphorylierte Stat5-Monomere, als Mechanismus der Expressionskontrolle und des Schutzes gegenüber genotoxischer Noxen, sowie die Regulation mitochondrialer Gene (Chueh et al., 2010; Yan et al., 2011). Beide Mechanismen wurden zuvor bereits unter Kap. 1.2.2 beschrieben. Desweiteren übt Stat5 coregulatorische Funktionen im Zytoplasma und im Zellkern aus, welche sowohl im physiologischen als auch im pathophysiologischen oder pathologischen Zustand der Zelle von Bedeutung sein können. Zu den detailliert beschriebenen Interaktionen mit anderen Proteinen und Signalkaskaden zählt die regulatorische Interaktionen mit dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR), im physiologischen Zustand in der Leber, wo Stat5B in Kooperation mit dem GR essentielle Gene des Körperwachstums und Geschlechtsdimorphismus reguliert (Engblom et al., 2007), sowie die Interaktion mit dem Androgen-Rezeptor in der Prostata, welche in Folge einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität beider Proteine vor allem pathophysiologische Effekte, mit der Ausbildung aggressiver Prostata-Karzinome, hervorruft (Tan et al., 2008). Zudem unterstützen aktive Stat5-Dimere den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg nicht nur durch die Expression entsprechender Zielgene wie Akt1, auch in Folge einer direkten Interaktion mit der regulatorischen p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und dem Adaptorprotein Gab2 induziert Stat5 eine nachgeschaltete Aktivierung von Akt. Diese Interaktion scheint sowohl im gesunden Organismus eine wichtige Rolle zu spielen, wie im Falle der Regulation Zytokin-vermittelter Hämatopoese, der T-Zell-Proliferation und -Viabilität

gezeigt werden konnte (Lockyer et al., 2007; Wofford et al., 2008; Zhang et al., 2007), als auch in leukämischen Zellen, wo kontinuierlich aktives Stat5 im Zytoplasma, als eine Art co-aktivierendes Adaptorprotein, den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg zusätzlich induziert (Harir et al., 2007; Li et al., 2010). Abschließend sei zu erwähnen, dass in einer kürzlich veröffentlichten Publikation eine permanente Assoziation unphosphorylierter Stat5-Proteine mit dem Golgi-Apparat und dem rauen ER in Fibroblasten, glatten Muskel- und vaskulären Zellen identifiziert wurde. Eine Inhibierung der Stat5-Expression durch RNA-Interferenz konnte belegen, dass Stat5 essentiell für den Erhalt von Struktur und Funktion dieser beiden Organellen ist (Lee et al., 2012). Zusätzlich zu der für viele Prozesse des Organismus essentiellen Aktivität als Transkriptionsfaktor, unterstreichen diese nicht-kanonischen Aktivitäten den vielseitigen Einfluss von Stat5, hinsichtlich der Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen.

1.3.2 DER EINFLUSS VON STAT5 AUF DIE TUMORGENESE

Konstitutive Stat5-Aktivität als prognostischer Biomarker der Leukämogenese

Aufgrund der zentralen Funktion von Stat5 in der Regulation der Hämatopoese und der Aktivität von Immunzellen ist es nicht verwunderlich, dass eine Deregulation der Stat5-Aktivität v.a. mit der Ausbildung maligner Entartungen des hämatopoetischen Systems in Verbindung steht. Der erste dokumentierte Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Stat5-Aktivität und der malignen Transformation von Zellen reicht zurück ins Jahr 1996, nur zwei Jahre nach seiner Entdeckung und erfolgreichen Klonierung. Nachdem zuvor eine konstitutive Aktivierung des Jak/Stat-Signalwegs in unreifen Prä-B-Zellen, nach vorheriger Infektion mit dem v-abl Onkogen exprimierendem murinem Abelson Leukämie-Virus (A-MuLV), identifiziert wurde, war es die Gruppe um Ilaria Jr. und Van Etten in Boston, welche den direkten Zusammenhang zwischen der Initiation einer chronisch myeloischen Leukämie durch das Fusionsprotein Bcr-Abl und einer konstitutiven Stat5-Phosphorylierung aufzeigen konnte (Danial et al., 1995; Ilaria & Van Etten, 1996). In den Folgemonaten konnte dieser Zusammenhang in peripheren Blutzellen von Patienten mit akut myeloischer (AML), akut lymphatischer (ALL) und chronisch myeloischer Leukämie (CML) bestätigt werden (Chai et al., 1997). Bcr-Abl ist eine onkogene Fusionskinase, welche als Produkt der Translokation der Chromosomen 9 und 22 t(9;22) (q34;q11) durch das anschließend verkürzte Chromosom 22 (nach dem Ort der Entdeckung auch „Philadelphia-Chromosom“ bezeichnet) exprimiert wird. Ca. 95% der CML-Patienten sowie 25% der ALL-

Einleitung

Patienten weisen diese Translokation auf, bei der die 3' Tyrosinkinase-Domäne des *c-abl* Gens von Chromosom 9 (oder *c-abl1* für „abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“) mit einer 5'-Proteindomäne des *bcr*-Gens des Chromosoms 22 („breakpoint cluster region“) fusioniert wird. Je nach Lokalisation des Strangbruches im *bcr*-Gen können drei Isoformen des Fusionsgens unterschiedlicher Größe gebildet werden, Bcr-Abl p190, p210, p230 (190, 210, 230 kDa). Die Fusion führt zu einer Dimerisierung und Tetramerisierung des Proteins mit dem Resultat der Autophosphorylierung von Tyrosinresten durch die abl-Tyrosinkinase. Über die phosphorylierten Tyrosinreste kommt es zu einer SH2-Domäne-vermittelten Interaktion mit verschiedenen Signalmolekülen, welche ihrerseits wiederum durch die abl-Kinase aktiviert werden (Pendergast et al., 1991; Pendergast et al., 1993). Über die Phosphorylierung des kritischen Tyrosin-Restes induziert Bcr-Abl eine permanente Aktivierung von Stat5A/B-Proteinen, entweder direkt (Nieborowska-Skorska et al., 1999) oder indirekt über Bcr-Abl aktivierte Vertreter der Src-Kinasefamilie (Klejman et al., 2002; Nam et al., 2007; Wilson et al., 2002). Das die anschließende konstitutive Stat5-Aktivität, mit der Expression von Zielgenen wie *CyclinD1*, *Bcl-xL*, *c-myc* oder *Mcl-1*, einen entscheidenden Regulationsmechanismus der Bcr-Abl-induzierten Leukämie darstellt, konnte in einer Vielzahl von Studien *in vitro* (de Groot et al., 2000; Horita et al., 2000) und *in vivo* (Hoelbl et al., 2006; Warsch et al., 2011; Ye et al., 2006) gezeigt werden. Eine mit fortschreitender Transformation auftretende exzessive Stat5 Expression kann dabei zu einer verminderten Sensitivität leukämischer Zellen gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs), wie Imatinib, Nilotinib oder Dasatinib führen (Warsch et al., 2011), was die Notwendigkeit einer kombinatorischen Stat5-Inhibierung in der Therapie Bcr-Abl-positiver Leukämien unterstreicht.

Doch Bcr-Abl ist nicht der einzig beschriebene Auslöser Stat5-vermittelter leukämischer Transformation. Denn auch im Falle der größtenteils Bcr-Abl-unabhängigen AML konnte ein essentieller Zusammenhang zwischen aberranter Stat5-Aktivität und der Selbsterneuerung und Expansion leukämischer Stamm- und Progenitorzellen gezeigt werden (Heuser et al., 2009; Schepers et al., 2007). Aufgrund der vergleichsweise hohen Teilungsaktivität hämatopoetischer Stamm- & Progenitorzellen ist das Risiko des Auftretens chromosomaler Abberationen stark erhöht. Tel-Jak1-3, Tel-Abl, Tel-PDGFR oder Npm-Alk sind Beispiele weiterer Translokationsprodukte mit onkogener Kinaseaktivität, welche an der Ausbildung von Neoplasien des hämatopoetischen Systems beteiligt sind und mit einer Liganden- bzw. Rezeptor-unabhängigen Aktivierung von Stat5 in Verbindung gebracht wurden (Cain et al., 2007; Carron et al., 2000; Nieborowska-Skorska et al., 2001; Pecquet et al., 2007; Schwaller et al., 2000; Sternberg et al., 2001). Aber auch durch Punktmutationen hervorgerufene Onkogen-

Aktivierungen, wie im Falle der Jak2-V617F Mutante oder der Rezeptortyrosinkinasen c-Kit (c-Kit D816V) und Flt3 (Flt3 D835), sowie die Tandem-Duplikation Mutation des Flt3 Proteins (Flt3-ITD), gelten als Marker von Leukämien, Lymphomen und myeloproliferativen Erkrankungen. Auch im Falle dieser Onkogene konnte eine Tyrosinkinase-vermittelte Stat5-Aktivierung, mit der Induktion von Stat5-Zielgenen, festgestellt werden (Choudhary et al., 2007; Funakoshi-Tago et al., 2010; Harir et al., 2008; Spiekermann et al., 2003; Takahashi et al., 2004). Der Mechanismus der Heterochromatin-Destabilisierung und Gen-Aktivierung durch Jak2 im Nukleus (beschrieben unter Kap. 1.2.2) verstärkt zudem das leukämische Potential der Tel-Jak2 und Jak2 (V617F) Mutanten, im Zusammenhang mit der zusätzlichen Phosphorylierung Heterochromatin-assoziiierter Stat5-Proteine (Dawson et al., 2009). Welch leukämisches Potential eine konstitutive Stat5-Aktivität aufweist, zeigte eine Studie von 2005 mit murinen Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks, welche mit einer konstitutiv aktiven Mutante des murinen Stat5A-Proteins (cS5^f: S710F (Onishi et al., 1998)) transfiziert wurden. Die Transplantation dieser Zellen in immundefiziente und wildtyp Mäuse führte zu einer Ausbildung und Manifestation aggressiver Leukämien myeloischen und lymphatischen Phänotyps (Moriggl et al., 2005). Dabei konnte eine starke Akkumulation von Tetrameren der aktiven Stat5-Mutante an der DNA festgestellt werden. In Folge der Interaktion mit bestimmten transkriptionsinitiierenden Co-Faktoren scheint eine Stat5-Tetramerbildung essentiell für die Zielgen-gesteuerte Leukämie-Induktion zu sein, da dieser Effekt in Gegenwart einer Stat5-Deletionsmutante ohne N-Terminus nicht bestätigt werden konnte. Die Durchführung selbiger Experimente mit cS5^f-Ser727/Ser779-Substitutionsmutanten sowie die Analyse primärer und kultivierter Leukämiezelllinien ergab zudem einen signifikanten Einfluss der Stat5-Transaktivierung, über die TAD-Serin-Phosphorylierung, auf den Prozess der Leukämogenese (Friedbichler et al., 2010). In einem Review von 2008 (Lewis & Ward, 2008) wurden verschiedene Formen hämatologischer Neoplasien, den onkogenen Kinasen welche für deren Transformation verantwortlich sind sowie die zugehörige Aktivierung von Stat-Proteinen in einer Übersicht zusammengefasst (siehe Abb. 1-5). Eine Erhöhung der Aktivität von Stat5 lässt sich in nahezu jeglicher Form von Tumoren und myeloproliferativen Erkrankungen des Blutes detektieren, was die Attraktivität dieses Transkriptionsfaktors als therapeutische Zielstruktur in der hämatologischen Onkologie unterstreicht.

Abb. 1-5: Aktivierung von Stat-Proteinen in Tumoren des hämatopoetischen Systems und myeloproliferativen Erkrankungen.

modifiziert aus (Lewis & Ward, 2008)

Neoplasien des Blutes	Transformierte Kinase	Aktivierte Stats
Akut myeloische Leukämie	FLT3	Stat1
	c-Kit	Stat3
	Jak3	Stat5
	v-abl	
	v-mpl	
Akut lymphoblastische Leukämie	Tel-Jak2	Stat1
	Tel-PDGFR	Stat5
Chronisch myeloische Leukämie	BCR-ABL	Stat5
	p185	
	p210	
	Tel-Jak2 (atypical chronic myelogenous leukemia) Jak2-PCM1	
Erythroleukämie		Stat1
		Stat5
Megakaryozytenleukämie		Stat5
T-Zell Lymphom	HTLV-T	
B-Zell Lymphom	BCR-ABL	Stat5
	p185	
	p210	
Myeloproliferative Erkrankungen	Jak2 (V617F)	Stat5
	Tel-Jak2	
	Tel-PDGFR	

Der Einfluss von Stat5 auf die Entstehung von Brustkrebs

Da die Physiologie des Brustdrüsen Gewebes ebenfalls in einem hohen Maße über Stat5 reguliert wird, ist das Auftreten deregulierter Stat5-Aktivitäten in Brusttumoren (Mammakarzinom) ebenso wenig überraschend wie im Falle der Leukämie (Cotarla et al., 2004). Obgleich sich eine erhöhte Stat5-Aktivität entscheidend auf den Erhalt der Viabilität alveolärer, ductaler und myoepithelialer Neoplasien auswirkt, ist die transformierende Wirkung im Vergleich zu anderen Onkogenen wie c-Myc, Her2/Neu oder Wnt1 im Mammakarzinom gering. Gen-Knockout Studien, mit der Herunterregulierung von Stat5, des Prolaktin-Rezeptors oder Caveolin-1 sowie Analysen einer transgenen Überexpression konstitutiv aktiver Stat5-Mutanten, von Prolaktin oder des SV40-LargeT Antigens, offenbarten jedoch in verschiedenen Brustkrebs-Mausmodellen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen erhöhter Stat5-Aktivität und dem Auftreten von Neoplasien in der Brustdrüse (Furth et al., 2011; Iavnilovitch et al., 2004; Ren et al., 2002). Allerdings weist eine aberrante Stat5-Aktivität im Verlauf der Entwicklung des Mammakarzinoms teils widersprüchliche Effekte auf. In frühen Stadien der Tumorgenese wirkt sich eine erhöhte Stat5-Aktivität unterstützend auf die Proliferation und maligne Transformation des Brustdrüsenepithels aus. Eine konstitutive Stat5-Aktivität, in Folge permanenter Phosphorylierung, konnte in diesem Zusammenhang mit der Ausbildung von Adenokarzinomen während der Involutionsphase der Mammogenese in Verbindung gebracht werden (Vafaizadeh et al., 2010). Im Gegensatz dazu wirkt sich Stat5 in fortgeschrittenen Stadien des Mammakarzinoms positiv auf die Zelldifferenzierung aus, mit dem Resultat reduzierter

Proliferation und Invasivität, einhergehend mit einer verbesserten Prognose für Brustkrebs-Patienten und einer erhöhten Sensitivität von Brusttumoren gegenüber endokriner Therapie, wie in etwa der Behandlung mit dem Anti-Östrogen Tamoxifen (Nevalainen et al., 2004; Peck et al., 2011; Sultan et al., 2005; Yamashita et al., 2006). Wie auch im gesunden Brustgewebe zeigen Stat5 und Stat3 im Mammakarzinom gegenläufige Effekte mit reziproker Expressionsregulation kritischer Zielgene wie BCL6, AP-1, E-Cadherin oder Matrix-Metalloproteasen. Brustkrebszellen mit erhöhter Aktivität beider Stat-Vertreter weisen im Vergleich zu einer alleinigen Stat3-Aktivität ein reduziertes Proliferations- und Invasionsverhalten, bei gleichzeitig erhöhter Zelldifferenzierung und Sensitivität gegenüber chemotherapeutischer Behandlung auf. In Brusttumoren kann man daher von einer dominierenden Aktivität von Stat5 gegenüber Stat3 sprechen, mit der Induktion anti-invasiver und Differenzierungs-induzierender Signale (Gutzman et al., 2007; Sultan et al., 2005; Walker et al., 2009). Dieser Effekt von Stat5, mit der primären Ausbildung differenzierter Adenokarzinome, erweist sich als Abhängig von der transkriptionellen Aktivität von Stat5 mit einer intakten Transaktivierung, da die Expression einer dominant-negativen Stat5-Mutante ohne Transaktivierungsdomäne zu phänotypischen Veränderungen und der Ausbildung von Karzinomen mit undifferenziertem und invasivem Phänotyp führte (Iavnilovitch et al., 2004). Verschiedene Mechanismen der Stat5-Aktivierung konnten in Neoplasien des Brustdrüsengewebes identifiziert werden. Dazu zählen Funktionsverluste von Tumorsuppressoren und natürlichen Negativregulatoren wie SOCS1 oder Caveolin-1 durch Geninaktivierung oder die Aktivierung von Stat5 durch autokrine Prolaktin-, EPO- oder IL6-Signale. Als Stat5-aktivierende zelluläre Onkoproteine konnten c-Myb und Brk im Mammakarzinom identifiziert werden (Furth et al., 2011; Wagner & Schmidt, 2011). Die mit der Ausbildung von Leukämien eng verbundene Aktivierung von Stat5 über mutierte, konstitutiv aktive Kinasen lässt sich in Brusttumoren nicht feststellen. Eine Ausnahme bildet die kritische Jak2-V617F-Punktmutation, welche in Mammakarzinomen der Maus als ein Auslöser Stat5-vermittelter Tumorgenese identifiziert werden konnte (Caffarel et al., 2012).

Der Rolle von Stat5 bei der Entstehung von Prostatakrebs

Vergleichbar mit der weiblichen Brustdrüse wird die Physiologie und Morphologie des Prostata-Drüsengewebes beim Mann entscheidend über Prolaktin und Stat5-vermittelte Signale reguliert (Nevalainen et al., 2000) und eine erhöhte onkogene Stat5-Aktivität konnte als Biomarker von Prostata Tumoren hohen histologischen Grades identifiziert werden (Li et al., 2004). Prostata-Krebszellen weisen dabei hinsichtlich ihrer Viabilität und proliferativem Verhalten eine starke Abhängigkeit von der Stat5-Aktivierung auf. So konnten über die Expression von Antisense-

Einleitung

Oligonukleotiden, siRNA oder dominant-negativen Stat5-Mutanten drastische Effekte einer Stat5A- und Stat5B-Inhibierung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Ahonen et al., 2003), welche die Effekte einer Stat3-Inhibierung in Prostatakrebszellen übertreffen (Gu et al., 2010). Der funktionale Verlust von Stat5 resultiert in einer Inhibierung zellulärer Viabilität und Proliferation, bei gleichzeitiger Apoptose-Induktion. Entscheidend scheint dabei unter anderem die Regulation der CyclinD1- und Bcl-xL-Expression durch Stat5 im Prostata-Karzinom zu sein (Dagvadorj et al., 2008). Wie auch im Mammakarzinom wirkt sich eine erhöhte Stat3-Aktivität in Prostata-Tumoren, im Vergleich zu Stat5, wiederum verstärkt auf den Metastasierungsprozess aus (Gu et al., 2010). Im Zusammenhang mit der Überexpression des Androgen-Rezeptors (AR) Hormon-resistenter und Hormon-refraktärer Prostatakarzinome konnte zudem eine Stat5-vermittelte Steigerung der transkriptionellen Aktivität des AR gezeigt werden. In 95% der Fälle Hormon-refraktärer Prostatakarzinome, also Karzinome welche nicht weiter auf eine Behandlung mit Hormonanaloga, wie LHRH-Analoga, oder Antiandrogene ansprechen, konnte eine simultane Aktivität des AR und Stat5 festgestellt werden. Die Präsenz konstitutiv aktivierter Stat5-Dimere, meist als Folge autokriner Prolaktin-Signale (Dagvadorj et al., 2007), führt zu einer Interaktion mit Antiandrogen-gebundenem AR im Zytoplasma und einer erhöhten Translokation beider Proteine in den Nukleus. Dadurch wird die transkriptionelle Aktivität beider Proteine erhöht, wobei sowohl Stat5 als auch der AR anti-apoptotische Zielgene exprimieren und zudem ein aggressives Hormon-unabhängiges Wachstum fördern (Tan et al., 2008).

Aberrante Stat5-Aktivitäten sind für weitere Arten solider Tumore beschrieben. Plattenepithelkarzinome des Hals und Nackens (HNSCC- „head and neck squamous cell carcinoma“) zeichnen sich durch eine Überexpression des EGF- und TGF- α -Rezeptors aus, in Kombination mit autokriner Rezeptoraktivierung. Die Analyse primären HNSCC-Tumorgewebes ergab eine Deregulation der Stat5B-Aktivität in Folge TGF- α und EGFR-vermittelter Signale und einen entscheidenden Einfluss von Stat5B auf die HNSCC-Tumorgenese (Leong et al., 2002; Xi et al., 2003). Eine prokanzerogene Aktivität von Stat5B konnte ebenfalls in der Leber detektiert werden. Neben der essentiellen Beteiligung von Stat5B an der Regulation des Sexualdimorphismus und des Körperwachstums in der Leber (Engblom et al., 2007), konnte ein unterstützender Effekt auf die Motilität und Invasivität hepatozellulärer Karzinome (HCC- „hepatocellular carcinoma“), mit der Induktion des EMT-Prozesses, durch Stat5B festgestellt werden (Lee et al., 2006). Zudem führte die Inhibierung der Stat5-Expression in HCC-Zelllinien durch RNA-Interferenz zu einer Wachstums-Reduktion und Apoptose-Induktion (Zhang et al., 2012). Gleiche Effekte resultierten aus einem Stat5-mRNA Knockdown über siRNA in kolorektalen Karzinomzellen (Du et al., 2012; Xiong et al., 2009). Weiterhin sind anti-

apoptotische Effekte Stat5-vermittelter Genexpression für maligne Melanome beschrieben. EGFR, Jak1 und Src konnten als verantwortliche Kinasen einer permanenten Stat5-Phosphorylierung in malignen Melanomen identifiziert werden (Hassel et al., 2008; Mirmohammadsadegh et al., 2006). Die Expression von Bcl-xL in Folge aberranter Stat5-Aktivität bildet einen Resistenzmechanismus gegenüber chemotherapeutischer Wirkstoffe im Ovarialkarzinom und korreliert mit histologischen Graden des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC-„non small cell lung cancer“) (Jinawath et al., 2010; Sanchez-Ceja et al., 2006).

Eine Vielzahl von Studien haben eindeutige Beweise geliefert, dass Stat5 in überexprimierter und überaktiver Form ein potentes Onkogen und vielversprechendes Target-Protein für eine therapeutische Intervention darstellt. Die verschiedenen Arten hämatologischer und solider Tumore in denen eine deregulierte Stat5-Aktivität im Zusammenhang mit der Initiation, Promotion, Progression oder dem Erhalt eines benignen bzw. malignen Phänotyps von Tumoren nachgewiesen wurde, sind in folgender Tab.1-2 zusammenfassend aufgelistet.

Humane Tumore mit abberanter Stat5 Aktivität (A-Z)	Referenz
Hals/Nacken-Plattenepithelkarzinom (HNSCC)	(Leong et al., 2002; Xi et al., 2003)
Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	(Lee et al., 2006; Zhang et al., 2012)
Kolorektales Karzinom	(Du et al., 2012; Xiong et al., 2009)
Leukämie	(Lewis & Ward, 2008; Moriggl et al., 2005; Ye et al., 2006)
Lymphom	(Hinz et al., 2002)
Mammakarzinom	(Cotarla et al., 2004; Iavnilovitch et al., 2004; Ren et al., 2002)
Melanom (epidermoides Karzinom)	(Hassel et al., 2008; Mirmohammadsadegh et al., 2006)
Myeloproliferative Neoplasien	(Walz et al., 2012; Wernig et al., 2006)
NSCLC – Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	(Sanchez-Ceja et al., 2006)
Ovarialkarzinom	(Jinawath et al., 2010)
Prostatakarzinom	(Li et al., 2004; Tan et al., 2008)

Tabelle 1-2: Übersicht der verschiedenen Arten hämatologischer und solider humaner Tumore, in denen eine aberrante und onkogene Stat5-Aktivität nachgewiesen wurde.

1.4 INTERFERENZ MIT INTRAZELLULÄREN PROTEINEN DURCH PEPTIDAPTAMERE ALS ANSATZ IN DER KREBSTHERAPIE

Die Mehrheit der in der Chemotherapie eingesetzten Zytostatika richtet sich gegen Membranrezeptoren oder Enzyme, welche Wirkstoff-zugängliche hydrophobe Bindetaschen in ihren katalytischen oder allosterischen Zentren aufweisen (Imming et al., 2006; Verdine & Walensky, 2007). Jedoch bietet die Oberflächenstruktur regulatorischer Proteine ohne Enzymfunktion, wie Transkriptionsfaktoren oder signalübertragende Adaptorproteine, meist nur begrenzte Möglichkeiten einer effektiven Interaktion und Inhibierung durch pharmakologische, mehrheitlich niedermolekulare Wirkstoffe. In Protein-Datenbanken zusammengefasste Oberflächenstrukturanalysen verdeutlichen, dass nur etwa 3.000 der 25.000 durch das humane Genom kodierten Proteine über solch hydrophobe Bindetaschen verfügen, weshalb eine Vielzahl nicht-enzymatischer, jedoch in Tumorzellen deregulierter und für deren Wachstum essentieller Signalmoleküle („addiction molecules“, „addiction oncogenes“), der Kategorie schwer zugänglicher Wirkstoff-Targets zugeordnet werden (Russ & Lampel, 2005; Sakharkar et al., 2007). Solch onkologisch relevante Zielstrukturen werden auch als „non-druggable“ oder „non-conventional drug targets“ bezeichnet. Peptide und Proteine sind als biologische Makromoleküle, mit definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen, wiederum in der Lage, unabhängig von dem Vorhandensein hydrophober Bindetaschen, spezifisch mit verschiedensten Grenzflächen anderer Proteine zu interagieren (Verdine & Walensky, 2007). So bilden natürlich auftretende Protein-Wechselwirkungen, welche in der funktionellen Inhibierung eines in einem Komplex vorliegenden Proteins resultieren, die Grundlage einer Vielzahl zellulärer Regulations-Mechanismen (z.B. allosterische Hemmung, E3-Ligation). Übertragen auf den pathologischen Zustand in Tumoren, stellt die Inhibierung von aktivierten Onkogenen mit schwer Wirkstoff-zugänglicher Proteinstruktur, durch Interaktion mit einem Protein-Liganden, daher einen vielversprechenden Therapieansatz dar und bietet eine Vielzahl neuer Möglichkeiten in der Mono- oder kombinierten Chemotherapie. Strukturelle Ableitungen natürlicher Inhibitoren, zur Entwicklung therapeutischer Protein-Liganden, sind bereits erfolgreich durchgeführt und mit vielversprechendem Ergebnis getestet wurden. So gelang es Mitgliedern der Arbeitsgruppe ein Fragment des endogenen Stat3 Inhibitors PIAS3 (*Protein Inhibitor of Activated Stat3*) zu isolieren, welches für dessen Interaktion mit der Coiled-Coil Domäne von Stat3 verantwortlich ist und als rekombinant zellpenetrierendes Protein die Viabilität Stat3-abhängiger Tumorzellen inhibiert (Borghouts et al., 2010). Aber auch in weiteren Fällen konnten aus natürlichen Protein-Interaktionsdomänen, wie der Mdm-2 Interaktionsdomäne des p53-Tumorsuppressors, der BH4-

Domäne des antiapoptotischen Bcl-x_L Proteins oder der bHLH-Domäne von c-myc, strukturell abgeleitete Protein-Liganden designt und erfolgreich getestet werden (Bidwell & Raucher, 2006; Kanovsky et al., 2001; Sugioka et al., 2003). Neben den notwendigen Vorkenntnissen über die Lokalisation, Größe und Struktur interagierender Protein-Domänen, wird das Design natürlich abgeleiteter Protein-Liganden zusätzlich durch die generelle Vielfalt möglicher Interaktionspartner limitiert. Im Gegensatz dazu bieten synthetische Peptidaptamer-Konstrukte die Möglichkeit der Interferenz mit beliebigen Protein-Zielstrukturen („protein targets“) und haben dadurch eine enorme Bedeutung bei der Entwicklung Protein-basierter Krebstherapeutika erlangt.

Peptidaptamere sind kurze (10-20 aa), artifizielle Peptidsequenzen, welche mit hoher Spezifität und Affinität mit Domänen bestimmter Zielproteine interagieren und diese in ihrer Funktion inhibieren. Als modifizierte Fusionsproteine setzen sie sich aus einem Struktur und Stabilität gebendem Gerüstprotein („Scaffold“ Protein) und einer variablen, Target-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz zusammen, welche in einer starren Konformation auf der Oberfläche des Scaffold-Proteins eingebaut und präsentiert wird (Crawford et al., 2003). Die Struktur von Peptidaptameren ähnelt daher der von Antikörpern oder scFv-Antikörper-Fragmenten („single-chain variable fragment“), mit ebenfalls vergleichbaren Dissoziationskonstanten. Neben dem nahezu uneingeschränkten Einsatz gegen verschiedenste Protein-Zielstrukturen, bieten Peptidaptamere zudem wesentliche Vorteile eines vereinfachten Designs sowie einer effizienten und kostenreduzierten Herstellung bzw. Synthese, mit einer meist Disulfidbrücken-unabhängigen Faltung im Gegensatz zu Antikörpern (Colas, 2008; Crawford et al., 2003; Hoppe-Seyler & Butz, 2000). Weiterhin können Peptidaptamere so modifiziert werden, dass sie in der Lage sind Zellmembranen zu penetrieren und intrazellulär zu wirken. Die Wahl eines geeigneten Scaffold-Proteins geringer Größe erweist sich dabei als bedeutend. Neben den essentiellen Kriterium erhöhter struktureller Stabilität und Löslichkeit sowie dem aus therapeutischer Sicht essentiellen Kriterium geringer Immunogenität, sollte sich das Scaffold-Protein zudem nicht-toxisch und biologisch neutral verhalten. Das heißt es sollte keine enzymatische Aktivität besitzen und keine Bindungsspezifitäten gegenüber zellulären Molekülen (Proteinen, Nukleinsäuren) oder Zellorganellen aufweisen (Crawford et al., 2003). Weiterhin sollte das Scaffold-Protein über exponierte Oberflächenstrukturen verfügen, welche eine Insertion von Peptidaptamer-Sequenzen, ohne eine signifikante Veränderung ihrer Faltung, tolerieren. Eine beidseitig, feste Verankerung der Peptidaptamer-Sequenz, in exponierten Oberflächenstrukturen von Scaffold-Proteinen, führt zu einer wesentlichen Erhöhung der Bindungsaffinität und -spezifität gegenüber den Target-Proteinen, im Vergleich zu strukturell

Einleitung

flexiblen Peptiden ohne Scaffold (Colas et al., 1996; Ladner, 1995). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Präsentation des Peptidaptamers auf der Scaffold-Oberfläche, in einer starren und daher definierten Konformation, die Bindungsaffinität zum Target um den Faktor 100 – 10.000 gegenüber ungebundenen, strukturell flexiblen Peptidaptamer-Sequenzen erhöht (Geyer & Brent, 2000). Verschiedenste Arten und Formen von Proteinen und Peptiden sind hinsichtlich der Anwendbarkeit als Aptamer-präsentierende Scaffold-Proteine getestet und zum Teil erfolgreich eingesetzt worden. Hierzu zählen CCSL-Scaffolds („Coiled-coil-stem-loop“), EFLIVKS-Dimerisierungsdomänen, Proteine der Lipocalin-Familie, GFP, Fibronectin oder Proteaseinhibitoren wie stefin A (Abedi et al., 1998; Gururaja et al., 2000; Koide et al., 1998; Miceli et al., 1996; Skerra, 2000; Woodman et al., 2005). Das Thioredoxin-Enzym aus *E.coli* (TrxA) war eines der ersten Proteine, welches für die Präsentation von Peptidaptamer-Sequenzen getestet wurde (Lu et al., 1995), und ist bis heute das nach wie vor am häufigsten verwendete Peptidaptamer-Scaffold (Colas, 2008; Hoppe-Seyler et al., 2004). Die ubiquitär im Organismus exprimierte Oxidoreduktase Thioredoxin ist Teil des Redoxsystems sämtlicher Pro- und Eukaryoten und wirkt im reduzierten Zustand über SH-Gruppen zweier benachbart im katalytischen Zentrum vorliegender Cysteine (Cys³²-Gly³³-Pro³⁴-Cys³⁴) als Antioxidants. Thioredoxin besitzt wesentliche Eigenschaften, welches ein Peptidaptamer-präsentierendes Scaffold-Protein benötigt. Hierzu zählen eine hohe Löslichkeit und Stabilität sowie die vergleichsweise geringe Größe von ca. 12 kDa. Zudem weißt Thioredoxin, nach Überexpression in pro- und eukaryotischen Zellen, keine Toxizität auf (Borghouts et al., 2008b). Die äußerst stabile Konformation von Thioredoxin resultiert aus dessen Struktur, welche sich aus drei parallelen und zwei anti-parallelen β -Faltblättern, umgeben von vier α -Helices, zusammensetzt (Holmgren, 1995). Zudem bietet die Thioredoxin-Oberflächenstruktur die Möglichkeit einer optimalen Präsentation von Peptidaptameren. Das katalytische Zentrum des Thioredoxin-Proteins ragt als Schleife aus der Proteinstruktur heraus und toleriert konformationell eine Integration kurzer Peptid-Sequenzen (LaVallie et al., 1993). Die Integration von Peptidaptamer-Sequenzen zwischen die redox-aktiven und Disulfidbrücken-bildenden Cysteinreste des katalytischen Zentrums resultiert in einer Aufhebung der Enzymfunktion von Thioredoxin und einer, für die effiziente Interaktion mit Target-Proteinen, essentiellen Exposition von Peptidaptameren auf der Thioredoxin-Oberfläche (siehe Abb. 1-6).

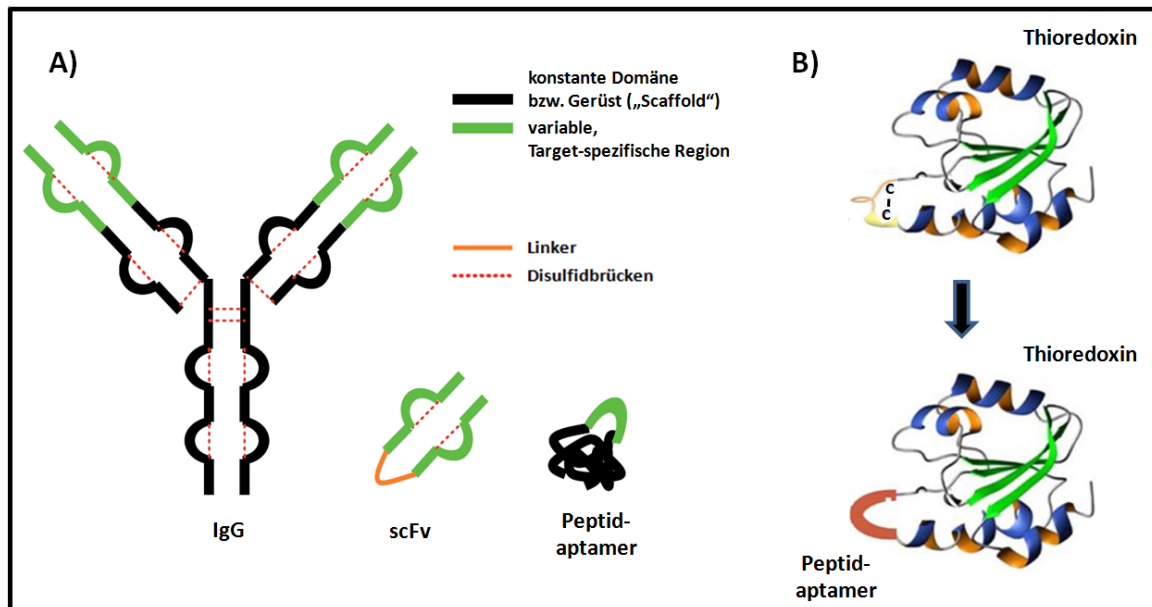


Abb. 1-6: Die Peptidaptamer-Struktur

A) Vergleich von Struktur und Größe in der Krebstherapie gegen bestimmte Zielstrukturen einsetzbarer, kombinatorischer Fusionsproteine, bestehend aus einer konstanten, strukturgebenden und variablen, Target-spezifischen Domäne mit starrer Konformation (modifiziert aus Colas, 2008). **B)** Die Kristallstruktur des Thioredoxin-Scaffolds, mit der schematischen Darstellung des aus der Proteinstruktur herausragenden katalytischen Zentrums im oxidierten Wildtyp-Grundzustand, unter Ausbildung einer Disulfidbrücke, und nach Integration einer Peptidaptamer-Sequenz.

Weitere vorteilhafte Eigenschaften des Thioredoxin-Proteins sind seine hohen rekombinanten Expressionsraten, weshalb sich Thioredoxin-basierte Peptidaptamer-Konstrukte effizient aufreinigen und dadurch im Vergleich zu Antikörpern wesentlich kostenreduzierter produzieren lassen. Zudem bietet das Thioredoxin-Scaffold die Möglichkeit des Anfügens funktioneller Domänen, ohne eine Beeinflussung von Struktur und Konformation. Hierzu zählen Fusionen mit NLS-Domänen, Aufreinigungs- und Epitop-Tags sowie Fusionen mit zellpenetrierenden Peptiden (CPPs), welche als Protein-Transduktionsdomänen (PTD) eine nicht-toxische Aufnahme des Peptidaptamer-Konstrukts in die Zielzellen vermitteln. Der Mechanismus einer Rezeptor-unabhängigen, zellulären Aufnahme von Peptid-Konstrukten mittels konjugierter PTDs basiert auf einer Interaktion dieser kurzen CPP-Sequenzen (max. 30 aa) mit negativ geladenen Zuckerresten der Glykokalyx, wie sauren Glykosaminoglykanen, über positiv geladene Arginin-, Lysin- und Histidin-Reste (Bitler & Schroeder, 2010; Console et al., 2003; Ziegler & Seelig, 2004). Natürlich vorkommende CPP-Sequenzen wurden aus dem *Drosophila*-Homöoprotein Antennapedia sowie aus dem TAT- und VP22-Protein des HIV und Herpes Simplex Virus abgeleitet und als PTD für den Transfer therapeutischer Moleküle (Proteine, Peptide, Antikörper, Nukleinsäuren) durch die Membran von Zielzellen eingesetzt (Bitler & Schroeder, 2010; Derossi et al., 1996; Fawell et al., 1994; Phelan et al., 1998). Die für eine Membran-Translokation des HIV-1 TAT-Proteins verantwortliche 9mer CPP-Sequenz, bestehend aus 6 Arginin-Resten

Einleitung

(RKKRRQRRR), ist die am besten untersuchte und zugleich meist verwendete PTD. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Verwendung von 8 oder 9 aufeinanderfolgenden L-Arginin-Resten, als PTD, die zelluläre Aufnahme von Proteinen und Peptiden bis um den Faktor 20 erhöhen kann (Suzuki et al., 2002; Wender et al., 2000). Der genaue Translokations- bzw. Transduktionsmechanismus PTD-gekoppelter Proteine und Peptide durch die Zellmembran ist bislang jedoch noch ungeklärt. Als sicher gilt, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Aminosäuren der PTD und der negativ geladenen Glykokalyx den initialen Schritt der zellulären Aufnahme, mit der Akkumulation PTD-gekoppelter Proteine an der Zellmembran, darstellt. Es wird vermutet, dass die Proteine in der Folge Rezeptor-unabhängig, durch eine spezielle Form der Endozytose, der Makropinozytose, in die Zellen aufgenommen werden. Der Prozess der Makropinozytose beschreibt eine ungezielte, Rezeptor-unabhängige und Aktin-abhängige Flüssigphasen-Endozytose, wobei die über die PTDs mit der Membran assoziierten Proteine durch Cholesterin- und Glycosphingolipid-reiche Lipid-Mikrodomänen, sogenannte Lipid Rafts, umschlossen und endosomal aufgenommen werden (Murriel & Dowdy, 2006). Inwiefern Caveoline oder Clathrin an diesem Lipid Raft-abhängigen Endozytoseprozess beteiligt sind, ist bislang unklar (Fittipaldi et al., 2003; Wadia et al., 2004). Ebenfalls ungeklärt ist der Mechanismus endosomaler Freisetzung biologisch aktiver PTD-gekoppelter Proteine ins Zytoplasma und deren Umgehung einer lysosomalen Degradation nach Lipid-Raft-abhängiger Endozytose (Foerg et al., 2005). Da eine Verwendung lysosomaler Inhibitoren nicht zu einer Erhöhung biologisch aktiver, PTD-gekoppelter Proteine im Zytoplasma geführt hat (Caron et al., 2004), ist von einer Umgehung lysosomaler Degradation auszugehen. In nachfolgender Abb. 1-7 ist der Prozess PTD-vermittelter, zellulärer Aufnahme (Proteintransduktion) von Peptidaptameren schematisch dargestellt.

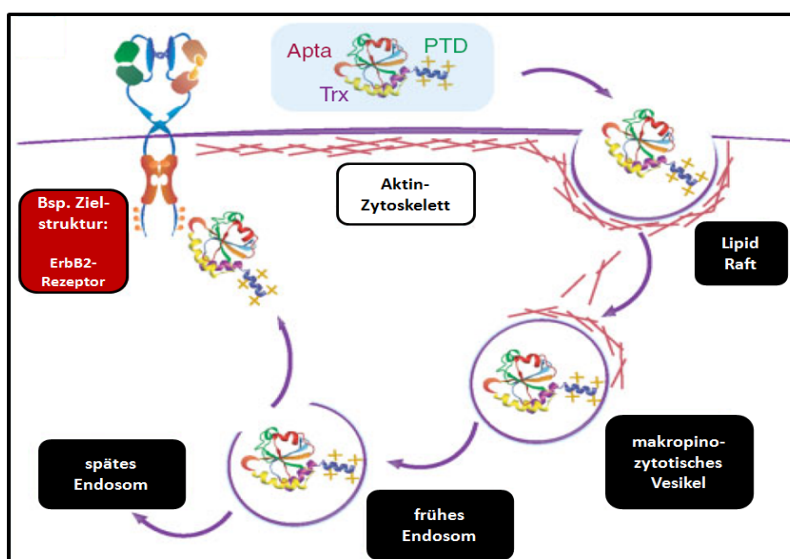


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme eines ErbB2-spezifischen Peptidaptamers mit Thioredoxin-Scaffold über eine gekoppelte PTD.

Nach elektrostatischer Interaktion positiv geladener Aminosäuren der PTD mit negativ geladenen Zuckerresten der äußeren Zellmembran wird das Peptidaptamer über Lipid Raft-abhängige Makropinozytose aufgenommen und aus Endosomen ins Zytoplasma freigesetzt, wo es im

Anschluss seine inhibitorische Funktion ausüben kann. Modifiziert aus (Borghouts et al., 2005a)

Die Selektion von Peptidaptameren als hochspezifische Bindepartner bestimmter Ziel-Proteinstrukturen erfolgt über das Screening komplexer Expressionsbibliotheken randomisierter Peptidaptamer-Sequenzen („Peptide-Library“). In den vergangenen 20 Jahren hat sich das Hefe-Zwei-Hybrid Verfahren mit all seinen Modifikationen als bevorzugte Screening-Technologie zur Identifikation und Selektion unbekannter Protein-Interaktionspartner einer cDNA- oder synthetischen Oligonukleotid- bzw. Peptidaptamer-Library, gegenüber einer definierten Protein-Zielstruktur, etabliert (Bickle et al., 2006; Borghouts et al., 2005b; Hamdi & Colas, 2012; Weiss et al., 2012). Der wesentliche Vorteil des Hefe-Zwei-Hybrid Systems beruht auf der Möglichkeit der Identifikation von Protein-Interaktionen unter intrazellulären und somit physiologischen Bedingungen, was vor allem im Falle intrazellulärer Ziel-Strukturen von großer Bedeutung ist (Hoppe-Seyler et al., 2001). Da die Messung in Hefe-Zellen (*S. cerevisiae*) zusätzlich Bedingungen eukaryotischer Organismen, wie bestimmte posttranslationale Modifikationen, widerspiegelt, kann von einer Übertragbarkeit der identifizierten Protein-Interaktion auf Zelltypen bzw. Zellsysteme anderer eukaryotischer Organismen wie dem Mensch oder der Maus ausgegangen werden (Crawford et al., 2003).

In der Vergangenheit konnten Peptidaptamere, mehrheitlich über das Hefe-Zwei-Hybrid Verfahren, gegen verschiedenste Tumor-assoziierte Proteine, wie Cdk2, ErbB2, Ras, RhoGEF, MMP9, Grb2 oder dem E6-Onkoprotein des humanen Papillomavirus erfolgreich isoliert werden (Bjorklund et al., 2004; Bouquier et al., 2009; Butz et al., 2000; Cohen et al., 1998; Kardinal et al., 2001; Kunz et al., 2006; Xu & Luo, 2002). Die nach viralem Transfer oder Applikation als rekombinante, zellpenetrierende Proteine beobachteten Effekte einer Peptidaptamer-Interaktion reichten dabei von Apoptose-Induktion über Inhibierung von Proliferation, Migration und Invasivität der Tumorzellen *in vitro* bis hin zu Reduktionen des Tumolvolumens nach Tumorzell-Xenotransplantationen in Mäusen. Diese Beobachtungen spiegeln das enorme therapeutische Potential von Peptidaptameren wieder. Vergleichbar mit einer Antikörper-Behandlung (Immuntherapie) könnten Peptidaptamere somit gezielt als target- bzw. tumorspezifische Wirkstoffe in der Behandlung von Krebs und somit als unterstützende Wirkstoffe in der kombinatorischen Chemotherapie eingesetzt werden. Weiterhin können Peptidaptamer-Interaktionen als Leitstrukturen für die Entwicklung und das Design neuer Medikamente sowie für die Identifikation niedermolekularer Wirkstoffe, mit gleichen Bindungseigenschaften, genutzt werden.

1.5 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Die Ätiologie und Pathogenese einer Krebserkrankung lässt sich wesentlich auf Deregulationen zentraler Signaltransduktionskaskaden zurückführen, welche durch ihre erhöhte regulatorische Aktivität entscheidende Kriterien einer malignen Transformation, wie die Sicherung von Überlebensfähigkeit und Wachstum sowie die Progression von Tumoren, dauerhaft unterstützen. In Folge einer erhöhten Abhängigkeit reagieren Tumorzellen mit einem Wachstumsstopp und einer gesteigerten Apoptoserate auf eine Inhibierung bestimmter Komponenten bzw. bestimmter Proteinfaktoren deregulierter Signalkaskaden („addiction phenotype“), weshalb die tumorspezifische Identifikation und gezielte Interferenz mit der Funktionalität aberrant aktiver und für den Tumor essentieller Proteine eine wesentliche Herausforderung in der personalisierten Krebstherapie darstellt. Verschiedenste humane Tumore sind durch eine Überaktivität von Komponenten des Jak/Stat-Signalwegs, wie Stat3, Stat5 oder Jak2 charakterisiert. Aufgrund ihrer Struktur lassen sich Transkriptionsfaktoren wie die Stat-Proteine jedoch nur bedingt mit niedermolekularen Wirkstoffen inhibieren. Einen Lösungsansatz zur Therapie Stat-abhängiger Tumore bietet die spezifische Interferenz mit makromolekularen Peptidaptamer-Konstrukten, welche zugleich als Leitstrukturen zur Entwicklung weiterer Inhibitoren genutzt werden können.

Unter Anwendung des Hefe-Zwei-Hybrid Verfahrens, war es Ziel dieser Arbeit eine 12mer Peptidaptamer-Sequenz aus einer komplexen Peptidaptamer-Library zu identifizieren, welche hochspezifisch mit einer funktionellen Domäne, entweder essentiell für die DNA-Bindung oder die Dimerisierung/Transaktivierung, der homologen Stat5A und Stat5B Isoformen interagiert. Nach vorheriger Validierung der Stat5-Abhängigkeit verschiedener humaner Tumorzelllinien durch RNA-Interferenz, sollten im Anschluss die Effekte einer Stat5-Inhibierung durch Interferenz mit einem Peptidaptamer-Konstrukt, bestehend aus der identifizierten, Stat5-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz und einem zuvor durch Mitglieder der Arbeitsgruppe optimierten humanen Thioredoxin-Scaffoldprotein (hTRX Δ cys5), *in vitro*, sowohl nach lentiviralem Gentransfer als auch nach Mediuminkubation mit dem rekombinant hergestelltem, zellpenetrierenden Inhibitor, analysiert werden. Aufgrund der mehrfach dokumentierten, zentralen Rolle von Stat5 bei der Ausbildung verschiedener Formen hämatologischer Neoplasien, stand dabei der mechanistische Vergleich einer Peptidaptamer und RNA-Interferenz basierten Stat5-Inhibierung in der Bcr-Abl positiven K562 CML- und der Jak2(V617F) positiven HEL AML(M6)-Zelllinie im Vordergrund.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 VERSUCHSMATERIAL

2.1.1 CHEMIKALIEN/REAGENZIIEN/BIOLOGISCHES MATERIAL

Von A-Z	Hersteller	Von A-Z	Hersteller
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg, DE	IPTG	Roth, Karlsruhe, DE
Agar	Sigma-Aldrich, München, DE	Isopropanol	Roth, Karlsruhe, DE
Agarose (high pure; für Klonierungen)	Sigma-Aldrich, München, DE	Kanamycin	Applichem, Darmstadt, DE
Agarose (low melting)	Bio-Rad Laboratories, München, DE	Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt, DE
Agarose (normal melting)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE	MG-132 (Proteasominhibitor)	Calbiochem – Merk, Darmstadt, DE
Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, München, DE	Natriumactetat	Sigma-Aldrich, München, DE
(L-)Aminosäuren	Sigma-Aldrich, München, DE	NaCl	Applichem, Darmstadt, DE
Ampicillin	Applichem, Darmstadt, DE	NaOH	Applichem, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, DE	ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid)	Applichem, Darmstadt, DE
Annexin V (APC konjugiert)	BD Biosciences, Heidelberg, DE	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe, DE
(L-)Arginin freie Base	Applichem, Darmstadt, DE	Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten (PhosSTOP)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Bradford Farbreagenz	Bio-Rad Laboratories, München, DE	Polyacrylamid - Rotiphorese Gel 30 (30% Acryla./Bisacryla. – 37,5:1)	Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt, DE	Polybren	Sigma-Aldrich, München, DE
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München, DE	Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, München, DE
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, München, DE	Poly-L-Lysin (0,1% w/v in aqua bidest, Cover-Medium)	Sigma-Aldrich, München, DE

Material & Methoden

Carrier-DNA (Herring Testes - Carrier DNA) „Yeastmaker™“	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FR	Prolaktin (human)	Sigma-Aldrich, München, DE
Chloramphenicol	Applichem, Darmstadt, DE	ProLong®Gold Antifade (Mounting-Medium)	Invitrogen, Darmstadt, DE
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München, DE	Protease Inhibitor Cocktail Set (III)	Calbiochem – Merk, Darmstadt, DE
Coomassie-Brillant-Blau G250	Applichem, Darmstadt, DE	Protein-Größenmarker	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
CSM (Complete Supplement Mixture – Aminosäure/ Nukleotid Gemisch)	MP Biomedicals Europe, Illkirch Cedex, FR	Puromycin	Applichem, Darmstadt, DE
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich, München, DE	RbCl ₂	Sigma-Aldrich, München, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, DE	Roti-Load I / II (4x)	Roth, Karlsruhe, DE
DTT-Lösung	Applichem, Darmstadt, DE	Rotiphenol (C/I)	Roth, Karlsruhe, DE
Dynabeads Protein G (Co-IP)	Invitrogen, Darmstadt, DE	SDS	Roth, Karlsruhe, DE
ECL (WesternBlot-Detektionsreagenz)	GE Healthcare Europe, München, DE	StrataClean Resin	Stratagene, La Jolla (CA), USA
EDTA	Applichem, Darmstadt, DE	Stat5A (human, rekombinant mit His-Tag - *ab84627)	Abcam Biochemicals®, Cambridge, UK
eFluor®780 (Fixable Viability Dye, Fluoreszenzvitalfärbung)	eBioscience, San Diego (CA), USA	Sucrose	Roth, Karlsruhe, DE
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor, human)	BD Biosciences, Heidelberg, DE	SuperSignal West Femto (WesternBlot-Detektionsreagenz)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Ethanol	Roth, Karlsruhe, DE	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, München, DE
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt, DE	Tetracyclin	Applichem, Darmstadt, DE
FCS (fetal calf serum)	Invitrogen, Darmstadt, DE	Tris	Applichem, Darmstadt, DE
Formalin	Roth, Karlsruhe, DE	Trypsin (-EDTA; 0,5%)	Invitrogen, Darmstadt, DE
Glucose	Roth, Karlsruhe, DE	Tween-20	Roth, Karlsruhe, DE
Glycerol	Applichem, Darmstadt, DE	Urea (Harnstoff)	Applichem, Darmstadt, DE

2.1.2 PUFFER/LÖSUNGEN

Von A-Z (+ Anwendung)	Zusammensetzung
2x HBS Puffer (Kalziumphosphat Präzipitation/ Zelltransfektion)	280 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH=7,12 ± 0,01 mit NaOH eingestellt; steril filtriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert)
A-Medium (β-Galactosidase-Test: Hefe-Zwei-Hybrid System)	60 mM K ₂ HPO ₄ , 30 mM KH ₂ PO ₄ , 8 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 mM Natriumcitrat (pH=7; steril filtriert)
Anodenpuffer I (Western Blot Transferpuffer)	300 mM Tris, 20% EtOH (pH = 10,4)
Anodenpuffer II (Western Blot Transferpuffer)	25 mM Tris, 20% EtOH (pH = 10,4)
BS-Puffer (Bandshift-Puffer) (EMSA)	20mM HEPES, 1mM EDTA, 20mM KCl, 1mM DTT, 2mM MgCl ₂ , 100µg/µl BSA
Co-IP-Assaypuffer	50 mM Tris (pH=7,4), 100mM NaCl, 0,01% Tween, 0,1% BSA, 1mM DTT
Coomassie-Färbelösung [0,1%]	500 mg Coomassie-Brillant-Blau (G250) 215 ml H ₂ O, 250 ml Methanol, 35 ml Essigsäure (500ml, durch Faltenfilter gefiltert)
Coomassie-Entfärbelösung	450 ml H ₂ O, 450 ml EtOH, 100ml Essigsäure
FACS – AnnexinV/7-AAD Assay-Puffer [1x] (AnnexinV/7-AAD Apoptosedetektion)	10mM HEPES (mit NaOH auf pH: 7,4 einstellen), 140mM NaCl, 2,5mM CaCl ₂ (bei 2-8 °C lagern)
Fixierungspuffer (EMSA)	7% Methanol, 7% Essigsäure, 10% Glycerol (v/v)
Hefe-Lysepuffer (DNA Isolation aus Hefen)	2% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1mM EDTA-Na ₂
Imidazol-Puffer (Puffer B – Proteinaufreinigung)	1M Imidazol, 8M Urea, 500mM NaCl, gelöst in PBS [1x] (pH=7,5; steril filtriert)
Kathodenpuffer (Western Blot Transferpuffer)	25 mM Tris, 20% EtOH, 40 mM Aminocaprinsäure (pH = 10,4)
LiAc/TE (Hefe-Transformation)	10% (v/v) Lithiumacetat [1M, 10x], 10% (v/v) TE [10x], gelöst in aqua bidest
LiAc/TE/PEG (Hefe-Transformation)	80% (v/v) Polyethylenglycol [50%iges PEG3350], 10% (v/v) Lithiumacetat [1M, 10x], 10% (v/v) TE [10x]
Lösung 1 – CaCl ₂ /RbCl ₂ Lösung (Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i>)	100 mM RbCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KaAc, 10 mM CaCl ₂ , 13% Glyzerol (v/v) (sterilfiltriert; pH=5,8)
Lösung 2 – CaCl ₂ /RbCl ₂ Lösung (Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i>)	10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl ₂ , 75 mM CaCl ₂ , 13% Glyzerol (v/v) (sterilfiltriert; pH=7)
Lyse-Puffer A (Herstellung fraktionierte Zelllysate)	10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0,05% NP40, 0,5 mM DTT (erst vor Gebrauch zugeben), pH 7,9, steril filtrieren, bei 4°C lagern
Lyse-Puffer B (Herstellung fraktionierte Zelllysate)	5 mM HEPES, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 26% glycerol (v/v), pH 7,9, steril filtrieren, bei 4°C lagern

Material & Methoden

Lyse-Puffer Gelshift-Assay (EMSA)	50mM Tris (pH 7.4), 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 10% Glycerol (v/v)
RIPA-Puffer – “Radio immunoprecipitation assay” Puffer (Zelllyse, Proteinextraktion)	1% NP40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH=7,5; steril filtriert)
Sammelgel-Puffer [4x] (SDS-PAGE)	6 g Tris, 4 ml 10% SDS (100 ml; pH=6,8)
SDS-Laufpuffer - TGS [10x] (SDS-PAGE)	30 g Tris, 144 g Glycine, 10g SDS (1 L; pH=8,3)
Stabilisierungspuffer (EMSA)	10mM Tris, 1mM EDTA in Aqua bidest
Stop-Lösung (β-Galactosidase-Test: Hefe-Zwei-Hybrid System)	1 M Na ₂ CO ₃ in Aqua bidest
Stripping-Puffer (Western Blot)	0,625 ml Tris [1 M], 2ml SDS [10%], 78 µl β-MercaptoEtOH, 7,297 ml H ₂ O (10 ml; pH=6,8)
TBE-Puffer [5x] (DNA-Elektrophorese-Puffer für native Polyacrylamid-Gele)	54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 2,92 g EDTA (1L; pH=8,4)
TAE-Puffer [50x] (DNA-Elektrophorese-Puffer)	2 M Tris, 1 M NaAc, 50 mM EDTA (pH 8,0)
TBS [10x] (Western Blot-, Co-IP-Waschpuffer)	0,2 M Tris, 1,5 M NaCl (pH=7,5)
TBS-T (Western Blot-, Co-IP-Waschpuffer)	TBS [1x], 0,05% Tween-20 (pH=7,5)
TE [Tris-EDTA; 10x] (DNA-Rekonstitution, Hefe-Trafo)	100mM Tris, 1mM EDTA (pH=8)
Trenngel-Puffer [4x] (SDS-PAGE)	18 g Tris, 4 ml 10% SDS (100 ml; pH=8,8)
Urea-Puffer (Puffer A – Proteinaufreinigung)	8M Urea, 500mM NaCl, gelöst in PBS [1x] (pH=7,5; steril filtriert)
Z-Puffer (β-Galactosidase-Test: Hefe-Zwei-Hybrid System)	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ (pH=7; steril filtriert)

2.1.3 GERÄTE

Von A-Z	Hersteller
Äkta FPLC (Proteinaufreinigung)	GE Healthcare Europe, Freiburg, DE
Blotting-Apparatur (Proteintransfer)	Fröbel Labortechnik, Lindau, DE
Brutschränke (Zellkultur)	Binder, Tuttlingen, DE
Brutschränke (Bakterien- & Hefenkultur)	Heraeus Instruments, Hanau, DE

Dispenser – HandyStep Electronic	Brand, Wertheim, DE
DNA-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories, München, DE
DNA-Sequenzierer (3130 Avant Genetic Analyzer)	Applied Biosystems Deutschland, Darmstadt, DE
ELISA – Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (SpectraMax 340)	MWG Biotech, München, DE
Entwicklermaschine Optimax (für Röntgenfilme) (Western Blot, Co-IP, EMSA)	G. Beetz Röntgenartikel, Langen, DE
FACSAria I	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Feinwaage AE240	Mettler-Toledo, Gießen, DE
Filmkassette	CAWO Photochemisches Werk, Schrobenhausen, DE
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE300	Nikon Instruments Europe, Kingston, UK
Gelelektrophorese-Kammer Mini Protean 3 (SDS-PAGE)	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Gelelektrophorese-Kammer Mini Sub-Cell GT, Wide Mini Sub-Cell (DNA-Agarose-Gele)	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, DE
Light Cycler 480 II (Real-Time PCR System)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP5)	Leica-Microsystems, Wetzlar, DE
Nano-Drop UV-Vis Spektrophotometer (ND1000)	Nano-Drop Technologies, Wilmington, Delaware, USA
PCR-T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, DE
Tube-Roller Cat-RM5	M.Zipperer, Staufen, DE
Semi-Dry-Blotting Apparatur	Fröbel Labortechnik, Lindau, DE
Ultrazentrifuge L8-60M	Beckman Coulter, Krefeld, DE
UV-VIS Spektrophotometer (Evolution60)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
UV-VIS DNA-Geldokumentationssystem (GelDoc 2000)	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach, DE
Zentrifugationsgefäße (250 ml)	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
Zentrifuge	Hettich, Mülheim, DE
Zentrifuge (Tischzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge (Hochgeschwindigkeitszentrifuge Avanti-J20)	Beckman Coulter, Krefeld, DE

2.1.4 LABOR-VERBRAUCHSMATERIAL

Von A-Z	Hersteller
Affinitätschromatographie-Säulen (Hi-/His-Trap: für Ni-Affinitätschromatographie)	GE Healthcare Europe, Freiburg, DE
Blotting-Papier (Western Blot)	A.Hartenstein, Würzburg, DE
Deckgläser (rund/ 170 µM Schichtdicke)	VWR International, Darmstadt, DE
FACS-Röhrchen (5 ml; mit/ohne Verschlussklappe)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Filterpapier (MN 615 . 125mm)	Macherey-Nagel, Düren, DE
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Küvetten (Halbmikro-UV/VIS-Küvetten; 10x4x45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatten (96-Well)	Corning Costar, Schiphol-Rijk, NL
Mikrotiterplatten (96-Well, „round bottom“ für Suspensionszellen)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatten (96-Well, weiß, für Luziferase-Assay)	Mikrolite 2, Thermo Labsystems, Dreieich, DE
Mikrotiterplatten (96-Well, für q-RT-PCR - LightCycler)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Multi-Well Zellkulturplatten (6-, 12- & 24-Well Platten)	Greiner, Frickenhausen BD Falcon Biosciences, Heidelberg, DE
Nitrozellulosemembran (Protran)	Whatman, Dassel, DE
Objekträger	Roth, Karlsruhe, DE
PCR-Reaktionsgefäße	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Petrischalen (92 mm Ø, für Bakterien & Hefekultur mit Agar-Nährböden)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Petrischalen (92 mm Ø, für Zellkultur)	Greiner Bio One, Frickenhausen BD Falcon Biosciences, Heidelberg, DE
Petrischalen (145 mm Ø, für Bakterien & Hefekultur mit Agar-Nährböden)	Greiner Bio One, Frickenhausen BD Falcon Biosciences, Heidelberg, DE
Petrischalen (144cm ² , für Bakterien & Hefekultur mit Agar-Nährböden)	Greiner Bio One, Frickenhausen BD Falcon Biosciences, Heidelberg, DE
Polystyrol-Rundboden-Reaktionsgefäße (14ml)	BD Falcon Biosciences, Heidelberg, DE
Reaktionsgefäße (1,5 & 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße (5, 15, 50 ml)	BD Falcon Biosciences, Heidelberg, DE
Röntgenfilme (Fujifilm SuperRX)	Fujifilm, Düsseldorf, DE

Zellkulturflaschen T25; T75; T175 (25cm ² ; 75cm ² ; 175cm ²)	Greiner Bio One, Frickenhausen, DE BD Falcon Biosciences, Heidelberg, DE
Zentrifugationsgefäße (250 ml)	Corning Costar, Schiphol-Rijk, NL
Zentrifugationsgefäße Polyallomer (Ultrazentrifugation; 40-50 ml)	Beckman Coulter, Krefeld, DE

2.1.5 LABOR-KITS

Labor-Kit	Anwendung	Hersteller
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Zellviabilitäts & -proliferations Test (Messung metabolischer Aktivität vitaler Zellen)	Roche Diagnostics Deutschland Mannheim, DE
Cytofix/Cytoperm™ (Fixierungs/Permeabilisierungspuffer; Waschpuffer)	Zell-Fixierung & -Permeabilisierung für Immunhistochemische Färbungen	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System	Dual-Luziferase-Assay	Promega, Madison (WI), USA
Easy Yeast Plasmid Isolation Kit	DNA-Präparation / -Isolation (Plasmid-Isolation aus Hefen)	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FR
Lipofectamine® LTX & Plus Reagent	Transfektion von Plasmid-DNA durch Lipofektion	Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE
Maxima™ SYBR green qPCR Master Mix (2x)	qPCR	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
NucleoBond Xtra Midi/Maxi	DNA-Präparation / -Isolation	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoBond PC Giga	DNA-Präparation / -Isolation	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin Extract II	DNA-Gelextraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin Plasmid	DNA-Präparation / -Isolation	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin RNA II	RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
QIAquick Gel Extraction Kit	DNA-Gelextraktion	QIAGEN, Hilden, DE
QIAquick Nucleotide Removal Kit	DNA-Aufreinigung/Isolation	QIAGEN, Hilden, DE
SuperScript III – Reverse Transkriptase Kit	cDNA-Synthese	Invitrogen, Karlsruhe, DE
TOPO-TA-Cloning Kit	Subklonierung von PCR-Fragmenten	Invitrogen, Karlsruhe, DE

2.1.6 PLASMIDE

2.1.6.1 HEFE-EXPRESSIONSVEKTOREN

Von A-Z (+ Anwendung)	Beschreibung	Referenz
pGADT7 (Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3)	<u>Originalvektor:</u> "Prey"-Expressionsvektor für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen; zur Expression von Fusionsproteinen mit den Aminosäuren 768-881 der Gal4-Aktivierungsdomäne; konstitutiver ADH1-Promotor & ADH1-Terminator; SV40-NLS; Selektionsmarker: Leucin-Biosynthese-Gen (LEU2); Ampicillin-Resistenz zur Selektion in <i>E.coli</i>	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FRA
pGADT7-T (Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3: Positiv-& Negativkontrollvektor)	"Prey"-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-Aktivierungsdomäne und SV40 large T-Antigen; für die Positiv- & Negativkontrolle	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FRA
pGADT7-hTRXΔcys5- (NNK)₁₂-Library	"Prey"-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-Aktivierungsdomäne und dem hTRXΔcys5-Gerüstprotein. 12mer Peptidaptamer-Sequenzen sind als Oligonukleotid-Library mit NNK-Kodonddefinition in das katalytische Zentrum von hTRX integriert	Klonierung war Bestandteil dieser Arbeit
pGADT7-S5-DBD-PA	"Prey"-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-Aktivierungsdomäne und dem S5-DBD-PA Peptidaptamer	Diese Arbeit (Im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen selektioniert)
pGBKT7 (Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3)	<u>Originalvektor:</u> "Bait"-Expressionsvektor für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen; zur Expression von Fusionsproteinen mit den Aminosäuren 1-147 der Gal4-DNA-Bindedomäne; konstitutiver ADH1-Promotor & ADH1&T7-Terminator; Selektionsmarker: Tryptophan-Biosynthese-Gen (TRP1); Kanamycin-Resistenz zur Selektion in <i>E.coli</i>	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FRA
pGBKT7-53 (Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3: Positivkontrollvektor)	"Bait"-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-DNA-Bindedomäne und p53 Tumorsuppressorprotein; für die Positivkontrolle	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FRA
pGBKT7-LamC (Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3: Negativkontrollvektor)	"Bait"-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-DNA-Bindedomäne und Lamin C (nukleäres Strukturprotein); für die Positivkontrolle	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FRA
pGBKT7-hStat3-DBD	"Bait"-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-DNA-Bindedomäne und DNA-Bindedomäne des humanen Stat3 Proteins (aa 322-483)	Arbeitsgruppe Prof. Groner

pGBKT7-hStat3-SH2/TA	“Bait“-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-DNA-Bindedomäne und einem Fragment aus SH2- und Transaktivierungsdomäne des humanen Stat3 Proteins (aa 655-755), essentiell für dessen Dimerisierung und Transaktivierung	Arbeitsgruppe Prof. Groner
pGBKT7-hStat5A-DBD	“Bait“-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-DNA-Bindedomäne und DNA-Bindedomäne des humanen Stat5A Proteins (aa 331-473)	Arbeitsgruppe Prof. Groner
pGBKT7-hStat5A-SH2/TA	“Bait“-Expressionsvektor: exprimiert Fusionsprotein aus Gal4-DNA-Bindedomäne und einem Fragment aus SH2- und Transaktivierungsdomäne des humanen Stat5A Proteins (aa 637-751), essentiell für dessen Dimerisierung und Transaktivierung	Arbeitsgruppe Prof. Groner

2.1.6.2 BAKTERIELLE EXPRESSIONSVEKTOREN

Von A-Z (+ Anwendung)	Beschreibung	Referenz
pET-30a(+) (rekombinante Proteinexpression)	<u>Originalvektor:</u> N- & C-terminales His-Tag; N-terminales S-Tag (+Thrombin “cleavage site”); T7-Promotor & -Terminator; Kanamycin-Resistenz	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)
pET-hTRXΔcys5 (+ RsrII-Linker)	Transgen: Humanes Thioredoxin (hTRX) mit Austausch von 5 Cystein-Resten (Cys ³² →Gly ³² , Cys ³⁵ →Gly ³⁵ , Cys ⁶² →Ser ⁶² , Cys ⁶⁹ →Ser ⁶⁹ , Cys ⁷³ →Ser ⁷³); RsrII-Linker zur Klonierung von Peptidaptamer-Sequenzen und C-terminaler 9-Arg-Proteintransduktionsdomäne	Arbeitsgruppe Prof. Groner (Borghouts et al., 2008)
pET-hTRXΔcys5 (+ Apal/SmaI-Linker)	Transgen: Humanes Thioredoxin (hTRX) mit Austausch von 5 Cystein-Resten (Cys ³² →Gly ³² , Cys ³⁵ →Gly ³⁵ , Cys ⁶² →Ser ⁶² , Cys ⁶⁹ →Ser ⁶⁹ , Cys ⁷³ →Ser ⁷³); Apal/SmaI-Linker zur Klonierung von Peptidaptamer-Sequenzen und C-terminaler 9-Arginin (9-R)-PTD	Diese Arbeit
pET-S5-DBD-PA	Transgen: Stat5-spezifische 12mer Peptidaptamer-Sequenz integriert in hTRXΔcys5 (über Apal/SmaI) + C-terminale 9-Arginin (9-R)-PTD	Diese Arbeit
pFLAG-2 (rekombinante Proteinexpression)	<u>Originalvektor:</u> N-terminales Flag-Tag; Lac1-Repressor-Gen; Tac-Promotor (Trp- & Lac-Promotor mit Lac1-Repressor-Bindestelle → IPTG induzierbar); Ampizillin-Resistenz	Sigma-Aldrich, München
pFLAG-hTRXΔcys5 (+ Apal/SmaI-Linker)	Transgen: Humanes Thioredoxin (hTRX) mit Austausch von 5 Cystein-Resten (Cys ³² →Gly ³² , Cys ³⁵ →Gly ³⁵ , Cys ⁶² →Ser ⁶² , Cys ⁶⁹ →Ser ⁶⁹ , Cys ⁷³ →Ser ⁷³) und Apal/SmaI-Linker zur Klonierung von Peptidaptamer-Sequenzen (+ Flag-Tag & NLS (N-terminus), 9-Arginin (9-R)-PTD & His-Tag (C-Terminus))	Diese Arbeit
pFLAG-S5-DBD-PA	Transgen: Stat5-spezifische 12mer Peptidaptamer-Sequenz integriert in hTRXΔcys5 (über Apal/SmaI) (+ Flag-Tag & NLS (N-terminus), 9-Arginin (9-R)-PTD & His-Tag (C-Terminus))	Diese Arbeit

2.1.6.3 EUKARYOTISCHE EXPRESSIONSVEKTOREN

Von A-Z (+ Anwendung)	Beschreibung (Promotoren; Transgen- & Reporter-gen-Expression; Selektionsmarker; RNA-Elemente für nukleären Im- & Export, reverse Transkription, RNA-Template Stabilisierung, virales packaging & genomische Integration sowie transkriptionelle & post-transkriptionelle Modifikationen)	Referenz
pCMVΔ8.91 (Lentiviraler „Packaging“-Plasmid)	CMV-Promotor gesteuerte Expression der Gene <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>rev</i> und <i>tat</i> , abgeleitet aus dem HIV-1 Genom. Ampicillin-Resistenz	Dr. M.Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt (Zufferey et al., 1997)
pEGFP-1 (Co-Reporter-Kontrollplasmid)	pUC-origin of replication und Kozak-Sequenz optimierte konstitutive eGFP-Expression. Einsatz als Reporter zur Ermittlung von Transfektionseffizienzen. Ampicillin- und Neomycin-Resistenz	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FRA
pGL4.74 [hRluc/TK] (Luziferase-Assay Co-Reporter-Kontrollplasmid)	HSV-TK Promotor gesteuerte, konstitutive Expression der Renilla-Luziferase. Einsatz als Reporter nach Co-Transfektion mit Firefly-Luziferase Reporterplasmid („Dual-Luciferase-Assay“). Ampicillin-Resistenz	Promega, Madison (WI), USA
pLeGO-C (Lentiviraler shRNA-Expressionsvektor)	<u>LeGO-Originalvektor mit mCherry Fluoreszenz-Reporter:</u> ψ, RRE, cPPT-Elemente, CMV → R-U5/5'-LTR → SIN/3'-LTR abgeleitet aus HIV-1 Genom. shRNA Expression über U6-Promotor; separate Expression des mCherry-Fluoreszenz-Reportergens über SFFV-Promotor; Ampicillin-Resistenz	<u>Lentiviral Gene Ontology Vector:</u> (www.lentigo-vectors.de); (Weber et al., 2008)
pLeGO-G (Lentiviraler shRNA-Expressionsvektor)	<u>LeGO-Originalvektor mit eGFP Fluoreszenz-Reporter:</u> ψ, RRE, cPPT-Elemente, CMV → R-U5/5'-LTR → SIN/3'-LTR abgeleitet aus HIV-1 Genom. shRNA Expression über U6-Promotor; separate Expression des eGFP-Fluoreszenz-Reportergens über SFFV-Promotor; Ampicillin-Resistenz	<u>Lentiviral Gene Ontology Vector:</u> (www.lentigo-vectors.de); (Weber et al., 2008)
pLeGO-G-NM_003152 / TRCN0000019308	LeGO-G mit shRNA gegen das humane Stat5A-Gen	Diese Arbeit
pLeGO-G-NM_012448 / TRCN0000019356	LeGO-G mit shRNA gegen das humane Stat5B-Gen	Diese Arbeit
pLKO.1-puro (Lentiviraler shRNA-Expressionsvektor)	<u>Originalvektor:</u> ψ, RRE, cPPT-Elemente, pUC ori → RSV/5'-LTR → SIN/3'-LTR abgeleitet aus RSV-Genom. shRNA Expression über U6-Promotor. separate Expression von Puromycin-Resistenzgen (puroR) über hPGK-Promotor; Ampicillin-Resistenz	Sigma-Aldrich, München (MISSION® shRNA)

pLKO.1-puro-NM_003152 / TRCN0000019308	pLKO.1-puro mit shRNA gegen das humane Stat5A-Gen	Sigma-Aldrich, München (MISSION® shRNA)
pLKO.1-puro-NM_012448 / TRCN0000019356	pLKO.1-puro mit shRNA gegen das humane Stat5B-Gen	Sigma-Aldrich, München (MISSION® shRNA)
pMD2.VSV-G (Lentiviraler „Envelope“-Plasmid)	CMV-Promotor gesteuerte Expression der Hüllproteine (<i>env</i>) des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G). Ampicillin-Resistenz	Dr. M.Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt D. Trono, Tronolab, Schweiz
pSiEW (optimierter lentiviraler Transfervektor)	<u>Modifizierte Variante des pSEW-Originalvektors mit integriertem IRES-Element für stabile eGFP-Expression:</u> ψ, RRE-Elemente, HIV- R-U5/5'-LTR → SIN/3'-LTR abgeleitet aus HIV-1 Genom. Transgen und eGFP-Expression gesteuert über SFFV-Promotor. Integration von IRES- und WPRE-Element (SFFV-IRES-eGFP-WPRE); Ampicillin-Resistenz	Dr. M.Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt (Demaison et al., 2002)
pSiEW-hTRXΔcys5 (+ Apal/Smal-Linker)	Transgen: optimiertes humanes Thioredoxin (hTRX Δcys5) mit Apal/Smal-Linker (+ Flag-Tag & NLS (N-terminus), 9-Arginin (9-R)-PTD & His-Tag (C-Terminus))	Diese Arbeit
pSiEW-S5-DBD-PA	Transgen: Stat5-spezifische 12mer Peptidaptamer-Sequenz integriert in hTRXΔcys5 (über Apal/Smal) (+ Flag-Tag & NLS (N-terminus), 9-Arginin (9-R)-PTD & His-Tag (C-Terminus))	Diese Arbeit
pStat5[RE]₂-TA-Luc (Stat5-induzierbarer Luziferase Reporter)	<u>Modifizierte Variante des pStat3-TA-Luc Originalvektors:</u> Stat3-Enhancer Elemente wurden gegen 2 Kopien eines Stat5-Enhancer Elementes des β-Casein Promotors ausgetauscht. Nach Bindung von aktiven Stat5-Dimeren wird die Expression der Firefly-Reporterluziferase über einen TA-Minimalpromotor gesteuert. Ampicillin-Resistenz	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, FRA

2.1.7 OLIGONUKLEOTIDE

2.1.7.1 SHRNA GEGEN DAS HUMANE STAT5A- & STAT5B-GEN

Für die RNA-Interferenz Experimente mit dem humanen Stat5A- & Stat5B-Gen, wurden shRNA-Sequenzen der Firma Sigma-Aldrich verwendet [MISSION® shRNA *NM_003152 (Stat5A), *NM_012448 (Stat5B); Sigma-Aldrich]. Die shRNA wird über den lentiviralen Expressionsvektor pLKO.1-puro exprimiert, welcher in Form transformierter *E.coli*-Stocks, zur anschließenden Amplifikation, durch Sigma geliefert wird. Je 5 shRNA's gegen das humane Stat5A & Stat5B-Gen wurden getestet, wobei die Kombination aus folgenden 2 Sequenzen die effizientesten Stat5-„Knockdown“-Ergebnisse lieferten. Die in den durchgeführten Knockdown-Experimenten eingesetzte Kontroll shRNA-Sequenz interagiert mit keiner mRNA aller bis dato identifizierten

Material & Methoden

Säugetiergene und stammte ebenfalls von Sigma-Aldrich [MISSION® „non-mammalian shRNA control“].

Target-Gen (Sigma Gen-NM Nummer) / Sigma shRNA-TRC Nummer	shRNA-Sequenz (5' → 3') Leit- bzw. „antisense“-Strang („hairpin“ durch Unterstrich markiert)	Komplementäre Nukleotide der Ziel-mRNA
Stat5A_human (NM_003152) / TRCN0000019308	CCGGGACCATGTACTCGATCAGGAT <u>CTCGAG</u> ATCCTGATCGAGTACATGGTCTTTTT	Ntd. 2223-2244 der hStat5A-mRNA (≙ aa 741-748)
Stat5B_human (NM_012448) / TRCN0000019356	CCGGCTACTCATTAAACAAGCCAGAT <u>CTCGAG</u> ATCTGGCTTGTTAATGAGTAGTTTT	Ntd. 1815-1836 der hStat5B-mRNA (≙ aa 605-612)

Kontroll-shRNA *Sigma Katalognummer / Sigma shRNA-TRC Nummer	shRNA-Sequenz (5' → 3') („hairpin“ durch Unterstrich markiert)
* SHC002 („non mammalian shRNA control“) / TRC1/1.5	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCA <u>ACTCGAG</u> TTGGTGCTCTTCATCTTGTTG TTTTT

2.1.7.2 PEPTIDAPTAMER-EXPRESSIONSBIBLIOTHEK (OLIGONUKLEOTID-LIBRARY)

Die randomisierte Oligonukleotid-Library, welche für Peptidaptamer-Sequenzen einer Länge von 12 Aminosäuren kodiert, wurde von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Synthese randomisierter Oligonukleotide erfolgte unter Anwendung der NNK-Kodondefinition für ein Basen-Triplett:

NNK (N = A,T,G,C; K = T,G)

Für die Klonierung der Library in das humane Thioredoxin-Scaffoldprotein wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende durch eine *ApaI*- und am 3'-Ende durch eine *SmaI*-Restriktionsschnittstelle flankierend synthetisiert. Für die effiziente Zweitstrangsynthese durch eine „proof-reading“ Polymerase, erfolgte die Synthese der Library als partiell doppelsträngige Oligonukleotide mit „hairpin“-Struktur.

12mer Peptidaptamer- Expressionsbibliothek	Sequenz (5' → 3') (Klonierungsschnittstellen & Poly-(T)-„hairpin-loop“ durch Unterstrich markiert)
<i>ApaI</i>-(NNK)₁₂-<i>SmaI</i>	TTTTT <u>GGGCC</u> NNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNK <u>CCCGG</u> <i>ApaI</i> <i>SmaI</i> <u>GCGCTTTTT</u> GCG <u>CCCGG</u> <i>SmaI</i>

2.1.7.3 PRIMER FÜR KLONIERUNGEN

Sämtliche für Klonierungsreaktionen benötigten Primer wurden als unmodifizierte Oligonukleotide von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Von A-Z	Sequenz (5' → 3') (für Klonierung essentielle Restriktions-schnittstellen sind durch Unterstrich markiert)	Klonierungsanwendung
Apal/Smal-Linker [fwd]	AAAACGGTCCGGGGCCCGCTATTGGACATATG <i>RsrII</i> <i>Apal</i> TCGTTCTCGTCCCGGGCGGTCCGAAAA <i>SmaI</i> <i>RsrII</i>	Integration der Apal/Smal-Linker-Sequenz für die Peptidaptamer-Library
Apal/Smal-Linker [rev]	TTTTCGGACCGCCCGGGACGAGGAACGACAT <i>RsrII</i> <i>SmaI</i> ATGTCCAATAGCGGGCCCGGACCGTTTT <i>Apal</i> <i>RsrII</i>	Klonierung in das katalytische Zentrum des hTRX-Scaffold
hTRX-pET-30a(+) [fwd]	CCAGATCTGATGGTGAAGCAGATCGAG <i>BglII</i>	Umklonierung des hTRXΔcys5-Scaffoldprotein ± integrierte Peptidaptamer-Sequenz in den pET-30a(+) bakteriellen Expressionsvektor
hTRX-pET-30a(+) [rev]	GAATTCGACTAATTCATTAATGGT <i>EcoRI</i>	
hTRX-pFLAG-2 [fwd]	AAAGAATTCATGGGTAAGCAGATCGAG <i>EcoRI</i>	Umklonierung des hTRXΔcys5-Scaffoldprotein ± integrierte Peptidaptamer-Sequenz aus den pET-30a(+) in den pFLAG-2 bakteriellen Expressionsvektor
hTRX-pFLAG-2 [rev]	AAAGAATTCGACTAATTCATTAATGGT <i>EcoRI</i>	
hTRX-pSiEW [fwd] [+ Kozak-Sequenz]	ACCGCGGCCGCCACCATGGACTACAAGGACGA <i>SacI</i> CGATGAC	Umklonierung des pFLAG-2 Peptidaptamer-Konstrukts mit hTRXΔcys5-Scaffoldprotein ± integrierte Peptidaptamer-Sequenz (Flag-Tag+NLS (C-Terminus) & 9-R PTD+His-Tag (C-Terminus)) aus den pFLAG-2 bakteriellen Expressionsvektor
hTRX-pSiEW [rev]	ACCGCGGGAAAATCTTCTCTCACTCGAGTTA <i>SacI</i>	
pLKO-U6+shRNA- [fwd]	ACGGTATCGATCACGAGACTAGCCTCGAGC	Umklonierung des U6-Promotors + shRNA-Sequenz aus dem pLKO.1-puro Vektor in den LeGO-G Vektor
pLKO-U6+shRNA- [rev]	TACTGCCATTTGTGTCGACGTCGAGAATTC <i>SalI</i>	

2.1.7.4 PRIMER FÜR REAL-TIME-PCR ANALYSEN VON STAT5-ZIELGENEN

Die in dieser Arbeit dokumentierten qRT-PCR-Analysen der Expression von Stat5-Zielgenen wurden ausschließlich mit humanen Zelllinien durchgeführt, weshalb sich die folgende Auflistung der dafür verwendeten Primersequenzen auf die Anwendung mit humanen Genen bezieht. HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) wurde als Referenz-Gen verwendet.

Primer Stat5-Zielgen (A-Z)	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur T _m [°C]	G/C-Gehalt [%]
Bcl-xL [fwd]	ACAGGACTGAGGCCCCAG	60,5	66,7
Bcl-xL [rev]	GCCACAGTCATGCCCGTC	60,5	66,7
CiSH [fwd]	AGAGGAGGATCTGCTGTGCAT	65,2	52,3
CiSH [rev]	GGAACCCCAATACCAGCCAG	67,5	60,0
CyclinD1 [fwd]	TGGCCATGAACTACCTGG	56,0	55,6
CyclinD1 [rev]	TTGGGGTCCATGTTCTGC	56,0	55,6
FoxP3 [fwd]	CTGCCCTAGTCATGGTGG	65,6	63,1
FoxP3 [rev]	CTGGAGGAGTGCCTGTAAGTG	63,8	57,1
Mcl-1 [fwd]	TTGGTCGGGGAATCTGGTAAT	60,6	47,6
Mcl-1 [rev]	TAGTGACCCGTCCGTAAGTG	62,5	60,0
Pim1 [fwd]	GTGGAGAAGGACCGGATTTCC	67,8	57,1
Pim1 [rev]	CAGTCCAGGAGCCTAATGACG	65,9	57,1
Pim2 [fwd]	TTGACCAAGCCTCTACAGGG	64,1	55,0
Pim2 [rev]	CCACCTGGAGTCGATCTGTG	65,9	60,0
SOCS1 [fwd]	GCAGCCGACAATGCAGTCT	66,7	57,8
SOCS1 [rev]	GAACGGAATGTGCGGAAGTG	67,8	55,0
SOCS3 [fwd]	TCGGACCAGCGCCACTTC	60,5	66,7
SOCS3 [rev]	CTCAACACCAGGGGGATC	58,2	61,1

Referenz-Gen	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur T _m [°C]	G/C-Gehalt [%]
HPRT1 [fwd]	ATGCTGAGGATTTGGAAAGG	56,0	45
HPRT1 [rev]	TCATCACATCTCGAGCAAGAC	59,0	47,6

2.1.7.5 STAT5-ENHANCER-ELEMENT

Für die Durchführung des Luziferase- und Gelshift-Assays wurde ein Stat5-Enhancer-Element aus dem β -Casein Promotor verwendet, welches sowohl Stat5A- und Stat5B-Homodimere, als auch Stat5A/Stat5B Heterodimere bindet (Soldaini et al., 2000) und als Oligonukleotid in den Assays eingesetzt wurde.

Referenz-Gen	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur T _m [°C]	G/C-Gehalt [%]
Stat5-RE [fwd]	TTCTTGGAATTGAAGGGACTT	65,7	38,1
Stat5-RE [rev]	AAGTCCCTTCAATTCCAAGAA	63,2	38,1

2.1.8 ENZYME

Von A-Z	Komponenten	Hersteller
Antarctic Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase)	Reaktionspuffer [10x]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
rDNase (NucleoSpin RNA II – Kit)	Reaktionspuffer [1x]	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE
Phusion-high fidelity DNA Polymerase	Reaktionspuffer [10X]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
Pwo-high fidelity DNA Polymerase	Reaktionspuffer [10X; + MgSO ₄]	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
qPCR-AmpliTaq Fast DNA Polymerase (Maxima SYBR green Master Mix)	SYBR green; dNTP's;	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Restriktions-Endonukleasen	Reaktionspuffer [10X]; (+/-) BSA [100x]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE/ Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Reverse Transkriptase (RT) (SuperScript III RT – Kit)	Reaktionspuffer [10X]; MgCl ₂ [25mM]; DTT [0,1M]; RNaseOUT [40U/μl]; dNTP's; random Hexamers [50ng/μl]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, DE
RNase H (SuperScript III RT – Kit)	/	Invitrogen GmbH, Darmstadt, DE
T4-DNA-Ligase	Reaktionspuffer (+ATP) [10x]	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
Taq-DNA Polymerase	Reaktionspuffer [10x], MgCl ₂ [50mM]	Invitrogen GmbH, Darmstadt, DE

2.1.9 ANTIKÖRPER

Die nachfolgend aufgelisteten Primär- und Sekundärantikörper wurden gemäß den Herstellerangaben je nach Anwendung in Verdünnungen von 1:100 bis 1:5000 in TBS-T, TBS-T (3-5 % Milchpulver) und TBS-T (5% BSA) eingesetzt.

Primärantikörper (von A-Z)	Antigenspezifität	Spezies / Isotyp	Anwendung in dieser Arbeit	Hersteller
β-Tubulin (T 0198) (Clone D66)	β-Tubulin (Mensch, Maus, Ratte, Hase, Affe, Rind, Hund, Huhn)	Maus, IgG1, monoklonal	Western Blot	Sigma-Aldrich, München, DE
Flag-Tag (Anti-Flag® M2; clone 2)	Flag-Tag [DYKDDDDK]	Maus, IgG1, monoklonal	Western Blot, Co-IP, Immunfluoreszenz	Sigma-Aldrich, München, DE
His-Tag - #2365	His-Tag [6xHis]	Kaninchen, IgG, polyklonal	Western Blot, Co-IP	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
His-Tag (27E8) - #2366	His-Tag [6xHis]	Maus, IgG1, monoklonal	Western Blot, Co-IP	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Phospho-Stat3 (Tyr705) - #9131	P-Stat3 (Tyr 705) (Mensch, Maus, Ratte, Affe)	Kaninchen, IgG, polyklonal	Western Blot	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Phospho-Stat5 (Tyr694) (C11C5) - #9359	P-Stat5A (Tyr 694) P-Stat5B (Tyr 699) (Mensch, Maus)	Kaninchen, IgG, monoklonal	Western Blot, Co-IP	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Phospho-Stat5 (Tyr694) (Alexa Fluor®647) (C71E5) - #9365	P-Stat5A (Tyr 694) P-Stat5B (Tyr 699) (Mensch, Maus)	Kaninchen, IgG, monoklonal	Immunfluoreszenz	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Stat3 (C-20): sc-482	Stat3 (Mensch, Maus, Ratte)	Kaninchen, IgG, polyklonal	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, Frankfurt am Main, DE
Stat5 (C-17): sc-835	Stat5A Stat5B (Mensch, Maus, Ratte)	Kaninchen, IgG, polyklonal	Western Blot, Co-IP, Immunfluoreszenz, EMSA	Santa Cruz Biotechnology, Frankfurt am Main, DE
Thioredoxin 1 (Human specific) - #2285	humanes Thioredoxin (Mensch)	Kaninchen, IgG, polyklonal	Western Blot, Co-IP	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE

Sekundärantikörper (von A-Z)	Antigenspezifität	Spezies Isotyp	/	Anwendung in dieser Arbeit	Hersteller
α-Mouse Alexa Fluor®546 - #A11003 (H+L)	Maus-IgG Antikörper	Ziege, IgG		Immunfluoreszenz (Alexa Fluor®546 gekoppelt)	Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE
α-Mouse-HRP- #NXA931	Maus-IgG Antikörper	Schaf, IgG		Western Blot (HRP gekoppelt)	Amersham/GE Healthcare München, DE
α-Rabbit Alexa Fluor®647 - #A31573 (H+L)	Kaninchen-IgG Antikörper	Esel, IgG		Immunfluoreszenz (Alexa Fluor®647 gekoppelt)	Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE
α-Rabbit-HRP- #RPN4301	Kaninchen-IgG Antikörper	Ziege, IgG		Western Blot (HRP gekoppelt)	Amersham/GE Healthcare München, DE
α-Rabbit-HRP- #7074	Kaninchen-IgG Antikörper	Ziege, IgG		Western Blot (HRP gekoppelt)	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE

2.1.10 BAKTERIENSTÄMME & BAKTERIENMEDIEN

Bakterienstamm (A-Z)	Genotyp	Anwendung	Hersteller
BL21-CodonPlus (DE3)- RP (BL21 ⁺) Chemically competent <i>E.coli</i>	F. ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Camr]	Rekombinante Expression eukaryotischer Proteine	Stratagene, La Jolla, CA, USA
One Shot® TOP10F' Chemically Competent <i>E.coli</i>	F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ 80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Plasmid- Transformation, Plasmid- Amplifikation	Invitrogen GmbH, Darmstadt

Bakterienmedien (A-Z)	Zusammensetzung	Anwendung für Bakterienstamm
LB (Lysogeny Broth)	Nach Miller: 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, pH 7,5	TOP10F' <i>E.coli</i> BL21 ⁺ <i>E.coli</i>
SOC (Super Optimal Broth + Glucose)	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 0,5 g/l NaCl, 10 ml KCl-Lösung (250mM), pH 7,0 Nach dem Autoklavierung: 5 ml MgCl ₂ -Lösung (2M), 20 ml Glukose-Lösung (1M)	TOP10F' <i>E.coli</i> (Transformation nach pCR2.1-TOPO-Vektor Subklonierung)
TB (Terrific Broth)	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefe-Extrakt, 4 ml/l 100% Glycerol, pH 7 Nach Autoklavierung: 100 ml/l Kaliumphosphat- Puffer (23,1 g/l KH ₂ PO ₄ , 125,4 g/l K ₂ HPO ₄)	BL21 ⁺ <i>E.coli</i>

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	20 µg/ml

2.1.11 HEFESTÄMME & HEFEMEDIEN

Die Kultivierung und Anzucht der Hefen erfolgte in den entsprechenden Voll- oder Selektionsmedien bei 30°C. für 24-30 Stunden. Die langfristige Lagerung erfolgte in YPD-Medium mit 50% Glycerin bei -80°C.

Hefestamm	Genotyp	Referenz/Hersteller
KF1	<i>MATα, trp1-901, leu2-3112, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ, SPAL10-URA3</i>	(Butz et al., 2000; James et al., 1996)

Für das Kultivieren und Heranziehen untransformierter Hefe-Stämme wurde das YPD-Vollmedium verwendet (Yeast extract-Peptide-Dextrose). Für die Selektion positiv transformierter Hefen, sowie für die Selektion von Hefen im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen (siehe Kap. 2.2.2) wurde das SD- Selektionsmedium (Synthetic Defined) verwendet. Die verschiedenen SD-Selektionsmedien beinhalten alle für das Wachstum der Hefen essentiellen Aminosäuren und Nukleotide, mit Ausnahme derjenigen, welche für die Selektion verantwortlich sind. Diese werden durch Enzyme synthetisiert, welche über die verwendeten Expressionsplasmide oder im Falle des Screenings über Reportergene exprimiert werden.

Hefemedien	Zusammensetzung
YPD (Yeast extract-Peptide-Dextrose)	Hefe-Extrakt 1% (w/v), Pepton 2% (w/v), gelöst in Aqua bidest., pH: 6,4, ± Agar 2% (w/v) Nach dem Autoklavieren: 40%ige Glucoselösung 5% (v/v)
SD (Synthetic Defined)	Sorbitol 182,2 g/l, YNB (Yeast Nitrogen Base) 6,7 g/l, CSM (Complete Supplement Mixture) Aminosäure/Nukleotid-Gemisch 0,62 g/l, gelöst in Aqua bidest., pH: 5,8, ± Agar 2% (w/v) Nach dem Autoklavieren: 40%ige Glucoselösung 5% (v/v)

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht der für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen verwendeten SD-Selektionsmedien, die Anwendungsbereiche der SD-Selektionsmedien mit ihren Aminosäure/Nukleotid-Dropout-Mischungen (CSM) und die dafür benötigten Vektoren.

SD-Selektionsmedien	Anwendung	Benötigte Vektoren
SD (Selektionsmedium) ohne Leucin (SD-L)	Selektion einfach positiv transformierter Hefen → Expression des „Prey“-Konstrukts	pGADT7
SD ohne Tryptophan (SD-T)	Selektion einfach positiv transformierter Hefen → Expression des „Bait“-Konstrukts	pGBKT7
SD ohne Leucin und Tryptophan (SD-LT)	Selektion doppelt positiv transformierter Hefen → Expression des „Bait“ und „Prey“-Konstrukts	pGADT7 pGBKT7
SD ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (SD-LTH)	Protein-Interaktions-Screen doppelt positiv transformierter Hefen („Bait“ und „Prey“) → Identifikation moderater Protein-Wechselwirkungen	pGADT7 pGBKT7
SD ohne Leucin, Tryptophan und Adenin (SD-LTA)	Protein-Interaktions-Screen doppelt positiv transformierter Hefen („Bait“ und „Prey“) → Identifikation starker Protein-Wechselwirkungen	pGADT7 pGBKT7
SD ohne Leucin, Tryptophan und Uracil (SD-LTU)	Protein-Interaktions-Screen doppelt positiv transformierter Hefen („Bait“ und „Prey“) → Identifikation stärkster Protein-Wechselwirkungen	pGADT7 pGBKT7

2.1.12 ZELLINIEN & ZELLKULTURMEDIEN

In folgender Tabelle findet sich eine Auflistung aller verwendeten eukaryotischen Zelllinien, der zugehörigen Spezies, ihrem ursprünglichen Zelltyp, Wachstumseigenschaften und Kultivierungsbedingungen.

Zelllinie (A-Z)	Herkunft (Spezies)	Zelltyp, Ursprung und phänotypische Merkmale	Kultivierung/ Wachstums-eigenschaften	Referenz/ ATCC-Nr. DSMZ-Nr.
293T (HEK-293T)	human	Embryonale Nierenepithelzellen welche mit gescherter DNA des Adenovirus 5 transformiert und immortalisiert wurden (HEK293). HEK293 Zellen wurden mit dem SV40 Large-T Antigen transfiziert (293T) und werden für Transfektions-experimente & die Produktion viraler Partikel eingesetzt.	DMEM / adhärent wachsend	ATCC: CRL-11268™ (Graham et al., 1977)
A431	human	Plattenepithelzelle der Haut; isoliert von 85-jähriger Patientin mit epidermoidem Vulva-karzinom; weisen EGFR-Genamplifikation und p53-LOF-Mutation auf	DMEM / adhärent wachsend	ATCC: CRL-1555™ (Giard et al., 1973)

Material & Methoden

B9-HeLa (modif. HeLa-Zellen)	human	HeLa-Zellen: Zervix-Epithelzelle; isoliert von 31-jähriger Patientin mit epidermoidem Zervix-Adenokarzinom; HeLa-Zellen wurden stabil transfiziert und überexprimieren als B9-Zellen Stat5 und PrIR	DMEM / adhärent wachsend	Edith Pfitzner, Georg-Speyer-Haus
Ba/F3	murin	Aus dem Knochenmark isolierte immortalisierte Pro-B- Zelllinie	RPMI (+ 1ng/ml IL3) / Suspensionszellen, IL3-abhängiges Wachstum	RCB-0805/ Dr. Richard Moriggl, Ludwig-Boltzmann Institut, Wien
Ba/F3- Bcr-Abl (p210)	murin	Ba/F3 Zellen transformiert mit der onkogenen Fusionskinase Bcr-Abl (p210)	RPMI / Suspensionszellen, IL3-unabhängiges Wachstum	Dr. Richard Moriggl, Ludwig-Boltzmann Institut, Wien
Ba/F3- cS5^F (S710F; H299R)	murin	Ba/F3 Zellen transformiert mit konstitutiv aktiv mutiertem Stat5A	RPMI / Suspensionszellen, IL3-unabhängiges Wachstum	Dr. Richard Moriggl, Ludwig-Boltzmann Institut, Wien (Onishi et al., 1998)
Ba/F3- caKit (D816V)	murin	Ba/F3 Zellen transformiert mit konstitutiv aktiv mutiertem c-Kit	RPMI / Suspensionszellen, IL3-unabhängiges Wachstum	Dr. Richard Moriggl, Ludwig-Boltzmann Institut, Wien
Ba/F3- NPM- ALK	murin	Ba/F3 Zellen transformiert mit der onkogenen Fusionskinase NPM-ALK	RPMI / Suspensionszellen, IL3-unabhängiges Wachstum	Dr. Richard Moriggl, Ludwig-Boltzmann Institut, Wien (George et al., 2008)
Ba/F3- TEL-JAK 1/2/3	murin	Ba/F3 Zellen transformiert mit den onkogenen Fusionskinasen TEL-JAK1,2,3	RPMI / Suspensionszellen, IL3-unabhängiges Wachstum	Dr. Richard Moriggl, Ludwig-Boltzmann Institut, Wien (Lacronique et al., 2000)
HCT116	human	Kolon-Epithelzelle; isoliert von adultem Patient kolorektalem Karzinom; exprimiert das RAS-Onkogen (Kodon13 Mutation)	RPMI / adhärent wachsend	ATCC: CCL-247 TM (Brattain et al., 1981)
HEL	human	Erythroblastische Zelllinie; isoliert von 30-jährigen Patienten mit Erythroleukämie (AML-M6); differenzieren spontan und produzieren Globin & Hämoglobin; exprimieren Jak2 (V617F)-Mutante	RPMI / Suspensionszellen	ATCC: TIB-180 TM (Martin & Papayannopoulou, 1982)
HL60	human	Promyeloblastische Zelllinie; isoliert von 36-jähriger Patientin mit akuter promyeloblastischer Leukämie; exprimieren c-myc- und N-ras-Onkogen; weisen p53-LOH auf	RPMI / Suspensionszellen	ATCC: CCL-240 TM (Gallagher et al., 1979)

HT-29	human	Kolon-Epithelzelle; isoliert von 44-jähriger Patientin (1964) mit kolorektalem Adenokarzinom; exprimiert das RAS & myc-Onkogen sowie mutiertes p53 (G→A Punktmut.; Kodon273)	RPMI / adhärent wachsend	ATCC: HTB-38™
K562	human	Erythroid-myeloblastische Zelllinie; 1975 als erste von einem chronisch myeloische Leukämie (CML) Patienten (56-jährige Frau) isolierte Zelllinie; exprimiert die onkogene Fusionskinase BcrAbl p210 – Translokation t(9;22)	RPMI / Suspensionszellen	ATCC: CCL-243™ (Lozzio & Lozzio, 1975)
Kasumi-1	human	Myeloblastische Zelllinie; isoliert von 7-jähriger Patientin mit akut myeloblastischer Leukämie; exprimiert AML1-ETO Fusionsprotein – Translokation t(8;21)	RPMI / Suspensionszellen	ATCC: CRL-2724™ (Asou et al., 1991)
Ku812	human	Basophil-myeloblastische Zelllinie; isoliert von 38-jährigen CML-Patienten; exprimiert die onkogene Fusionskinase BcrAbl p210 – Translokation t(9;22)	RPMI / Suspensionszellen	ATCC: CRL-2099™ (Kishi, 1985)
MCF-7	human	Brustdrüsen-Epithelzelle; isoliert von 69-jähriger Patientin mit invasiv duktalem Mamma-Adenokarzinom; exprimiert das WNT7B-Onkogen; ER, PR positiv	DMEM / adhärent wachsend	ATCC: HTB-22™ (Soule et al., 1973)
MZ-54	human	Gliazelle; isoliert aus Patienten mit malignem Glioblastom des Stadium 4 (T4)	DMEM / adhärent wachsend	Prof. Donat Kögel, Neuroscience Center, Universitäts- Klinikum Frankfurt am Main (Hetschko et al., 2008)
PC-3	human	Metastatische Prostata-Epithelzelle; isoliert aus Knochenmetastase eines 62-jährigen Patienten mit Prostata-Adenokarzinom des Stadium 4 (T4); reagieren nicht auf Androgen, Glucocorticoid, EGF & FGF Behandlung	DMEM / adhärent wachsend	ATCC: CRL-1435™ (Kaighn et al., 1979)
SK-BR-3	human	Brustdrüsen-Epithelzelle; isoliert von 43-jähriger Patientin mit Mamma-Adenokarzinom; hypertriploide Zelllinie; überexprimiert das HER2-Onkogen	DMEM / adhärent wachsend	ATCC: HTB-30™ (Trempe, 1976)

Material & Methoden

SKNO-1	human	Myeloblastische Zelllinie; isoliert von 22-jährigem Patienten mit akut myeloblastischer Leukämie; exprimiert AML1-ETO Fusionsprotein – Translokation t(8;21); Monosomie 17	RPMI (+ 10ng/ml GM-CSF) / Suspensionszellen	DSMZ: ACC 690 (Matozaki et al., 1995)
T-47D	human	Brustdrüsen-Epithelzelle; isoliert von 54-jähriger Patientin mit invasiv duktalem Mamma-Adenokarzinom; exprimiert das WNT7B-Onkogen; ER, GR, PrIR, PR, AR & Calcit.R positiv	RPMI / adhärent wachsend	ATCC: HTB-133™ (Keydar et al., 1979)

Zellkulturmedien	Hersteller	Zusammensetzung
DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, w/o L-Glutamin]	Gibco®Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE / Lonza Group Ltd. Basel, SUI	DMEM mit <u>10 % FCS</u> , 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
DMEM - Mangelmedium [Dulbecco's Modified Eagle Medium, w/o L-Glutamin]	Gibco®Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE / Lonza Group Ltd. Basel, SUI	DMEM mit <u>2 % FCS</u> , 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
RPMI 1640 [Roswell Park Memorial Institute, w/o L-Glutamin]	Gibco®Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE / Lonza Group Ltd. Basel, SUI	RPMI 1640 mit <u>10 % FCS</u> , 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
RPMI 1640 - Mangelmedium [Roswell Park Memorial Institute, w/o L-Glutamin]	Gibco®Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE / Lonza Group Ltd. Basel, SUI	RPMI 1640 mit <u>2 % FCS</u> , 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
D-PBS (1x) [Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺)	PAA Laboratories Pasching, AUT	w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺
D-PBS (10x) [Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺)	Lonza Group Ltd. Basel, SUI	w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺
Opti-MEM® [Transfektionsmedium]	Gibco®Life Technologies, Invitrogen GmbH Darmstadt, DE	Opti-MEM (serumreduziertes Fertigmedium)

2.2 METHODEN

2.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1.1 PLASMID-TRANSFORMATION IN *E. COLI* ZELLEN

Für die bakterielle Amplifikation von Plasmid-DNA wurden chemokompetente *Escherichia coli* des Stammes TOP10F' verwendet. Das Einbringen der Plasmid-DNA in die *E. coli* (Transformation) erfolgte über Poren in den Zellmembran, welche durch einen Hitzeschock (1 min, 42°C) induziert wurden. Die Bakterien wurden mit Calcium- und Rubidiumchlorid vorbehandelt, wodurch die Abstoßungskräfte zwischen negativ geladener DNA und negativ geladener Zellmembran reduziert und die Plasmid-Aufnahme erhöht wurde. Zunächst wurden pro Transformation ca. 5-10 ng Plasmid-DNA in 100 µl *E. coli* resuspendiert (Transformations-effizienz 100 µl TOP10F' *E. coli*: $\sim 2 \times 10^7$ cfu / µg Plasmid-DNA) und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß der Hitzeschock für 1 min bei 42°C in einem Wasserbad oder Heizblock. Nach Zugabe von 1 ml kaltem LB-Medium wurden die transformierten Bakterien bei 37°C für 1 h geschüttelt (500-600 rpm) und in ihrer Vitalität stabilisiert. Anschließend wurde das Volumen der Bakteriensuspension durch Zentrifugation (1-2 min; 5000 rpm; RT) auf 50-100 µl reduziert und auf LB-Agarplatten (92 mm Ø Petrischalen) ausgestrichen. Zur Selektion positiv transformierter Bakterien wurden, in Abhängigkeit von dem durch das Plasmid exprimierten Antibiotikaresistenz-Gen, dem LB-Agar Antibiotika (Konzentrationen siehe 2.1.10) hinzugesetzt. Die Bakterienkolonien wurden über Nacht bei 37°C herangezogen.

Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Gefrorene *E. coli*-Stämme eines Glycerol-Stocks wurden mit einer Pipettenspitze entnommen und auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Eine in der Folge herangezogene Kolonie wurde zum Animpfen einer 5 ml LB-Vorkultur benutzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit der Vorkultur eine 500 ml LB-Kultur bis zu einer optischen Zelldichte OD_{600} : 0,45-0,5 herangezogen. Die Bakterien befinden sich nun im frühen Stadium des exponentiellen Wachstums (*log*-Phase). Aufgrund der hohen Zellteilungsrate ist die Zellmembran mit ihrem Murein-Gerüst nicht vollends ausgebildet und daher eher dünn, was einen zusätzlichen Vorteil für die Transformation darstellt. Die Zellsuspension wurde

Material & Methoden

abzentrifugiert (10 min; 4°C; 5.000 x g) und das Pellet in 200 ml kalter Lösung 1 resuspendiert und für 1-2 h auf Eis mit Calciumchlorid und Rubidiumchlorid aus der Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (10 min; 4°C; 5.000 x g) und in 15 ml Lösung 2 vorsichtig resuspendiert. Bei strikter Behandlung auf Eis wurden die Zellen á 200 µl aliquotiert (entspricht 2 Transformationen; 220 µl mit Pipettierzusatz), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.1.2 ISOLATION VON PLASMID-DNA AUS *E. COLI* ZELLEN

Das Verfahren zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen beruht im Wesentlichen auf folgenden Schritten. Unter Verwendung eines alkalischen Lyse-Puffers [200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS] werden die Bakterienzellen zunächst aufgeschlossen. Im zweiten Schritt erfolgt eine Neutralisation des alkalischen Lysats durch die Zugabe von Kaliumacetat [3 M; pH:5]. Dies bewirkt ein Ausfallen makromolekularer, denaturierter Zellbestandteile (Proteine, chromosomale DNA, Membranbestandteile), während die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt. Nach der Abtrennung des Präzipitats (Zentrifugation, Filterung) erfolgt die Säulen-Aufreinigung der gelösten Plasmid-DNA über Anion-Austausch an einer hydrophilen Silica-Matrix. Das Waschen der Säule unter erhöhter Salzkonzentration [800 mM KCl; pH:6] entfernt niedermolekulare Verunreinigungen (Peptide, Kohlenhydrate, RNA), während die Plasmid-DNA weiterhin über sein negativ-geladenes Phosphatrückgrat an die Matrix bindet. Erst nach dem Waschen der Säule mit einem Hochsalzpuffer [1250 mM KCl; pH: 8,5] eluiert die Plasmid-DNA, welche in der Folge durch Isopropanol-Präzipitation konzentriert und entsalzt wird. Abschließend werden die präzipitierten Plasmide in H₂O oder TE-Puffer gelöst.

Plasmid-Isolation zu Analysezwecken (Mini-Präparation):

Für die Isolation kleinerer Mengen Plasmid-DNA (5-20 µg), zur Durchführung und Analyse von Klonierungsschritten bzw. zur Durchführung von Sequenzanalysen, wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit (AX 20 Säulen) der Firma Macherey & Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Eine 5 ml LB_{AMP} bzw. LB_{KAN} Übernachtskultur (37°C), welche mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft wurde, bildeten hierfür die Grundlage. Für die Plasmid-Isolation wurden die Bakterien am Folgetag durch Zentrifugation pelletiert (20 min; 4°C; 4.000 rpm).

Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Midi-/Maxi-Präparation):

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (0,1 – 1 mg) erfolgte mit Hilfe des NucleoBond PC 100 / PC 500 Xtra Midi-/Maxi-Kit (AX 100/AX 500 Säulen) von Macherey & Nagel, gemäß der Herstellerangaben. 200 – 400 ml LB_{AMP} bzw. LB_{KAN} Übernachtskulturen einer transformierten Bakterienkolonie wurden hierfür angefertigt. Für die Plasmid-Isolation wurden die Bakterien am Folgetag durch Zentrifugation pelletiert (30 min; 4°C; 4.000 rpm).

Plasmidisolierung amplifizierter „Library“-Vektoren (Giga-Präparation):

Die Isolation größter Mengen klonierter und amplifizierter „Library“-Vektoren (2 – 10 mg), welche für den Yeast-Two-Hybrid Screen eingesetzt wurden, erfolgte über das NucleoBond PC 10000 Giga-Kit (PC 10000 Säulen) von Macherey & Nagel, gemäß der Herstellerangaben. Klonierte Library-Vektoren (pGADT7) wurden dafür in TOP10F' *E. coli* transformiert und auf 300 – 400 großen LB_{AMP} Agarplatten (145 mm Ø runde & 144cm² quadratische Petrischalen) ausgestrichen. Die einzelnen Bakterienkolonien wurden am darauffolgenden Tag abgeschabt (ca. 1x10⁷/200 Platten) und die amplifizierten „Library“-Vektoren mittels Gigapräparation isoliert.

2.2.1.3 BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON NUKLEINSÄUREN

Die Bestimmung der Konzentration gelöster DNA (Plasmid- oder genomische DNA) und RNA erfolgte photometrisch bei $\lambda=260$ nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, am NanoDrop UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND1000). Dafür wurden zunächst ca. 1,5 - 2 μ l des entsprechenden Lösungsmittels der Nukleinsäureprobe (dH₂O, TE [1x], Elutionspuffer) zur Ermittlung des Leerwerts („Blank“-Wert) aufgetragen. Anschließend wurden ebenfalls ca. 1,5 - 2 μ l der zu messenden Probe eingesetzt. Um die Reinheit der Probe festzustellen wurde zusätzlich die Extinktion bei $\lambda=280$ nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen und der Quotient [$A_{260}:A_{280}$ Ratio] beider Extinktionswerte ermittelt. Bei sauberen DNA-Proben liegt dieser Wert bei 1,8, bei sauberen RNA-Proben bei 2,0.

2.2.1.4 AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

Nach Anlegen eines elektrischen Feldes können DNA-Moleküle, aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrats, nach ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente zur Anode ist dabei proportional zu ihrer Größe. Entsprechend der zu analysierenden Fragmentgrößen wurden Gele mit 0,8 % bis 2 % Agarose

Material & Methoden

(w/v) hergestellt. Durch das Aufkochen in einem Mikrowellenherd wurde die Agarose in TAE-Puffer [1x] vollständig aufgelöst. Nach kurzer Abkühlung wurde das Gel in Abhängigkeit von der Menge und dem Volumen der aufzutragenden Proben in einer entsprechenden Gelkammer mit zugehörigen Kammeinsätzen gegossen. Als Laufpuffer während der Elektrophorese wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Aufzutrennende DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Bromphenol-haltigen 6x Ladepuffer [NEB] versetzt. Die Gelelektrophorese wurde in Abhängigkeit von den Schmelzeigenschaften der Agarose („low“ oder „normal melting“) bei einer kontinuierlichen Spannung von 60-110 V, in einer Elektrophoresekammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden 8-10 µl (entspricht ca. 0,5 µg) eines DNA-Größenmarkers (100 bp bzw. 1 kb DNA-Ladder) [NEB] mitgeführt. Anschließend erfolgte die Färbung der DNA-Banden durch interkalierendes Ethidiumbromid, welches einfallendes UV-Licht emittiert. Hierfür wurde das Gel für 20-30 min in ein Ethidiumbromid getaucht. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Transilluminierung unter UV-Bestrahlung bei 302 nm. Die DNA-Banden wurden für eine Extraktion ausgeschnitten oder über eine Kamera digital dokumentiert [Bio-Rad Gel Doc; Quantity One Software].

2.2.1.5 EXTRAKTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Für die Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurden der „NucleoSpin Extract“ (Macherey-Nagel) oder der „Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Vorgaben des Hersteller verwendet. Hierfür wurden einzelne Banden unter schwacher UV-Bestrahlung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe eines Hochsalzpuffers wurde das Gelstück mit dem DNA Fragment für 5-10 min bei 50°C geschmolzen. Durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol konnte die präzipitierte DNA an eine Silica Membran durch Zentrifugation gebunden werden. Überschüssige Agarose, sowie Verunreinigungen wurden anschließend durch einen Ethanol-haltigen Waschpuffer entfernt. Abschließend wurde die DNA eluiert und für Klonierungen oder Sequenzierungen eingesetzt.

2.2.1.6 DNA-SEQUENZANALYSE

Die Sequenzierung mit einem Primer gegen eine bekannte DNA-Sequenz ermöglicht die Identifizierung benachbarter Basenpaare. Die Methode basiert auf der Kettenabbruchsynthese von Sanger. Hierbei wird die enzymatischen Replikation durch 2',3'-Dideoxynanaloga (Terminator) der jeweiligen Nukleotide kontrolliert unterbrochen. Da diese charakteristisch für jede Base mit einem Fluoreszenzmarker versehen sind, können anschließend die Kettenabbruch-Produkte aufgetrennt und anhand eines Referenzmarkers, ein Chromatogramm erstellt werden. Hieraus

ergibt sich die Basenfolge der sequenzierten DNA. Alle Sequenzierungen der vorliegenden Arbeit sind im Institut (Georg-Speyer-Haus) mit dem 3130 Avant Genetic Analyzer durchgeführt worden. Für die Sequenzierung wurden 15 µl Ansätze mit 0,5 – 1 µg zu analysierender Plasmid-DNA als Template und entsprechendem Sequenzierprimer (Konzentration: ca. 700nM), gelöst in aqua bidest, angefertigt. Erhaltene Sequenzen konnten anschließend mit der Lasergene DNASTAR Software *in silico* analysiert werden.

2.2.1.7 POLYMERASE-KETTENREAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die komplementäre Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen aus verschiedenen DNA-Ausgangsmaterialien („Template“) wie Plasmide, genomischer DNA oder komplementärer cDNA. Die amplifizierten Sequenzen können zu Analyse Zwecken oder für Klonierungen verwendet werden. Mit Hilfe von zwei flankierenden, sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) und thermostabilen DNA Polymerasen kann die gewünschte Sequenz in aufeinanderfolgenden Zyklen exponentiell amplifiziert werden. Ein einzelner Zyklus besteht dabei in der Regel aus folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges
2. Anlagerung („Annealing“) der Primer an den Template-Einzelstrang
3. Elongation der komplementären Sequenz, ausgehend vom Primer in 5'-3' Richtung

Der Ablauf der Prozesse wird über die Temperatur geregelt. Die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs erfolgt in der Regel bei 95°C. Die Temperatur für die Hybridisierung der Primer an den Einzelstrang (T_A : Annealing temperature) wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur (T_M : Melting temperature) des Primer ausgewählt, welche durch den G/C-A/T Gehalt des Primer bestimmt wird. Die Hybridisierungstemperatur sollte 5°C unterhalb der Schmelztemperatur liegen und kann nach der Wallace-Regel (Suggs et al., 1981) bestimmt werden: $T_A = 4x(G/C) + 2x(A/T) - 5$. Die Auswahl der Temperatur für die Elongation erfolgte in Abhängigkeit vom Wirkungsoptimum der eingesetzten Polymerase (in der Regel 72°C). Die PCR-Reaktion wurde in dieser Arbeit mit dem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Die anschließende Auswertung der Amplifikate erfolgte durch Auftrennung in Agarose Gelen (siehe Kap. 2.2.1.4). Um die Wahrscheinlichkeit von Mutationen innerhalb des Amplifikats zu minimieren, wurden zusätzlich Polymerasen mit einer „proof-reading“-Funktion eingesetzt.

Material & Methoden

<u>Standard PCR-Reaktionsansatz:</u>	x µl	10 ng Plasmid-DNA (Template)
	5 µl	10 x Reaktionspuffer
	1,5 µl	MgCl ₂ (50 mM)
	1 µl	dNTP's (10 mM)
	2,5 µl	Forward Primer (10 µM)
	2,5 µl	Reverse Primer (10 µM)
	0,5 µl	High-Fidelity Taq Polymerase
	Ansatz mit Aqua bidest auf 50 µl aufgefüllt	

<u>Standard PCR-Protokoll:</u>	1. Initiale DNA Denaturierung	2 min	95°C
	2. DNA-Denaturierung	1 min	95°C
	3. Primer Hybridisierung	1 min	55-65°C
	4. Elongation (1min pro kb)	0,5-1 min	72°C
	5. Terminale Elongation	10 min	72°C
	6. Reaktionsende	∞	4°C

Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen der Schritte 2-4. Die Dauer des Elongation-Schrittes wurde dabei entsprechend der Länge des Amplifikats angepasst.

2.2.1.8 KLONIERUNGSSCHRITTE

Die Klonierung beschreibt die Integration eines DNA-Fragments bzw. Gens in einen Expressionsvektor (Plasmid) und dessen anschließende Vervielfältigung. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte dieses Prozesses aufgeführt.

2.2.1.8.1 AUSSCHNEIDEN VON DNA-FRAGMENTEN (RESTRIKTIONSVERDAU)

Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten das Zucker-Phosphat-Rückgrat doppelsträngiger DNA innerhalb bestimmter Sequenzmotive mit hoher Spezifität. Alle DNA-Restriktionen wurden nach Herstellerangaben (New England Bio Labs; Fermentas) mit 1-10 Enzym-Einheiten (U) pro µg zu verdauender DNA und dem entsprechenden Reaktionspuffer durchgeführt. Für präparative Restriktionsansätze wurden 5–20 µg und für analytische Restriktionsansätze 0,1–1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Restriktionsreaktionen wurden bei 37°C für 2-16 h durchgeführt. Im Falle eines Enzym-Doppelverdau wurde der optimale Reaktionspuffer (+/- BSA) wie nach Herstellerangaben empfohlen eingesetzt. Nach erfolgter Restriktion wurden die ausgeschnittenen Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert (siehe Kap. 2.2.1.4). DNA-Fragmente aus präparativen Restriktionsansätzen wurden zur Weiterverwendung größenabhängig durch Ethanol-fällung (siehe Kap. 2.2.1.8.2) oder direkt

über eine Säulenaufreinigung (QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAGEN) isoliert, oder nach Agarose-Auftrennung (Verwendung von „low-melting“ oder speziell für Klonierungen optimierte Agarose) aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (siehe Kap. 2.2.1.5). Kleine, zu klonierende Fragmente (50-600 bp) wurden im Gel aufgetrennt und isoliert, wohingegen die Aufreinigung des verdauten Vektor-Rückgrats des jeweiligen „Empfänger“-Plasmids (1-15 kb), in welches nachfolgend die Fragmente eingebaut wurden, über eine Säule oder Ethanolfällung erfolgte.

2.2.1.8.2 ETHANOLFÄLLUNG VON DNA

Für eine Fällung von DNA in Lösungen nutzt man die Eigenschaft von DNA, aufgrund ihrer starken negativen Ladung in Ethanol unlöslich zu sein und somit auszufallen. In dieser Arbeit wurde die Ethanolfällung, nach erfolgtem Restriktionsverdau, zur Aufreinigung linearisierter Vektoren angewendet. Hierfür wurden zunächst Proteinverunreinigungen, sowie Enzyme und BSA durch eine hydroxylgruppenreiche, jedoch phenolfreie und somit nicht toxische Silica-Matrix [StrataClean™, Stratagene] aus dem Restriktionsansatz entfernt. Dieses lösliche Granulat wurde im Volumen 1/10 hinzugegeben, der Ansatz gevortext, 1 min bei RT inkubiert, anschließend abzentrifugiert [1 min, 14.000 rpm, RT] und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der Vorgang wurde dreifach wiederholt. Im Anschluss wurde die DNA-Lösung mit einem 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2,5 fachen Volumen an eiskaltem (-20°C) 100%-igen Ethanol versetzt und durch vortexen vermischt. Die Ansätze wurden dann etwa 30 min bei -20°C inkubiert, bei 14.000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um Salze zu entfernen wurde die präzipitierte DNA anschließend einmal mit 70%-igen Ethanol gewaschen, nach Zentrifugation bei 37°C getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE Puffer oder Aqua bidest (100-200 µl in Abhängigkeit von der Pelletgröße) bei 37°C unter schütteln rückgelöst.

2.2.1.8.3 PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION VON DNA

Mit der Phenol/Chloroform-Extraktion lassen sich Nukleinsäuren und Proteine aufgrund ihrer Löslichkeit in einer zweiphasigen Emulsion (wässrige und organische Phase) separieren. In dieser Arbeit wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion für die Synthese und Klonierung der Oligonukleotid-Bibliothek in den Hefe-Zwei-Hybrid Expressionsvektor und für die Extraktion genomischer und Plasmid-DNA aus Hefe-Zellen eingesetzt. Dafür wurde der Reaktionsansatz zunächst im Verhältnis 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) versetzt, 1 min gevortext, abzentrifugiert (10 min; 14.000 rpm; RT) und die obere nukleinsäurehaltige, wässrige Phase abgenommen. Zum erhöhen der DNA-Reinheit und zum entfernen von Phenol-

Material & Methoden

Resten wurde der Vorgang anschließend mit einem Chloroform/Isoamylalkohol Gemisch (24:1) wiederholt. Abschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in einem geeigneten Volumen, 30 µl im Falle der Oligonukleotid-Bibliothek, in Aqua bidest gelöst.

2.2.1.8.4 DEPHOSPHORYLIERUNG VON 5'-ENDEN

Um die Selbstligation linearisierter Vektoren, vor allem im Falle glatter Restriktionsenden ohne Nukleotid-Überhang (blunt-end restriction), zu verhindern und die Ligationseffizienz beim Fragmenteinbau zu erhöhen, wurden die 5'-Phosphatgruppen durch Phosphatase-Behandlung an den Restriktionsenden abgespalten. Dies erfolgte über die Shrimp Alkaline Phosphatase [Antarctic PhosphataseTM, New England Biolabs]. Im Gegensatz zur häufig verwendeten Alkalischen Phosphatase aus dem Intestinum von Kälbern („calf intestinal phosphatase“) bietet die Shrimp Alkaline Phosphatase die Möglichkeit der Hitzeinaktivierung, wodurch eine weiterer Aufreinigungsschritt vermieden wird. Der Reaktionsansatz wurde gemäß den Herstellerangaben, mit 1-2 Enzymeinheiten pro µg DNA, unter Verwendung eines 10fachen Reaktionspuffers und Aqua bidest pipettiert. Die Dephosphorylierung des linearisierten Vektors erfolgte, in Abhängigkeit von der DNA-Menge, bei 37°C für 30-180 min.

2.2.1.8.5 EINBAU (LIGATION) VON DNA-FRAGMENTEN IN PLASMIDE

Die Ligation erfolgte über das Enzym T4-DNA-Ligase, welche die Ausbildung von Phosphorsäurediesterbindungen zwischen den dephosphorylierten Vektoren und den einzufügenden DNA-Fragmenten (Inserts), unter ATP Verbrauch, katalysiert. In dieser Arbeit wurden sowohl Ligationen komplementärer Nukleotid-Überhänge nach Restriktion („sticky-end ligation“), als auch glatter Fragmentenden („blunt-end ligation“) durchgeführt.

<u>Standard Ligationsansatz:</u>	linearisierter Vektor	0,5-1µg
	Insert	im molaren Verhältnis
		Vektor:Insert = 1:2 bis 1:10
	T4-DNA-Ligase	1µl
	ATPhaltiger Ligasepuffer [10x]	2 µl
	Ansatz mit Aqua bidest auf 20 µl Totalvolumen aufgefüllt	

Der Ligationsansatz wurde vor der Zugabe der T4-DNA-Ligase auf 45°C vorgewärmt und auf RT abgekühlt. Die Ligationsreaktion wurde über Nacht (16-20 h) bei 16°C durchgeführt.

Als eine zusätzliche Ligationsstrategie wurde die „In-Gel“ Ligation durchgeführt. Hierbei wurde das in einem „low-melting“ Agarosegel aufgetrennte DNA-Insert ausgeschnitten, geschmolzen

(5-10 min, 65°C) und direkt zum Ligationsansatz hinzugegeben (10µl). Nach abschließender Zugabe der Ligase wurde der Ansatz auf Eis, bis zum erneuten Festwerden der Agarose, heruntergekühlt und die Ligation bei 4°C für 1-3 Tage durchgeführt. Aufgrund einer reduzierten Molekülbewegung bei niedriger Temperatur und dem Auftreten zum Teil erhöhter und zum Teil geringer Konzentrationen von Insert- und Vektor-DNA in Subkompartimenten innerhalb der Gelmatrix, kann die Wahrscheinlichkeit des gewünschten Ligationsergebnisses, vor allem im Falle von „blunt-end“ Ligationen oder bei der Ligation großer Vektoren (>10kb), erhöht werden. Zum Entfernen restlicher Ligase von der DNA sowie zum Schmelzen der „low-melting“ Agarose im Falle der „In-Gel“ Ligation, wurden die Ligationsansätze, nach Ablauf der Ligationsreaktion, kurz aufgeköcht (5 min, 70°C). 5µl des Ansatzes wurden anschließend in kompetente Bakterien transformiert, amplifizierte Vektoren einzelner Kolonien isoliert (Minipräparation, siehe Kap. 2.2.1.2) und der korrekte Insert-Einbau über DNA-Sequenzanalyse überprüft. Um die Qualität des linearisierten Vektors zu überprüfen, wurde stets ein Ligationskontroll-Ansatz, ohne Zugabe des Inserts, mitgeführt. Da nur geschlossene Ring- bzw. Plasmid-DNA effektiv in Bakterien transformiert und anschließend exprimiert werden kann, sollte die Transformation der Ligationskontrolle keine Bakterienkolonien hervorbringen. Eine niedrige Qualität der eingesetzten Vektoren, in Folge einer ineffizienten Restriktion (z.B. ineffizientes Schneiden des Plasmids an zwei Stellen beim Endonuklease-Doppelverdau) oder ineffizienter Dephosphorylierung der Restriktionsenden, führt jedoch zu deren Religation durch die T4-Ligase. Wurde ein Wachstum von Bakterienkolonien nach der Transformation des Ligationsansatzes festgestellt (> 10 Kolonien pro Ø 10 cm Schale), erfolgte eine Wiederholung der Vektor-Restriktion, Dephosphorylierung und Aufreinigung.

2.2.1.8.6 SUBKLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN ÜBER DAS TOPO-TA-CLONING KIT

Die *Taq*-Polymerase besitzt neben ihrer Polymeraseaktivität eine Template unabhängige terminale Deoxyadenosin-Transferase-Aktivität. PCR-Produkte einer *Taq*-Polymerase haben daher überhängende 3'-Adenosin-Enden, was für eine Ligation in einen Zielvektor mit überhängenden 3'-Thymidin-Enden wie z.B. den pCR2.1-TOPO Vektor genutzt werden kann. Durch eine gebundene Topoisomerase-I mit Ligase-aktivität an den überhängende 3'-T-Enden des pCR2.1-TOPO Vektors ist eine sehr effiziente Ligation möglich. Die Ligation wurde bei RT für 5 bis 30 min durchgeführt. Die Transformation der ligierten DNA-Fragmente erfolgte anschließend in chemisch kompetente TOP10F' Bakterien. Nach Amplifikation und Isolation des TOPO Vektors im präparativem Maßstab, konnten in der Folge effiziente Mengen des

Material & Methoden

gewünschten DNA-Fragments über Restriktionsverdau ausgeschnitten, extrahiert und für nachfolgende Ligation in den Ziel-Vektor verwendet werden.

<u>TOPO-Klonierungsansatz:</u>	1-4 µl	PCR-Produkte
	1 µl	Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl ₂)
	0,5-1 µl	pCR2.1-TOPO-Vektor
	Ansatz mit Aqua bidest auf 6 µl aufgefüllt	

2.2.1.9 RNA-ISOLATION & CDNA-SYNTHESE (REVERSE TRANSKRIPTION)

2.2.1.9.1 RNA-ISOLATION

In dieser Arbeit wurde die Isolation der Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien zur Analyse der Expression von Stat5-Zielgenen durchgeführt. Hierfür wurde das RNA-Extraktions-Kit „NucleoSpin RNA II“ von Macherey-Nagel, gemäß den Herstellerangaben, verwendet. Nach dem Waschen der Zellen (1×10^6 bis 5×10^6 Zellen pro Isolation) mit PBS, erfolgte ein Zellaufschluss mit einem speziellen Lysepuffer und β -Mercaptoethanol. Der Lysepuffer beinhaltet denaturierende, chaotrope Salze (Guanidiniumthiocyanat), wodurch u.a. sämtliche RNasen inaktiviert werden. Nach der Bindung sämtlicher Nukleinsäuren an eine hydrophile Silica-Säulenmatrix, erfolgte ein Abbau der DNA durch Zugabe einer rDNase-Lösung. Salze und makromolekulare Zellbestandteile wurden nach wiederholten Waschschritten mit verschiedenen Puffern entfernt und die reine RNA konnte in einem geringen Volumen (30-50 µl) RNase freiem dH₂O eluiert werden. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch am NanoDrop UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND1000) (siehe Kap. 2.2.1.3).

2.2.1.9.2 CDNA-SYNTHESE

Die Umwandlung der isolierten RNA in komplementäre cDNA mittels reverser Transkription wurde mit dem SuperScript III - Reverse Transkriptase Kit von Invitrogen, gemäß den Herstellerangaben, durchgeführt. Mit dem Kit lassen sich pro Ansatz RNA-Mengen von 1 pg bis 5 µg in cDNA umwandeln. Um den anschließenden analytischen Vergleich von Stat5 Zielgenen unterschiedlicher Proben zu gewährleisten, wurden innerhalb einer Versuchsreihe gleiche RNA-Mengen (zwischen 100ng bis 5 µg) eingesetzt. Als Primer für die Initiation der cDNA Synthese wurden unspezifische, randomisierte Hexamere verwendet. Nach Abschluß der cDNA Synthese wurden sämtliche RNA-Templates im Reaktionsansatz durch Zugabe einer RNase (RNase H) und einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C abgebaut. Dies erhöht die Genauigkeit für nachfolgende quantitative Analysen (z.B. qRT-PCR).

2.2.1.10 REAL-TIME PCR (QPCR)

Die „Real-Time“ oder „quantitative“ PCR (qPCR) ist eine hochspezifische und sensitive Methode, die es erlaubt bestimmte DNA-Sequenzen, gemäß dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe Kap. 2.2.1.7), zu amplifizieren und simultan in Echtzeit zu quantifizieren. Wird DNA als Template eingesetzt, spricht man von qPCR. Bei dem Nachweis von RNA-Transkripten wird cDNA eingesetzt, hier spricht man von RT-qPCR oder qRT-PCR (quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion). Die Methode beruht auf der Detektion von Fluoreszenzsignalen am Ende eines PCR-Zyklus, welche durch die Verwendung von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (SYBR-Green, Ethidiumbromid) oder spezifischer fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide (DNA-Sonden) abgegeben werden. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge amplifizierter PCR-Produkte zu, weshalb sich unter anderem quantitative Aussagen über mRNA-Templates bestimmter Gene treffen lassen. So wurde in dieser Arbeit die qRT-PCR genutzt um Unterschiede in der Expression von Stat5-Zielgenen auf mRNA-Ebene, in Abhängigkeit einer Intervention mit der Stat5-DNA-Bindeaktivität, zu analysieren. Für die Durchführung wurden spezifische Primer für cDNA-Templates von Stat5-Zielgenen (siehe Primerliste 2.1.7.4) und CYBR-Green als fluoreszierender DNA-Marker eingesetzt. Über Schmelzkurvenanalysen wurde die Sequenzspezifität der Primer überprüft und die Bildung unspezifischer Amplifikate ausgeschlossen. Die Messungen erfolgten am LightCycler 480 II Real-Time PCR-System von Roche Diagnostics.

qRT-PCR-Reaktionsansatz:

1 µl	cDNA-Template (1:2 bis 1:20 verdünnt)
10 µl	2x CYBR-Green/Polymerase Mix [Fermentas]
0,5 µl	Forward Primer (10 µM)
0,5 µl	Reverse Primer (10 µM)
Ansatz mit Aqua bidest auf 20 µl aufgefüllt	

qRT-PCR-Protokoll:

1. Initiale DNA Denaturierung	5 min	95°C
2. PCR (40 Zyklen)		
DNA-Denaturierung	15 sec	95°C
Primer Hybridisierung	20 sec	60°C
Elongation	40 sec	72°C
3. Schmelzkurvenanalyse	5 min	65-95°C
4. Herunterkühlen	∞	40°C

2.2.2 DAS HEFE-ZWEI-HYBRID-SYSTEM (YEAST-2-HYBRID SYSTEM)

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System dient dem Nachweis von Protein-Protein Interaktionen unter intrazellulären Bedingungen in Hefe-Zellen (Colas & Brent, 1998). Mit diesem Verfahren lassen sich große Mengen unterschiedlicher Proteine oder Peptide, welche durch Expressionsplasmide („Library-Vektoren“) in die Hefen eingebracht werden, auf ihre Fähigkeit der Interaktion mit bestimmten Protein-Zielstrukturen (komplettes zu untersuchendes Protein oder Domänen dieses Proteins) analysieren. Da dieses Verfahren das Messen von Protein-Interaktionen unter *in vivo* Bedingungen ermöglicht, eignet es sich besonders für die Identifikation von Protein-Interaktionspartnern intrazellulärer Proteine. Den zentralen Bestandteil des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems bilden dimere Transkriptionsfaktoren, bestehend aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transaktivierungsdomäne. Diese Domänen können getrennt voneinander vorliegen und es bedarf lediglich einer räumlichen Nähe um einen aktiven Transkriptionsfaktor zu bilden. Diese Tatsache macht man sich zu nutze, indem man zu untersuchende Proteine mit beiden Domänen fusioniert. Finden Protein-Protein-Wechselwirkungen statt, führt dies zur Ausbildung eines aktiven Transkriptionsfaktors, welcher die Expression bestimmter Reportergene (Gene für die Biosynthese von Aminosäuren oder Nukleotiden, LacZ) antreibt. Erstmals beschrieben wurde dieses System 1989 von Fields & Song (Fields & Song, 1989) unter Verwendung des Transkriptionsfaktor GAL4 aus *S. cerevisiae*, welcher auch heute noch mehrheitlich verwendet wird. Die DNA-bindenden Tet- oder LexA-Repressorproteine in Kombination mit dem als Transkriptions-Aktivator wirkenden VP16 Protein des Herpes Simplex Virus, sind Beispiele weiterer Domänen, welche über die Interaktion fusionierter Proteine, einen aktiven Transkriptionsfaktor bilden können. Zur Initiation der Protein-Interaktionsmessung müssen zwei Expressionsvektoren, auf denen die Fusionskonstrukte kodiert vorliegen in die Hefezellen transformiert werden. Die Protein-Zielstrukturen („Target-Proteine“), gegen welche im Hefe-Zwei-Hybrid Screen die Identifikation eines Protein-Interaktionspartners erfolgt, werden dabei mit der DNA-Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Diese Fusionsproteine bilden das sogenannte „Köder-Protein“ oder „Bait-Protein“ („Bait-Konstrukt“). Die auf eine Interaktion zu untersuchende Peptidbibliothek („Peptid-Library“) wird C-terminal mit der Aktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert („Beute-Protein“ bzw. „Prey-Protein“, „Prey-Konstrukt“) und über die Hefe-Zwei-Hybrid Library-Vektoren exprimiert.

Für die Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde der *S. cerevisiae* Stamm KF1 verwendet (Butz et al., 2000; James et al., 1996). Zur Auswertung einer Gal4-Transkriptionsaktivität verfügt dieser Hefestamm über verschiedene Reportergene. Dies sind

zum einen essentielle Gene für die Biosynthese von Histidin, Adenin und Uracil (HIS3, ADE2, URA3) und zum anderen das LacZ-Gen zur Expression der β -Galaktosidase. Nur Hefezellen in denen Gal4 über eine Proteininteraktion aktiv transkribiert, sind in der Lage auf Selektionsmedien (ohne Histidin, Adenin oder Uracil) zu überleben und zu wachsen, was die Identifikation und Isolation von Protein-Bindungspartnern aus einer Peptidbibliothek ermöglicht.

2.2.2.1 PLASMID-TRANSFORMATION IN HEFE-ZELLEN (*S. CEREVISIAE*)

Für die Transformation von Plasmiden in Hefen wurde zunächst eine 5 ml YPD-Vorkultur mit einer Hefekolonie (KF1-Stamm, *S. cerevisiae*) angeimpft und bei 30°C über Nacht unter schütteln (200 rpm) herangezogen. Wurden die Hefen zuvor bereits mit einem der beiden Vektoren des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems transformiert, so wurde die Vorkultur, entsprechend dem Hefe-Selektionsmarkergen des Vektors (siehe Kap. 2.1.6.1), in SD-Selektionsmedium angefertigt. Am darauffolgenden Tag wurde aus der Vorkultur eine 10-20 ml Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,1-0,2 angesetzt und bis zu einer OD_{600} = 0,5-0,6 herangezogen, was, wie im Falle einer bakteriellen Flüssigkultur, den für eine Transformation optimalen Zustand exponentiellen Wachstums entspricht. Pro Transformationsansatz wurde 1 ml der Hefekultur abzentrifugiert (3.500xg; 4°C; 5 min). Zur Vorbereitung der Transformation wurde das Zellpellet in 50 μ l LiAc/TE-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 30°C unter schütteln inkubiert.

Transformationsansatz:

- 1 μ g Plasmid-DNA
- 50 μ l Hefesuspension
- 5 μ l (50 μ g) „Carrier“ DNA (Herring Testes – Yeastmaker™, Clontech)
- 300 μ l LiAc/TE/PEG Puffer

Der Transformationsansatz wurde erneut für 30 min bei 30°C unter schütteln inkubiert, ehe ein 15minütiger Hitzeschock bei 42°C durchgeführt wurde. Die Zellen wurden anschließend zur Stabilisierung in 1 ml SD-Selektionsmedium aufgenommen und für weitere 30 min bei 30°C inkubiert, bevor sie auf dem entsprechenden SD-Selektionsagar ausplattiert wurden (ca 50 μ l abzentrifugierte Hefesuspension). Die Hefekolonien wurden für 2-4 Tage bei 30°C herangezogen.

2.2.2.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS HEFE-ZELLEN (*S. CEREVISIAE*)

Für die Isolation der „Bait-“ & „Prey-“ Expressionsplasmide aus den Doppel-transformierten KF1-Zellen wurde zunächst eine 5 ml SD-LT Flüssigkultur mit dem entsprechenden Hefeklon angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln herangezogen. Nach der Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation (3600 x g, 5 min, 4°C) erfolgte die Plasmidisolation entweder über das „Easy Yeast Plasmid Isolation“ – Kit [Clontech], oder über folgendes Protokoll zur Isolation

genomischer und Plasmid-DNA aus Hefen. Die pelletierten Zellen wurden in 200 µl Hefelysepuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss überführt. Nach Zugabe von 300 mg Glasperlen (\emptyset 425-600 µm) und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) wurden die Hefen durch 2-minütiges vortexen aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat abzentrifugiert (14.000 x g, 5 min, 4°C) und die nukleinsäurehaltige, obere wässrige Phase (ca. 150-200 µl) in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In einem zweiten Extraktionsschritt wurde das gleiche Volumen (150-200 µl) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) erneut hinzugegeben, die Proben gevortext und erneut abzentrifugiert (14.000 x g, 5 min, 4°C). Die nukleinsäurehaltige, wässrige Phase wurde erneut abgenommen (150-200 µl), in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von Natriumacetat [10% (v/v) 3 M NaAc (pH: 5)] und der 2-fachen Menge an eiskaltem Ethanol [100% EtOH, -20°C] durch leichtes Schwenken präzipitiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei -20°C wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (14.000 x g, 20 min, 4°C) und mit 500 µl 70% EtOH, nach Abnahme des Überstands, gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (14.000 x g, 5 min, 4°C) wurde die präzipitierte DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in Abhängigkeit von der Pelletgröße in 50-100 µl TE-Puffer mit RNase A (Endkonzentration: 1 µg/µl), unter schütteln, bei 37°C (30-60 min) gelöst. Die in dem Hefe-Gesamt-DNA-Extrakt enthaltenen Plasmide wurden in der Folge in Top10F' *E.coli* transformiert, über Kanamycin (pGBKT7 Bait-Expressionsvektor) und Ampicillin (pGADT7 Prey-Expressionsvektor) selektioniert und nach anschließender Amplifikation und Extraktion sequenziert.

2.2.2.3 DER HEFE-ZWEI-HYBRID SCREEN

Der Hefe-Zwei-Hybrid Screen umfasst folgende Arbeitsschritte:

1. Konstruktion des Bait-Konstrukts: Klonierung des Target-Proteins als Fusionsprotein mit der Gal4-DBD im Bait-Expressionsvektor [pGBKT7: Matchmaker™ GAL4, Clontech]
 - Überprüfung der Bait-Expression
 - Ausschluss einer Reporter-gen-Autoaktivierung durch das Bait-Konstrukt
2. Konstruktion der Prey-Konstrukte: Klonierung einer cDNA- oder synthetischen Oligonukleotid-Library als Fusionsproteine mit der Gal4-AD im Prey-Expressionsvektor [pGADT7: Matchmaker™ GAL4, Clontech]
 - Transformation der Library-Vektoren in *E.coli*
 - Amplifikation der Library-Vektoren durch Ausstreichen der *E.coli* auf Agarplatten
 - Isolation der amplifizierten Library-Vektoren durch Giga-Präp (siehe Kap. 2.2.1.2)

3. „Library-Scale“- Hefetransformation & Library Screen
4. Isolation der Vektoren positiv selektionierter Hefe-Klone & DNA-Sequenzierung des Prey-Konstrukts
5. Validierung der Proteininteraktion durch Hefe-Zwei-Hybrid Protein-Interaktionsassays

Die Ergebnisse der einzelnen Schritte für den in dieser Arbeit durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid Screen sind im Ergebnisteil (Kap. 3.2.1) zusammengefasst.

2.2.2.3.1 „LIBRARY SCALE“-HEFETRANSFORMATION & LIBRARY SCREEN

Die Transformation der Library-Vektoren in die Hefezellen und anschließende Ausplattierung auf SD-Selektivagar im „Library scale“-Format, erfolgte nach Protokoll-Angaben des Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid Systems 3 von Clontech. Hierbei wurden die Hefe-Zellen zunächst mit dem Bait-Expressionsvektor transformiert. Mehrere Kolonien Bait-exprimierender KF1-Hefe wurden anschließend in einer 150 ml Vorkultur mit SD-T Selektionsmedium über Nacht bei 30°C und unter schütteln (200 rpm) herangezogen. Anschließend wurde mit der Hefesuspension eine 1 Liter SD-T Hauptkultur angefertigt. Die Hefe wurde in der Hauptkultur bei 30°C und unter schütteln bis zu einer $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ herangezogen (ca. 3-4 h) und anschließend abzentrifugiert (1000 x g; 5 min; RT). Der Mediumüberstand wurde abgenommen, die pelletierte Hefe zum waschen in 500 ml sterilem Aqua bidest resuspendiert und erneut abzentrifugiert (1000 x g; 5 min; RT) und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Hefe-Zellen in 8 ml frisch hergestelltem LiAc/TE-Puffer resuspendiert. Für die Transformation der Prey-Expressionsvektoren konnten die nun kompetenten Hefezellen in folgendem Transformationsansatz eingesetzt werden.

„Library Scale“-

Transformationsansatz:

- 500 µg Prey-Expressionsvektoren (Library-Vektoren)
- 8ml LiAc/TE-Hefesuspension
- 20 mg „Carrier“ DNA (Herring Testes – Yeastmaker™, Clontech)
- 60 ml LiAc/TE/PEG Puffer

Der Transformationsansatz wurde durch intensives Vortexen gemischt und für 30 min bei 30°C unter schütteln (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 7 ml DMSO hinzugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und ein 15minütiger Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad durchgeführt. Währenddessen wurde der Ansatz im Abstand von 5 min durch leichtes Schwenken erneut gemischt. Nach einer 2minütigen Abkühlung auf Eis wurde der Ansatz abzentrifugiert (1000 x g; 5 min; RT), der Überstand verworfen und die transformierten Hefezellen in 10 ml TE-Puffer [1x] resuspendiert. Die transformierten Hefe-Zellen wurden gemäß den Protokollangaben auf 50 SD-

Material & Methoden

Selektivagarplatten (145 mm Ø) zu je 200 µl ausgestrichen und die Hefe-Kolonien für 4 Tage bei 30°C herangezogen. Für die Bestimmung der Transformationseffizienz wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) der doppelt transformierten KF1-Zellen in TE-Puffer angefertigt und zu je 200 µl auf SD-LT Selektivagar ausgestrichen. Die Transformationseffizienz wird als die Anzahl gewachsener Zellkolonien pro µg transformierten Plasmids angegeben [„colony forming units per µg“: cfu/µg] und berechnet sich wie folgt:

$$\text{cfu}/\mu\text{g}: \frac{\text{Anzahl Kolonien} \times \text{totales Suspensionsvolumen}}{\text{ausplattiertes Suspensionsvolumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{transformierte Plasmidmenge}}$$

2.2.2.3.2 ISOLATION DER VEKTOREN POSITIV SELEKTIONIRTER HEFE-KLONE & DNA-SEQUENZIERUNG DES BEUTE-PROTEINS („PREY“)

Die auf Selektivagar gewachsenen bzw. selektionierten Hefeklone wurden zunächst zur Sicherung auf SD-LT Agar ausgestrichen, ehe eine Verifikation der Protein-Interaktion über den Tropfplattentest (siehe Kap. 2.2.2.3.3) erfolgte. Konnte eine vielversprechende Protein-Interaktion, aufgrund des Wachstums eines Hefeklons auf den verschiedenen Selektivmedien, in Folge einer Reporter-gen Expression, bestätigt werden, wurden die Plasmide isoliert, die Bait- und Prey-Vektoren über Kanamycin- und Ampicillin-Selektion in Bakterien separiert und die DNA-Sequenz des Prey-Konstrukts analysiert. Aufgrund fehlerhafter Klonierungen auftretende falsch positive Screening-Ergebnisse wurden verworfen. Hierzu zählten verkürzte oder fusionierte Sequenzen des Prey-Konstrukts, welche unspezifische Affinitäten mit dem Bait-Protein bzw. der Gal4-DBD aufwiesen. Positiv selektionierte Prey-Konstrukte wurden im Anschluss, zur erneuten Verifikation der Protein-Interaktionsstärke mit der Bait-Domäne, über Hefe-Reporter-gen-Tests analysiert.

2.2.2.3.3 NACHWEIS DER PROTEIN-INTERAKTIONSTÄRKE DURCH DAS ANFERTIGEN VON TROPFPLATTEN

Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid Tropfplatten-Testverfahren lassen sich quantitative Aussagen hinsichtlich potentieller Protein-Protein Interaktionen treffen. So wurden im Falle dieser Arbeit, im Anschluss an den Hefe-Zwei-Hybrid Library Screen, pGADT7-Library-Vektoren mit positiv selektionierter Peptidaptamer-Sequenz zusammen mit dem entsprechenden Bait-Vektor in KF1-Hefen co-transformiert und analysiert. Eine 3 ml SD-LT Vorkultur wurde anschließend mit einer Kolonie doppelt transformierter KF1-Hefe angeimpft und über Nacht (30°C, 200 rpm) herangezogen. Am darauffolgenden Tag wurde die Hefekultur auf eine $OD_{600} = 0,5$ mit sterilem

Aqua bidest eingestellt (Volumen: 1-2 ml). Die Hefen wurden anschließend um 3 log-Stufen mit Aqua bidest verdünnt (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Zu je 5 μ l Tropfen wurde die $OD_{600} = 0,5$ Ausgangssuspension sowie die Verdünnungen auf den 4 Selektivagarplatten (SD-LT, SD-LTH, SD-LTA, SD-LTU) aufgetragen. Nach 4 Tagen Inkubationszeit bei 30°C wurde die Intensität des Hefe-Wachstums, als Folge einer Reporter-gen-Aktivierung, per Foto dokumentiert. Als Kontrolle wurden Bait- und Prey-Vektoren des Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid Systems 3 von Clontech verwendet, welche im Falle der Positivkontrolle für den Tumorsuppressor p53 und das stark interagierende Large-T Onkogen des SV40 Virus kodieren. Im Falle der Negativkontrolle wird p53 durch das nukleäre Strukturprotein Lamin C ersetzt. Als weitere Kontrollen wurden jeweils die reine Gal4-DNA-Bindedomäne mit den Prey-Konstrukten, sowie die reine Gal4-Aktivierungsdomäne mit dem jeweiligen Bait-Konstrukt in die Hefen co-transformiert. Dies diente der Detektion eventueller Autoaktivierungen und somit dem Ausschluss von Protein-Protein Interaktionen, welche nicht auf den zu analysierenden Proteinen beruhen.

2.2.2.3.4 NACHWEIS DER PROTEIN-INTERAKTIONSTÄRKE ÜBER DIE B-GALACTOSIDASE-AKTIVITÄT

Die Expression der β -Galactosidase über den *lacZ*-Reporter bietet eine weitere Möglichkeit der Quantifizierung von Protein-Wechselwirkungen durch das Hefe-Zwei-Hybrid System. Für den in dieser Arbeit durchgeführten photometrischen β -Galactosidase-Test wurden für eine Dreifachbestimmung zunächst 3 x 3 ml SD-LT Selektionsmedium mit jeweils einer Kolonie doppeltransformierter Hefe angeimpft und über Nacht bei 30°C, unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Hefesuspension bestimmt. Im Falle von OD_{600} -Werten $\leq 1,2$ wurden 2 ml der Hefekultur entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Lagen die OD_{600} -Werte darüber wurden 1 ml Hefekultur entnommen. Die Hefen wurden anschließend abzentrifugiert (5000 rpm; 10 min; RT), der Überstand vollständig abgenommen und die pelletierte Hefe in 1 ml Z-Puffer, inklusive frisch zugegebenem 2,7 μ l β MeEtOH, resuspendiert. Im Anschluss erfolgte ein Zellaufschluss durch 1 min Schockfrostung in flüssigem Stickstoff. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 30°C im Wasserbad aufgetaut und nach Zugabe von je 200 μ l frisch angesetzter ONPG-Substrat-Lösung (4mg ONPG in 1 ml A-Medium) die β -Galactosidase vermittelte Hydrolyse zu Galaktose und o-Nitrophenol im 30°C Wasserbad gestartet. Gebildetes o-Nitrophenol verursacht einen detektierbaren gelben Farbumschlag. Für die spätere Blank-Messung wurden 1 ml Z-Puffer mit 200 μ l ONPG-Lösung versetzt und mit inkubiert. Die Zugabe der ONPG-Substrat-Lösung markiert den Startpunkt der Messung. Sobald ein Farbumschlag ins hellgelbe feststellbar war, wurde die

Material & Methoden

Reaktion durch die Zugabe von 500 µl Stop-Lösung beendet. Zur abschließenden Auswertung wurde die Dauer bis zum Farbumschlag für jede einzelne Probe notiert (maximale Inkubationsdauer = 2h). Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (12.000 rpm; 1 min; RT) und 1 ml des Überstandes in eine Küvette überführt. Die Quantifizierung gebildeten o-Nitrophenols erfolgte über die Messung der Extinktion bei 420 nm. Die Messung des Blank-Wertes sollte nicht höher als 1 und damit im linearen Bereich liegen. Die Angabe der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte in Miller Units [MU] und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MU} = 1000 \times \frac{E_{420 [\text{o-Nitrophenol}]}}{\text{Reaktionszeit } t [\text{min}] \times \text{OD}_{600 [\text{Hefekultur}]} \times \text{verwendetes Hefekultur-Volumen } V [\text{ml}]}$$

Wie auch im Falle der Durchführung des Tropfplatten-Tests, wurde p53 und Large-T Onkogen exprimierende KF1-Hefe als Positivkontrolle, LaminC und Large-T Onkogen exprimierende KF1-Hefe als Negativkontrolle, sowie die Autoaktivierungskontrollen für die Gal4-DBD und Gal4-AD im Versuch mitgeführt.

2.2.3 ZELLKULTUR- & VIROLOGISCHE METHODEN

2.2.3.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLINIEN

Alle verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 98% kultiviert und in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen passagiert, wobei angemessene Verdünnungsverhältnisse zwischen 1/3 - 1/10 verwendet wurden. Die Arbeiten mit Zellen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Vor jeder Verwendung erfolgte eine mikroskopische Betrachtung der Zellen, um den Konfluenzgrad, die Morphologie und eine mögliche Kontamination der Zellen beurteilen zu können. Dem jeweiligen Experiment entsprechend wurden die Zellen auf eine bestimmte Zelldichte bzw. -zahl ausgesät. Arbeiten mit Viren wurden unter den gentechnischen Sicherheitsbedingungen der Stufe S2 und biologischen Sicherheitsbedingungen L2 durchgeführt.

Zellzahlbestimmung:

Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Hämozytometer). Suspensionszellen wurden dafür zunächst durch resuspendieren vereinzelt, sowie adhärenente Zelllinien durch Trypsin/EDTA je nach Größe der verwendeten Zellkulturschale

mit Medium verdünnt. Für die Bestimmung der relativen Zellzahl (Zellen pro ml) wurden die Zellen unverdünnt oder in Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Berechnung erfolgte über das definierte Volumen von 0,1 µl eines Großquadrates der Neubauer-Zählkammer (4-8 Großquadrate wurden pro Zelllinie bzw. Probe ausgezählt).

$$\text{rel. Zellzahl [Zellen pro ml]} = \text{Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde der Wert der relativen Zellzahl pro ml auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension hochgerechnet. Die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen erfolgte über die Trypanblau-Färbung. Das Prinzip des Trypanblau-Ausschlusstest beruht auf der Tatsache, dass nur Membranen toter Zellen für den Farbstoff durchlässig sind und die toten Zellen, aufgrund der anschließenden Bindung an zytosolische Proteine, bei einer Betrachtung im Lichtmikroskop blau erscheinen.

Einfrieren und Auftauen von Zelllinien:

Für die Aufbewahrung und Lagerung von Zelllinien bei -80°C oder in Flüssigstickstoff wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Zentrifugation pelletiert [3-5min; 1.300-1.500 rpm] und in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) aufgenommen. Adhärente Zellen wurden, nach dem Waschen mit PBS, dafür zunächst durch Zugabe von Trypsin (1ml pro 10cm Ø Kulturschale) abgelöst und in 5-10ml Zellkulturmedium aufgenommen. Suspensionszellen wurden abzentrifugiert, zum Waschen in PBS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Nach der Aufnahme und Resuspension der Zellen im Einfriermedium erfolgte eine Aliquotierung zu 1 ml in Kryoröhrchen. In einem mit Isopropanol als Kühlmittel gefüllten Einfriercontainer wurden die Zellen bei -80°C schonend eingefroren oder direkt in Flüssigstickstoff schockgefroren. Zur Inkulturnahme eingefrorener Zellen wurden diese nach dem Auftauen sofort in Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert und der Überstand, zum Entfernen des zytotoxischen DMSO abgesaugt. Das Zellpellet wurde zur Kultivierung in dem entsprechenden Nährmedium aufgenommen und in Kulturschalen bzw. Kulturflaschen ausgesät.

2.2.3.2 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN DURCH LIPOFEKTION

Die Lipofektion, als eine spezielle Form der Transfektion, umschreibt den Transfer von Fremd-DNA (z.B. Plasmid-DNA) oder -RNA in eukaryotische Zellen über Liposome bzw. Lipid-Vesikel. Hierfür wurde die Lipfectamine®LTX Transfektions-Reagenz von Life Technologies-Invitrogen

verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Transfektion mit Lipofectamine wurden in 24-Well Platten mit adhären Zellen durchgeführt, wobei in Abhängigkeit von der Wachstumsrate der Zelllinie am vorherigen Tag $8 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät wurden, sodass die Zellen für die Transfektion eine Konfluenz von 70 – 80 % aufwiesen. Die Menge an transfizierter Plasmid-DNA variierte zwischen 0,5 – 3 µg pro 24-Well und die Reaktion wurde in Serum-reduziertem Opti-MEM® Medium durchgeführt. Für die Analyse der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit dem pEGFP-1-Kontrollplasmid [Takara-Clontech] in separaten Wells cotransfiziert.

2.2.3.3 PRODUKTION LENTIVIRALER PARTIKEL & LENTIVIRALER GENTRANSFER

Der stabile Transfer von fremdem genetischem Material in eukaryontische Zielzellen, erfolgte über die Transduktion mit lentiviralen Partikeln (shRNA und Peptidaptamer-Gentransfer). Als eine Gattung der Retrovirus-Familie sind Lentiviren in der Lage auch teilungsinaktive, postmitotische und langsam teilende Zellen zu infizieren, was die Effizienz des viralen Gentransfers entscheidend erhöht. Aus Gründen der biologischen Sicherheit wurden, gemäß den S2-Sicherheitsanforderungen, replikationsinkompetente lentivirale Partikel hergestellt. Replikationsinkompetente Viren sind nach Infektion (Transduktion) und Integration in das Genom der Wirtszelle nicht in der Lage neue Viruspartikel zu bilden. Am 5' und 3' Ende durch Long Terminal Repeat (LTR) Regulations- und Integrationssequenzen flankiert, setzt sich das Genom von Lentiviren (wie auch aller Retroviren) aus dem *gag*-Gen („group-specific antigen“), zur Expression von Kapsid-, Nukleokapsid- und Matrix-Strukturproteinen, dem *pol*-Gen, zur Expression retro- bzw. lentiviraler Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease) und dem *env*-Gen zur Expression der (Glyko-) Proteine der äußeren Virushülle („envelope“) zusammen. Zusätzlich verfügen Lentiviren über verschiedene akzessorische Gene (*rev*, *tat*, *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr*), welche ebenfalls an der Regulation des lentiviralen Replikationszyklus beteiligt sind. Für die Generierung replikationsinkompetenter Lentiviren wird das virale Genom auf 3 Plasmide (3-Plasmid System: „Envelope“-Plasmid, „Packaging“-Plasmid, Transfer-Plasmid) aufgeteilt und nicht-essentielle akzessorische Gene entfernt (Zufferey et al., 1998). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten lentiviralem Vektorsystem kodiert das „Packaging“-Plasmid (pCMVΔR8.91) für die *gag*- und *pol*-Gene sowie die für die virale Replikation und Expressionsregulation essentiellen *rev*- und *tat*-Gene, abgeleitet aus dem HIV-1 Genom. Das „Envelope“-Plasmid (pMD2.VSV-G) kodiert für die äußere Virushülle des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G), wodurch erhöhte physikalische Stabilität und ein erweitertes Wirtsspektrum (Tropismus) erzielt wird. VSV-G pseudotypisierte lentivirale Vektoren bieten die Möglichkeit der Transduktion nahezu aller

Zelltypen. Das Transfer-Plasmid kodiert für das relevante Transgen, sowie für essentielle cis-regulatorische Elemente, welche die Verpackung, Reverse Transkription, Integration und Transgenexpression vermitteln (ψ , LTRs, cPPT, RRE, WPRE). Die in dieser Arbeit eingesetzten Transfer-Vektoren (LeGO-G und pSiEW) sind vom HIV-1 Virus abgeleitet. Da die *gag*, *pol*, *env*, *rev* und *tat* Gene auf dem Transfer-Plasmid fehlen, ist die zu transduzierende Zielzelle später nicht in der Lage neue Viruspartikel zu produzieren. Zusätzlich besitzen diese Vektoren eine sogenannte SIN-Konfiguration („self-inactivating“). SIN-Vektoren zeichnen sich durch eine Deletion von Promotor und Enhancer-Sequenzen innerhalb der 3' LTR-U3 Region aus. Während der reversen Transkription wird die Δ 3'LTR-U3 Sequenz auf das 5' Ende übertragen, wodurch eine transkriptionelle Aktivität beider LTR-Regionen verhindert wird. Dadurch wird eine alleinige Expression des über einen eigenen Promotor gesteuerten Transgens und nicht der kompletten proviralen DNA, nach Integration ins Wirtsgenom, sichergestellt. Zusätzlich wird durch die Deletion der viralen LTR-Elemente das Risiko einer aberranten Expression von Genen, welche sich in unmittelbarer Nähe der Integrationsstelle befinden, minimiert (Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998). Nach transienter Transfektion der 3 Plasmide in eine Virus-produzierende Verpackungszelllinie werden die replikationsinkompetenten lentiviralen Partikel hergestellt (Dull et al., 1998; Naldini et al., 1996). Durch die Aufteilung des viralen Genoms auf 3 Plasmide wird in der Verpackungszelllinie zusätzlich die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination, und dem damit verbundenem Risiko der Bildung replikationskompetenter Viruspartikel, minimiert. Das Verfahren zur Herstellung der in dieser Arbeit für Transduktionsexperimente eingesetzten VSV-G pseudotypisierten lentiviralen SIN-Vektoren wird im Folgenden erläutert.

2.2.3.3.1 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON 293T ZELLEN DURCH CALCIUMPHOSPHAT-PRÄZIPITATION

Für die Verpackung lentiviraler Partikel wurden routinemäßig 293T-Zellen verwendet. Als modifizierte HEK293 Zellen exprimieren diese Zellen das SV40 „large T-Antigen“, was eine episomale Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung und entsprechendem Promotor, wie im Falle der verwendeten Verpackungsplasmide, ermöglicht und die Produktion viraler Partikel steigert. Die Drei-Plasmid-Transfektion in die 293T-Zellen erfolgte über das Verfahren der Kalziumphosphat-Präzipitation. Die Plasmid-DNA bindet dabei an präzipitierte Kalziumphosphat-Kristalle, welche über Endozytose durch die Zellen aufgenommen werden (Kingston et al., 2003). Pro Transfektionsansatz wurden 5×10^6 293T-Zellen 24 Stunden vor der Transfektion, bzw. 1×10^6 293T-Zellen 72 Stunden vor der Transfektion, in T75 Zellkulturflaschen (75 cm^2) ausgesät. Je nach der gewünschten Menge an Virusüberstand wurden 1-3 T75 Flaschen

Material & Methoden

pro Transfektionsansatz ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde der Kulturüberstand gegen 10 ml frisches DMEM-Medium mit Chloroquin (Endkonzentration: 10 μ M) ausgetauscht. Unter sterilen Bedingungen wurde folgender Transfektionsansatz pipettiert (Angaben je Zellkulturflasche):

10 μ g Transfer-Plasmid [pSiEW; LeGO-G]
6,5 μ g Packaging-Plasmid [pCMV Δ R8.91]
3,5 μ g Envelope-Plasmid [pMD2.VSV-G]
50 μ l CaCl₂ (2,5 M)
Ansatz mit Aqua bidest auf 500 μ l aufgefüllt

Unter konstantem Mischen des Ansatzes (Vortexen oder Aufblubbern der Lösung mittels Aspirationspipetten) erfolgte im Anschluss die Präzipitation durch tropfenweise Zugabe des gleichen Volumens 2x HBS Puffer (500 μ l pro Zellkulturflasche). Der Ansatz wurde für 30 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert, je 1 ml einer Zellkulturflasche hinzugegeben und unter schwenken im Chloroquin-haltigem Medium verteilt. Nach 24 h wurde das Medium, nach dem Waschen der Zellen mit PBS, gegen ein geeignetes Volumen frisches DMEM Medium ausgetauscht (5-8 ml). Nach 48 h wurde der Virus-haltige Mediumüberstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach 72 h wurde der Mediumüberstand erneut abgenommen und mit dem tags zuvor abgenommenen Überstand, welcher bei 4°C gelagert wurde, vereinigt.

2.2.3.3.2 AUFKONZENTRIERUNG LENTIVIRALER PARTIKEL DURCH ULTRAZENTRIFUGATION

Direkt im Anschluss an die Virusproduktion wurden die Lentiviren für die Titer-Bestimmung und Infektion der Zielzellen, sowie für die Lagerung, durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Dafür wurden zunächst grobe Verunreinigungen, wie Zellreste, durch Zentrifugation (4.000 rpm; 3 min; 4°C) aus dem Virus-haltigen Mediumüberstand abgetrennt. Danach wurde der Virusüberstand durch einen 0,22 μ M PVDF-Membran Spritzenfilter gefiltert und in Ultrazentrifugationsröhrchen, zu je maximal 30 ml, überführt. Für ein schonendes abzentrifugieren wurden 5 ml einer 20%igen Sucroslösung (gelöst in PBS), unterschichtend auf den Boden des Zentrifugenröhrchens pipettiert. Nach dem Einsetzen der Zentrifugenröhrchen in die Ultrazentrifugationsbuckets (Ti32) wurde das Gewicht bis auf \pm 0,1 g genau mit PBS tariert und im Anschluss unter Vakuum bei 22.500 rpm (ca. 50.000 x g) und 4°C für 2,5 h ultrazentrifugiert (Beckman L8-60M). Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Viren wurden in sterilem PBS mit 1% BSA (4°C) für mindestens 4 h oder über Nacht bei 4°C gelöst. Im Anschluss wurden die konzentrierten Viren zu 50-80 μ l aliquotiert und bei -80°C weggefroren und/oder für die Bestimmung des Virustiters verwendet.

2.2.3.3.3 TITRIERUNG VON VIRUSPARTIKELN & TRANSDUKTION VON ZIELZELLEN (BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS)

In dieser Arbeit wurde der Virustiter (transduzierende Einheiten/ml) über die Expression von Fluoreszenz-Markergenen, nach Transduktion einer definierten Anzahl von Zielzellen mit unterschiedlichen Verdünnungen konzentrierten Virus bestimmt. Die Titerbestimmung erfolgte mit 293T-Zellen, sowie vereinzelt mit Zelllinien späterer Versuchsreihen. 1×10^5 Zellen wurden pro Well einer 24-Well Platte ausgesät (adhärente Zellen wurden über Nacht zum Anwachsen kultiviert). Im Anschluss erfolgte die Zugabe des konzentrierten Virus zu verschiedenen Wells in Form einer seriellen Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-6} (in 1:10 Schritten; Doppelbestimmung), welche mit Medium angefertigt wurde. Das Totalvolumen pro Well betrug 500 μ l. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Transduktionsexperimente erfolgten im Falle adhärenter Zielzellen unter der Zugabe von Polybren (Endkonzentration: 8 μ g/ml) und im Falle von Suspensionszellen unter der Zugabe von Protaminsulfat (Endkonzentration: 6 μ g/ml). Durch die Abschirmung negativer Oberflächenladungen der Zellmembran verhindern diese polykationischen Verbindungen elektrostatische Abstoßungen zwischen den Viruspartikeln und der Zelloberfläche, was zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz führt (Coelen et al., 1983). Zur weiteren Steigerung der Infektionsrate wurden die Viruspartikel anschließend bei 2000 rpm (ca. 900 x g) und 32°C für 60 min auf die Zielzellen zentrifugiert. Danach wurde der Transduktionsansatz über Nacht (20-24 h) im Brutschrank inkubiert und die Zellen am Folgetag mit frischem Medium versetzt. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte nach 72 h über die Expression des Fluoreszenzmarkers positiv transduzierter Zellen per FACS-Analyse [BD FACSCalibur™ System] (siehe Kap2.2.3.4). In die Auswertung einbezogen wurden die Proben der Virus-Verdünnungsreihe, welche eine Anzahl von ca. 5 bis 20% transduzierten Zellen aufwiesen. Innerhalb dieses Bereichs kann man von Einzelinfektionen pro Zelle, mit dem Vorhandensein einzelner proviraler Kopien, ausgehen. Dies ist für eine genaue Bestimmung der Virusmenge entscheidend, da mehrfach transduzierte Zellen in der Berechnung nicht berücksichtigt werden können und daher zu einer Fehleinschätzung des Virustiters führen. Die Berechnung des Virustiters erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Virustiter [TU/ml]} = \frac{\text{transduzierte Zellen [\%]}}{100 \%} \times \text{Zellzahl (} 1 \times 10^5 \text{)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die, basierend auf dem ermittelten Virustiter einer Virus-Produktionscharge, für nachfolgende Transduktionsexperimente eingesetzte Virusmenge wurde über den MOI-Wert definiert („multiplicity of infection“), welcher die Menge an eingesetzten Viruspartikeln pro zu transduzierender Zielzelle angibt. MOI-Werte zwischen 20-50 wurden in den verschiedenen Versuchsreihen eingesetzt, wobei die Transduktion der Zielzellen in 24-Well-Platten ($1,5 \times 10^5$

Zellen pro Well) erfolgte. 24 h nach der Transduktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Medium weiter kultiviert.

2.2.3.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE & SELEKTIONIERUNG VON ZELLEN (FACS-MESSUNG / FACS-SORTIERUNG)

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS-Messung („Fluorescence Activated Cell Sorting“) ermöglicht die quantitative und qualitative Analyse von Zellen, sowie deren Selektionierung, basierend auf physikalisch-morphologischen (Größe, Granularität) und molekularbiologischen Eigenschaften (Proteinexpressionsmuster, DNA). Die zu analysierenden Zellen fließen hierbei mit hoher Geschwindigkeit in einem geschlossenen, flüssigkeitsgefüllten Kapillarsystem einzeln an einer Lichtquelle in Form eines komplexen Laserstrahl-Systems vorbei, mit dem Resultat der Emission optischer Signale seitens der Zelle. Die Detektion der durch die Zelle verursachten Lichtbeugung im flachen Winkel (Vorwärtsstreulicht: FSC = „forward scatter“) ist ein Maß für die Größe der Zelle, bzw. deren Volumen. Die Lichtbrechung im rechten Winkel (Seitwärtsstreulicht: SSC = „side scatter“) liefert Informationen über die Struktur und Granulärität der Zelle. Zusätzlich bieten Fluoreszenzeigenschaften von Zellen, welche durch autofluoreszierende Proteine oder durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper, welche spezifisch gegen zelluläre Proteine gerichtet sind, hervorgerufen werden, die Möglichkeit die Zellen, in Abhängigkeit von der Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichts, quantitativ und qualitativ über verschiedene Detektoren zu analysieren und zu isolieren („cell sorting“). In dieser Arbeit wurde die FACS-Messung für die Analyse Virus-transduzierter Zielzellen, in Folge der Expression von Fluoreszenz-Markergenen durch den viralen Vektor, eingesetzt. Dies umfasste die Bestimmung des Virustiters, die Messung der GFP-Expressionsänderung in Form von Intensität und Anzahl GFP-exprimierender Zielzellen, Apoptosebestimmung durch AnnexinV/7-AAD Doppelfärbung sowie die Isolation Virus-transduzierter Zielzellen aus einer Zellpopulation.

2.2.3.4.1 ANALYSE DER FLUORESZENZMARKER-EXPRESSION

Die in dieser Arbeit für die Transduktion von Zielzellen eingesetzten lentiviralen Vektoren (pSiEW; LeGO-G) kodierten für das eGFP Protein („enhanced green fluorescent protein“) als fluoreszierender Detektions- und Selektionsmarker. Neben der Bestimmung des Virustiters wurden Änderungen der eGFP-Expression in Form von Intensität und Anzahl eGFP-positiver Zellen über das FACSCalibur™ System von Becton Dickinson (BD Biosciences) beobachtet und analysiert. Die nach erfolgter Infektion in Kultur befindlichen Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen (im Falle adhärenter Zellen abtrypsinisiert), in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert

(1.500 rpm, 3 min, RT) und bei direkter Messung erneut in 0,2 bis 1 ml PBS resuspendiert. Erfolgte die Messung erst nach ca. 2-6 h, wurden die Zellen durch Resuspension in PBS mit 4% Formalin fixiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die eGFP-Detektion erfolgte im FL1-Detektionskanal. Je Probe wurden 10^4 Zellen mit FACS gemessen und anschließend die Werte für die Anzahl GFP-positiver Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität der eGFP-Expression (MFI: „Mean Fluorescence Intensity“) mit der Software CellQuest™ Pro (BD Biosciences) ausgewertet. Ausnahme bildete die MCherry-Messung des LeGO-C-Scramble shRNA Vektors im FL3-Kanal.

2.2.3.4.2 ISOLATION POSITIV-TRANSDUZIERTER ZIELZELLEN („FACS-SORTING“)

Für die Analyse ausschließlich infizierter Zielzellen, wurden diese 2-3 Tage nach erfolgter Virus-Transduktion aus der gemischten Zellpopulation, bestehend aus transduzierten und nicht-transduzierten Zellen, über die eGFP Expression mit dem FACSAria™ I System von Becton Dickinson (BD Biosciences) isoliert und angereichert. Dies erfolgt über eine spannungsgesteuerte Aussortierung Signal-positiver Zellen, welche anschließend in ein vorgelegtes FACS-Röhrchen mit Medium aufgefangen werden. Vor allem im Falle niedriger Transduktionseffizienzen, mit einem geringen Anteil transduzierter Zellen, ist eine FACS-Zellsortierung, für eine weitere Analyse nahezu unumgänglich. Zur Vorbereitung für das FACS-sorting wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation in PBS mit 2% FCS aufgenommen (ca. 1×10^6 Zellen pro ml). Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb von Zellaggregaten befreit. Die sortierten Zellen wurden abzentrifugiert (1.500 rpm, 3 min, RT), erneut mit PBS gewaschen und in Kultur gebracht. Um die Gefahr einer Kontamination bei diesem nicht vollends sterilen Prozess zu vermeiden, wurde der Antibiotika-Gehalt (Penicillin/Streptomycin) im Medium zunächst verdoppelt.

2.2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN (PROTEOMICS)

2.2.4.1 AUFREINIGUNG REKOMBINANT EXPRIMIERTER PROTEINE

1. Rekombinante Expression & Protein-Extraktion unter denaturierenden Bedingungen

Der durch eine Reduktion endogener Proteasen und durch einen zusätzlichen Einbau von tRNA-Genen, speziell für die rekombinante Expression eukaryotischer Proteine, optimierte *E.coli*

Material & Methoden

Stamm BL21⁺, wurde mit den Expressionsplasmiden (pET-30a, pFLAG-2) transformiert. Für die Induktion der Transgen-Expression über IPTG wurde eine 5 ml LB-Vorkultur (+ entsprechendes Antibiotikum) mit einer Kolonie BL21⁺ angeimpft und über Nacht bei 37°C unter schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit der Vorkultur eine 500 ml LB-Hauptkultur (+ Antibiotika) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀= 0,55-0,6 herangezogen. Die für die Expression des Transgens benötigte T7-RNA-Polymerase wird im Bakteriengenom über den Laktose-(*lac*-)Promotor und –Operator kontrolliert. Durch Zugabe des Allolactose-Derivats IPTG in der Endkonzentration 1mM wird die T7-RNA-Polymerase, über die Entfernung des *lac*-Repressors, exprimiert und die rekombinante Proteinexpression induziert. Dies wurde über einen Zeitraum von 4 h bei 30°C unter schütteln (200 rpm) durchgeführt. Als weitere Möglichkeit der Bakterienkultur während der Induktion rekombinanter Expression wurde die Kultivierung in 500 ml TB-Medium durchgeführt. Bei dem heranziehen der Bakterien bis zu einer optischen Dichte von ca. OD₆₀₀= 3-4 über Nacht, fand dies vor allem bei der Produktion besonders großer Mengen an Protein (> 2µg / µl) Anwendung.

Nach der rekombinanten Expression der Proteine wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert (4°C, 4.000 rpm, 25-30 min) und das Zellpellet einer 500 ml Kultur in 30 ml Urea-Puffer (8M Urea, 500 mM NaCl, PBS [1x] – Puffer A) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien durch die Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen (Intervalle von 3 x 1 min, auf Eis) und die Proteine unter denaturierenden Bedingungen, in Gegenwart von hochkonzentriertem Harnstoff extrahiert (Urea-Denaturierung). Zur Abtrennung restlicher unlöslicher-Zellbestandteile wurde das Extrakt zunächst bei 11.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und anschließend durch einen Faltenfilter gefiltert.

2. Proteinaufreinigung über Affinitätschromatographie

Um die rekombinant exprimierten Proteine aus einem komplexen Proteinlysats aufzureinigen zu können, wurde eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt. Die mit Histidin-Tags fusionierten Proteine wurden dabei über Ni²⁺-Ionen beladene Sepharose-Säulen (Hi-/HisTrap chelating columns, GE Healthcare) in einer FPLC-Apparatur extrahiert (ÄKTA-FPLC - Fast Protein Liquid Chromatographie). Eine 0,1 M NiSO₄-Lösung wurde für die Beladung der Sepharose-Säulen, gemäß ihrer Volumina, benutzt. Der über Pumpen gesteuerte FPLC-Lauf beinhaltete in einem ersten Schritt die Äquilibration der Säule mit dem für den Proteinaufschluss verwendeten Urea-Puffer (Puffer A), das Auftragen des Proteinlysats auf die Säule, das Waschen der Säule mit Urea-Puffer zum Entfernen ungebundener Proteine sowie die Elution der His-Tags von der Säule und fraktionierte

Sammlung der aufzureinigenden Proteine über einen Imidazol-Gradienten (1. 0-40 mM; 2. 40-80 mM; 3. 80-300mM Puffer B: 1M Imidazol, 8M Urea, 500 mM NaCl, PBS [1x]).

3. Renaturierung der aufgereinigten Proteine durch Dialyse

In Abhängigkeit von der Menge aufgereinigten Proteins (ca. 20mg Protein pro 500 ml Bakterienkultur) wurden in einem Dialyseschlauch Proteinkonzentrationen von 1-3 mg/ml mit den Elutionsfraktionen eingestellt. Die Dialyse zur Entfernung denaturierenden Harnstoffes wurde über ca. 24h bei 4°C in einem Dialysebad, mit einem Volumenverhältnis 1:125, durchgeführt. Nach 16h wurden alle weitere 2h ein Viertel des Dialysebadvolumens durch eine 10%ige Glycerinlösung ersetzt. Für eine schonende Rückfaltung setzte sich die Dialyselösung im Schlauch und umgebenden Bad wie folgt zusammen: 400mM L-Arginin (in seiner freien basischen Form auf pH=7,5 als 1fach Kation eingestellt), 250mM NaCl und 10% Glycerin, alles gelöst in 1x PBS. Bei größeren Proteinkonzentrationen wurde zum Teil auch Tween-20 (0,05% Vol.) zugesetzt um ein Ausfallen der Proteine zu vermeiden. Anschließend wurden die aufgereinigten und rückgefalteten Proteine bei 11.000rpm bei 4°C für 20 min abzentrifugiert um eventuell entstandene, größere Aggregate ausgefallener Proteine zu entfernen. Die Proteine wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Um die Verwendung einer monomären Proteinlösung zu garantieren, wurden die Proteine nach wieder auftauen erneut zentrifugiert (11.000 rpm; 4°C; 10 min) und anschließend deren Konzentration bestimmt.

2.2.4.2 ANFERTIGEN VON ZELLYSATEN – PROTEINEXTRAKTION

Für den Nachweis zellulärer Proteine wurden sowohl Gesamtzellextrakte als auch fraktionierte Zellysate, Kern- und Zytosol-Extrakte, angefertigt. Um eine repräsentative Protein-Analyse kultivierter Zellen zu gewährleisten, erfolgte der gesamte Prozess der Zellysat Herstellung unter gekühlten Bedingungen bei 4°C (z.B. Zentrifugation) und auf Eis.

1. Gesamtzellextrakt

Für die Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Zellyse-Puffer, inklusive frisch zugegebenem Protease- (Protease Inhibitor Cocktail III, Calbiochem, 1-2µg/µl) und Phosphataseinhibitor (PhosSTOP, Roche, 1 Tablette/10ml), aufgenommen. In Abhängigkeit von der zu lysierenden Zellmenge bzw. Zelldichte wurden RIPA-Puffer Volumina von ca. 80-500 µl eingesetzt. Im Falle adhärenter Zellen wurden pro 10 cm Ø Schale, ab einer Konfluenz von 50-80 %, 200-500 µl des Lysepuffers

| Material & Methoden

verwendet (6-Well-Platte: ca. 100-200 μ l). Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und für ca. 20-30 min im RIPA-Puffer auf Eis lysiert. Im Falle von Suspensionszellen wurden RIPA-Puffer Mengen von 80-300 μ l, in Abhängigkeit von der Größe der Zellpellets, nach PBS-Waschung und Zentrifugation eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls für etwa 20-30 min auf Eis lysiert. Nach vortexen und einer abschließenden Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, 4°C) wurde der proteinhaltige Überstand weggefroren und gelagert (-20°C) oder direkt für eine weitere Analyse, nach Bestimmung der Proteinkonzentration, verwendet.

2. fraktioniertes Zelllysate (Kern- & Zytosolextrakte)

Die Extraktion von Proteinen des Zytosols und des Zellkerns erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Lyse-Schritten. Im ersten Lyse-Schritt wird die äußere Zellmembran aufgelöst. Hierfür wurde erneut in Abhängigkeit von der Menge der zu lysierenden Zellen ein spezieller Lysepuffer (Puffer A) im Volumen von ca. 100-500 μ l, nach dem Waschschrift mit kaltem PBS, zu den Zellen gegeben. Dem Lysepuffer-A wurden ebenfalls Protease- und Phosphataseinhibitor frisch beigefügt. Nach einer 10-minütigen Lyse auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand abgenommen, weggefroren und gelagert (-20°C). Der Überstand beinhaltet die Proteine des Zytosols (zytosolische Fraktion). Der Zellkern, mit DNA und Nucleoli, sowie größere Reste der Plasmamembran verbleiben als ungelöstes Pellet. Im zweiten Lyse-Schritt wurden aus diesem Pellet die nukleären Proteine extrahiert. Hierfür wurden, in Abhängigkeit von der Größe der Pellets, 200-400 μ l eines weiteren Lyse-Puffers (Puffer B) hinzugefügt. In diesem Puffer wurde eine 300mM NaCl-Konzentration frisch eingestellt (6,5 % v/v einer 4,6M NaCl Lösung), da eine hohe Salzkonzentration die Lyse der Kernmembran begünstigt und die Löslichkeit der Kernbestandteile erhöht. Nach einer Ultraschallbehandlung mit 20 Impulsen im Sonikator und einer weiteren Inkubation auf Eis für 30 min wurden die festen Bestandteile bei 14.000 rpm für 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand (nukleäre Fraktion) wurde weggefroren und gelagert (-20°C) oder direkt für eine weitere Analyse zusammen mit der zytosolischen Fraktion, nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kap. 2.2.4.3), verwendet.

Entfernung Zellmembran-gebundener Protein- bzw. Peptidaptamer-Konstrukte vor der Zelllyse durch „Acid-Wash“

Im Falle einer Zelllyse und Proteinextraktion nach Proteintransduktions-Versuchen mit rekombinanten zellpenetrierenden Proteinen, wurden zunächst die überschüssigen, nicht aufgenommenen und an der äußeren Zellmembran gebundenen Protein-Konstrukte von der

Zellmembran abgelöst. Dafür wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen ebenfalls mit kaltem PBS gewaschen. Vor der Lyse wurden die Zellen erst mit 0,2 M Essigsäure (in PBS) und nochmals mit kaltem PBS gewaschen.

2.2.4.3 QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch (Bradford-Test). Hierfür wurden 1-5 µl des zu untersuchenden Proteingemisches (Proteinextrakte, Zelllysate) in 1 ml Bradford-Farbreagenz (5x Coomassie® Brilliant Blue G-250, Bio-Rad) verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der entstehenden blauen Protein-Farbkomplexe lässt sich bei einem Absorptionsmaximum von 595nm bestimmen (Absorption Farbstoff: 470nm). Die Erstellung einer Titrations-Eichkurve erfolgte mittels eines BSA-Standards.

2.2.4.4 QUALITATIVE PROTEINBESTIMMUNG

2.2.4.4.1 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON PROTEINGEMISCHEN (SDS-PAGE)

Für die qualitative Bestimmung einzelner Proteine eines Proteingemisches bzw. Zelllysats wurden die Proteine nach ihrer Größe in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). In Abhängigkeit vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wurden Gele mit unterschiedlichem Acrylamid-Anteil gegossen (kleine Proteine <50kDa: 12-20% Acrylamid; große Proteine >50kDa: 6-12% Acrylamid). Acrylamid wurde in einem SDS- & Tris-haltigem Puffer mit entsprechendem Wasseranteil durch Zugabe des Radikalbildner Ammoniumpersulfat und des Katalysators TEMED (Tetramethylethylendiamin) auspolymerisiert. Es wurde dabei das Verfahren der diskontinuierlichen SDS-PAGE angewendet, mit einer Aufkonzentrierung der Proteine in einem Sammelgel und der anschließenden Auftrennung im Trenngel (Laemmli, 1970; Sammel- & Trenngel Zusammensetzung nach Sambrook and Russel – *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*). Je nach Konzentration des zu untersuchenden Proteingemisches wurden 20 – 40 µg Protein auf das Gel geladen. Für die optimale Detektion einzelner Proteine wurden die Proben durch Zugabe eines β-Mercaptoethanol-haltigen, reduzierenden Gelladepuffers (Roti-Load I) und 5 minütiger Erhitzung (95°C) denaturiert und anschließend aufgetragen. Proteinkomplexe sowie Tertiär- & Sekundärstruktur der Proteine wurden dadurch aufgebrochen. Für die Bestimmung aggregierter Proteine (Protein-Dimere) wurde ein nicht reduzierender Ladepuffer verwendet (Roti-Load II). Zur späteren Identifizierung der Proteine nach ihrer Größe wurden Proteingrößenmarker aufgetragen. Bei 120 V (ca. 60mA) wurden die Proteine für ca. 2 h elektrophoretisch unter

Verwendung eines SDS-Laufpuffers aufgetrennt. Die Aufhebung der Protein-Eigenladung durch das negativ geladene SDS ermöglicht die alleinige Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe.

2.2.4.4.2 COOMASSIEBLAU-FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN

Zur Sichtbarmachung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine, wurden die Gele bei RT für 30-60 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau interagiert dabei mit basischen Aminosäure-Seitenketten. Anschließend wurden die Gele, durch erneutes Schwenken mit einer Entfärbelösung, bis zum Verschwinden bestehender Hintergrundfärbungen gewaschen (2-3 h bei RT oder schonend über Nacht mit 25% Entfärbelösung und 75% H₂O). Über die Farbintensität (Bandendicke) und die in Abhängigkeit zum Molekulargewicht stehende Laufstrecke konnten die Proteinbanden anschließend analysiert werden.

2.2.4.4.3 IMMUNOLOGISCHER PROTEINNACHWEIS (WESTERN BLOT)

Um die im Acrylamid-Gel aufgetrennten Proteine immunologisch Bestimmen zu können, müssen diese zunächst aus dem Gel auf eine Trägermembran übertragen werden (Western Blotting). Als Trägermembran wurden Nitrozellulosemembranen benutzt. Zur Übertragung wurde ein „Semi-Dry“-Blot-System benutzt. Der Reihe nach wurden dabei, beginnend bei der Anode, in Anodenpuffer I/II getränktes Blotting-Filterpapier, in Wasser getränkte Nitrozellulosemembran, Polyacrylamid-Gel und in Kathodenpuffer getränktes Blotting-Filterpapier übereinander angeordnet. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (50 mA pro Gel) wurden dann die Proteine aus dem Gel auf die direkt anliegende Nitrozellulose in Richtung Anode übertragen (Dauer: 1 h). Um für die immunologische Auswertung unspezifische Antigen-Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran zu blockieren, wurde diese für mindestens 1 h mit einer 5%igen Milchpulverlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den für das Target-Protein spezifischen Primär-Antikörpern bei 4°C über Nacht. Dabei wurden die Membranen unter Rotation in einem 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß mit einer 1:1000 Verdünnung des Antikörpers in 5 ml einer 3-5%igen BSA oder Milchpulverlösung (in Abhängigkeit vom Antikörper - siehe Antikörperliste 2.1.9) behandelt. Nach dreimaligem Waschen der Protein-Blots für jeweils mindestens 5 min, erfolgte die Inkubation mit „horseradish“ Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Fc-Fragment spezifischen Sekundärantikörper, wurden entsprechend der Spezies des Primärantikörpers ausgewählt und in einer 1:5000 Verdünnung in 5 ml TBST eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei RT erneut unter Rotation in einem 50 ml-Falcon Reaktionsgefäß für 1 bis maximal 2 h. Nach erneutem Waschen der Protein-Blots, konnten die Banden der zu untersuchenden Proteine über die HRP des spezifisch gebundenen Komplexes aus

Primär- & Sekundärantikörper detektiert werden. Hierfür wurden die Protein-Blots mit Luminol-haltigen Substraten (ECL, SuperSignal-West-Femto), umschlossen von durchsichtiger Folie, für 1-5 min inkubiert. Die bei der Oxidation des Luminols über die HRP auftretende Chemolumineszenz kann dann durch Auflegen eines Röntgenfilms (wenige Sekunden bis mehrere Minuten in Abhängigkeit von Substrat und Bandendicke bzw. Signalstärke) in einer lichtgeschützten Fotokassette detektiert werden. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine entwickelt. Sämtliche Behandlungen mit Antikörpern und in diesem Zusammenhang stehenden Waschschrte erfolgten mit TBST-Puffer. Auch die Anfertigung der BSA- und Milchpulverlösungen erfolgten mit TBST-Puffer.

Antikörper-Stripping

Durch die Entfernung gebundener Antikörper von einer Western Blot – Membran (Stripping), können diese mehrfach genutzt werden, was sich vor allem bei der Detektion verschiedener Proteine mit ähnlicher Größe als nützlich erweist. Hierfür wurde die Membran unter Rotation für 30 min bei 60°C mit Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit H₂O gewaschen bis kein β -Mercaptoethanol-Geruch mehr wahrnehmbar war (ca. 1 h). Die Membran wurde abschließend mit TBST für 30 min gewaschen und erneut mit Milchpulverlösung geblockt.

2.2.4.5 ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN DURCH CO-IMMUNOPRÄZIPITATION

Die Methode der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) beruht auf der Markierung bzw. Präzipitation eines interagierenden Protein-Paares in Lösung bzw. in einem Proteingemisch oder Zelllysat durch Bead-gekoppelte Antikörper. Nach anschließender Separierung über die Beads, lassen sich interagierende Proteine im Anschluss im Western-Blot detektieren bzw. analysieren. In dieser Arbeit wurden magnetische, Protein G-beladene Polystyren-Beads der Firma Invitrogen-Life Technologies (Dynabeads® ProteinG) verwendet. Sämtliche Schritte, die Fc-Antikörper-Kopplung an die Beads über Protein G, die Inkubation mit einem Proteingemisch, unter Verwendung eines speziellen Bindepuffers, oder mit Zelllysaten, die magnetische Separierung sowie alle anschließenden Waschschrte erfolgten nach Herstellerangaben. Für die anschließende Analyse der präzipitierten Proteine im Western Blot, wurden die Proben zunächst mit reduzierendem Roti Load I Gelladepuffer [4x] für 5 min, bei 100°C aufgeköcht. Dadurch wurde die Bindung zwischen Protein G und Antikörper bzw. zwischen den Beads und den Immun-Präzipitaten aufgebrochen, wodurch die Proben nach sofortiger Magnet-Separierung auf ein

Polyacrylamidgel geladen und im Western Blot analysiert werden konnten. Dabei wurden ein Zehntel des zuvor für die Co-IP eingesetzten Volumens an Proteingemisch bzw. Zelllysat als Input-Kontrolle mit auf das Gel geladen.

2.2.4.6 NACHWEIS ZELLULÄRER PROTEINE DURCH IMMUNFLUORESCENZ

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde eine Visualisierung intrazellulärer Proteine durchgeführt. Nach Vorbehandlung der Zellen wurden diese zunächst fixiert und permeabilisiert. Adhärenz Zellen wurden hierfür zunächst auf runden (170 µM Schichtdicke) Deckgläsern in 12-Well Platten ausgesät (ca. $1,5 - 2 \times 10^5$ Zellen pro Well). Nach Sterilisation der Deckgläser unter UV-Licht für mindestens 4 h, wurden diese zuvor mit Poly-L-Lysin „Cover-Medium“ (1:10 in Aqua bidest verdünnt) beschichtet (Inkubationszeit: 1h bei 37°C). Vor dem Aussäen der Zellen wurden die beschichteten Deckgläser dreimal mit sterilem Aqua bidest und einmal mit sterilem PBS für je 5 min gewaschen. Im Falle der Behandlung der Zellen mit rekombinanten, zellpenetrierenden Proteinen wurden nicht vollständig transduzierte Proteine, vor der intrazellulären Färbung, durch Acid Wash (siehe Kap. 2.2.4.2.) von der äußeren Zellmembran abgewaschen. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit dem Cytofix/Cytoperm™ Permeabilisierungs- und Waschpuffer System von BD Bioscience für intrazelluläre Proteinfärbung. 500 µl des Formaldehyd- und Saponin-haltigen Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer wurden hierfür pro 12-Well auf die mit Zellen behafteten Deckgläser gegeben und für 30 min bei RT, im Dunklen inkubiert. Im Falle von Suspensionszellen erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung in FACS-Röhrchen. Hierfür wurden die Suspensionszellen, nach Vorbehandlung und anschließenden Waschschritten, zuvor zu $1,5 - 2 \times 10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (3 min, 1.500 rpm, RT) und der Überstand verworfen. Nach Ablauf der 30minütigen Inkubation wurde der Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer abgenommen (Suspensionszellen stets zuvor abzentrifugiert und anschließend in Puffer resuspendiert) und die Zellen dreimal, je 10 min bei RT, im Dunklen mit 500µl Cytofix/Cytoperm™-Waschpuffer (1:10 in Aqua bidest) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 30minütige Inkubation (bei RT, im Dunklen) mit fluoreszenzmarkierten Primäantikörpern sowie Zell- und DNA-Fluoreszenzfarbstoffen, welche ebenfalls in Waschpuffer gelöst wurden. Die Zugabe der entsprechenden Menge an Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurden die Zellen erneut je dreimal für 10 min mit Waschpuffer inkubiert. Wurden Primäantikörper ohne gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, erfolgte eine weitere 30minütige Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörpern, welche in Abhängigkeit der Spezies des Primäantikörpers und des für die Analyse benötigten Emissionsspektrums des gekoppelten

Fluorophors eingesetzt wurden. Nach erneutem Waschen der Zellen mit Waschpuffer wurden die Zellen abschließend mit PBS für 10 min inkubiert. Suspensionszellen wurden abschließend auf Objektträger überführt und durch das Auftragen von ca. 3-5 µl „Mounting-Medium“ [ProLong® Gold Antifade; Invitrogen] wurden die Deckgläser auf dem Objektträger fixiert und für die anschließende Lagerung und mikroskopische Auswertung präpariert. Die Dokumentation der fluoreszenzmarkierten Proteine und DNA erfolgte in einem intrazellulären Querschnitt (dreidimensionaler Ebene) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop [Leica TCS SP5; Leica-Microsystems] und anschließender Auswertung mit der Software LAS AF [LAS Advanced Fluorescence; Leica-Microsystems].

2.2.5 METHODEN ZUR ANALYSE EINER FUNKTIONELLEN INHIBIERUNG VON STAT5

2.2.5.1 ANALYSE DER PROLIFERATION UND VIABILITÄT VON ZELLEN

Die Analyse des Einflusses einer funktionalen Stat5-Inhibierung auf die Überlebensfähigkeit (Viabilität) von Tumorzellen und deren Erhalt tumoralen Wachstums bildete ein zentrales Kriterium der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Die Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität und proliferativen Verhaltens erfolgte über Messungen der metabolischen Aktivität, Zellzahlbestimmungen und Messungen apoptotischer Zellen.

2.2.5.1.1 BESTIMMUNG VON ZELLPROLIFERATION & -VIABILITÄT MIT DEM XTT-ASSAY

Mit dem XTT-Zellproliferations & -viabilitäts Assay (XTT – Cell Proliferation Kit II, Roche) lassen sich vitale Zellen, ohne die Verwendung radioaktiver Isotope, in einem Ansatz spektrophotometrisch quantifizieren. Die Methode beruht auf der Spaltung eines löslichen, gelben Tetrazoliums Salzes (XTT) in den ebenfalls löslichen, orangen Farbstoff Formazan über die mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase metabolisch aktiver Zellen. Als Folge der Inkubation mit bestimmten Testsubstanzen (z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren oder pharmakologische Testsubstanzen) über einen mehrtägigen Zeitraum, können über die Intensität des Farbumschlags Wachstumskinetiken erstellt und quantitative Aussagen über die Zellviabilität, als Folge metabolischer Aktivität, getroffen werden. Zu Beginn des Experiments wurde dafür eine definierte Zellzahl (in Abhängigkeit von der Wachstumsrate der Zelllinie zwischen 1×10^3 und 5×10^3) in 100 µl Medium pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Während

das Experiment mit Suspensionszellen direkt nach dem aussäen gestartet wurde, wurden adhärente Zellen erst nach dem anwachsen über Nacht zur Messung verwendet. Im Falle der Inkubation mit den zu untersuchenden rekombinant aufgereinigten Proteinen wurden tägliche Messungen über einen Zeitraum von 5 Tagen durchgeführt. Die Proteine wurden dabei in verschiedenen Konzentrationen ebenfalls täglich mit frischem Medium (stets 100 µl Gesamtvolumen pro Kavität) zu den Zellen gegeben. Im Falle der Suspensionszellen wurden spezielle 96-Well Platten mit abgerundeten Boden („96 round bottom-wells“ für Suspensionszellen) verwendet, in welchen Suspensionszellen im Zentrum des Rundbodens akkumulieren, was ein nahezu komplettes Absaugen des Mediums ermöglicht. Lentiviral transduzierte, Transgen (shRNA oder Proteinkonstrukte) exprimierende Zellen, wurden 3 Tage nach der Transduktion für den XTT-Test ausgesät und über einen Zeitraum von bis zu 3 Wochen untersucht. Messungen wurden dabei im Abstand von 2-3 Tagen durchgeführt und das Medium im Abstand von 4-5 Tagen gewechselt. Erreichten die Zellen innerhalb des Analysezeitraums die Konfluenz, so wurden frische Zellen der jeweiligen Proben erneut in einer 96-Well Platte ausgesät und weiter analysiert. Zum Start der Messung wurden pro Kavität 50 µl XTT-Lösung und 1 µl Elektronenkopplungsreagenz zu Medium und Zellen gegeben und die Zellen bei 37°C im Brutschrank weiter kultiviert. Dabei wurden Triplettmessungen je Ansatz durchgeführt. Nachdem ein Farbumschlag zu orange-rot in einem der Ansätze stattgefunden hat (in Abhängigkeit von der Zellmenge und korrespondierender Viabilität nach 4-16 h), wurde die Absorption bei 490 nM (Referenzwellenlänge = 690nm) in einem ELISA Reader gemessen. Die Auswertung der Absorptionswerte erfolgte in Prozent zur Kontrolle (PBS- oder unbehandelte Zellen bzw. mit Leervektor transduzierte Zellen).

2.2.5.1.2 BESTIMMUNG DER KUMULATIVEN ZELLZAHL VON SUSPENSIONSZELLEN

Um das Proliferationsverhalten von Suspensionszellen über einen längeren Zeitraum beobachten zu können, wurden kumulative Wachstumskurven erstellt. Dabei wurde zunächst eine definierte Zellzahl von 1×10^5 Zellen in 5ml Medium in kleinen Zellkulturflaschen ausgesät. In Abständen von 3 bis 4 Tagen erfolgte dann eine Passagierung der Zellen im Zusammenhang mit der Bestimmung der absoluten Zellzahl mit dem Hämozytometer (siehe Kap. 2.2.3.1). Für die Weiterpassagierung wurde wiederum die gleiche Zellzahl von 1×10^5 Zellen im definierten Volumen von 5 ml ausgesät und der jeweilige Verdünnungsfaktor notiert. Am Ende des Analysezeitraums konnte dann die kumulative Zellzahl (KZZ) über die bei den Passagierungen ermittelten Zellzahlen und zugehörigen Verdünnungsfaktoren wie folgt bestimmt werden.

$$KZZ_i = N_0 \times V_1 \times V_2 \times V_3 \times \dots \times V_i$$

N_0 = die zu Versuchsbeginn in einem definierten Volumen eingesetzte Zellmenge [in dieser Arbeit = 1×10^5 Zellen]

V_i = der an den verschiedenen Passagierungszeitpunkten, basierend auf der ermittelten Zellzahl, eingesetzte Verdünnungsfaktor zur Weiterpassagierung von 1×10^5 Zellen

2.2.5.1.3 MESSUNG APOPTOTISCHER ZELLEN DURCH ANNEXIN V/7-AAD FÄRBUNG

Für die Analyse der Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) wurde in dieser Arbeit die kombinierte Annexin V/7-AAD Zell- bzw. Apoptosefärbung durchgeführt. Wie auch mit der etablierten Annexin V/Propidiumiodid (PI) Doppelfärbung lassen sich mit der Annexin V/7-AAD Doppelfärbung Zellen hinsichtlich früh- und spätapoptotischer Stadien in denen sie sich befinden effektiv analysieren und unterscheiden. Intrazellulär membranständiges Phosphatidylserin (PS) wird in einer frühen Phase der Apoptose, in Folge einer Auflösung der symmetrischen Membranstruktur, als physiologischer Prozess der Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten auf der Außenseite der Zellmembran exponiert. Das hochspezifisch mit PS interagierende Annexin V kann durch Kopplung mit Fluoreszenzmarkern oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern anschließend durchflusszytometrisch analysiert werden (Koopman et al., 1994). Um ein frühapoptotisches Zellstadium der Zellen von spätapoptotischen und nekrotischen Stadien unterscheiden zu können, erfolgt eine Doppelfärbung mit einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff wie 7-AAD (7-Amino-Actinomycin). Mit fortschreitendem Prozess der Apoptose verlieren die Zellen ihre Membranintegrität, 7-AAD kann in die Zellen eindringen und nach Interkalierung mit der DNA, in Folge veränderter Fluoreszenzeigenschaften, ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert werden (Philpott et al., 1996). Dadurch lassen sich Zellen in frühapoptotischen Stadien, aufgrund Annexin V-positiver und 7-AAD-negativer Signale, von spätapoptotischen Zellen, mit doppelt-positiven Signalen, im FACS unterscheiden.

Nach erfolgter Zellernte wurden die zu analysierenden Zellproben zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in einem entsprechenden Volumen (ca. 1×10^6 Zellen /ml) FACS-Annexin V/7-AAD Assaypuffer [1x] resuspendiert und auf Eis kühl gehalten. Je 100 μ l der jeweiligen Zellsuspensionen (ca. 1×10^5 Zellen) wurden anschließend in FACS-Röhrchen überführt und mit 2 μ l APC-konjugiertem Annexin V und 1 μ l 7-AAD versetzt und kurz gevortext. Da die Annexin V-Färbung mit lentiviral transduzierten Zellen durchgeführt wurde, welche eGFP als Fluoreszenzmarker exprimierten, erfolgte die Annexin-Detektion über das konjugierte Fluorophor APC, welches bei ca. 660-680 nm emittiert. Nach einer 15-20 minütigen Inkubationszeit bei RT und unter Ausschluss von Licht wurden 400 μ l Assaypuffer [1x] hinzugegeben und die Zellen

innerhalb 1 h im FACS analysiert. Die Detektion von Annexin V-APC erfolgte im Fluoreszenzkanal FL-4 und von 7-AAD im Fluoreszenzkanal FL-3 des FACSCalibur Systems [BD™]. Für die FACS-Kalibrierung mit der Bestimmung korrekter Detektions-Schwellenwerte von AnnexinV-APC und 7-AAD Fluoreszenzsignalen, wurden zusätzlich ungefärbte Zellen sowie einfach Annexin V bzw. einfach 7-AAD gefärbte vitale bzw. apoptotisch gestresste Zellen des gleichen Typs mitgeführt und zu Beginn gemessen.

2.2.5.2 INHIBIERUNG TRANSKRIPTIONELLER AKTIVITÄT – UNTERSUCHUNG DER DNA-BINDEAKTIVITÄT VON STAT5

Neben der über qRT-PCR und Western Blot (siehe Kap. 2.2.1.10 & 2.2.4.4.3) durchgeführten Analyse der Stat5-Zielgenexpression, als Indiz einer Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität von Stat5 nach spezifischer Behandlung, wurde in dieser Arbeit zudem der Luziferase- und Bandshift-Assay (EMSA) zur Detektion der DNA-Bindeaktivität von Stat5 durchgeführt.

2.2.5.2.1 DUAL-LUZIFERASE-REPORTERASSAY

Über die Verwendung von Luziferasen als Reportergene lassen sich transkriptionelle Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit von verschiedenen Einflussfaktoren detailliert analysieren. Die Anwendung von Dual-Reporter Systemen, mit der simultanen Expression und Messung zweier individueller Reporter-Enzyme innerhalb eines Systems wie der Zelle, liefert dabei exaktere quantitative Messergebnisse. Die Messung erfolgt dabei über die sequentielle Zugabe zweier lumineszierender Substrate, welche spezifisch durch jeweils eine der beiden Luziferasen umgesetzt und photometrisch bestimmt werden kann. Die Co-Transfektion einer basal bzw. konstitutiv exprimierten Kontroll-Luziferase bietet, nach einer abschließenden Normalisierung der gemessenen Werte gegen die Kontroll-Werte, die Möglichkeit der Einbeziehung essentieller Variablen wie Transfektionseffizienz und Zellviabilität, weshalb die Genauigkeit der Messung wesentlich erhöht wird. Als Reporterkonstrukt für die Messung einer transkriptionellen Aktivität von Stat5 wurde der zuvor durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe modifizierte pSTAT3-TA-Luc Vektor von Clontech verwendet. Entsprechend der Namensgebung erlaubt der pStat3-TA-Luc Originalvektor eine Messung der transkriptionellen Aktivität von Stat3 über eine von Stat3-Enhancer-Elementen regulierte Luziferase Expression (Firefly-Luziferase aus *Lampyridea*). Die Stat3-Enhancer-Elemente wurden durch zwei Kopien eines Stat5-Enhancer Elementes aus dem β -Casein Promotor [TTCTtgGAAttgAAGggaCTT] ersetzt (pStat5[RE]₂-TA-Luc), welches sowohl durch Stat5A- als auch Stat5B-Homodimere sowie Stat5A-Stat5B Heterodimere

gebunden werden kann (Soldaini et al., 2000). Die Anwendbarkeit des Plasmids als einen durch Stat5 induzierbaren Reporter wurde zuvor getestet. Als Kontroll-Luziferase wurde die Renilla-Luziferase (aus *Renilla reniformis*), welche nach Co-Transfektion konstitutiv über den pGL4.74[hRluc/TK]-Plasmid exprimiert wurde. Der Assay wurde mit dem Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System von Promega nach Herstellerangaben durchgeführt. Die wesentlichen Schritte dieses Assays, nach Co-Transfektion und Behandlung der Zielzellen, umfasste die Zelllyse und Übertragung der Proben in Multiwell-Platten, die Zugabe des Firefly-Luziferase Detektionssubstrates und anschließende photometrische Messung, die Zugabe einer Reaktions-StoppLösung und die abschließende Zugabe des Renilla-Luziferase Detektionssubstrates mit anschließender photometrischer Messung. Für die Versuche wurden Plasmidmengen von 0,5 bis 1µg pStat5[RE]₂-TA-Luc und jeweils stets 25 ng pGL4.74[hRluc/TK]-Kontrollplasmid pro Well einer 24-Well Platte co-transfiziert.

2.2.5.2.2 GELSHIFT-ASSAY (EMSA)

Mit dem Gelshift-Assay oder EMSA („electrophoretic mobility shift assay“) lassen sich DNA-Protein-Interaktionen unter elektrophoretischer Auftrennung kurzer, radioaktiv-markierter, doppelsträngiger DNA in einem nativen Polyacrylamidgel detektieren. Im Falle einer Interaktion zwischen Protein und DNA führt dies zu einem detektierbaren Bandenshift im Gel. Für die Detektion einer Interaktion zwischen Stat5 und der DNA wurde das zuvor unter Kap. 2.2.5.2.1 beschriebene Stat5-Enhancer-Element aus dem β-Casein Promotor verwendet und als Oligonukleotid im Assay eingesetzt. In einem ersten Schritt wurden die beiden Einzelstränge der Enhancer-Sequenz, welche in gleichen Konzentrationen eingesetzt wurden, unter 5minütigem aufkochen und anschließendem abkühlen bei Raumtemperatur hybridisiert. Im Anschluss erfolgte eine radioaktive Markierung der doppelsträngigen Oligonukleotide mit ATP³² durch eine T4-Polynukleotidkinase.

<u>Reaktionsansatz:</u>	Oligonukleotid-DNA (200 ng)	1 µl
	T4 -Kinase Puffer [10x]	1 µl
	T4 (PNK) Kinase	1 µl
	Aqua bidest	4 µl
	³² ATP	3 µl

Die Reaktion wurde bei 37°C für 30 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die markierten Oligonukleotide in 190µl Stabilisierungspuffer gelöst und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Unter Verwendung eines speziellen Lysepuffers, mit der Zugabe eines Protease- und

| Material & Methoden

Phosphataseinhibitor-Cocktails, wurde der Assay mit Proteinlysaten vorbehandelter Zellen oder mit Proteingemischen durchgeführt und nach folgendem Pipettierschema eingesetzt.

<u>EMSA-Reaktionsansatz:</u>	Proteingemisch/Lysat	2-5 μ l (2-3 μ g Protein)
	unspezifische Competitor-DNA (Carrier DNA)	300-750 ng
	BS-Puffer	3,2 μ l
	mit Lyse-Puffer auf 14 μ l aufgefüllt	
	markierte Oligonukleotide	1 μ l

Nach einer Inkubation bei RT für 30 min wurden die Proben in einem nativen 4%igen TBE-Polyacrylamidgel [6ml Acrylamid-Gemisch, 2,5ml TBE [5x], 2,5ml 50% Glycerol, 360 μ l 10% APS, 28 μ l TEMED, 34 ml H₂O] zunächst für 30 min bei 60 V und anschließend für 90 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer: TBE-Puffer [0,25x]). Abschließend wurde das Gel durch leichtes Schwenken in Fixierungspuffer fixiert und nach Folienverschluss getrocknet und abschließend durch Auflegen eines Fotofilms ausgewertet. Ein Stat5-Antikörper wurde zur Markierung der entsprechenden Bande durch anschließenden Gel-Supershift eingesetzt. Ebenfalls wurden eine Oligonukleotid-Scramble sowie eine Protein-Negativkontrolle verwendet.

3 ERGEBNISSE

Die Deregulation der Aktivität von Stat-Transkriptionsfaktoren, vor allem von Stat3 und Stat5, ist ein Phänomen, welches nahezu alle Formen und Arten humaner Tumore aufweisen. Durch die Expression ihrer Zielgene sowie durch weitere nicht-kanonische Funktionen im Zytoplasma und im Zellkern tragen Stat3 und Stat5 in überexprimierter und vermehrt phosphorylierter Form einer fortschreitenden Entartung benigner und maligner Tumore entscheidend bei. Essentielle Mechanismen der Tumorgenese, wie gesteigertes Zellwachstum, Apoptosehemmung, Migration und Metastasierung, Sauerstoff-unabhängiger Energiestoffwechsel, Angiogenese oder die Umgehung der Immunabwehr werden durch Stat3 und Stat5 unterstützt. Als Resultat dieser multiplen Effekte entwickeln Tumore hinsichtlich ihrer Viabilität häufig eine phänotypische Abhängigkeit gegenüber diesen Signalmolekülen, weshalb diese Vertreter der Stat-Proteinfamilie in aberrant exprimierter Form vielversprechende Zielstrukturen in der Krebstherapie darstellen.

Die makromolekularen Strukturen interferierender Proteine und Peptide bieten die Möglichkeit einer effektiven und spezifischen Inhibierung nicht-konventioneller Wirkstoff-Targets, wie Transkriptionsfaktoren. Peptidaptamere, als kombinatorische Proteinkonstrukte, bestehend aus einer kurzen targetspezifischen Peptidsequenz, welche in starrer Konformation durch ein Gerüstprotein präsentiert wird, sind in der Lage mit hoher Affinität mit verschiedensten Proteindomänen zu interagieren und diese in ihrer Funktion zu inhibieren. Die Grundlage dieser Arbeit bildete das zuvor durch Mitglieder der Arbeitsgruppe in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifizierte Peptidaptamer rS3-PA, eine 20mer Aminosäuresequenz, welche spezifisch mit der für die Dimerisierung über Phosphotyrosin-Interaktion verantwortlichen Region des Stat3-Proteins interagiert und anschließend in eine modifizierte und optimierte Variante des humanen Thioredoxin Proteins (hTRX), als Gerüstprotein, integriert wurde (Borghouts et al., 2008a). Mit diesem zellpenetrierenden Peptidaptamer konnte die Phosphorylierung von Stat3 reduziert werden, was in einer Inhibierung des Wachstums, der Viabilität, der Migration sowie der Zielgen-Expression Stat3-abhängiger Tumorzellen resultierte (Borghouts et al., 2012).

Unter Verwendung dieses Inhibitor-Grundgerüsts sollte eine 12mer Peptidaptamer-Sequenz, durch das Screening einer synthetischen Peptidaptamer-Library, in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert werden, welche in der Lage ist mit einer funktionellen Domäne von Stat5A zu interagieren. Dafür galt es zunächst Stat5 als geeignete Zielstruktur für eine therapeutische

Ergebnisse

Intervention in verschiedenen Tumorzelllinien durch shRNA-Knockdown zu validieren. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Beobachtung einer Stat5-Abhängigkeit von Leukämiezellen, da diese häufig eine stark deregulierte Stat5-Aktivität aufweisen. Nach Abschluss der Stat5-Target-Validierung und Identifikation eines geeigneten Peptidaptamer-Konstrukts, war es Ziel, die Effekte einer Peptidaptamer-Interaktion hinsichtlich einer funktionellen Inhibierung der Stat5-Aktivität, sowohl nach lentiviralem Gentransfer als auch nach Medium-Applikation als rekombinantes Protein, in verschiedenen Zielzellen zu testen. Anhand dessen sollte das Potential des Peptidaptamers abgeschätzt werden, gezielt in der Behandlung Stat5-abhängiger Tumore und als unterstützender Wirkstoff in der kombinatorischen Chemotherapie zum Einsatz zu kommen. Basierend auf den antitumoralen Effekten und der Stärke bzw. Spezifität der Stat5-Protein Interaktion sollte zudem die Anwendbarkeit des Peptidaptamers als Leitstruktur für die Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe abgewogen werden.

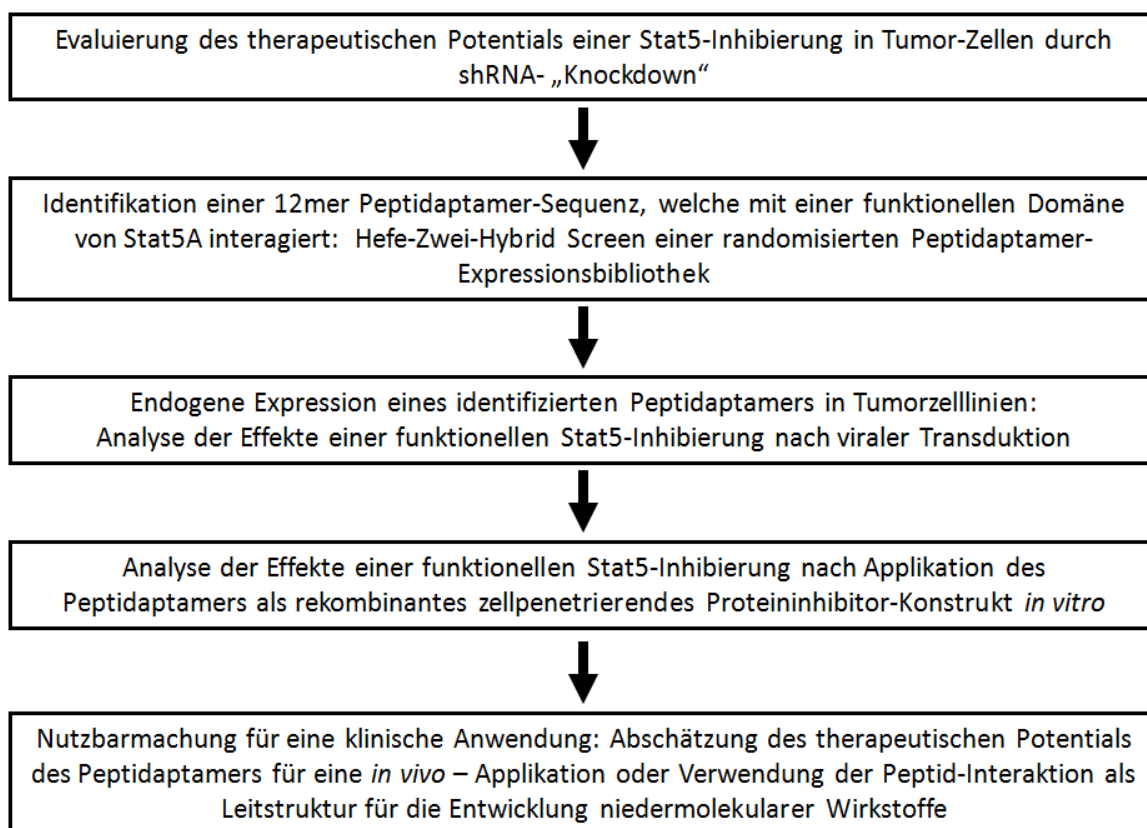


Abb. 3-1: Projektübersicht und Arbeitsablauf

Inhibierung der Aktivität von Stat5 durch spezifische Interferenz mit einem Peptidaptamer-Konstrukt

3.1 EVALUIERUNG VON STAT5 ALS ZIELSTRUKTUR FÜR EINE THERAPEUTISCHE INTERVENTION IN TUMOREN

Wie einleitend bereits erwähnt ist ein prokanzerogener Einfluss von aberrant aktivem Stat5, in Folge einer erhöhten Expression und Tyrosin-Phosphorylierung, vor allem im Zusammenhang mit der Ausbildung hämatologischer Neoplasien, aber auch verschiedener solider Tumore, wie dem Mamma- oder Prostatakarzinom, vielfach dokumentiert. Eine konstitutive Aktivierung von Stat5 lässt sich in nahezu jeglicher Form von Leukämien, Lymphomen und myeloproliferativen Erkrankungen detektieren, weshalb Stat5 als eine vielversprechende Zielstruktur in der Behandlung von Tumoren und Neoplasien des Blutes betrachtet wird (Benekli et al., 2009; Lewis & Ward, 2008). Die Beobachtung des Einflusses einer Stat5-Inhibierung in Leukämien stand daher bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen im Vordergrund. Um Stat5 als eine geeignete Zielstruktur für eine therapeutische Intervention in Tumoren zu validieren, erfolgte zu Beginn dieser Arbeit eine Analyse der Effekte einer Inhibierung der Stat5-Expression in verschiedenen humanen Tumorzelllinien, über die Methodik der RNA-Interferenz. Neben diversen leukämischen Zelllinien wurden dabei auch verschiedene Arten solider Tumore untersucht. Nach Herunterregulierung der Stat5-Expression über interferierende shRNA („Stat5-Knockdown“), wurde über die Messung der Veränderung zellulärer Viabilität die Intensität des Einflusses einer erhöhten Stat5-Expression und -Tyrosinphosphorylierung auf die Überlebensfähigkeit humaner Tumore analysiert.

3.1.1 STAT5 EXPRESSION UND AKTIVIERUNG IN TUMORZELLEN

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung von Tumorzelllinien unterschiedlicher Gewebe hinsichtlich der Expression von Stat5-Proteinen und deren Aktivierung als transkriptionell aktive Dimere durch Phosphorylierung ihrer kritischen Tyrosinreste. Hierfür wurden Western Blot-Analysen mit Gesamtzellextrakten durchgeführt und die totalen Stat5-Proteinmengen, ohne eine quantitative Unterscheidung der Stat5A und Stat5B-Isoformen, bestimmt. Die Bestimmung der Stat5-Tyrosinphosphorylierung erfolgte in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ebenfalls generell, unter Verwendung von Antikörpern welche sowohl eine Phosphorylierung des kritischen Stat5A-Tyrosinrestes Tyr-694 als auch des Tyrosinrestes Tyr-699 des Stat5B-Proteins gleichermaßen detektierten. Im Falle der Analyse akut (AML) und chronisch myeloischer Leukämien (CML) wurden die humanen Leukämie-Zelllinien K562, Ku812, HEL, HL-60, Kasumi-1

und SKNO-1 verwendet. Bezüglich ihrer phänotypischen und molekularen bzw. genetischen Merkmale wurde dabei eine Einteilung der Zellen in Bcr-Abl-positive CML- (K562, Ku812) und Bcr-Abl-negative AML-Zelllinien (HEL, HL-60, Kasumi-1, SKNO-1) vorgenommen (siehe Abb. 3-2).

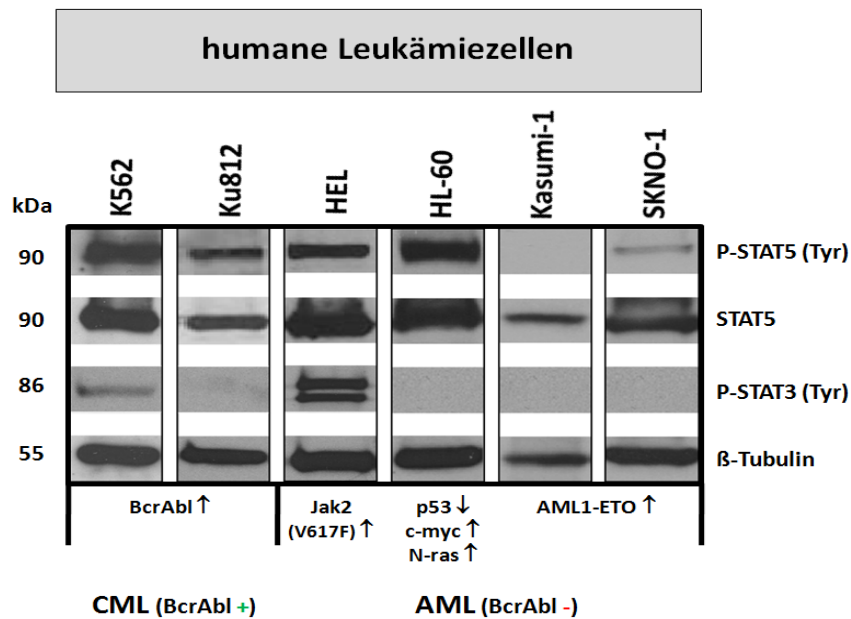


Abb. 3-2: Aktivierung von Stat5 in humanen Leukämie-Zelllinien

Analyse der Stat5-Expression und Aktivierung im Western Blot, unter Verwendung von Proteinextrakten humaner Leukämiezelllinien, welche in Bcr-Abl positive CML- und Bcr-Abl negative AML-Zelllinien eingeteilt wurden. 20µg Protein wurden für die Western Blot Analyse verwendet. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der Stat3-Aktivierung mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper.

Das Fusionsprotein Bcr-Abl ist als Produkt der Translokation der Chromosomen 9 und 22 bei ca. 95% der CML-Patienten und ca. 25% der ALL-Patienten (ALL: akut lymphatische Leukämie) nachweisbar. Es interagiert mit verschiedenen intrazellulären Signalmolekülen über deren SH2-Domäne und aktiviert diese über die konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität des Abl-Proteins. Eine Phosphorylierung von Stat5 durch Bcr-Abl, mit dem Resultat der Expression von Stat5-Zielgenen und der fortschreitenden Entartung leukämischer Zellen, ist in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben. Für die Analyse molekularer Zusammenhänge einer BcrAbl-vermittelten CML, hat sich die humane CML-Zelllinie K562 als eine Standard-Zelllinie etabliert. K562 und Ku812 CML-Zellen exprimieren die p210 Isoform des Bcr-Abl Fusionsgens, in dessen Verbindung eine Erhöhung der Stat5-Aktivität zuvor bereits gezeigt wurde (de Groot et al., 1999; Horita et al., 2000; Warsch et al., 2011). Die hohen Expressionslevel an tyrosinphosphoryliertem und totalen Stat5 Protein konnten im Western Blot bestätigt werden, wobei die detektierbare Menge an aktiviertem Stat5 in K562-Zellen deutlich über der Menge der Ku812-Zellen lag. Die Zelllinien HEL und HL60 wiesen trotz der Abwesenheit von Bcr-Abl hohe Stat5 Expressions- und Phosphorylierungslevel auf. Die HEL-Zelllinie entstammt einem Patienten mit Erythroleukämie („Human Erythroleukemia Cell Line“), einer speziellen Form der AML-Erkrankung (Typ M6 nach

FAB-Klassifikation), welche sich durch eine Entartung unreifer Erythroblasten auszeichnet. HEL-Zellen sind durch eine homozygote Mutation des Jak2-Gens, in Folge der häufig auftretenden V617F-Punktmutation der JH2-Domäne, charakterisiert, welche eine konstitutive Jak2-Aktivität und eine daraus resultierende aberrante Stat5-Tyrosinphosphorylierung zur Folge hat (Levine et al., 2005). Die unter dem Begriff myeloproliferative Erkrankungen oder myeloproliferatives Syndrom (MPS) zusammengefassten Formen hämatologischer Neoplasien myeloischen Ursprungs, wie Polycythaemia vera (PV), essentielle Thrombozythämie (ET) oder idiopathische Myelofibrose (IMF), sind in ihrer Entstehung eng mit dem Auftreten der Jak2(V617F)-Mutation und Stat5-vermittelter, proliferativer und antiapoptotischer Signalgebung verbunden (Funakoshi-Tago et al., 2010). Das MPS-Krankheitsbild, einschließlich genetischer und chromosomaler Veränderungen, v.a. das der Jak2-Stat5 vermittelten Epo-hypersensitiven PV (Wernig et al., 2006), unterscheidet sich dabei nur geringfügig von dem einer akuten Erythroleukämie, wie im Falle der HEL-Zelllinie (Quentmeier et al., 2006). Die promyeloblastische HL-60-Zelllinie ist durch einen kompletten Verlust des p53-Tumorsuppressorproteins, in Folge einer homozygoten Deletion des p53-Gens, gekennzeichnet (Wolf & Rotter, 1985). Der aggressive Phänotyp einer AML-Erkrankung wurde in dieser Zelllinie durch eine zusätzliche Aktivierung des c-myc und N-ras Onkogens durch Gen-Amplifikation bzw. Punktmutation hervorgerufen (Collins, 1987). Die identifizierte, intensive Stat5-Tyrosinphosphorylierung deckte sich jedoch nicht mit den mehrheitlichen Angaben der Literatur. Wie die HEL-Zelllinie wurden HL-60 Zellen in verschiedenen Studien als Kontrollzelllinie einer Bcr-Abl vermittelten Stat5-Inhibierung eingesetzt, da HL-60 Zellen neben der Abwesenheit von Bcr-Abl zudem über kaum detektierbare Mengen an phosphoryliertem Stat5 verfügen (Huang et al., 2002a; Nam et al., 2007; Wang et al., 2011). Nichtsdestotrotz lassen sich in der Literatur auch Angaben über konstitutive Stat5-Aktivitäten finden (Chien et al., 2008). Diese kontroversen Angaben führten dazu, dass die HL-60-Zelllinie mehrheitlich von weiteren Versuchen ausgeschlossen wurde, da phäno- und genotypische Veränderungen im Verlauf der artifiziellen Kultivierung nicht ausgeschlossen werden konnten. Desweiteren wurden die AML-Zelllinien Kasumi-1 und SKNO-1, welche das Fusionsprotein AML1-ETO in Folge einer Translokation der Chromosomen 8 und 21 exprimieren, im Western Blot analysiert. Diese Translokation gilt als eine der Hauptursachen für die Ausbildung einer AML-Erkrankung. Ca. 12% der *de novo* AML-Fälle und 20% der Patienten mit fortgeschrittener AML (Typ: M2) exprimieren das AML1-ETO Fusionsprotein. AML1 („Acute myeloid leukemia 1“) ist als Transkriptionsfaktor ein zentraler Regulator der Differenzierung myeloischer Zellen. In Folge der t(8;21) Translokation kommt es zu einer Fusion der AML1 DNA-Bindedomäne mit dem nahezu kompletten ETO Protein, welches als transkriptioneller Repressor

Ergebnisse

fungiert („Eight-twenty-one corepressor“). Unter Bildung eines ETO-Co-Repressor-Komplexes kommt es zu einer Inhibierung der Expression von AML1-Zielgenen, mit dem Resultat der Inhibierung erythroid-myeloischer Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen und der Ausbildung einer AML-Erkrankung. Ein direkter Zusammenhang zwischen einer AML1-ETO Expression und der konstitutiven Aktivierung von STAT5A/B-Proteinen ist bislang nicht belegt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass AML1-ETO-positive AML-Zellen eine Überexpression des Thrombopoetin-Rezeptors MPL aufweisen und dessen Aktivierung den Jak/Stat- und Pi3K/AKT-Signalweg auslöst, was zu einer Induktion antiapoptotischer Signale führt. Kasumi-1 und SKNO-1 Zellen wiesen keine bzw. nur geringe Mengen tyrosinphosphorylierten Stat5-Proteins auf. Zusätzlich wurde eine Aktivierung des Stat3-Proteins anhand der Phosphorylierung seines kritischen Tyrosin-705-Restes im Western Blot analysiert. Hierbei wiesen alleinig die Jak2(V617)-positiven HEL-Zellen hohe Mengen und Bcr-Abl positive K562-Zellen ein vergleichsweise geringes Maß an phosphoryliertem Stat3 auf.

Um den Einfluss onkogener Fusionskinasen auf die Stat5-Aktivierung zu verdeutlichen, wurde zusätzlich ein Western Blot mit Lysaten transformierter Ba/F3-Zellen angefertigt (siehe Abb. 3-3). In Folge Stat5- und Akt-vermittelter Proliferation und Apoptose-Inhibierung lässt sich die murine Pro-B-Zelllinie Ba/F3 in Gegenwart von IL3 kultivieren (Leverrier et al., 1999; Onishi et al., 1998). Ba/F3-Zellen sind daher ein geeignetes zelluläres Testsystem zur Analyse Onkogen-vermittelter leukämischer Transformation, mit dem Resultat IL3-unabhängigen Wachstums.

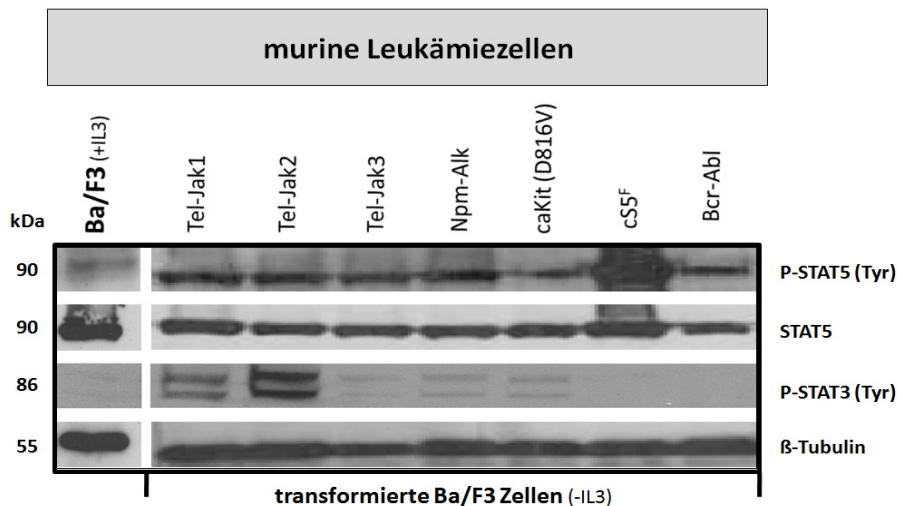


Abb. 3-3: Stat5-Aktivierung in transformierten Ba/F3-Zellen

Zelllysate IL3-abhängig wachsender Wildtyp- und IL3-unabhängig wachsender transformierter Ba/F3-Zellen wurden im Western Blot hinsichtlich der Expression von Stat5 sowie hinsichtlich der Aktivierung von Stat5 und Stat3 über Tyrosinphosphorylierung analysiert. Die Transformation der Ba/F3-Zellen erfolgte über die Leukämie-assoziierten Translokationsprodukte Bcr-Abl, Tel-Jak (1-3) und Npm-Alk sowie über konstitutiv aktive Stat5- (cS5^f, S710F) und c-Kit (D816V) Mutanten. 20µg Protein wurden für die Western Blot Analyse verwendet.

Durch Transfektion und virale Transduktion mutierter Gene wurden in der Vergangenheit verschiedene stabil transformierte Ba/F3-Zellen hergestellt und der onkogene Charakter mutierter und fusionierter Proteine identifiziert und charakterisiert (George et al., 2008; Gesbert & Griffin, 2000; Lacronique et al., 2000; Mayerhofer et al., 2008). Transformierte Ba/F3-Zellen, welche die Fusionskinasen Tel-Jak1-3, Npm-Alk und Bcr-Abl sowie konstitutiv aktive Mutanten des Stat5A und c-Kit Proteins (cS5^f-S710F, caKit-D816V) exprimieren, wurden freundlicherweise von Dr. Richard Moriggl (Ludwig Boltzmann Institut für Krebsforschung Wien, AT) bereitgestellt. Die transformierten Ba/F3-Zellen wiesen alle eine Erhöhung der Stat5-Tyrosinphosphorylierung gegenüber den IL3-abhängigen Wildtyp-Ba/F3-Zellen auf. Eine signifikante Erhöhung der Stat3-Phosphorylierung konnte jedoch nur in Tel-Jak transformierten Ba/F3-Zellen, vor allem im Falle des Tel-Jak2 Fusionsproteins, festgestellt werden, was den dominierenden Einfluss von Stat5 gegenüber Stat3 in der Ausbildung hämatologischer Neoplasien unterstreicht.

Zusätzlich erfolgte eine Charakterisierung verschiedener solider Tumorzelllinien auf Proteinebene, hinsichtlich totaler Stat5-Expression und Aktivierung über Tyrosinphosphorylierung. Die verwendeten Zelllinien entstammen unterschiedlicher Gewebe humanen Ursprungs (siehe Abb.3-4). Hierzu zählten epidermale Karzinomzelllinien (A431, B9-HeLa), Mamma-Karzinomzellen (MCF7, T-47D, SK-BR-3), kolorektale Karzinomzellen (HCT116, HT29) sowie Prostatakarzinom- (PC-3) und Glioblastom-Zellen (MZ-54).

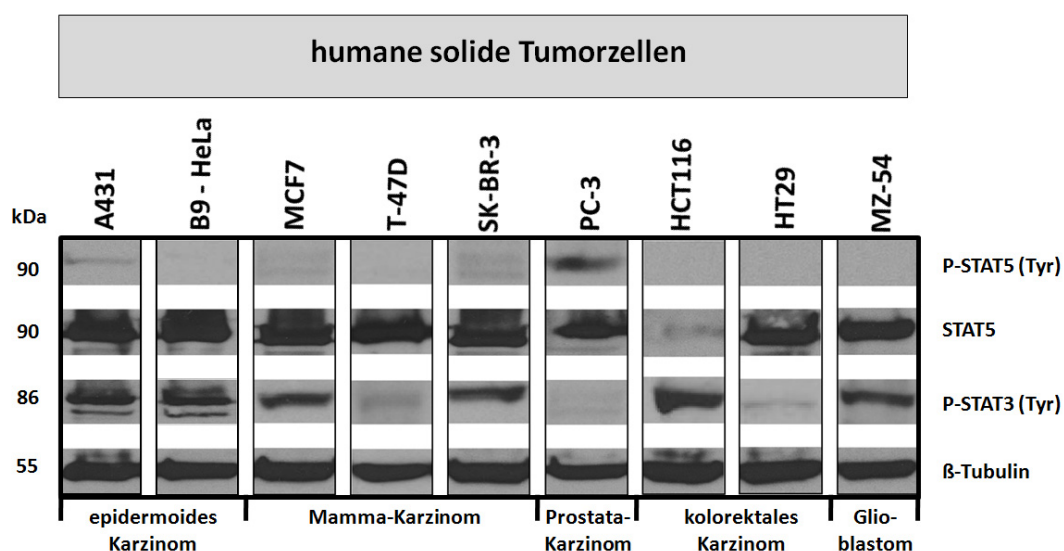


Abb. 3-4: Stat5-Aktivierung in soliden humanen Tumorzelllinien

Analyse der Stat5-Expression und Aktivität in soliden Tumorzelllinien unterschiedlicher Gewebe im Western Blot. Neben der Bestimmung der Stat5-Proteinlevel wurde die Stat5- und Stat3-Tyrosinphosphorylierung über Phosphotyrosin-spezifische Antikörper detektiert. 20µg Protein wurden für die Western Blot Analyse verwendet.

Ergebnisse

Unter normalen Kultivierungsbedingungen, mit Serum-haltigen Kulturmedium und in Abwesenheit zusätzlicher Zytokin- oder Hormon-Supplemente, wiesen die soliden Tumorzelllinien in der Summe deutlich reduzierte Mengen an phosphoryliertem Stat5, bei gleichzeitig erhöhter Stat3-Phosphorylierung, gegenüber den Leukämiezelllinien auf. Diese Beobachtungen deckten sich mehrheitlich mit Angaben vorheriger Analysen aus der Literatur. Am deutlichsten war eine Tyrosin-Phosphorylierung in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 erkennbar. Diese metastatische Prostataepithelzelllinie, isoliert aus dem Knochen eines 62-jährigen Kaukasiers mit aggressivem Prostata-Adenokarzinom, wächst androgenunabhängig, begünstigt durch einen heterozygoten p53-Verlust, einer c-Myc Genamplifikation und einer PTEN-LOF („loss of function“-)Mutation (van Bokhoven et al., 2003). Eine genomische Analyse chromosomaler Aberrationen von Prostatakarzinomzellen ergab zudem einen kompletten homozygoten Verlust der benachbarten Stat5B- und Stat3-Gene in Folge einer 500kb Sequenz-Deletion auf Chromosom 17 (Clark et al., 2003). Daher handelt es sich bei den im Western Blot detektierten Banden ausschließlich um phosphoryliertes und totales Stat5A-Protein, bei gleichzeitig kompletter Abwesenheit einer Stat5B- und Stat3-Expression. Fortgeschrittene, metastasierende und Hormon-refraktäre Prostatakarzinome zeichnen sich in der Mehrheit der Fälle durch eine autokrine Prolaktin (Prl)-Expression aus. Autokrine Prl-Signale, mit dem Resultat kontinuierlicher Stat5A-Tyrosinphosphorylierung über aktivierte Prl-Rezeptoren (PrLR) und Jak2 konnten auch in PC-3 Zellen detektiert werden (Dagvadorj et al., 2007). Weiterhin weisen PC-3 Zellen eine signifikante Reduktion der SOCS-Proteinexpression gegenüber gesundem Prostata-Epithel auf (Evans et al., 2007), wodurch die Menge an phosphoryliertem Stat5A, in Folge einer mangelnden Jak2-Inhibierung durch SOCS-Proteine, zusätzlich erhöht bzw. stabilisiert wird. Im Gegensatz dazu weisen die Brustkrebszelllinien MCF7, T-47D und SK-BR-3 erhöhte SOCS-Expressionslevel auf. Basierend auf der Expressionskontrolle durch Stat-Proteine, als natürlicher Feedback-Regulationsmechanismus, konnte die erhöhte SOCS-Expression dieser Zelllinien auf konstitutive Stat1- und Stat3-Aktivitäten zurückgeführt werden, mit dem Resultat erhöhter mitogener MAP-Kinase Signale und reduzierter Stat5-Aktivierung, wie am Beispiel reduzierter Wachstumsinhibierung nach IFN γ -Stimulation gezeigt werden konnte (Evans et al., 2007; Raccurt et al., 2003). Autokrine Signalschleifen und die Überexpression von HER2/neu sowie weiterer Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie, in Kombination mit einer erhöhten Src-Kinase Aktivität, konnten als primäre Mechanismen konstitutiver Stat3-Tyrosinphosphorylierung in Brustkrebszelllinien wie MCF7, T-47D und SK-BR-3 identifiziert werden (Garcia et al., 2001; Li & Shaw, 2002). Wie in Kap. 1.3.2 zuvor erläutert induziert Stat3, in Abwesenheit von transkriptionell aktivem Stat5, einen undifferenzierten, aggressiv proliferierenden und invasiven

Phänotyp des Mammakarzinoms. Die ER⁺-Zelllinien MCF7 und T-47D weisen eine Überexpression des PrIR auf, welcher vor allem in T-47D Zellen, mit einem um den Faktor 25-30 erhöhten PrIR mRNA-Level, stark vermehrt gegenüber normalem Brustdrüsen-Epithel exprimiert wird (Peirce et al., 2001) und nach Prl-Stimulierung und Jak2-Aktivierung zu einem raschen Anstieg der Stat5-Tyrosinphosphorylierung führt (siehe Abb.3-5).

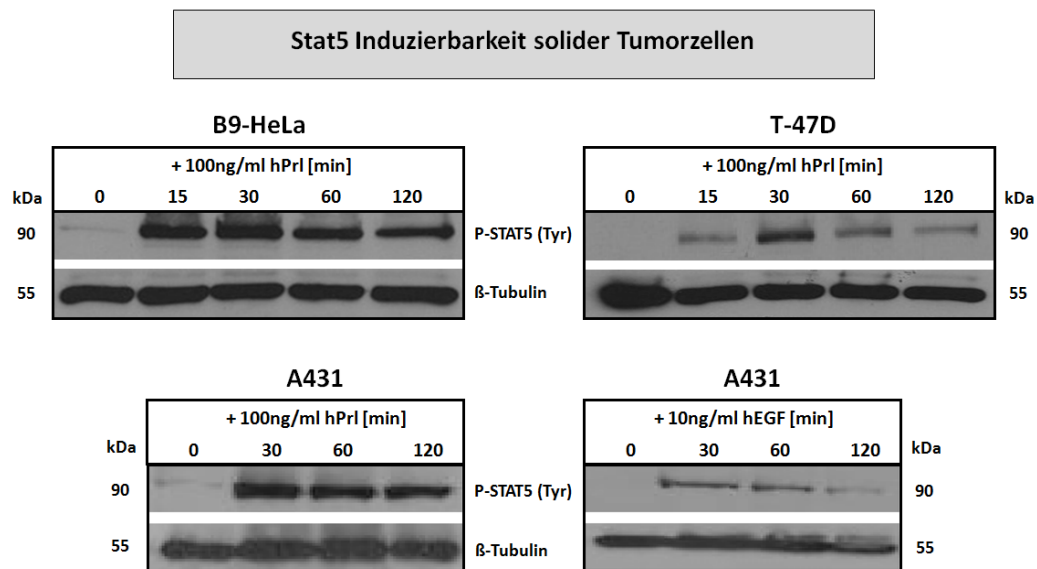


Abb. 3-5: Stat5 Induzierbarkeit solider Tumorzellen

Analyse der Stat5-Tyrosinphosphorylierung in den humanen Tumorzelllinien A431, B9-HeLa und T-47D nach Inkubation mit aktivierenden Liganden. Die Zellen wurden mit 100ng/ml humanem Prolaktin, sowie zusätzlich 10ng/ml humanem EGF im Falle der A431-Zelllinie, über einen Zeitraum von 2h inkubiert. Im Abstand von 30 min (B9-HeLa und T-47D zusätzlich nach 15 min) wurden die Zellen lysiert und anschließend im Western Blot analysiert. 20µg Protein wurden für die Western Blot Analyse verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Prl zu einer phänotypischen Veränderung von T-47D Zellen führt. Über die Aktivierung von Genen wie E-Cadherin und die Repression von Genen wie BCL6, wirkt Stat5 einer Stat3-Aktivität entgegen und induziert eine Differenzierung der Zellen, bei gleichzeitig reduzierter Proliferation und Invasivität (Walker et al., 2009). Dieser Effekt kann durch Expression einer dominant-negativen Stat5-Mutante inhibiert werden, was die tumorsuppressive Aktivität von Stat5 in etablierten, aggressiv wachsenden und invasiven Mammakarzinomen unterstreicht (Sultan et al., 2005). In den Karzinomzelllinien epidermalen Ursprungs A431 und B9-HeLa lässt sich eine Aktivierung von Stat5 ebenfalls nach Prl-Stimulation induzieren, wobei es sich bei den B9-HeLa Zellen um modifizierte HeLa-Zellen handelt, welche stabil Stat5 und den PrIR überexprimieren. A431 Zellen weisen eine Überexpression des EGF-Rezeptors (ErbB1) als Folge einer Amplifikation des ErbB1-Gens auf. Es konnte gezeigt werden, dass Stat1, Stat3 und Stat5 konstitutiv assoziiert mit ErbB1 vorliegen und Jak-unabhängig, auch in Abwesenheit von EGF, durch rekrutierte überaktive Src-Kinasen basal phosphoryliert werden können (Olayioye et al., 1999). Dies liefert eine Erklärung für das zwar geringe, aber

Ergebnisse

detektierbare Maß an Stat5-Tyrosinphosphorylierung in Abwesenheit von EGF (siehe Abb.3-4). Zusätzlich konnte eine EGF-unabhängige Formierung von ErbB2/ErbB4 Heterodimeren mit einer Stat5-Aktivierung in Verbindung gebracht werden (Olayioye et al., 1999). A431 Zellen weisen ebenfalls eine erhöhte Expression des PrIR auf, weshalb sich sowohl nach Zugabe von EGF als auch PrI eine rapide Stat5-Aktivierung erkennen ließ. Die stark erhöhte und kontinuierliche Stat3 Aktivierung in Melanomen und epidermoiden Karzinomen, wie im Falle der A413 oder HeLa Zelllinie, lässt sich auf aberrante Aktivitäten mutierter oder amplifizierter Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase wie Pyk2, zusätzlich zu Src, zurückführen (Shi & Kehrl, 2004). Hinsichtlich eines prokanzerogenen Einflusses von Stat-Proteinen, ist vor allem aber eine deregulierte Stat3-Aktivität als ein kritischer Faktor der Tumorgenese kolorektaler Karzinome und Glioblastome beschrieben, wie unter anderem Studien anhand der auch hier verwendeten Zelllinien HCT116, HT29 und MZ-54 ergaben (Senft et al., 2011; Weber et al., 2012). Dementsprechend konnten unter normalen Kultivierungsbedingungen auch stark erhöhte Level Tyrosin-phosphoryliertem Stat3-Proteins im Western-Blot detektiert werden (siehe Abb.3-4), welche vorherigen Beobachtungen aus der Literatur entsprachen. Die genauen Mechanismen konstitutiver Stat3-Aktivierung, vor allem in den HCT116- und MZ-54-Zellen, sind bislang unklar. Eine aberrante Aktivität zytoplasmatischer Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase wie Src oder Bmx gilt aber auch im Falle dieser Zellen als wahrscheinlich. Jedoch konnten neuerliche Studien auch eine erhöhte Expression und Aktivierung von Stat5 in primärem Tumorgewebe von Patienten dieser beiden Krebsarten identifizieren (Cao et al., 2011; Du et al., 2012). Im Gegensatz zu den Beobachtungen welche in Brustkrebszellen fortgeschrittenem Stadiums gemacht wurden, konnte in kolorektalen Krebszellen wie den HT29-Zellen gezeigt werden, dass eine Inhibierung von Stat5 in reduzierter Invasivität und Wachstum resultiert (Xiong et al., 2009), weshalb man auch von einer prokanzerogenen Aktivität von Stat5 in der Entwicklung kolorektaler Karzinome sprechen kann.

Die Charakterisierung leukämischer und solider Tumorzelllinien, hinsichtlich der Expression und Aktivierung von Stat5, ließ unter normalen, serumhaltigen Kultivierungsbedingung im Vergleich deutlich erhöhte Mengen an Tyrosin-phosphoryliertem und daher transkriptionell aktivem Stat5 in leukämischen Zellen erkennen, während generelle Unterschiede einer Stat5-Expression nur in wenigen Fällen feststellbar waren. Hierzu zählte die kolorektale Karzinomzelllinie HCT116, welche eine nur minimale Stat5-Expression aufwies, und die Prostatakarzinomzelllinie PC-3, welche, aufgrund einer Deletion des Stat5B-Gens, durch eine alleinige Stat5A-Expression gekennzeichnet ist. Um den Einfluss von Stat5 im Prozess der Tumorgenese verschiedener Gewebe zu analysieren, wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansätze zur funktionellen Inhibierung von Stat5 verfolgt, welche teils große Varianzen an Effekten hervorbrachten. Hierzu

zählten die Expression von dominant-negativen Stat5-Mutanten, siRNA-Interferenz oder die Expression von „antisense“ oder „decoy“-Oligonukleotiden. Als „proof of principle“ einer späteren funktionalen Stat5-Intervention durch Peptidaptamer-Konstrukte, erfolgte daher zunächst eine gesamtheitliche Analyse der Effekte einer Stat5-Inhibierung auf die Viabilität verschiedener Tumorzelltypen, über die Methodik der RNA-Interferenz.

3.1.2 VALIDIERUNG DER STAT5-ABHÄNGIGKEIT HUMANER TUMORZELLEN DURCH RNA-INTERFERENZ

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) basiert auf einer, durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNA-„small interfering RNA“) induzierten, sequenzspezifischen Degradation von mRNA. Evolutionär betrachtet dient die RNA-Interferenz der Abwehr schädigender Fremd-DNA, in Form viraler Retroelemente oder Transposons. Die Expression RNA-interferierender MicroRNA (miRNA) hat sich im Zuge der Evolution mehrzelliger Organismen zu einem essentiellen genregulatorischem Mechanismus entwickelt, durch welchen gewebespezifische Funktionen und Phänotypen bestimmt werden. Heute wird die RNA-Interferenz als molekularbiologisches Werkzeug zur spezifischen Inhibierung der Expression bestimmter Zielgene genutzt. Hierbei werden synthetische siRNA-Oligonukleotide (19-23 bp), mit einem jeweils 3'-Zwei-Nukleotid-Überhang, entweder direkt über diverse Transfektionstechniken oder über Liposome in die Zielzellen eingeschleust oder in Form prozessierbarer shRNA-Moleküle („short hairpin RNA“) in den Zielzellen exprimiert. Vergleichbar mit der unprozessierten, endogenen miRNA (pre-miRNA: „precursor miRNA“) weisen shRNA-Moleküle eine Länge von bis zu 70-80 Nukleotiden auf, welche über komplementäre Sequenzen nach der Transkription eine RNA-Doppelhelix mit Haarnadelstruktur ausbilden. Der Transfer von shRNA in die Zielzellen erfolgt über Expressionsvektoren, welche entweder als Plasmide transfiziert oder als virale Vektoren in die Zielzellen transduziert werden (Iorns et al., 2007).

Der Transfer der in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Sequenzen in die Zielzellen erfolgte über lentivirale Vektoren. Nach Infektion der Zielzellen und Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom wird die shRNA je nach verwendetem Promotor über die Polymerase II oder III exprimiert. Das shRNA-Primärtranskript wird zunächst über die RNase Drosha zur fertigen shRNA verarbeitet und über Ran-GTP aus dem Zellkern exportiert. Im Zytosol erfolgt eine Prozessierung der shRNA zur kurzen doppelsträngigen siRNA durch die Endoribonuclease Dicer. Die siRNA wird in der Folge in den RISC-Enzymkomplex („RNA-induced silencing complex“) über

RNA-bindende Proteine der Argonaut-Familie integriert. Im RISC-Komplex wird die siRNA-Doppelhelix entwunden und gespalten, wobei der zur Ziel-mRNA komplementäre Einzelstrang („Leitstrang“) im RISC-Komplex gebunden bleibt. Über den Leitstrang erkennt und bindet der nun vollständig aktivierte RISC-Komplex spezifisch die Ziel-mRNA, welche in der Folge durch Endonukleasen des RISC-Komplexes, wie dem AGO2-Argonautprotein, gespalten und zu kurzen Fragmenten degradiert wird und nicht mehr translatiert werden kann.

3.1.2.1 KLONIERUNG LENTIVIRALER SHRNA-EXPRESSIONSVEKTOREN ZUR INTERFERENZ MIT HUMANER STAT5A- UND STAT5B-MRNA

Die in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Sequenzen zum spezifischen „Knockdown“ humaner Stat5A- und Stat5B-mRNA wurden von Sigma [MISSION®shRNA, SIGMA-Aldrich] in dem lentiviralen pLKO-Transfervektor bereitgestellt (siehe Kap. 2.1.6.3 & 2.1.7.1). Da der pLKO-Vektor alleinig über ein Puromycin-Resistenzgen als selektierbaren Marker verfügt, erfolgte eine Umklonierung in den lentiviralen eGFP-exprimierenden pLeGO-G Vektor [Lentiviral Gene Ontology Vectors, www.lentigo-vectors.de], wodurch effiziente Analysen von Transduktionseffizienzen durchgeführt sowie Veränderungen der Anzahl transduzierter Zellen innerhalb einer Zellpopulation beobachtet und über FACS sortiert werden konnten. Die humanen U6- und H1-Polymerase III-Promotoren werden standardmäßig für die Expression von shRNA-Sequenzen genutzt, da sich diese Promotoren, aufgrund ihrer natürlichen Funktion der Expressionsregulation kurzer RNAs wie tRNAs oder 5 S-RNA, als besonders effizient hinsichtlich der Expression von shRNAs erwiesen haben (Makinen et al., 2006). Die shRNA-Sequenz wird in der „sense-loop-antisense“-Abfolge transkribiert, gefolgt von einer Poly-(T)-Terminationssequenz. Der „antisense“-Strang repräsentiert den zur Ziel-mRNA komplementären Leitstrang welcher später die Degradation im RISC-Komplex vermittelt. Im Falle der Verwendung eines U6-Promotors erwies es sich zudem als sinnvoll eine 27 Nukleotid U6-Leader-Sequenz vor Beginn der shRNA-Sequenz einzubauen, da dies die Effizienz des mRNA-Knockdowns, vermutlich in Folge erhöhter Stabilität und Prozessierung des Primärtranskripts, verbesserte (Paul et al., 2002). Daher wurde sowohl die shRNA-Sequenz als auch der U6-Promotor des pLKO.1-puro-Vektors mit zwischengelagerter Leader-Sequenz in den pLeGO-G Vektor umkloniert und gegen dessen U6-Promotor ersetzt. Der Klonierungsablauf gestaltete sich wie folgt: Das amplifizierte [U6-Promotor-shRNA]_{pLKO.1-puro}-Fragment wurde zunächst in den pCR2.1-TOPO-Vektor subkloniert und nach Restriktion mit *NotI* und *SaII* über die komplementären Restriktionsenden

PspOMI und *XhoI* gegen den U6-Promotor des pLeGO-G Vektors ersetzt (siehe Abb.3-6). Das lentivirale pLeGO-G Transfer-Plasmid besitzt eine SIN-Konfiguration („self-inactivating“), welche nach reverser Transkription und Integration der proviralen DNA ins Wirtsgenom eine alleinige Expression der über den U6-Promotor gesteuerten shRNA- und der über den SFFV-Promotor gesteuerten eGFP-Expression sicherstellt (siehe Kap. 2.2.3.3). Zusätzlich kodiert das Plasmid für essentielle cis-regulatorische Elemente zur Verpackung, Reversen Transkription, Integration und Transgenexpression (Ψ , LTRs, cPPT, RRE, WPRE), welche aus dem HIV-1 Genom abgeleitet sind. Für die Transduktion der Zielzellen wurden stabile VSV-G pseudotypisierte Lentiviren hergestellt, was die Infektion verschiedener hämatologischer und solider Zelltypen ermöglichte.

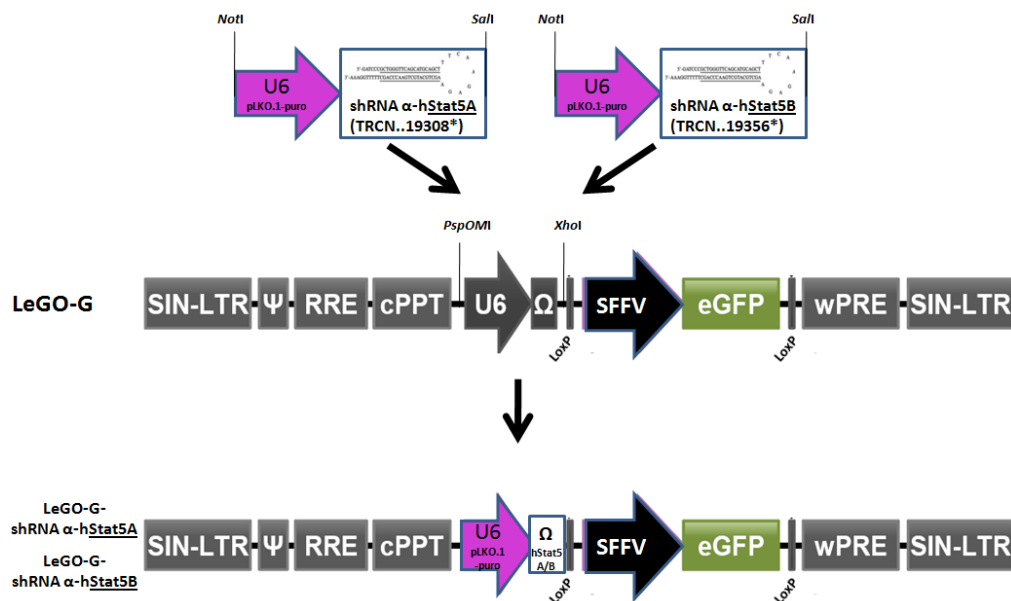


Abb. 3-6: Klonierung der lentiviralen (SIN)-LeGO-G shRNA-Expressionsvektoren

Die gegen die humane Stat5A- bzw. Stat5B-mRNA gerichteten shRNA-Sequenzen [MISSION® shRNA, Sigma-Aldrich, TRC-Nr.: *19308 (shRNA α -hStat5A) und *19356 (shRNA α -hStat5B)] wurden gemeinsam mit dem U6-Promotor (+ 27 Nukleotid U6-Leader-Sequenz) aus dem pLKO-Vektor amplifiziert und in den pCR2.1-TOPO-Vektor subkloniert. Nach Amplifikation der TOPO-Vektoren wurde das [U6-Promotor-shRNA]_{pLKO.1-puro}-Fragment über *NotI* und *SalI* ausgeschnitten und über die komplementären Restriktionsenden *PspOMI* und *XhoI* gegen den U6-Promotor des pLeGO-G Vektors ersetzt. Die Expression des eGFP-Fluoreszenzmarkers wird separat über den SFFV-Promotor gesteuert.

3.1.2.2 INHIBIERUNG DER STAT5A/B-EXPRESSION DURCH RNA-INTERFERENZ („STAT5A/B SHRNA-DOPPEL-KNOCKDOWN“)

In allen durchgeführten Experimenten erfolgte ein kombinierter shRNA-Transfer, mit der Herunterregulierung der mRNA beider Stat5-Isoformen. Dabei wurden die Lentiviren mit der shRNA gegen humanes Stat5A bzw. Stat5B, nach Bestimmung des Virustiters, im Verhältnis 1:1 zu den Zielzellen gegeben, wobei die zugegebene Virusmenge, mit einer MOI=50, stets dem

Wert der Leervektor-Kontrolle entsprach. Im Fokus des Interesses stand dabei zunächst die Analyse der Effekte einer Stat5-Inhibierung auf die Viabilität humaner Leukämiezelllinien, mit dem Vergleich Bcr-Abl-vermittelter Stat5-Aktivierung im Falle der CML- und Jak2(V617F)-vermittelter Stat5-Aktivierung im Falle der AML- bzw. MPS-Erkrankungen.

3.1.2.2.1 STAT5-KNOCKDOWN IN K562- & HEL-ZELLEN

Ohne die Beeinflussung ihres Differenzierungsverhaltens durch Zugabe stimulierender Agenzien wie Zytokinen, weisen K562-CML- und HEL-AML(M6)-Zellen unter normalen Zellkultur-Bedingungen eine vergleichbare, mikroskopisch nicht zu unterscheidende Morphologie erythroid-myeloischer Progenitorzellen auf. Ebenfalls vergleichbar ist das hohe Maß an Stat5-Tyrosinphosphorylierung, wobei mit Bcr-Abl und Jak2(V617) jedoch zwei verschiedene, mutierte Tyrosinkinasen, als Auslöser, der Stat5-Aktivierung zu Grunde liegen. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivierung von Stat5, sowohl über Bcr-Abl als auch über Jak2(V617), zentrale Mechanismen leukämischer Transformation darstellen, welche sich zudem essentiell auf die Sicherung von Überlebensfähigkeit, Selbsterneuerung und Expansion leukämischer Stamm- und Progenitorzellen auswirken (Funakoshi-Tago et al., 2010; Hoelbl et al., 2010; Walz et al., 2012). Auf welchem Wege diese Mechanismen zu einer Ausprägung unterschiedlicher Krankheitsbilder myeloproliferativer Neoplasien, mit der Ausbildung von CML oder CML-ähnlichen Verläufen im Falle der Bcr-Abl Translokation und der Ausbildung verschiedener MPS-Erkrankungen oder verschiedener Formen akut verlaufender Leukämien nach Jak2(V617F)-Mutation, führen, ist bislang jedoch größtenteils unbekannt. Um die Stat5-Abhängigkeit Bcr-Abl positiver CML- und Jak2(V617)-positiver akut erythroleukämischer AML-Zellen zu verifizieren, wurden zunächst parallele Stat5-Knockdown Experimente in K562- und HEL-Zellen durchgeführt.

Die Effizienz des Stat5-Doppel-Knockdowns, nach Expression der shRNA, wurde anhand beider Stat5-Isoformen auf Proteinebene im Western-Blot analysiert (siehe Abb.3-7). Der lentivirale Transfer von Stat5-shRNA wies in beiden Zelllinien eine vergleichbare Effizienz in der Herunterregulierung der Stat5-Proteinlevel auf. Sechs Tage nach der Transduktion konnte eine deutliche Reduktion der Stat5-Expression in den Zellen festgestellt werden, wobei die Menge an tyrosinphosphoryliertem Stat5 auf ein nahezu nicht mehr detektierbares Level reduziert wurde. Zehn Tage nach der Transduktion war ein weiterer Rückgang des Stat5-Gesamtproteins zu erkennen, wobei die Menge phosphorylierter Stat5-Proteine leicht zunahm. Diese Beobachtung lässt auf eine sofortige Phosphorylierung restlichen Stat5-Proteins, in Folge des permanenten Einflusses aberranter Bcr-Abl- und Jak2(V617F)-Kinaseaktivität, schließen. Drei Wochen nach der

Transduktion schien die Wirkung der shRNA aufgehoben, da sowohl die Banden des Stat5-Gesamtproteins als auch tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine die Intensität der Leervektor-Kontrolle aufwiesen und im Falle der HEL-Zellen diese sogar übertrafen.

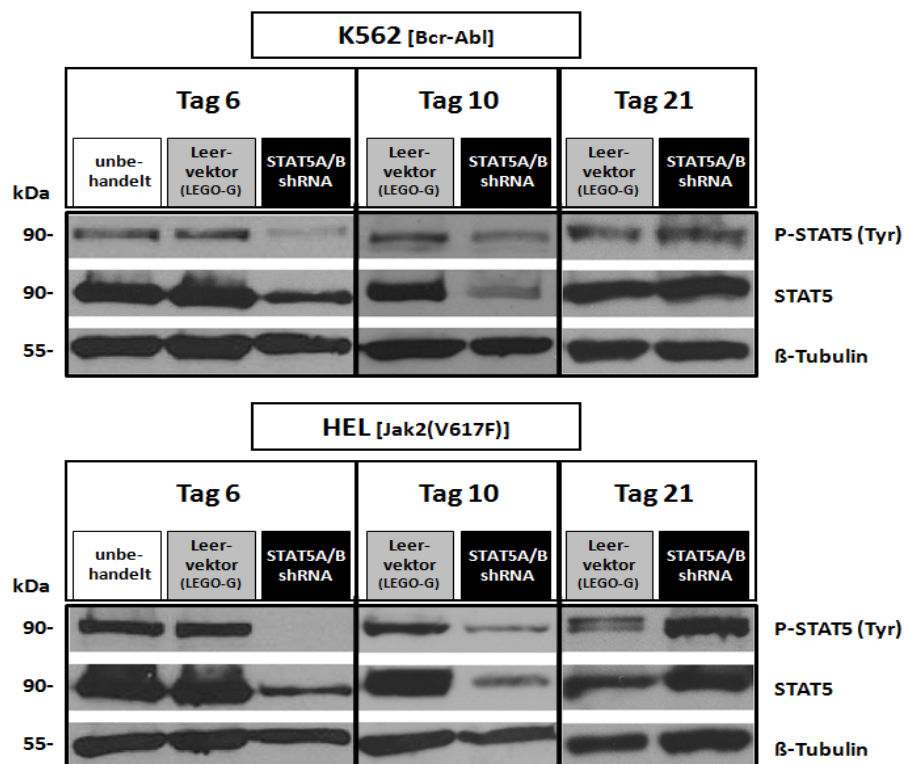


Abb. 3-7: Inhibierung der Expression von Stat5A und Stat5B in K562- und HEL-Zellen durch RNA-Interferenz

K562- und HEL-Zellen wurden mit VSV-G pseudotypisierten LeGO-G Lentiviren mit einer MOI=50 transduziert, welche entweder den leeren LeGO-G Transfervektor ohne Transgen oder mit shRNA gegen humanes Stat5A bzw. Stat5B exprimierten. Die Infektion mit shRNA kodierenden Viren gegen Stat5A bzw. Stat5B erfolgte im Verhältnis 1:1. Die Transduktionseffizienz lag bei ca. 90% transduzierter Zellen. 6, 10 und 21 Tage nach der Transduktion wurden Gesamtzelllysate hergestellt und im Western Blot hinsichtlich der Expression von Stat5 und der Menge Tyrosin-phosphorylierter Stat5-Proteine analysiert.

Von besonderem Interesse war die Beobachtung des Einflusses des Stat5-Knockdowns auf die Viabilität und das Wachstum beider Zelllinien. Für die Analyse zellulärer Viabilität wurde der XTT-Assay durchgeführt (siehe Kap. 2.2.5.1.1). Über die photometrische Quantifizierung metabolischer Aktivität lassen sich mit diesem Assay Aussagen zu der Zellviabilität treffen, welche, unterstützt durch eine mikroskopische Verifikation, zugleich Rückschlüsse auf Veränderungen des Zellwachstums erlauben. Für die Messung wurden unbehandelte sowie Leervektor- und shRNA exprimierende Zellen zwei Tage nach der Transduktion in einer definierten Zellzahl ausgesät und über einen Zeitraum von knapp drei Wochen im Abstand von zwei bis drei Tagen analysiert (siehe Abb.3-8A).

Ergebnisse

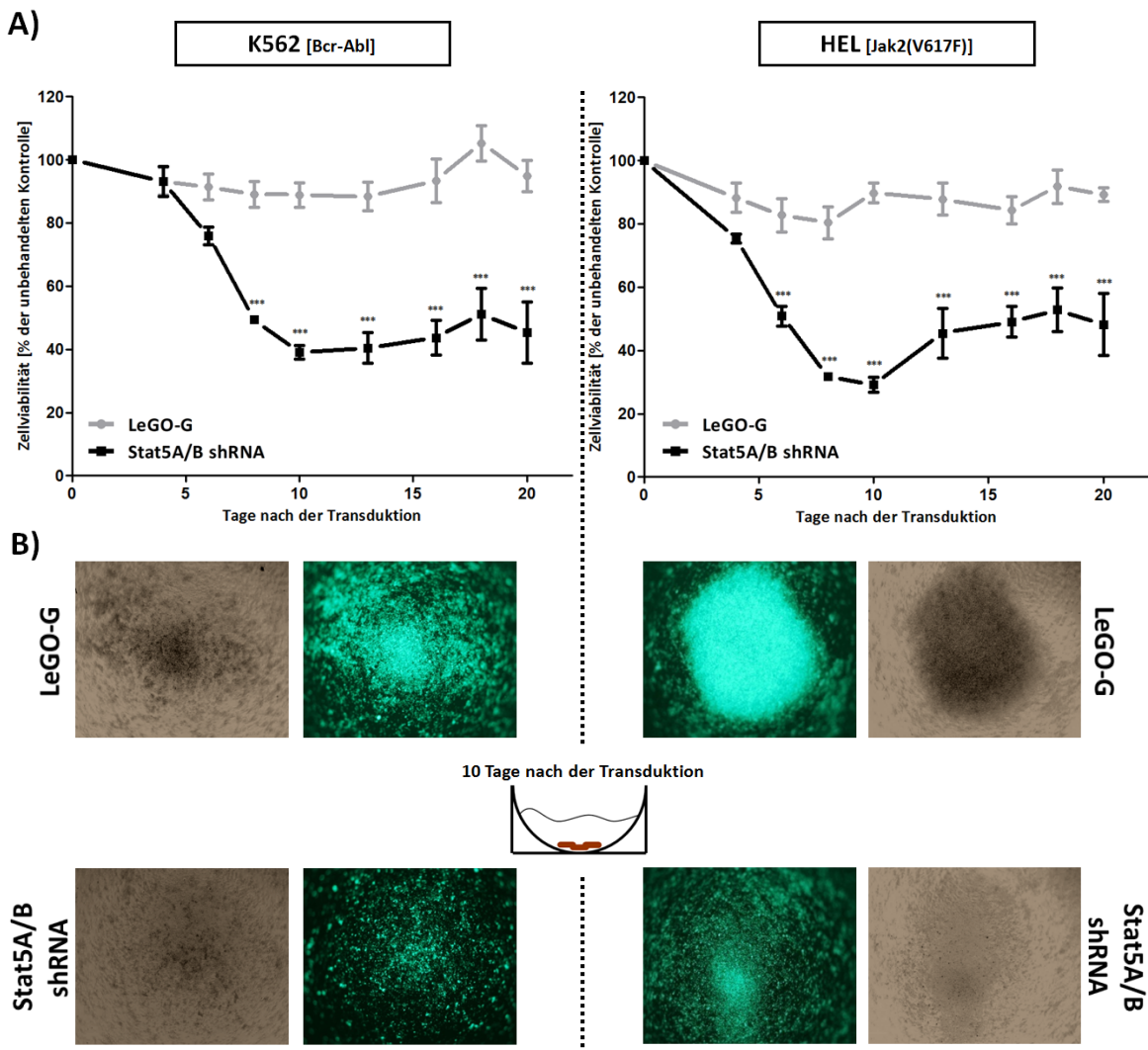


Abb. 3-8: Reduktion der Viabilität von K562- und HEL-Zellen durch Stat5A/B-shRNA

A) Die Messung zellulärer Viabilität erfolgte über den XTT-Assay. Unbehandelte und mit Lentiviren infizierte K562- und HEL-Zellen wurden 2 Tage nach der Transduktion in einer definierten Zellzahl ausgesät (2×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte) und in einem Abstand von 2-3 Tagen über einen Zeitraum von 20 Tagen analysiert. Die Graphen zeigen die an den verschiedenen Zeitpunkten photometrisch ermittelten XTT-Werte der Leervektor- und shRNA-exprimierender Zellen prozentual zu dem jeweiligen Wert unbehandelter Zellen. ($n=4$; MW \pm SD). *** $p < 0,001$ gegenüber LeGO-G Levektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test) **B)** K562- und HEL-Zellen wurden entweder mit LeGO-G Leervektor oder Stat5AB-shRNA kodierenden Lentiviren infiziert und für die Durchführung des XTT-Assays in 96-Well Rundboden-Platten kultiviert. 10 Tage nach der Transduktion wurde die in der Mitte der Wells abgesetzte Zellmasse sowohl durch Phasenkontrast-Aufnahmen, als auch fluoreszenzmikroskopisch, über die Expression von eGFP, dokumentiert.

Zwischen dem 5. und 10. Tag nach der Transduktion führte die Inhibierung der Stat5-Expression in beiden Zelllinien zu einem rapiden Abfall zellulärer Viabilität im Vergleich zu den Kontrollen. Hierbei kann man davon ausgehen, dass in etwa ab dem 3. bis 4. Tag nach der Transduktion die shRNA durch die Zielzellen effizient exprimiert wird. Am Zeitpunkt des 10. Tages nach der Transduktion wiesen K562-Zellen eine in etwa um 60% und HEL-Zellen eine in etwa um 70% reduzierte Zellviabilität gegenüber unbehandelten Zellen auf. Danach stabilisierten sich die Werte und stiegen, einhergehend mit der im Western Blot beobachteten Wiederkehr der Stat5-

Expression, bis zum Zeitpunkt von etwa drei Wochen nach der Transduktion wieder leicht an. Dass die deutliche Reduktion zellulärer Viabilität nach 10 Tagen mit einer Reduktion des Zellwachstums einhergeht, konnte durch das Anfertigen fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen veranschaulicht werden. Die Durchführung des XTT-Assays erfolgte in 96-Well Platten mit Rundboden, speziell für Suspensionszellen. Bereits nach wenigen Stunden setzten sich die Suspensionszellen an der tiefsten Stelle, im Zentrum des Rundbodens ab, was sowohl einen Mediumwechsel während des Zeitraums der Analyse ermöglichte, als auch eine einfache mikroskopische Dokumentation der Zellen im Well erlaubte (siehe Abb.3-8B).

Für eine genauere Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Zellen, wurde zusätzlich die kumulative Zellzahl (KZZ; siehe Kap. 2.2.5.1.2) über einen Zeitraum von 30 Tagen nach der Transduktion ermittelt. Nach Ablauf eines Monats konnte dabei eine deutliche Reduktion der Zellzahl Stat5-shRNA exprimierender K562- und HEL-Zellen gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die reine eGFP-Expression Leervektor-transduzierter Zellen resultierte in einer vergleichsweise nur geringfügigen Reduktion der Zellzahl. Zudem ließen die Wachstumskurven erkennen, dass die reduzierte Zellzahl shRNA-exprimierender Zellen vor allem auf eine Wachstumsstagnation innerhalb der ersten 10 bis 14 Tage nach erfolgter Virustransduktion zurückzuführen war. Danach schienen sich die Zellen von dem Stat5-Knockdown zu erholen und wiesen gegenüber den Kontrollen vergleichbare Teilungsraten, mit dem Resultat exponentiellen Wachstums, auf (siehe Abb.3-9).

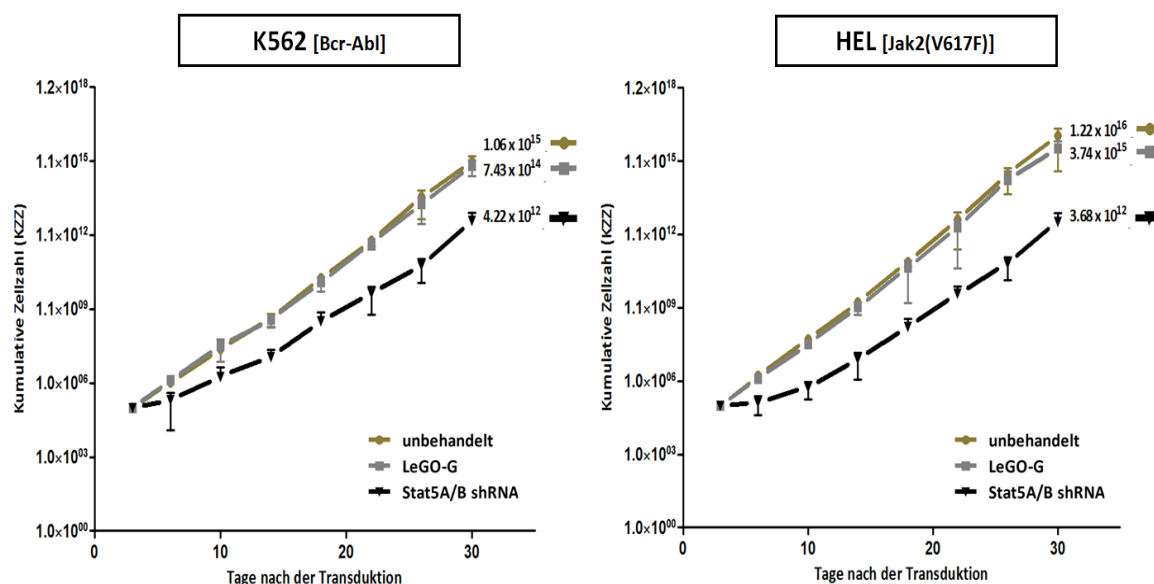
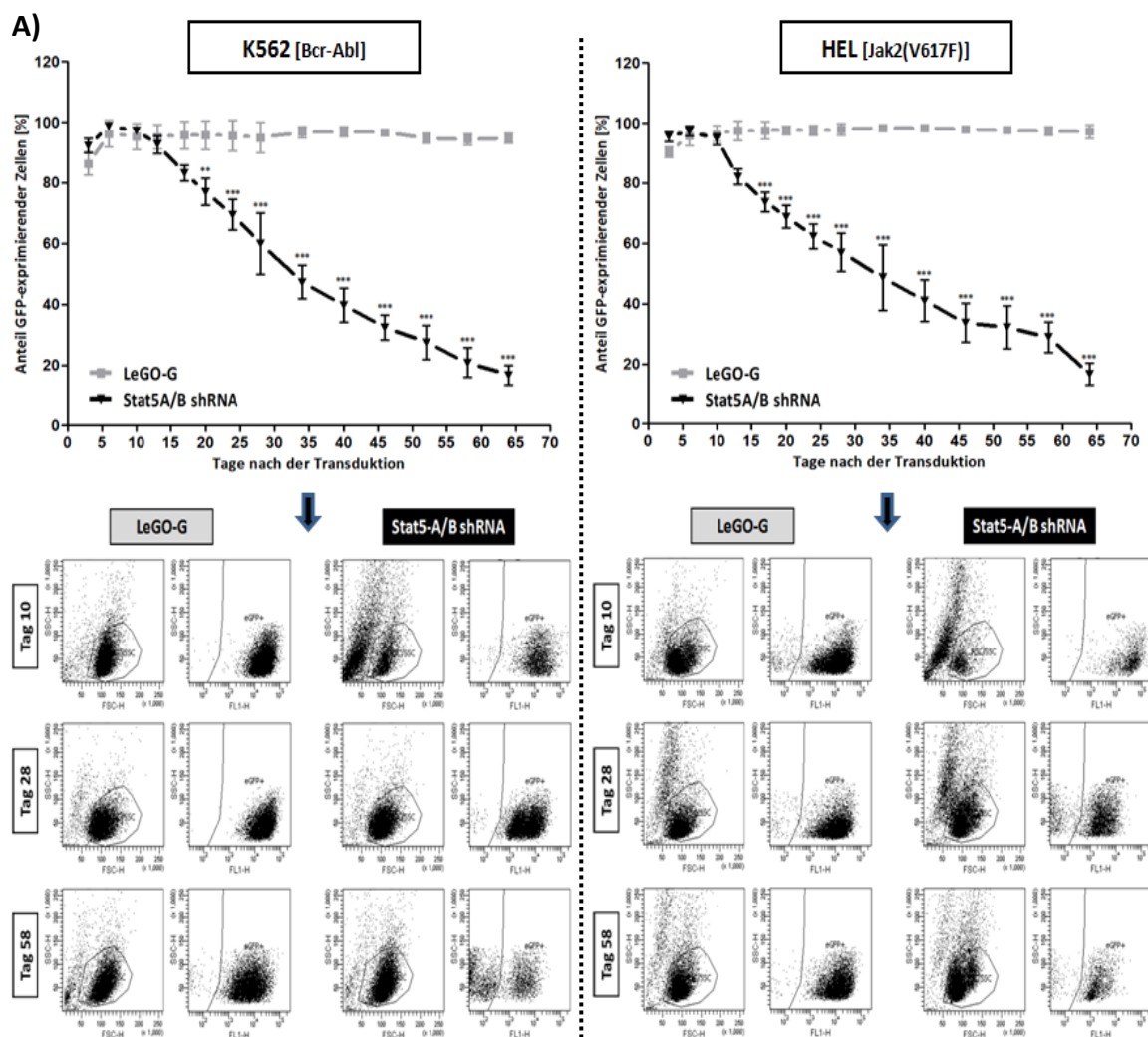


Abb. 3-9: Reduktion des Wachstums von K562- und HEL-Zellen durch Stat5-A/B shRNA

Mit einer Passagierung und Zellzahlbestimmung im Abstand von 3-4 Tagen wurde die kumulative Zellzahl (KZZ) unbehandelter und mit Lentiviren infizierter (LeGO-G, Stat5A/B shRNA) K562- und HEL-Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen ermittelt. 3 Tage nach der Transduktion wurden dafür 1×10^5 Zellen in einem definierten Volumen von 5 ml ausgesät. Die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen (MW \pm SD) sind als Wachstumskurven, mit der nach Abschluss des Analysezeitraumes ermittelten Zellzahl, dargestellt.

Ergebnisse

Die Erholung der Zellen nach viralem shRNA-Transfer, mit der im Western Blot beobachteten Wiederkehr der Stat5-Expression und Phosphorylierung nach ca. drei Wochen und dem Wiederanstieg zellulären Wachstums und Vitalität, ließ einen Zelltod shRNA-exprimierender Zellen und ein Überleben nicht- oder schwach-infizierter Zellen mit geringer shRNA-Expression, unterhalb des Wirkoptimums, vermuten, was in einem Auswachsen dieser Zellpopulationen innerhalb des infizierten Zellpools resultiert. Zusätzlich konnte eine epigenetische Inhibierung der shRNA-Expression durch Abschaltung des U6-Promotors („Gen-“ bzw. „Promotor-Silencing“) nicht ausgeschlossen werden. Da die eGFP-Expression des LeGO-G-Transfervektors separat über den SFFV-Promotor gesteuert wird, sollte eGFP, im Falle eines Silencing-Effektes des U6-Promotors, vergleichbar mit der Levektor-Kontrolle, weiterhin exprimiert werden. Daher erfolgte nach Transduktion der Zielzellen eine Beobachtung zellulärer eGFP-Expression über einen Zeitraum von ca. 9 Wochen, mit der Messung des Anteils GFP-positiver Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl und der mittleren Fluoreszenzintensität (siehe Abb.3-10) im FACS.



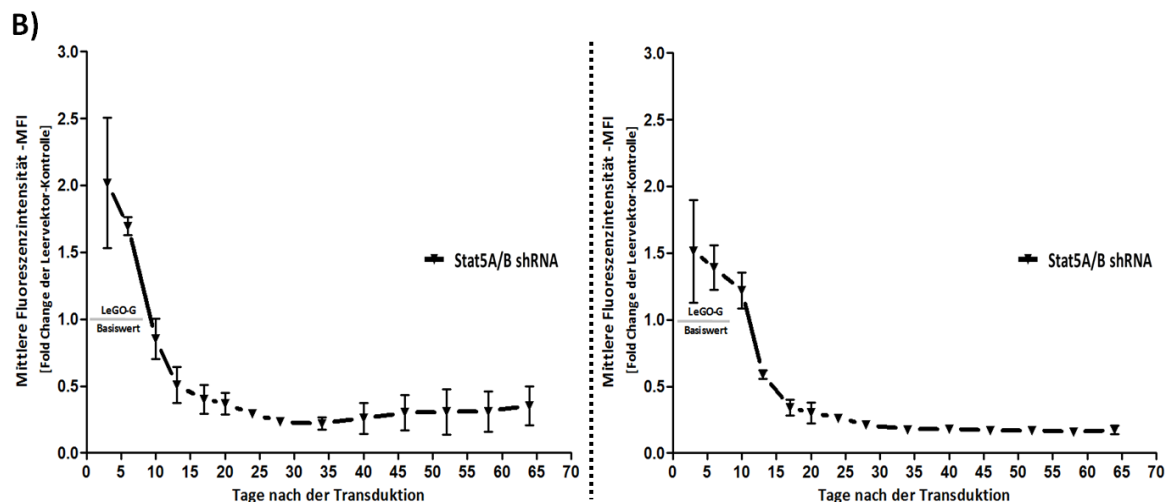


Abb. 3-10: Messung des Anteils GFP-exprimierender Zellen und der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität nach shRNA-Transduktion

A) K562- und HEL-Zellen wurden mit LeGO-G-Leervektor und Stat5A/B-shRNA exprimierenden Lentiviren infiziert und in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von ca. 9 Wochen hinsichtlich des Anteils GFP-positiver Zellen im FACS analysiert ($n=3$; $MW \pm SD$) $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ gegenüber LeGO-G-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test). Exemplarisch sind FACS-Plots der Messungen von Tag 10, 28 und 58 nach erfolgter Transduktion dargestellt, welche das SSC/FSC-Gating vitaler Zellen und der jeweiligen Menge GFP-exprimierender Zellen zeigen. **B)** Parallel zu der Messung des Anteils GFP-positiver Zellen erfolgte die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), als quantitatives Maß der GFP-Expression durch die analysierte Zellpopulation. Dabei wurden die MFI-Werte der LeGO-G Leervektorkontrolle als Basiswerte (=1) festgelegt und die gegenüber dem LeGO-G Basiswert relative Veränderung der MFI-Werte (Fold Change) shRNA-transduzierter Zellen im Graph dargestellt ($n=3$; $MW \pm SD$).

Die lentivirale Infektion von K562- und HEL-Zellen brachte Transduktionseffizienzen von 80-90 % hervor, basierend auf der ersten Messung des Anteils eGFP-exprimierender Zellen drei Tage nach der Transduktion. In der Folge, in etwa ab Tag 10, zeigte der Kurvenverlauf shRNA-exprimierender K562- und HEL-Zellen jedoch eine gleichmäßig, lineare Abnahme des Anteils eGFP-exprimierender Zellen bis unter 20% innerhalb der vital eingezäuten Zellpopulation („vital cell gate“) nach 9 Wochen, während der Anteil eGFP-exprimierender Zellen der Leervektor-Transduktion konstant zwischen 90-100 % verblieb. Auch die exemplarisch dargestellten FACS-Plots ließen im Falle der Leervektor-exprimierenden Zellpopulation keine optische Veränderung des Anteils eGFP-exprimierender Zellen erkennen. Die FACS-Messung shRNA-exprimierender Zellen zeigte jedoch bereits nach 10 Tagen eine deutliche Reduktion des vitalen Zellpools im SSC/FSC-Plot, einhergehend mit der Detektion schrumpfender Zellen, kleinerer Vesikel und apoptotischer Körperchen, als Produkte zellulären Zerfalls, welche das Seitwärtsstreulicht stärker brechen und daher zu einem Shift, mit der Detektion verstärkter SSC-Signale im SSC/FSC-Plot führten (siehe Kap. 2.2.3.4). Nahezu die gesamte Population des reduzierten vitalen Zellpools zeigte dabei eGFP-positiv Signale (siehe auch Abb. 3-8B). Im Verlauf der neun Wochen nahm die Anzahl vitaler Zellen der shRNA-transduzierten Zellpopulation wieder zu, während der

Ergebnisse

Anteil eGFP-exprimierender Zellen im Gate stetig sank. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), als ein im Durchschnitt pro Zelle berechneter quantitativer Wert für die in diesem Fall auftretende Stärke der eGFP-Expression verschiedener Zellpopulationen, nahm entsprechend der Reduktion eGFP-positiver und shRNA-exprimierender Zellen ebenfalls ab. Dabei lag der MFI-Wert innerhalb der ersten 10 Tage noch deutlich über dem Wert der Leervektor-transduzierten Zellen. Ein Phänomen welches trotz separater Promotoren häufig im Falle einer zusätzlich zum Fluoreszenzmarkergen stattfindenden Transgenexpression beobachtet werden kann. Zwischen dem 10. und 20. Tag der Transduktion fiel dieser Wert jedoch rapide unter den Leervektor-Vergleichswert und die shRNA-transduzierte Zellpopulation wies nur noch schwache Intensitäten einer GFP-Expression auf. Zusammenfassend ließen diese Ergebnisse einen proapoptotischen Effekt einer Inhibierung der Stat5-Expression durch shRNA in diesen Zellen vermuten. Zusätzlich sei erwähnt, dass ein Sortieren stark GFP-exprimierender Zellen wenige Tage nach der Transduktion zu einem kompletten Absterben shRNA-exprimierender Zellen an den darauffolgenden Tagen geführt hat, was eine weitere experimentelle Auswertung unmöglich machte. Diese Beobachtung unterstrich die Theorie der Apoptose-Induktion von K562- und HEL-Zellen durch shRNA-vermitteltem Stat5-Knockdown und ließ erkennen, dass alleinig uninfizierte und einhergehend mit einer schwachen eGFP-Expression gering infizierte bzw. in einem geringen Umfang shRNA-exprimierende Zellen innerhalb der transduzierten Zellpopulation überlebten.

Für eine detailliertere Analyse dieser Beobachtungen wurden die Zellen durch Annexin V/7-AAD Doppelfärbung 10 Tage nach der Transduktion auf eine Induktion der Apoptose im FACS untersucht (siehe Kap. 2.2.5.1.3). Die Zellfärbung mit Annexin V und 7-AAD ermöglicht eine differenzierte Detektion früh- und spätapoptotischer Zellstadien. Hierbei wird das zu Beginn des Apoptoseprozesses auf der Außenseite der Zellmembran exponierte Phosphatidylserin (PS) spezifisch mit Annexin V und die DNA spätapoptotischer Zellen, in Folge des Verlustes der Membranintegrität, durch interkalierendes 7-AAD markiert bzw. angefärbt. Zellen die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden sind daher Annexin V-positiv und 7-AAD-negativ und lassen sich dadurch von spätapoptotischen Zellen, mit einer 7-AAD und Annexin V doppelt positiven Färbung, unterscheiden. Unbehandelte und LeGO-G Leervektor-transduzierte K562- und HEL-Zellen wiesen keinen Zustand fortgeschrittener Apoptose auf, ließen sich jedoch in etwa 10% der Fälle mit Annexin V markieren, was sich auf einen nicht untypischen basalen Level an Apoptose-Induktion in der Zellkultur zurückführen lässt. Im Gegensatz dazu führte die Expression spezifisch gegen Stat5-gerichteter shRNA nach 10 Tagen zu einer sichtbar verstärkten Induktion der Apoptose, mit einem 7-AAD-positiven Shift der Zellen im FACS-Plot. Der Wert Annexin V-positiver Färbung blieb allerdings unverändert (siehe Abb. 3-11).

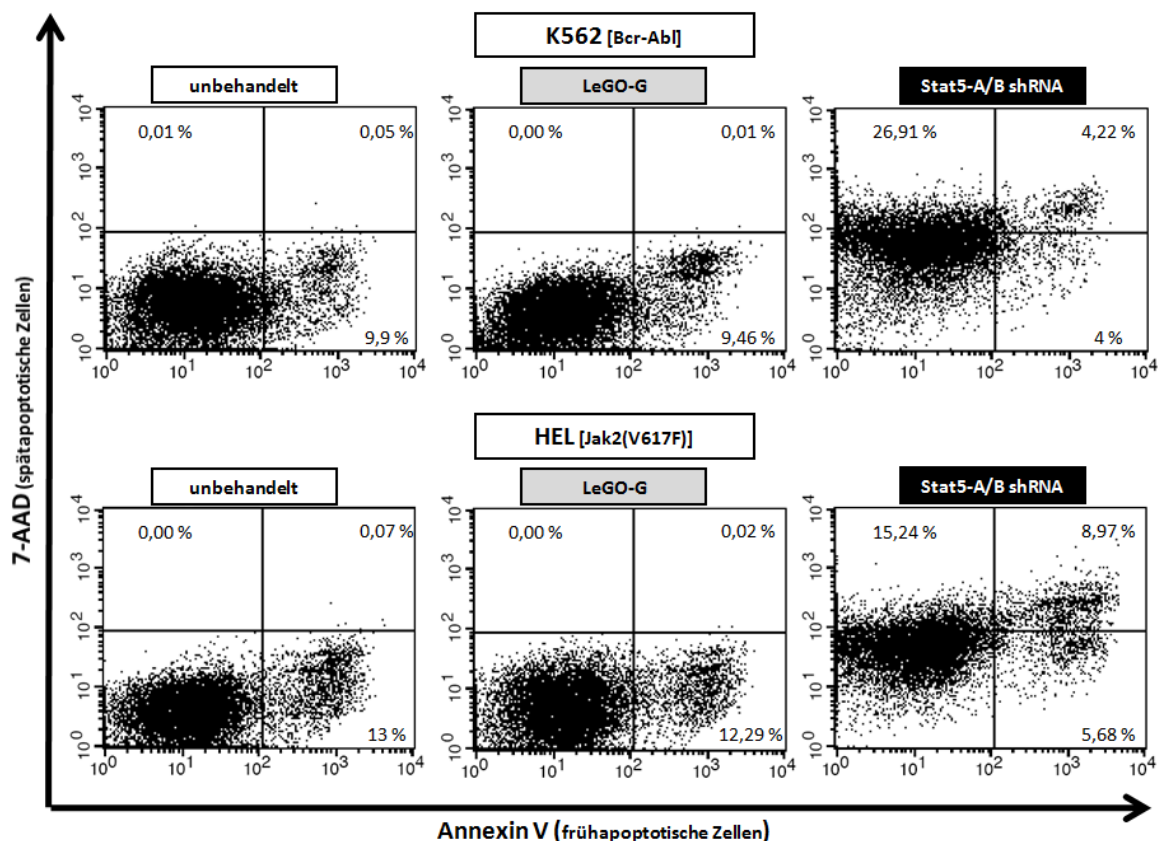


Abb. 3-11: Analyse der Apoptose-Induktion in K562- und HEL-Zellen durch Annexin V/7-AAD Färbung 10 Tage nach der Virus-Transduktion

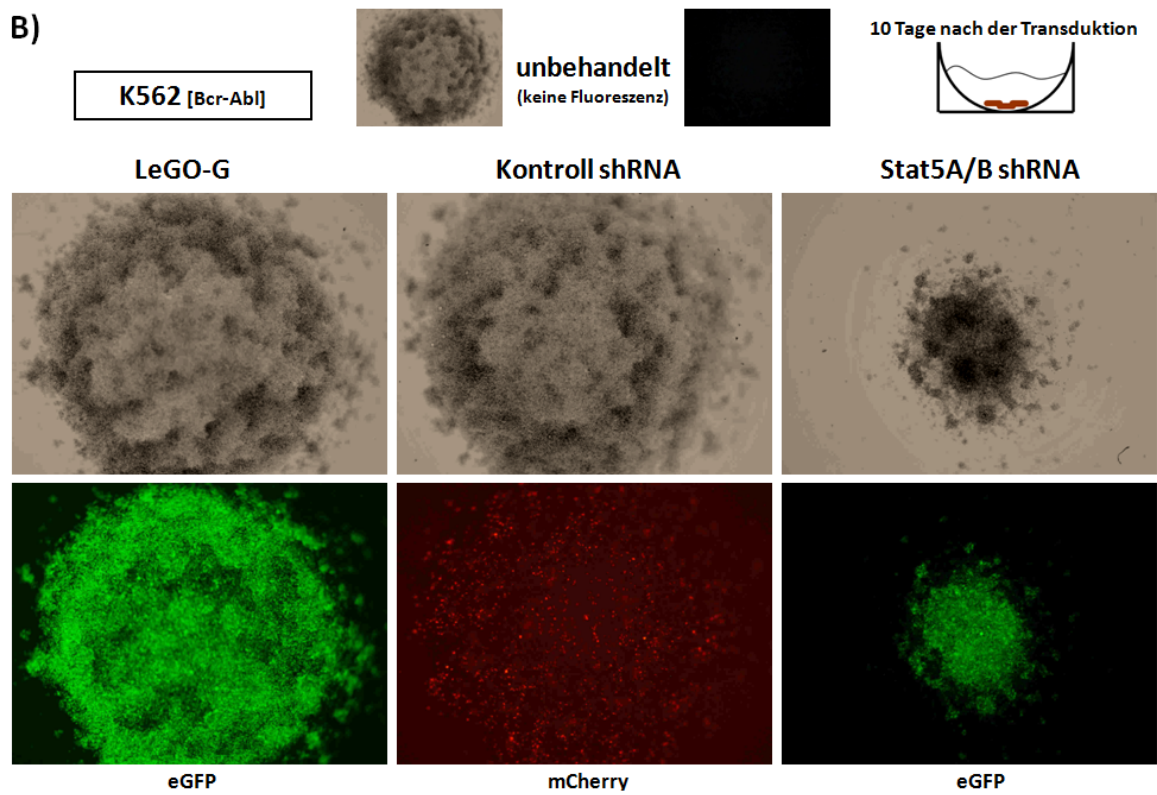
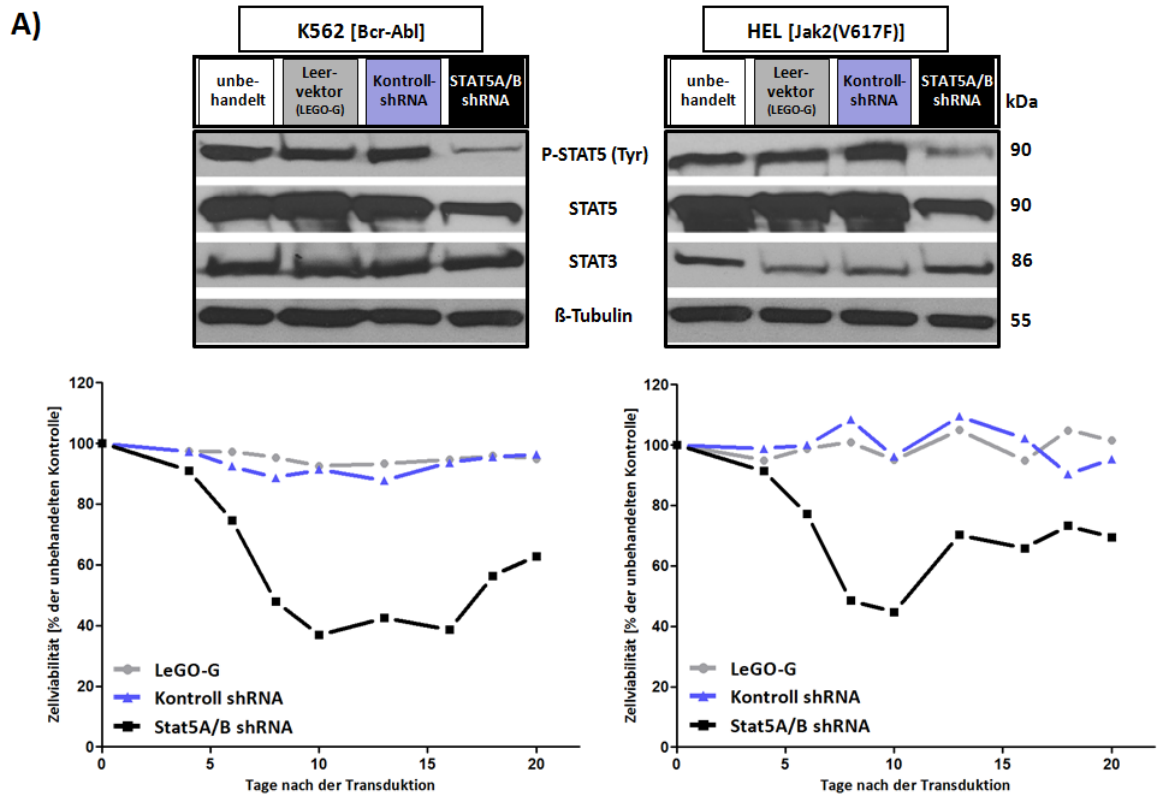
Infizierte (LeGO-G, Stat5A/B-shRNA) und unbehandelte K562- und HEL-Zellen wurden 10 Tage nach der Transduktion mit Annexin V/7-AAD gefärbt und im FACS gemessen. Die Ergebnisse sind als Dot Plot-Diagramme dargestellt, welche nach Vorkalibrierung in 4 Quadranten aufgeteilt wurden. Unten-links: vitale Zellen (Annexin V/7-AAD-negativ), Unten-rechts: frühapoptotische Zellen (Annexin V-positiv, 7-AAD-negativ), Oben-links: nekrotische und spätapoptotische Zellen (Annexin V-negativ, 7-AAD-positiv), Oben-rechts: spätapoptotische Zellen (Annexin V/7-AAD-positiv)

Zellen welche sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose befinden, lassen sich trotz des Verlustes der Membranintegrität, dem Schrumpfen der Zelle und dem beginnenden Zerfall der Zelle in apoptotische Körperchen, zusätzlich zur 7-AAD Färbung, noch mit PS-spezifischen Annexin V markieren. Dementsprechend findet man in der Literatur viele Beispiele, in denen eine eindeutige Separation spätapoptotischer Zellen durch eine Annexin V/7-AAD doppelt positive Färbung im FACS-Plot ersichtlich ist. Mit 4,22 %-AnnexinV/7-AAD doppelt-positiven K562- und 8,97 % doppelt-positiven HEL-Zellen war dies auch in diesem Experiment der Fall. Überraschend war jedoch der stark erhöhte Wert 7-AAD-positiver und AnnexinV-negativer Färbung mit 26,91 % im Falle der K562- und 15,24 % im Falle der HEL-Zellen. Nekrotische Zellen lassen sich ausschließlich mit 7-AAD färben. Jedoch kann dies auch für weit fortgeschrittene Stadien der Apoptose, mit dem abgeschlossenen Zerfall der Zelle in vesikuläre Strukturen gelten. Eine solche Destruktion war zuvor im Falle shRNA-exprimierender Zellen nach 10 Tagen im SSC/FSC-Plot deutlich erkennbar (siehe Abb. 3-10A). Werden die apoptotischen Körperchen

Ergebnisse

nicht durch Phagozyten aufgenommen, resultiert dies in einer Lyse der Vesikel und einem Nekrose-vergleichbaren Prozess, welcher auch als „Sekundäre Nekrose“ bezeichnet wird (Lecoeur et al., 1997; Leist & Nicotera, 1997; Zimmermann & Meyer, 2011). Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der detektierten massiven zellulären Destruktion auch um Nekrose-ähnliche Zustände spätapoptotischer Zellen handelte, welche nicht länger mit Annexin V markierbar waren.

Es konnte gezeigt werden, dass eine transgene Expression von shRNA nach viralem Transfer, in Abhängigkeit von der Dosis, irreversible Schäden in den Zielzellen, aufgrund einer Überbeanspruchung von Exportinen und des Dicer/RISC-siRNA Prozessierapparates, verursachen kann. Ist die Dosis der shRNA-Expression zu hoch, wird zudem die Prozessierung natürlich vorkommender, für die Physiologie der Zelle essentieller, kurzer, doppelsträngiger RNA-Moleküle, wie den endogenen microRNAs, gehindert (Grimm et al., 2006). Um auszuschließen, dass die im Apoptose-Assay und vorherig gezeigten Proliferations- und Viabilitäts-Analysen beobachteten Effekte einer zellulären Destruktion auf Stat5-unabhängige, zytotoxische Effekte einer übermäßigen shRNA-Expression zurückzuführen waren, wurden die Zellen zusätzlich mit einer unspezifischen shRNA-Kontrollsequenz transduziert (MISSION® – „non mammalian shRNA control“ [Sigma-Aldrich], siehe Kap. 2.1.7.1). Erneut wurden die Zellen sowohl in den Kontrollen als auch in der kombinierten Stat5A/B-shRNA Transduktion mit einer MOI = 50 infiziert, wobei der Transfer und die Expression der Kontroll-shRNA ebenfalls über den lentiviralen LeGO-Vektor, allerdings mit dem rot fluoreszierenden mCherry-Protein als Reporter (LeGO-C), erfolgte. Im Gegensatz zu K562- & HEL-Zellen welche gegen Stat5-gerichtete shRNA exprimierten, zeigte die Expression der Kontroll shRNA keinerlei Effekte auf die Zellviabilität, vergleichbar mit der Transduktion des LeGO-G Leervektors (siehe Abb. 3-12A). Die Stat5-Expression blieb ebenfalls unbeeinflusst durch die Infektion mit den Kontrollen (LeGO-G; LeGO-C Kontroll shRNA), wie die Analyse im Western Blot ergab. Dabei sei zu erwähnen, dass die untersuchten Zelllysate erst 14 Tage nach der Transduktion angefertigt werden konnten, da die benötigte Menge Stat5A/B-shRNA exprimierender Zellen aufgrund reduzierten Wachstums und vermehrtem Zelltod zuvor zu gering war, weshalb das dargestellte Western Blot-Ergebnis, im Vergleich zu vorherig gezeigten Ergebnissen (siehe Abb. 3-7), nicht dem Zeitpunkt des shRNA-Wirkoptimums entsprach.



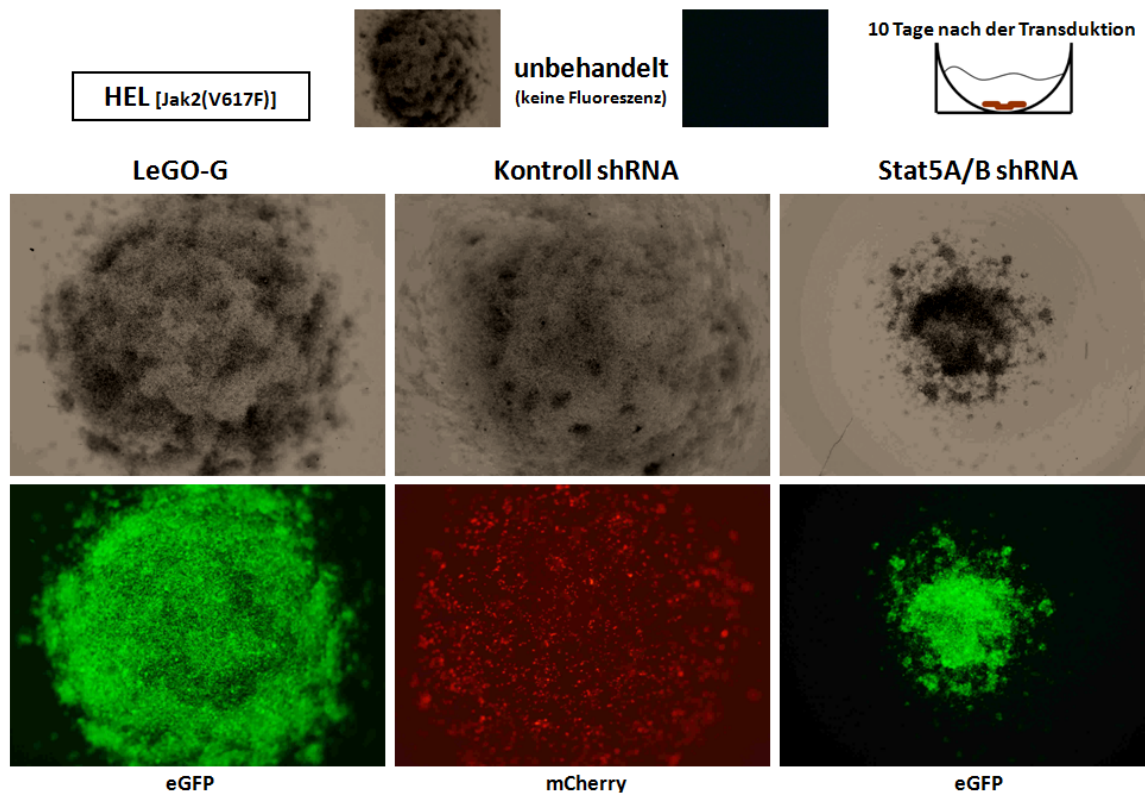


Abb. 3-12: Vergleich der Effekte Stat5-spezifischer und unspezifischer Kontroll shRNA auf die Viabilität von K562- und HEL-Zellen

A) Zusätzlich zu der Infektion mit Leervektor und Stat5A/B-shRNA kodierenden Lentiviren wurden K562- und HEL-Zellen lentiviral mit einer Kontroll shRNA transduziert und erneut über einen Zeitraum von 3 Wochen hinsichtlich einer Veränderung ihrer Viabilität mit dem XTT-Assay analysiert. Gesamtzellextrakte wurden 14 Tage nach der Transduktion angefertigt und hinsichtlich einer Expression und Aktivierung von Stat5 sowie einer Expression von Stat3 auf Proteinebene im Western Blot untersucht. **B)** Nach 10 Tagen erfolgte eine mikroskopische Dokumentation der Zellen im 96-Rundboden-Well durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen. Transfer und Expression der Stat5-spezifischen shRNA erfolgte über den lentiviralen LeGO-G Vektor mit eGFP-Fluoreszenz-Reportergen, während die Kontroll shRNA über den LeGO-C Vektor transduziert wurde, welcher das rot fluoreszierende mCherry Protein als Reporter exprimiert.

Zusätzlich wurde die Expression von Stat3 im Western Blot analysiert um einen unspezifischen Einfluss der Stat5-gerichteten shRNA auf die mRNA-Sequenz dieses strukturell verwandten und Tumor-assoziierten Mitglieds der Stat-Proteinfamilie auszuschließen. Hierbei konnte kein Stat3-inhibierender Effekt auf Proteinebene festgestellt werden. Um den wachstumshemmenden und Apoptose-induzierenden Effekt des Stat5-Knockdowns im Vergleich zur Kontroll shRNA zu verdeutlichen, wurden die am Boden des Rundboden-Wells abgesetzten Zellen erneut durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen dokumentiert (siehe Abb. 3-12B).

Diese Beobachtungen deuteten unmissverständlich darauf hin, dass die Überlebensfähigkeit dieser beiden Leukämiezelllinien in einem hohen Maße von der Expression und Aktivierung von Stat5 abhängig ist. Um herauszufinden inwiefern diese Abhängigkeit aus der Aktivität von Stat5 als Transkriptionsfaktor resultiert, wurden abschließend Expressionsanalysen von Stat5-

Zielgenen nach lentiviraler Transduktion der K562- und HEL-Zelllinien durchgeführt. Neben Mitgliedern der Stat negativ-regulatorischen SOCS- (CiSH, SOCS1, SOCS3) und der antiapoptotischen Bcl-2 Proteinfamilie (Bcl-xL, Mcl-1), wurde die Expression des Zellzyklusregulators CyclinD1, der zytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinasen Pim1 und Pim2 sowie des T-Zell regulatorischen FOXP3-Gens nach RNA-Isolation und Reverser Transkription per Real-Time PCR quantifiziert. Die Gene wurden basierend auf Angaben der Literatur ausgewählt und werden alle in einem hohen Maße von Stat5 reguliert, wobei eine Stat5-abhängige Regulation des Pim1, Pim2 und FOXP3-Gens ausschließlich und eine Stat5-abhängige Regulation des Bcl-xL, Mcl-1 und CyclinD1-Gens vorwiegend in hämatologischen und leukämischen Zellen identifiziert wurde (de Groot et al., 2000; Epling-Burnette et al., 2001; Matsumura et al., 1999; Pauku & Silvennoinen, 2004; Yao et al., 2007). In drei unabhängigen Versuchen wurde die RNA unbehandelter, Leervektor- und Stat5A/B-shRNA-exprimierender K562- und HEL-Zellen extrahiert und analysiert. Nach Auswertung und Zusammenfassung der Daten waren in Gegenwart Stat5-spezifischer shRNA deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expression von Stat5 Zielgenen zwischen den Bcr-Abl exprimierenden K562- und den Jak2(V617F)-exprimierenden HEL-Zellen erkennbar (siehe Abb. 3-13). Dabei wiesen HEL-Zellen allein im Falle des CyclinD1-Gens eine erkennbare Expressionsreduktion nach Stat5-Knockdown auf. In K562-Zellen fiel die Reduktion der CyclinD1-Expression noch deutlicher aus und war signifikant gegenüber unbehandelter Zellen (**, $p < 0,01$). Die daraus resultierende Abnahme des Zellzyklus-regulierenden CyclinD1-Proteins ging einher mit dem zuvor beobachteten Wachstumsstopp Stat5A/B-shRNA exprimierender K562- und HEL-Zellen. Beide Zelllinien zeigten keine Veränderung hinsichtlich der Expression von SOCS-Proteinen nach Stat5-Knockdown, was sich mit einer möglichen kompensatorischen Regulation durch andere Mitglieder der Stat-Familie erklären ließe. In HEL-Zellen war die Expression von SOCS-Proteinen nach viraler Infektion teils um das Doppelte erhöht, was sich möglicherweise mit einer verstärkten Reaktion von HEL-Zellen gegenüber Virus-bedingter Interferon-Sekretion, im Vergleich zu K562-Zellen, erklären ließe. Die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3, welcher vor allem in lymphatischen Zellen, wie regulatorischen T-Zellen, aktiv ist und deren Differenzierung und Funktionen bestimmt, erwies sich in den erythroid-myeloischen K562- und HEL-Zellen ebenfalls unbeeinflusst von einem Stat5-Knockdown. Allerdings konnte in K562-Zellen, neben dem CyclinD1-Gen, eine reduzierte Expression der antiapoptotisch und mitogen wirkenden Protoonkogene Bcl-xL, Mcl-1, Pim1 und Pim2 nach Stat5-Knockdown festgestellt werden (Pim2 signifikant gegenüber unbehandelter und Leervektor-transduzierter Zellen verringert), welche in HEL-Zellen jedoch in unveränderter Intensität bzw. im Falle des Mcl-1 und Pim2-Gens sogar verstärkt exprimiert wurden.

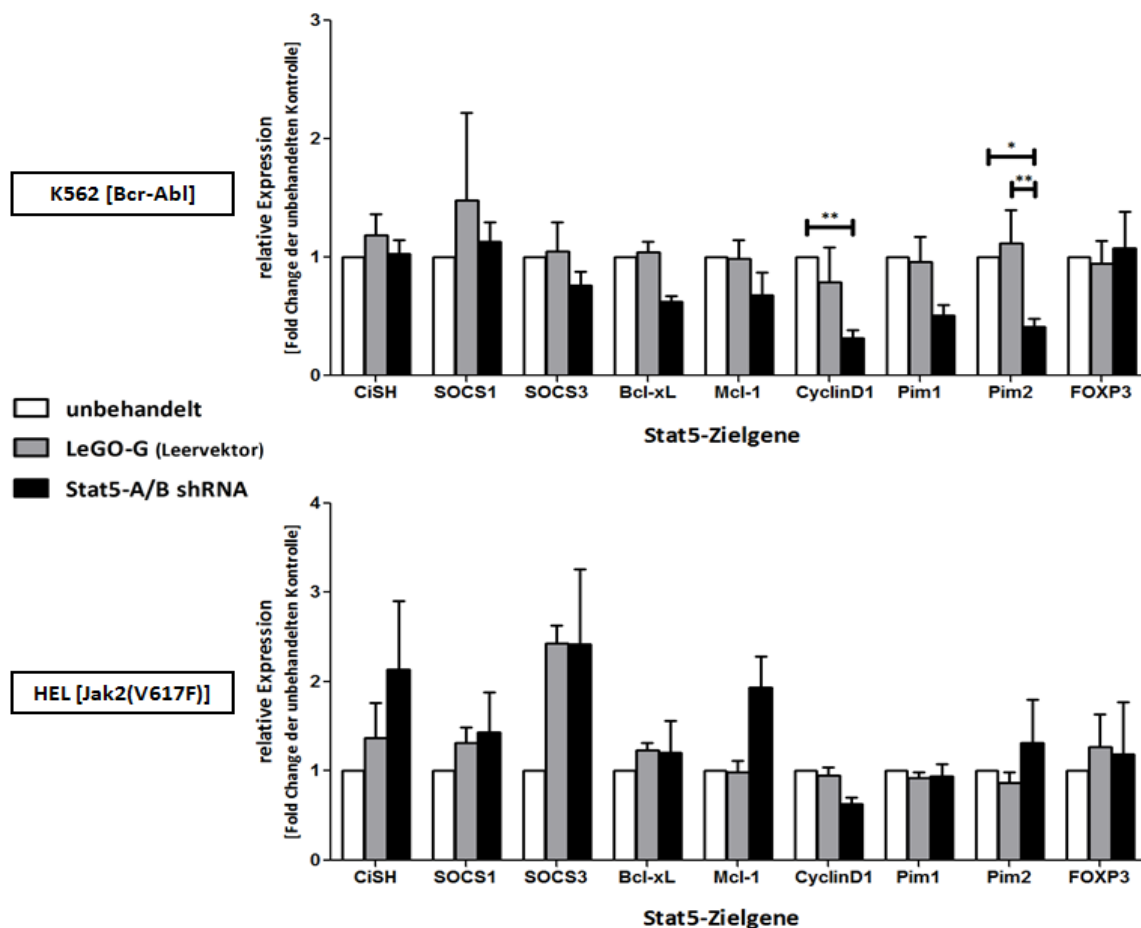


Abb. 3-13: Einfluss des Stat5-Knockdown auf die Expression von Stat5-Zielgenen in Bcr-Abl positiven K562 und Jak2(V617F)-positiven HEL-Zellen

In 3 unabhängigen Versuchen wurde die RNA von K562- und HEL-Zellen isoliert, in cDNA revers transkribiert und per qRT-PCR hinsichtlich der Expression verschiedener Stat5-Zielgene analysiert. Die für jedes einzelne Zielgen ermittelten ct-Werte wurden gegen das Referenzgen HPRT1 normalisiert und als relative Veränderung der Expression (Fold Change) gegenüber der unbehandelten Kontrolle angegeben. (n=3; MW±SD). Angegeben sind signifikante Reduktionen der Stat5-Zielgenexpression nach Stat5-Knockdown gegenüber unbehandelter und LeGO-G-transduzierter Zellen. *p<0,05, **p<0,01 (2-way-ANOVA/Bonferroni post test)

Generell sei zu erwähnen, dass die transkriptionelle Aktivität von Stat5 und das Spektrum von Genen, welche Stat5A und Stat5B regulieren, zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben, in Folge vielseitiger Aktivierungsmechanismen und verschiedenster Formen von Cofaktor-Interaktionen, stark variiert. Da K562- und HEL-Zellen jedoch sowohl vergleichbare Phänotypen als auch eine vergleichbare Intensität konstitutiver Stat5-Tyrosinphosphorylierung aufweisen, lag die Annahme vergleichbarer transkriptioneller Aktivität, vor allem im Falle Leukämie-assoziiertes Zielgenen wie Bcl-xL, Mcl-1, Pim1 und Pim2, nahe, konnte allerdings anhand der nach Stat5-Knockdown durchgeführten PCR-Analysen widerlegt werden. Der minimale Effekt in der HEL-Zelllinie, mit einer Reduktion der CyclinD1-Expression, lässt trotz konstitutiver Stat5-Aktivität eine verminderte transkriptionelle Aktivität von Stat5 gegenüber der K562-Zelllinie vermuten. Obwohl natürlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass Stat5 in HEL-Zellen aktiv an der

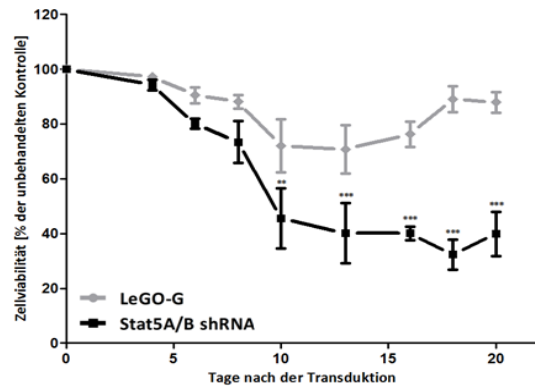
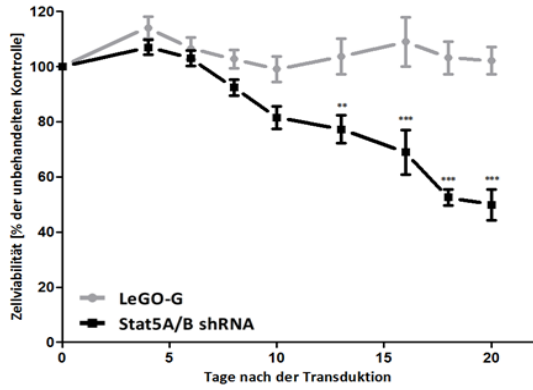
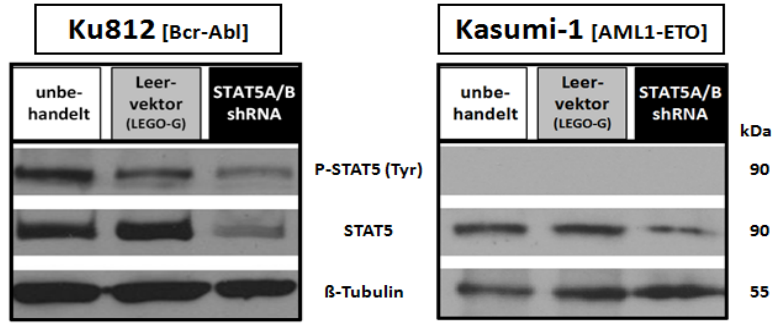
Transkription einer Vielzahl weiterer, für die Überlebensfähigkeit dieser Zelllinie essentieller, Gene beteiligt ist, ließen die PCR-Analysen in Kombination mit zuvor gezeigten Viabilitäts-Analysen vermuten, dass Stat5A- und Stat5B, neben der Aktivität als Transkriptionsfaktoren, zusätzliche überlebenswichtige Aufgaben übernehmen. Um diese These zu überprüfen wurden weitere Knockdown-Experimente mit Leukämie- sowie verschiedenen soliden Tumorzelllinien durchgeführt, welche über keine bzw. eine geringe Präsenz aktiver, Tyrosin-phosphorylierter Stat5-Dimere verfügen.

3.1.2.2.2 STAT5-KNOCKDOWN IN KU812 & KASUMI-1 ZELLEN

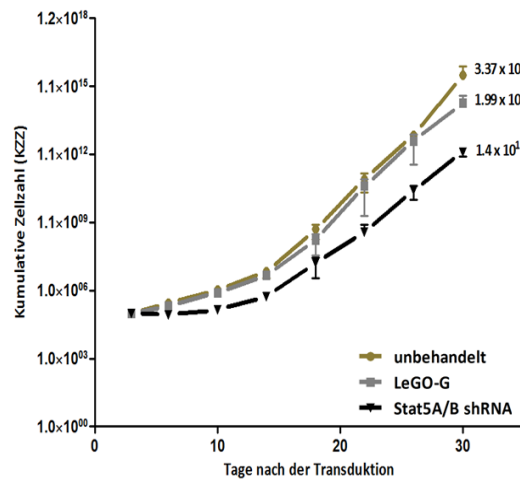
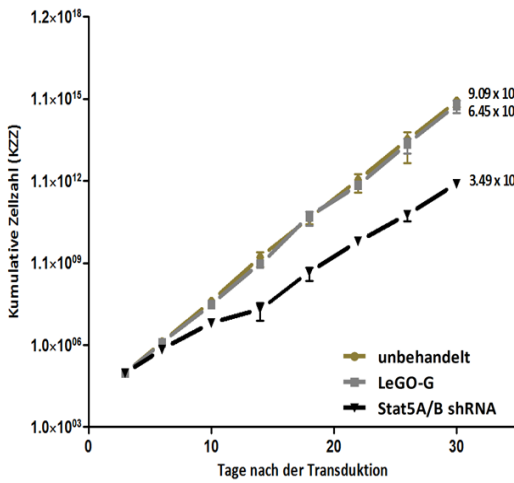
Für einen zusätzlichen Vergleich des Einflusses von Stat5-Expression und Aktivierung in unterschiedlichen Leukämieformen, wurde in den Bcr-Abl exprimierenden Ku812 CML-Zellen und den AML1-ETO exprimierenden Kasumi-1 AML(M2)-Zellen ein Stat5-Knockdown durchgeführt. Wie zuvor bereits erwähnt konnte bislang kein direkter Zusammenhang zwischen einer Expression des AML-assoziierten AML1-ETO Fusionsproteins und einer Erhöhung bzw. konstitutiven Aktivierung von STAT5 belegt werden. Dementsprechend wiesen Kasumi-1 Zellen, im Gegensatz zu Ku812-Zellen, eine kaum detektierbare Stat5-Aktivierung auf (siehe Abb. 3-2). Die lentivirale Transduktion Stat5-spezifischer shRNA ließ jedoch erneut im Falle beider Zelllinien eine signifikante Abnahme der Zellviabilität (siehe Abb. 3-14A) und des Zellwachstums (siehe Abb. 3-14B) erkennen. Die Vitalität der Kasumi-1 Zellen erwies sich als generell von einer lentiviralen Infektion, mit einer MOI=50, beeinflusst, da bereits die Transduktion des LeGO-G Leervektors zu einer 20-30 %igen Reduktion gemessener XTT-Werte gegenüber unbehandelter Zellen führte. Wie zuvor bei den K562- und HEL-Zellen verdeutlichte auch die Messung des Anteils GFP-positiver Zellen und des MFI-Wertes der infizierten Zellpopulation, über einen Zeitraum von 9 Wochen, den Apoptose-induzierenden Effekt einer Transduktion mit Stat5-spezifischer shRNA (siehe Abb. 3-14C). In beiden Zelllinien trat dabei ca. 2 Wochen nach der Transduktion ein rapide einsetzender Verlust stark infizierter bzw. vermehrt eGFP und shRNA exprimierender Zellen auf.

Ergebnisse

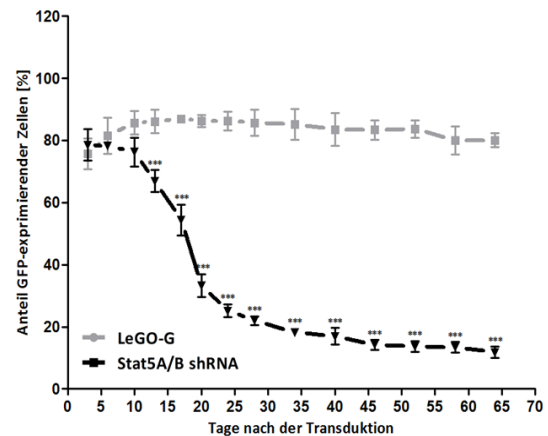
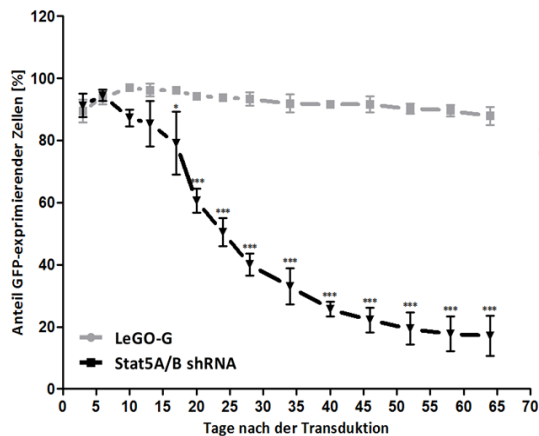
A)



B)



C)



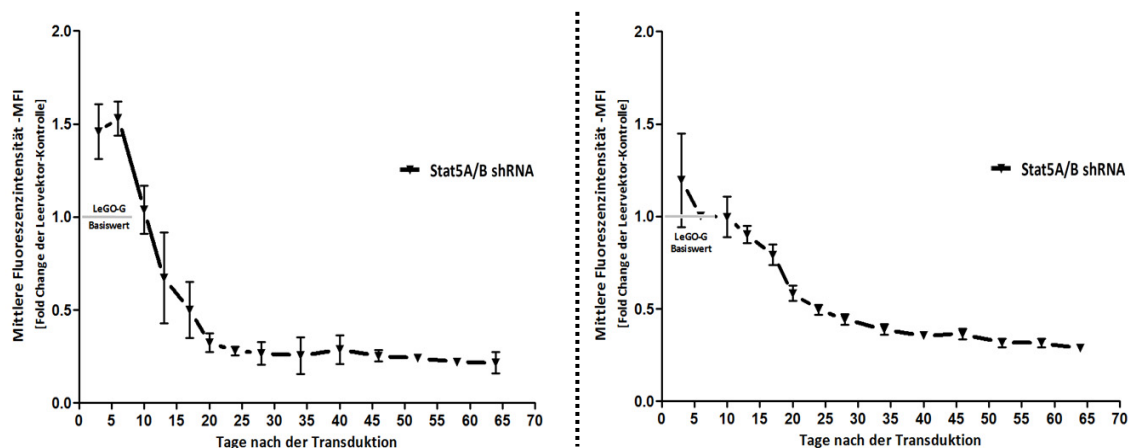


Abb. 3-14: Stat5-Knockdown in Ku812 CML- und Kasumi-1 AML-Zellen

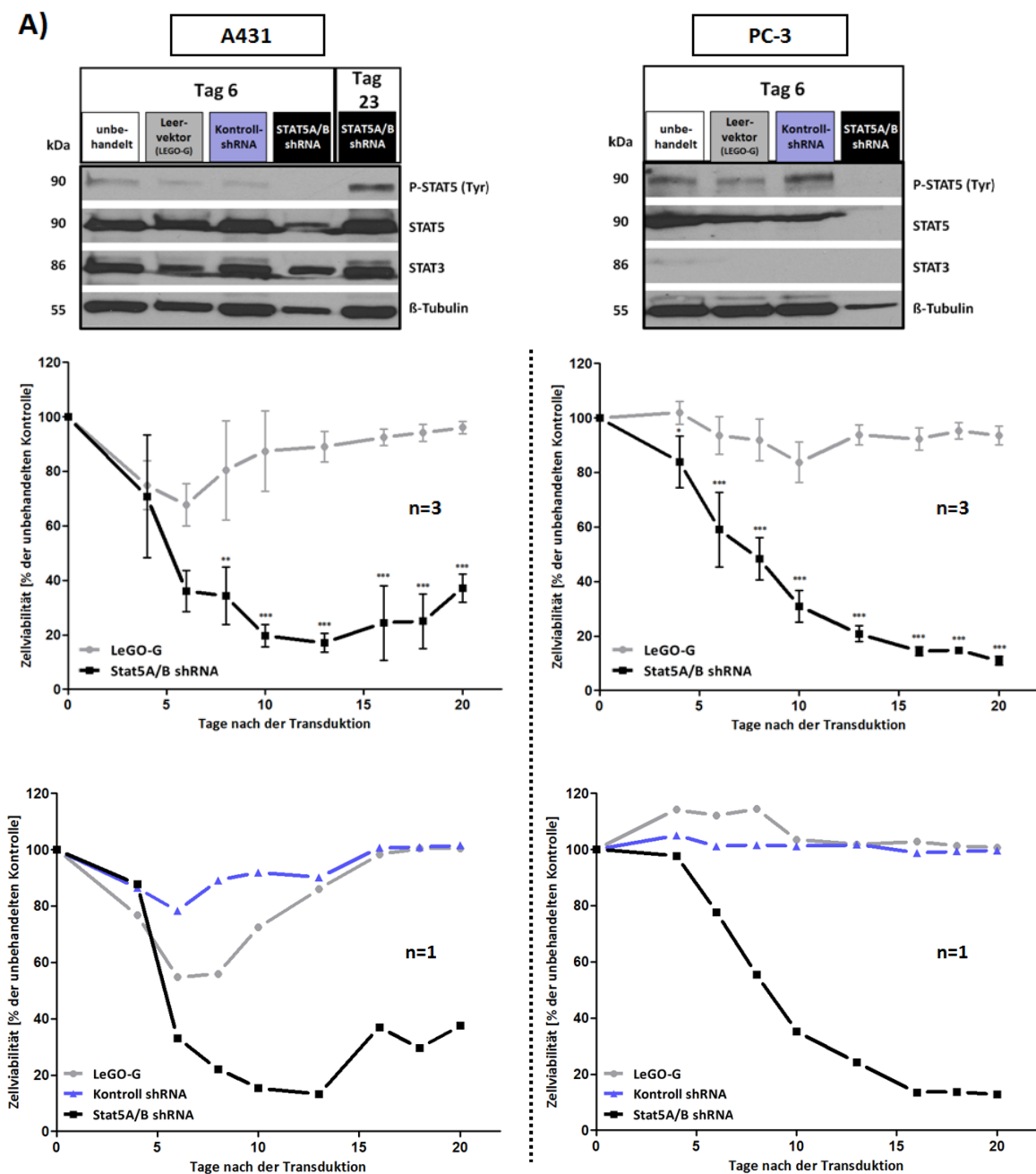
Die Bcr-Abl-positiven Ku812 und AML1-ETO-positiven Kasumi-1 CML- bzw. AML-Zellen wurden mit LeGO-G Leervektor- und Stat5A/B-shRNA exprimierenden Lentiviren infiziert. **A)** Veränderungen der Zellviabilität wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen mit Hilfe des XTT-Assay beobachtet. Die ermittelten XTT-Werte sind als prozentualer Anteil gegenüber der unbehandelten Kontrolle angegeben (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 gegenüber LeGO-G-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test). Zudem wurde die Knockdown-Effizienz im Western Blot überprüft. **B)** Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der kumulativen Zellzahl beider Zelllinien über einen Zeitraum von 30 Tagen, wobei 1x10⁵ unbehandelte und infizierte (LeGO-G, Stat5A/B-shRNA) Zellen 3 Tage nach der Transduktion ausgesät und im Abstand von 3-4 Tagen passagiert und gezählt wurden. **C)** Ebenfalls parallel dazu wurden der Anteil GFP-positiver Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (dargestellt als relative Veränderung der MFI-Werte gegenüber der LeGO-Leervektor Expression) des infizierten Zellpools über einen Zeitraum von ca. 9 Wochen im FACS gemessen. (n=3; MW±SD) *p<0,05, ***p<0,001 gegenüber LeGO-G-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test)

3.1.2.2.3 STAT5-KNOCKDOWN IN SOLIDEN TUMORZELLEN

Um einschätzen zu können in welchem Maße die identifizierte Stat5-Abhängigkeit leukämische Zelllinien betrifft, wurden abschließend Stat5-Knockdown Experimente mit soliden Tumorzellen durchgeführt. Aufgrund der Identifizierung basaler Stat5-Phosphorylierung (siehe Abb. 3-4), wurden die Effekte einer Stat5 Inhibierung zunächst anhand der epidermalen Karzinomzelllinie A431 und der PC-3 Prostatakarzinomzelllinie analysiert. Mikroskopische Beobachtungen und die erneute Messung zellulärer Viabilität, mit Hilfe des XTT-Assays, offenbarten auch in diesen beiden Tumorzelllinien eine Abhängigkeit von der Stat5-Expression, da eine Herunterregulierung durch RNA-Interferenz ebenfalls in einem Wachstumsstopp und einem Verlust der Überlebensfähigkeit resultierte. Die Effekte fielen, wie im Falle der PC-3 Zellen, dabei teilweise so drastisch aus, dass es schwierig war Gesamtzellextrakte mit ausreichend Protein für die Verifizierung des Stat5-Knockdown im Western Blot zu gewinnen. Die reduzierte Proteinkonzentration der Zelllysate Stat5A/B-shRNA-exprimierender Zellen war anhand der β -Tubulin Gel-Ladekontrolle deutlich erkennbar (siehe Abb. 3-15A). Die EGFR-überexprimierenden A431-Zellen ließen neben der deutlichen Reduktion der Zellviabilität durch die Stat5-spezifische

Ergebnisse

shRNA jedoch auch eine generelle Sensitivität gegenüber der viralen Infektion erkennen. In etwa zwischen dem 3. und 10. Tag nach der Transduktion konnte eine Reduktion der Viabilität sowohl LeGO-G-Leervektor- als auch LeGO-C-Kontroll shRNA-transduzierter Zellen um ca. 30-40 % gegenüber unbehandelter Zellen festgestellt werden, wobei ein zusätzlicher Effekt des Stat5-Knockdown, mit einer Reduktion der A431-Viabilität um bis zu 80% gegenüber unbehandelter Zellen, noch deutlich erkennbar war.



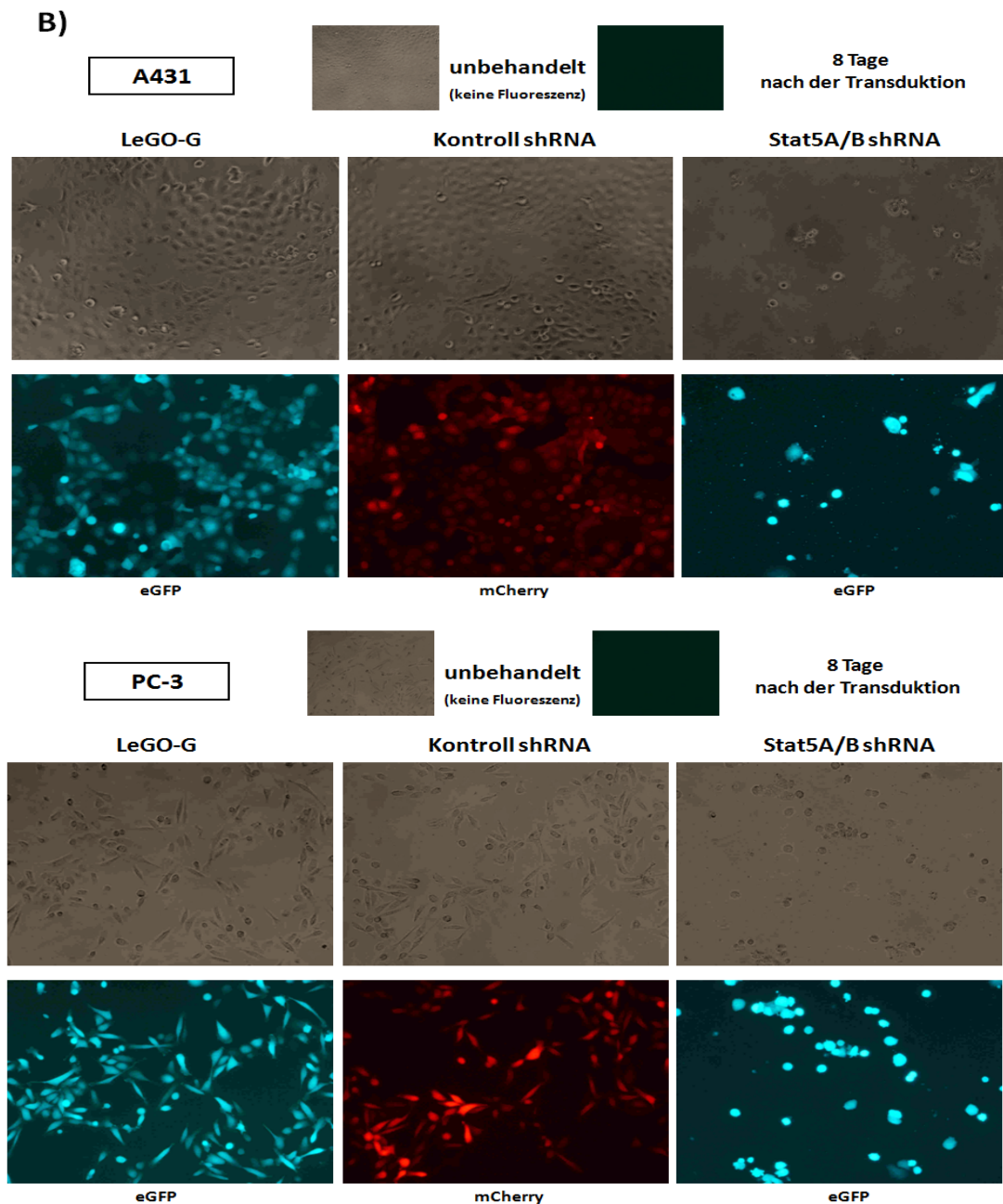


Abb. 3-15: Inhibierung der Viabilität von A431 und PC-3 Zellen durch Stat5-spezifische shRNA

A) Über einen Zeitraum von 3 Wochen wurde die Veränderung der Viabilität von A431 und PC-3 Zellen mit Hilfe des XTT-Assay analysiert, wobei die Zellen in 3 unabhängigen Versuchen zu Beginn mit LeGO-G Leervektor- und Stat5A/B-shRNA exprimierenden Lentiviren und in einem 4. Versuch zusätzlich mit Kontroll shRNA-exprimierenden Lentiviren infiziert und mit unbehandelten Zellen verglichen wurden (Angaben als relative Werte in %). Die Knockdown-Effizienz wurde im Western Blot überprüft, wobei hier die Ergebnisse des 4. Versuchs mit Kontroll shRNA dargestellt sind. Hierfür wurden 6 Tage nach der Transduktion Gesamtzellextrakte gewonnen (+ Zelllysat Stat5A/B-shRNA exprimierender A431 Zellen an Tag 23). (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 gegenüber LeGO-G-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test) **B)** 8 Tage nach der Transduktion erfolgte zudem eine mikroskopische Dokumentation der A431 und PC-3 Zellen (unbehandelt, LeGO-G, Kontroll und Stat5A/B shRNA) durch Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahmen.

Wie zuvor die Leukämiezellen, wiesen auch A431-Zellen in etwa ab Tag 15 einen Wiederanstieg der Zellviabilität und des Wachstums auf. Die Western Blot Analyse eines an Tag 23 nach der

Stat5A/B-shRNA Transduktion angefertigten Zelllysats offenbarte dabei einen, im Vergleich zum Normalzustand, auffälligen Anstieg der Stat5-Phosphorylierung innerhalb der überlebenden Zellpopulation. Diese Beobachtung läßt auf einen Liganden-unabhängigen Mechanismus der Stat5-Aktivierung in A431-Zellen unter Stressbedingungen schließen. Erneut wurde zusätzlich die Expression des Stat3-Proteins im Western Blot überprüft. In Relation zu der Bandendicke der β -Tubulin Ladekontrolle ließ sich erkennen, dass die Stat3-Expression nicht durch die Stat5-spezifische shRNA beeinflusst wird. Aufgrund der Deletion des Stat3- und Stat5B-Genlocus, repräsentieren die im Western Blot detektierten Banden der PC-3 Zelllinie eine alleinige Stat5A-Expression. Die Herunterregulierung des Stat5A-Proteins durch RNA-Interferenz resultierte in einer drastischen Abnahme der Zellviabilität um ca. 90% gegenüber unbehandelter PC-3 Zellen, ohne dem Einsetzen einer Erholungsphase bzw. dem Auswachsen einer überlebenden Zellpopulation nach 3 Wochen. Dass die Inhibierung der Stat5-Expression neben der Reduktion von Viabilität und Wachstum auch die Morphologie von Zellen wesentlich beeinflusst, konnte anhand von Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen dieser beiden adhären Tumorzelllinien belegt werden (siehe Abb. 3-15B). Während die Transduktion der Kontrollen (LeGO-G, LeGO-C-Kontroll shRNA) keinen erkennbaren Einfluss auf die Morphologie der Zellen hatte, wiesen Stat5-Knockdown Zellen eine starke Veränderung ihrer Form auf, welche, mit einer einsetzenden Abrundung und Schrumpfen der Zellen und dem Verlust zytoplasmatischer Fortsätze (Lamellipodien), der Morphologie apoptotischer Zellen gleichkommt.

Aufgrund des beschriebenen essentiellen Einflusses von Stat5 auf die Überlebensfähigkeit von Brusttumoren, wurde weiterhin ein viraler Transfer Stat5-gerichteter shRNA in die T-47D Mammakarzinomzelllinie sowie in die kolorektale Karzinomzelllinie HCT116 durchgeführt. HCT116-Zelllysate wiesen, bei einer Beladung des Polyacrylamid-Gels mit 20 μ g Protein, eine kaum detektierbare Stat5-Expression auf (siehe Abb. 3-4), weshalb von einer Stat5-Unabhängigkeit dieser Zelllinie ausgegangen wurde und der durchgeführte Stat5-Knockdown als ein zusätzliches Kontroll-Experiment dienen sollte. Trotz minimaler Stat5-Expression war jedoch auch eine leichte Reduktion der Viabilität Stat5A/B shRNA-exprimierender HCT116-Zellen um ca. 40% gegenüber unbehandelter Zellen, innerhalb der 1. Woche nach der Transduktion, erkennbar, während die Zellen von einer Infektion mit Kontroll-Lentiviren unbeeinflusst blieben (siehe Abb. 3-16). Ab dem 8. Tag in etwa stieg die Viabilität der HCT116 Zellen wieder an und erreichte nach 3 Wochen nahezu wieder den Wert unbehandelter und Kontrollzellen. Wenn auch nicht so drastisch, resultierte der Stat5 Knockdown in T-47D Zellen in einer, mit den XTT-Kurvenverläufen der PC-3 Zelllinie vergleichbaren, konstanten Abnahme der Viabilität über den Analysezeitraum, ohne eine einsetzende Erholung der infizierten Zellpopulation.

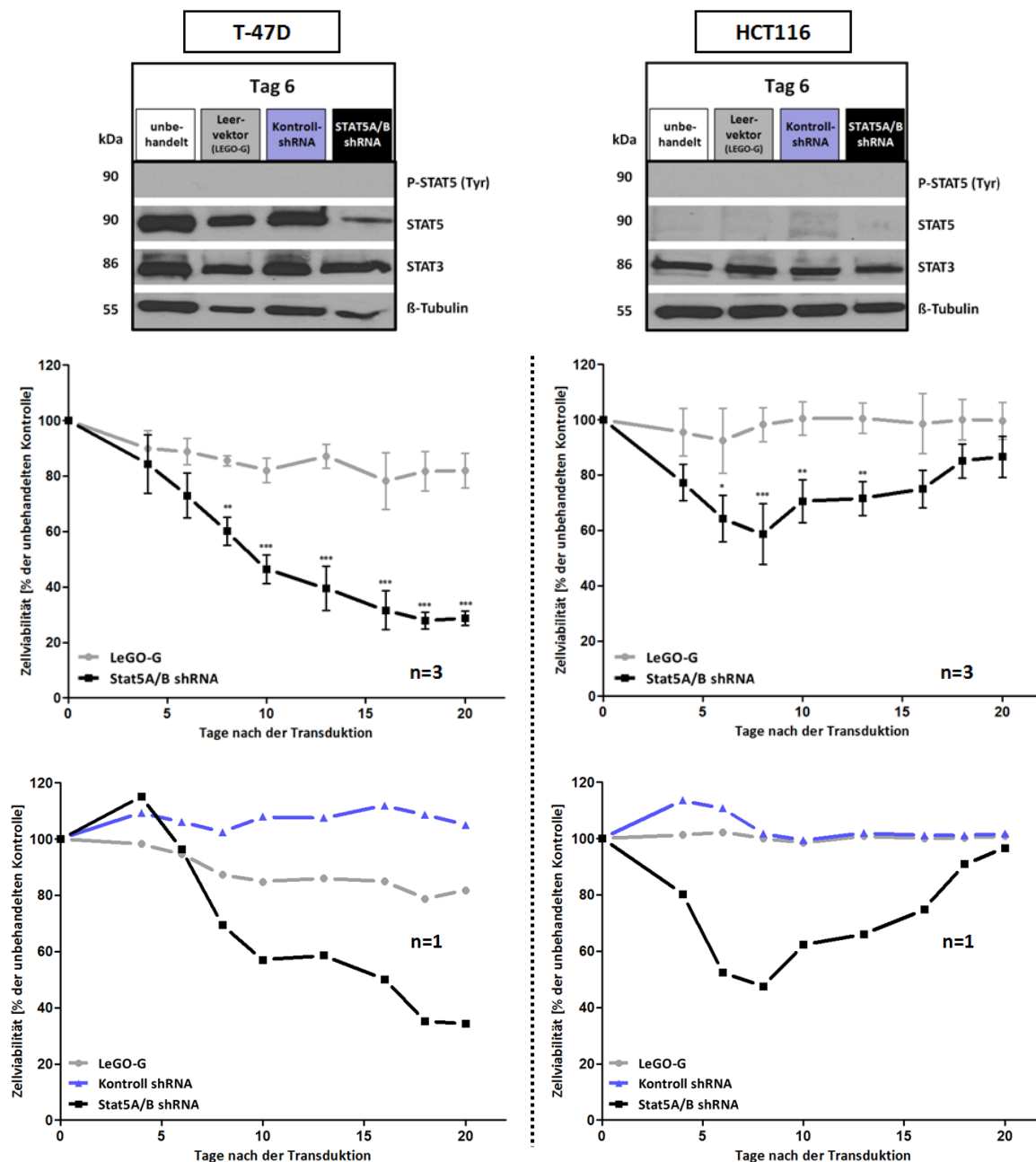


Abb. 3-16: Inhibierung der Viabilität von T-47D Mammakarzinom- und kolorektalen HCT116 Karzinomzellen nach Stat5 Knockdown

In 3 unabhängigen Versuchen wurden T-47D- und HCT116-Zellen mit LeGO-G Leervektor- und Stat5A/B-shRNA exprimierenden Lentiviren und in einem 4. Versuch zusätzlich mit Kontroll shRNA-exprimierenden Lentiviren infiziert und die Zellviabilität über einen Zeitraum von 3 Wochen, im Abstand von 3-4 Tagen, mit dem XTT-Assay gemessen. Die gemessenen XTT-Werte sind relativ zu der Messung unbehandelter Zellen in Prozent angegeben (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 gegenüber LeGO-G-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test). Die Knockdown-Effizienz wurde im Western Blot überprüft, wobei hier die Ergebnisse des 4. Versuchs mit Kontroll shRNA dargestellt sind. Hierfür wurden 6 Tage nach der Transduktion Gesamtzellextrakte gewonnen.

Die durchgeführten Stat5 Knockdown-Experimente offenbarten einen direkten Zusammenhang zwischen der Inhibierung der Stat5-Expression und dem Verlust der Überlebensfähigkeit sämtlich getesteter leukämischer und solider Tumorzelllinien, wobei die beobachteten Effekte nur

bedingt von der Intensität zellulärer Stat5-Expression und -Aktivierung abhängig schienen. Sowohl die Erkenntnis, dass Tumorzellen, welche keine basale Stat5-Aktivierung aufweisen, ebenfalls von einer Inhibierung der Stat5-Expression beeinflusst werden, als auch die Ergebnisse der nach RNA-Interferenz, im Vergleich zwischen Bcr-Abl exprimierenden K562- und Jak2(V617F) exprimierenden HEL-Zellen, durchgeführten Analyse der Expression von Stat5-Zielgenen, deuten darauf hin, dass Stat5-Proteine neben ihrer transkriptionellen Aktivität weitere essentielle Funktionen in der Zelle ausüben, welche in der Summe zu einer Abhängigkeit in den analysierten Tumorzelllinien führen. Zusammenfassend verdeutlichten die Knockdown Ergebnisse den Einfluss der Expression und Aktivität von Stat5 auf die Überlebensfähigkeit humaner Tumore und bildeten die Grundlage für die Verwendung dieser zellulären Testsysteme für nachfolgende Analysen einer Peptidaptamer-basierten Stat5-Intervention.

3.2 ISOLATION EINER 12MER PEPTIDAPTAMER-SEQUENZ, WELCHE MIT EINER FUNKTIONELLEN DOMÄNE DES HUMANEN STAT5A-PROTEINS INTERAGIERT

Ziel dieser Arbeit war es eine Peptidaptamer-Sequenz mit einer Länge von 12 Aminosäuren zu isolieren, welche über eine spezifische Interaktion mit einer funktionellen Domäne von Stat5 dessen Aktivität in Tumorzellen inhibiert. Die Identifikation bzw. Selektion dieser Sequenz aus einer randomisierten 12mer Peptidaptamer-Expressionsbibliothek (Peptidaptamer-„Library“) erfolgte über einen Protein-Interaktions-Screen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System (siehe Kap. 2.2.2), wodurch Protein-Interaktionen unter intrazellulären Bedingungen detektiert werden konnten. Durchgeführt wurde der Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit dem dimeren GAL4-Transkriptionsfaktors aus der Hefe. Hierfür wurden Domänen des humanen Stat5A-Proteins als Zielstrukturen mit der DNA-Bindedomäne (DBD) von GAL4 fusioniert und als „Bait“-Konstrukte im Screen eingesetzt. Die für den Interaktionsscreen verwendeten Peptidaptamer-Sequenzen einer synthetischen Oligonukleotid-Library wurden in das aktive Zentrum des humanen Thioredoxin-Scaffoldproteins kloniert und als Fusionsproteine mit der Aktivierungsdomäne (AD) von GAL4 („Prey“-Konstrukte) für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen verwendet.

3.2.1 IDENTIFIKATION EINER STAT5-SPEZIFISCHEN PEPTIDAPTAMER-SEQUENZ DURCH DAS HEFE-ZWEI-HYBRID VERFAHREN

Die Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Screen zur Isolation einer Stat5-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz umfasste folgende Arbeitsschritte:

1. Klonierung der pGBKT7-„Bait“-Expressionsvektoren
2. DNA-Zweitstrangsynthese der randomisierten „hairpin“-Oligonukleotid-Library
3. Klonierung der Oligonukleotid-Library in das katalytische Zentrum des humanen Thioredoxin Gerüstproteins, welches fusioniert mit der Gal4-AD durch den pGADT7-„Prey“-Expressionsvektor exprimiert wird
4. Transformation & Amplifikation der klonierten Library-Vektoren in *E.coli*
5. „Library-Scale“- Hefetransformation & Library Screen
6. Isolation der Vektoren positiv selektionierter Hefe-Klone & DNA-Sequenzierung des Prey-Konstrukts
7. Validierung der Proteininteraktion identifizierter Peptidaptamer-Sequenzen mit der Stat5-Zielstruktur durch Hefe-Zwei-Hybrid Protein-Interaktionsassays

3.2.1.1 DIE VERWENDETEN GAL4-DBD-FUSIONSKONSTRUKTE ALS KÖDER FÜR DEN PEPTIDAPTAMER-SCREEN

Für eine funktionelle Inhibierung der Stat5-Aktivität wurden zwei verschiedene Domänen des humanen Stat5A-Proteins als Zielstrukturen bzw. Bait für den Peptidaptamer-Screen eingesetzt, welche zum einen essentiell für die Formierung transkriptionell aktiver Dimere durch SH2-Domänen-vermittelte, reziproke Phosphotyrosin-Interaktion und zum anderen für die Bindung an die responsiven GAS-Elemente der DNA verantwortlich sind. Dabei handelte es sich um ein Fragment von 114 Aminosäuren der SH2- und Transaktivierungsdomäne (SH2/TA: aa 637 – 751), welches das für die Transaktivierung und Dimerisierung essentielle Tyrosin 694 umspannt, und um die komplette Sequenz der DNA-Bindedomäne (DBD: aa 331 – 473) des humanen Stat5A-Proteins (siehe Abb. 3-17). Beide Domänen wurden im Leserahmen mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors in den pGBKT7-Bait-Expressionsvektor [Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3, Clontech] kloniert und die Expression der GAL4-DBD-Stat5A-SH2/TA bzw. der GAL4-DBD-Stat5A-DBD Bait-Fusionsproteine im Western Blot überprüft (erfolgte zuvor durch Mitglieder der Arbeitsgruppe).

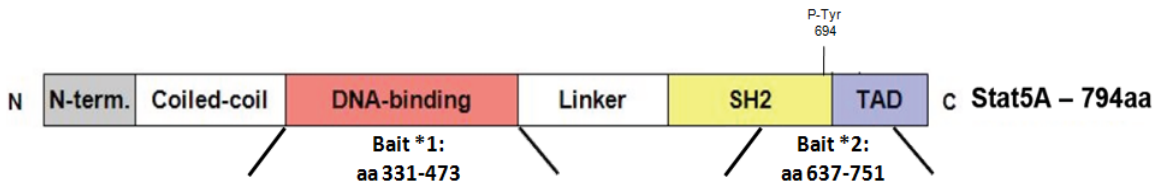


Abb. 3-17: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen Stat5A-Proteins und der Fragmente welche als Bait-Konstrukte fusioniert mit der GAL4-DBD für den Hefe-2-Hybrid Screen eingesetzt wurden.

3.2.1.2 DNA-ZWEITSTRANGSYNTHESE DER RANDOMISIERTEN „HAIRPIN“-OLIGONUKLEOTID-LIBRARY

Die randomisierte Oligonukleotid-Library, welche für Peptidaptamer-Sequenzen einer Länge von 12 Aminosäuren kodiert, wurde von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert (siehe Kap. 2.1.7.2). Für die Randomisierung der Oligonukleotide wurde folgende Kodondefinition für ein Basen-Triplett verwendet:

$$\text{NNK (N = A,T,G,C; K = T,G)}$$

Durch die Verwendung der NNK-Kodondefinition ergeben sich 32 mögliche Kombinationen für ein Basentriplett, welche das gesamte Spektrum der proteinogenen Aminosäuren abdecken. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Stopcodon betrug 3,1 %, da nur 1 dieser 32 möglichen Kombinationen für ein Stopcodon (TAG) kodiert. Die synthetisierte NNK Oligonukleotid-Library besaß eine Gesamtkomplexität von 3×10^{15} möglichen Sequenzen. Die Oligonukleotid-Sequenzen wurden am 5'-Ende von einer *Apal*- und am 3'-Ende von einer *SmaI*-Restriktionsschnittstelle flankiert. Unter Verwendung einer Haarnadelschleife („hairpin loop“)-ausbildenden Nukleotidsequenz mit komplementären Nukleotid-Überhang am 3' Ende, lagen die synthetisierten Oligonukleotide bereits partiell als DNA-Doppelstrang mit einer Primer-Sequenz zur Zweitstrangsynthese vor (siehe Abb. 3-18).

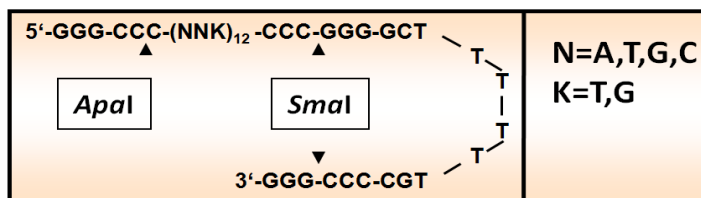


Abb. 3-18: Sequenz & Struktur der randomisierten 12mer NNK-„hairpin“-Oligonukleotid-Library

Unter Verwendung einer hochprozessiven Polymerase mit zusätzlicher 3' – 5' Exonuclease-aktivität (*Pwo*: high fidelity proof-reading polymerase; Roche Diagnostics) erfolgte anschließend die Zweitstrangsynthese durch eine Zwei-Schritt PCR mit 15 Zyklen.

PCR-Ansatz zur Oligonukleotid-Library-Zweitstrangsynthese:

1 µl randomisierte „hairpin“-Oligonukleotide (100µM)
 5 µl *Pwo*-Polymerase
 10 µl Reaktionspuffer [10x]
 5 µl dNTP's (10 mM)
 Ansatz mit Aqua bidest auf 100 µl aufgefüllt

PCR-Protokoll zur Oligonukleotid-Library-Zweitstrangsynthese (15 Zyklen):

1. DNA Denaturierung	1 min	95°C
2. Hybridisierung & Synthese	1 min	60°C

Die Elongation partiell doppelsträngiger „hairpin“-Oligonukleotide im PCR-Ansatz bietet den Vorteil, dass die hoch-diverse Library in einem effizienten Umfang amplifiziert wurde. Würde die Library als einzelsträngige Oligonukleotide synthetisiert werden, so würde eine Zweitstrangsynthese mit zwei, entsprechend der Restriktionsenden, separaten Primern zu einer inhomogenen Amplifikation führen (Borghouts et al., 2008b). Die Aufreinigung der nun doppelsträngigen Oligonukleotid-Library erfolgte über Phenol/Chloroform Extraktion.

3.2.1.3 KLONIERUNG DER LIBRARY-VEKTOREN FÜR DEN HEFE-ZWEI-HYBRID SCREEN (INSERTION DER OLIGONUKLEOTID-LIBRARY IN DAS OPTIMIERTE HUMANE THIOREDOXIN-SCAFFOLDPROTEIN)

Wie einleitend bereits erwähnt handelt es sich bei Peptidaptameren um modifizierte Proteinkonstrukte, welche sich, vergleichbar mit der Struktur eines Antikörpers, aus einer variablen Target-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz, mit einer Länge von 10-20 Aminosäuren, und einem konstantem, Struktur und Stabilität gebendem Gerüst- bzw. „Scaffold“-Protein zusammensetzen. Das Redoxenzym Thioredoxin konnte aufgrund seiner hohen Stabilität und vergleichsweise geringen Größe von ca. 12 kDa, in Vorarbeit durch Mitglieder der Arbeitsgruppe, als ein geeignetes Scaffoldprotein etabliert werden (Borghouts et al., 2008a). Thioredoxin bietet zudem strukturelle Vorteile für die Integration von Peptidaptameren auf seiner Oberfläche. Das katalytische Zentrum des Thioredoxin-Proteins ragt als Schleife aus der Proteinstruktur heraus und ermöglicht dadurch eine optimale Präsentation der Target-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz in starrer Konformation (siehe Kap. 1.4). Für eine Anwendung in dem zellulären Background humaner Tumorzelllinien sowie für einen möglichen therapeutischen Einsatz im Menschen, ist das humane Thioredoxin (hTRX) eingesetzt worden. Für die Klonierung der Library-Vektoren wurde daher zunächst hTRX in den pGADT7 Prey-Expressionsvektor [Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3, Clontech], als Fusionsprotein mit der Gal4-AD

Ergebnisse

kloniert. Im Anschluss erfolgte die Klonierung der doppelsträngigen Oligonukleotid-Library in das katalytische Zentrum von hTRX, wodurch zudem die enzymatische Aktivität von Thioredoxin inhibiert wurde. Um eine Aggregation durch die Ausbildung von Disulfid-Brücken nach der Proteinaufreinigung zu vermeiden, wurden zusätzlich die für die Funktion als Oxidoreduktase essentiellen Cysteinreste Cys³² und Cys³⁵ im katalytischen Zentrum durch Glycine und eine *RsrII*-Restriktionsschnittstelle sowie drei weitere Cystein-Reste im C-terminalen Teil des Proteins durch Serine ersetzt [nicht Teil dieser Arbeit, (Borghouts et al., 2008a)]. Für die Integration der randomisierten Peptidaptamer-Sequenzen wurde eine *Apal* – *SmaI* Linkersequenz im katalytischen Zentrum von hTRX eingebaut. Die Restriktionsschnittstellen wurden aufgrund ihrer Glycin-Prolin Kodierung gewählt, da sich die Kombination dieser Aminosäuren positiv auf eine strukturelle Ausstülpung der integrierten Peptidaptamer-Sequenzen, zur Verbesserung einer Interaktion mit dem Target-Protein, auswirkt (Borghouts et al., 2008a). Durch die Klonierung der Library-Oligonukleotide über zwei separate, nicht kompatible Restriktionsschnittstellen wurde eine monodirektionale Integration der Peptidaptamer kodierenden Oligonukleotide in der gewünschten NNK-Reihenfolge sichergestellt. Eine Klonierung über zwei kompatible Restriktionssenden, würde in einem zusätzlichen Einbau der Library in KNN-Reihenfolge resultieren, wodurch die Varianz der möglichen Aminosäure-Kodierungen stark minimiert und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Stop-Codons stark erhöht werden würde (Borghouts et al., 2008b).

Der *Apal/SmaI* Restriktionsverdau der Oligonukleotid-Library wurde über Nacht bei 25°C durchgeführt (*Apal/SmaI* - Temperaturoptimum). Anschließend erfolgte eine erneute Aufreinigung der Library über Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation. Das Ergebnis der Library-Oligonukleotid Zweitstrangsynthese und des Restriktionsverdaus wurde in einem nativen 20%igen TBE-Polyacrylamid-Gel überprüft (siehe Abb. 3-19).

<u>Library-Restriktionsansatz:</u>	24 µl	doppelsträngige Library-Oligonukleotide
	1 µl	<i>Apal</i> -Restriktionsendonuklease [20U]
	1 µl	<i>SmaI</i> -Restriktionsendonuklease [20U]
	4 µl	NEB4-Reaktionspuffer [10x]
	0,4 µl	BSA [100x]
	Ansatz mit Aqua bidest auf 40 µl aufgefüllt	

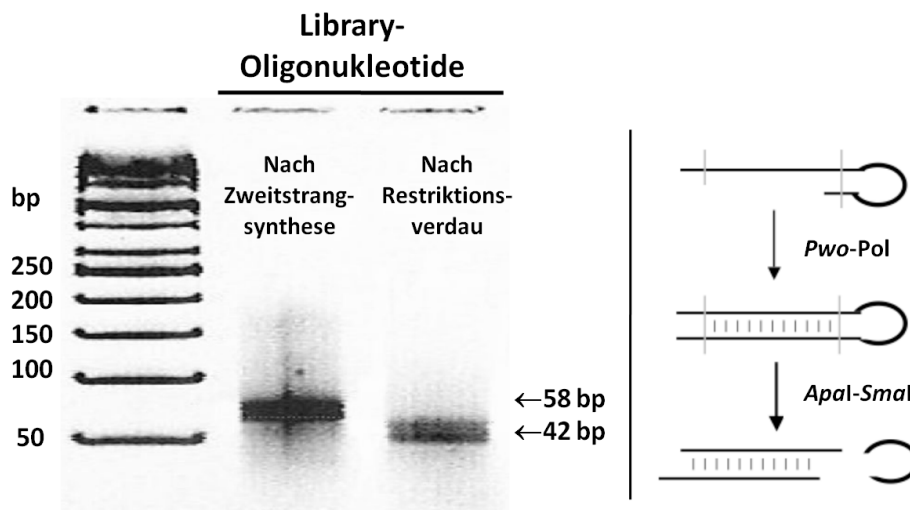


Abb. 3-19: Vorbereitung der Oligonukleotid-Library für die Hefe-Zwei-Hybrid Prey-Expressionsvektor Klonierung

Nach Elongation des Komplementärstrangs der synthetischen 12mer NNK-Oligonukleotid Library mit Hairpin-Struktur und anschließendem *Apal/SmaI*-Restriktionsverdau wurden je 5 μ l der Proben auf ein natives 20%iges TBE-Polyacrylamidgel aufgetragen und überprüft.

Die Ligation mit dem über den *Apal/SmaI* – Linker im katalytischen Zentrum des hTRX-Proteins linearisierten Prey-Expressionsvektor erfolgte mit einem Vektor:Insert Mengenverhältnis von 1:10. Nach erneuter Aufreinigung wurde die Ligationseffizienz der klonierten Library-Vektoren überprüft. Dafür wurden 10 ng der Vektoren in *E.coli* transformiert, die Plasmide aus 50 Kolonien isoliert und über einen Restriktions-Testverdau, sowie anschließender Sequenzanalyse, die Anzahl erfolgreicher Ligationen, anhand des Einbaus eines Library-Oligonukleotids, überprüft. Ca. 80-90 % der klonierten Library-Vektoren für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen wiesen korrekt eingebaute 12mer Peptidaptamer-Sequenzen auf (siehe Abb. 3-20). Bei den restlichen 10-20 % handelte es sich um Vektoren ohne Insert oder falsch-positive Klonierungsergebnisse, vermittelt über Fehler bei der *SmaI*-„blunt-end“ Restriktion und Ligation, mit Vektoren in denen verkürzte Peptidaptamer-Sequenzen oder fusionierte Doppelsequenzen auftraten. Der inkorrekte Einbau von Peptidaptamer-Sequenzen führte zu Verschiebungen des Leserahmens und zum Auftreten von Stop-Codons im C-terminalen Teil des hTRX-Scaffolds, was zur Expression verkürzter Fusionsproteine führte.

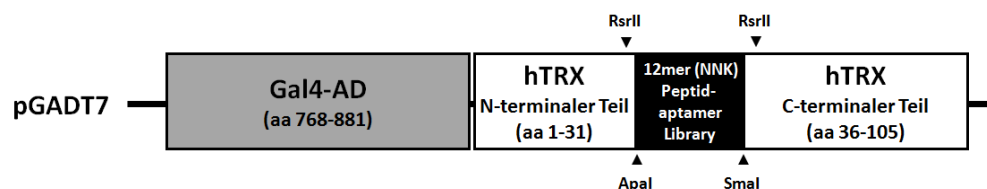


Abb. 3-20: Schematische Darstellung der klonierten Prey-Konstrukte für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen

Randomisierte 12mer (NNK) Peptidaptamer-Sequenzen wurden als Oligonukleotid-Library monodirektional über einen *Apal/SmaI*-Linker in das katalytische Zentrum des hTRX Proteins integriert, was zuvor als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne (AD) von Gal4 in den Hefe-Expressionsvektor pGADT7 des Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid Systems 3 [Clontech] kloniert wurde (pGADT7-hTRX-(NNK)₁₂-Library).

3.2.1.4 TRANSFORMATION & AMPLIFIKATION DER KLONierten LIBRARY-VEKTOREN

Um ausreichend DNA-Ausgangsmaterial für den anschließenden Hefe-Zwei-Hybrid Screen zu erhalten, wurden die Library-Vektoren in Top10F' *E.coli* transformiert und amplifiziert. Dabei sollte die Anzahl verschiedener amplifizierter Library-Vektoren möglichst groß sein, um eine hohe Varianz zu testender Protein-Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid Screen zu gewährleisten. Hierfür wurden nach erfolgter Transformation ca. 2×10^7 *E.coli* Kolonien auf 300-400 großen LB_{AMP} Agarplatten (145 mm \varnothing runde & 144cm² quadratische Petrischalen) ausgestrichen. Die Herstellung der chemokompetenten Top10F' *E.coli* (siehe Kap. 2.2.1.1) sowie das Gießen der LB_{AMP} Agarplatten erfolgten frisch vor der Transformation. Um eine Gleichverteilung der Amplifikation zu gewährleisten sollten Einzelkolonien herangezogen werden, welche andere Kolonien nicht überlagern und deren Wachstum behindern. Daher erfolgte zunächst eine Bestimmung des optimalen Verhältnisses aus Library-Vektor Menge und dem Volumen an Bakterienlösung, welche im Transformationsansatz eingesetzt wurden, unter Einbeziehung der zuvor ermittelten Transformationseffizienz. So wurden für 100 LB_{AMP} Agarplatten 1 μ g Library-Vektoren transformiert. Hierfür wurden 10 Transformationsansätze mit je 100 ng Library-Vektoren und 100 μ l *E.coli*-Lösung angefertigt. Nach erfolgter Transformation wurden die Ansätze vereinigt mit LB-Medium auf 50 ml aufgefüllt und nach 60 minütiger Inkubation bei 37°C (unter schütteln; 500 rpm) zu je 500 μ l auf 100 LB_{AMP}-Platten ausgestrichen. Nach weiterer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden so ca. 50.000 Einzelkolonien auf einer großen LB_{AMP} Agarplatte herangezogen. Die einzelnen Bakterienkolonien wurden nach Zugabe von 10 ml LB_{AMP}-Medium abgeschabt, die erhaltene Suspension bei 37°C für 60 min geschüttelt und die amplifizierten Library-Vektoren, nach Pelletierung der Bakterien über Zentrifugation (30 min; 4000 rpm; 4°C), mittels Gigapräparation isoliert (siehe Kap. 2.2.1.2). Ausgehend von einem 80-90 %igen Anteil korrekt klonierter Library-Vektoren im Transformationsansatz, konnten somit theoretisch aus 2×10^7 Bakterienkolonien ca. $1,6 - 1,8 \times 10^7$ verschiedene Prey-Expressionsvektoren in amplifizierter Form für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen gewonnen werden.

3.2.1.5 HEFETRANSFORMATION & LIBRARY SCREEN

Die Transformation der Library-Vektoren in die Hefezellen und anschließende Ausplattierung auf SD-Selektivagar im „Library scale“-Format, erfolgte nach Protokoll-Angaben des Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid Systems 3 von Clontech. Die DBD sowie das SH2/TA-Fragment des humanen Stat5A Proteins wurden als Bait für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen eingesetzt. Insgesamt wurden 4 Library-Screens, je 2 gegen Stat5A-DBD sowie je 2 gegen Stat5A-SH2/TA durchgeführt. Wie

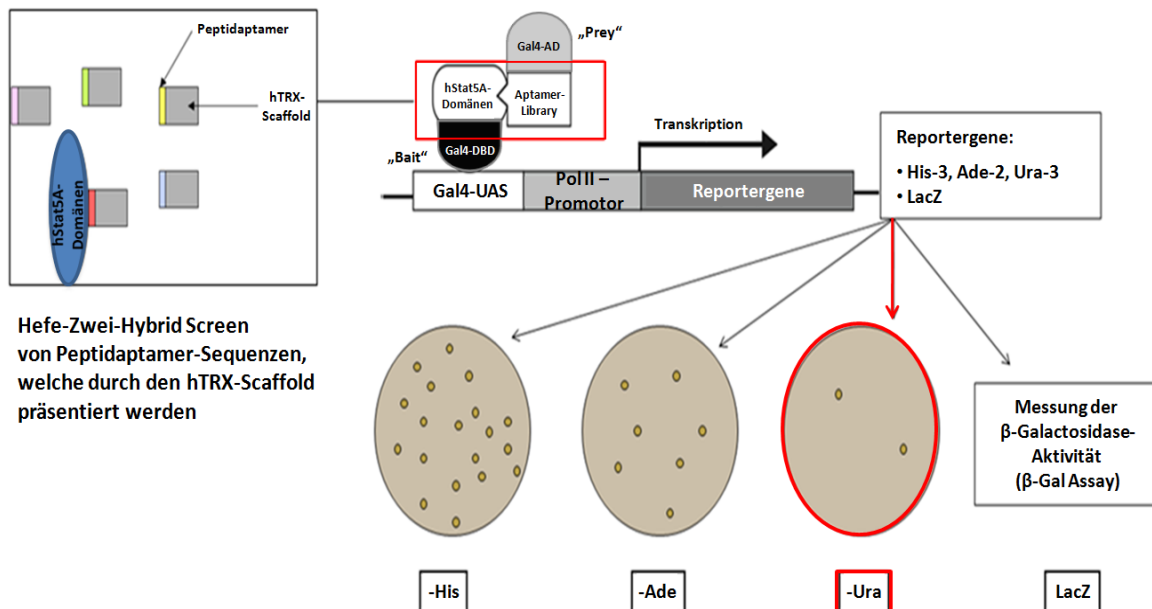
unter Kap. 2.2.2 einleitend bereits erwähnt, wurde für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen der *S. cerevisiae* Stamm KF1 verwendet, welcher über Reporter Gene für die Biosynthese von Histidin, Adenin und Uracil (HIS3, ADE2, URA3), sowie einem LacZ-Reporter verfügt (Butz et al., 2000; James et al., 1996). Die über cis-regulatorische Elemente bestimmte Promotorstärke der einzelnen Reporter Gene bietet die Möglichkeit Protein-Protein-Wechselwirkungen unterschiedlicher Stärke zu identifizieren. So wird das HIS3-Gen durch einen relativ starken Promotor, mit vier Gal4-UAS Elementen („upstream activating sequences“), kontrolliert, wodurch eine schwache und kurzlebige transkriptionelle Aktivität von Gal4, als Resultat schwächerer und kurzlebigerer Protein-Wechselwirkungen, bereits zur Expression führt. Das ADE2-Gen wird nur durch zwei Gal4-UAS Elemente reguliert, wodurch stärkere Protein-Wechselwirkungen für eine ausreichende Expression benötigt werden, welche ein Überleben von Hefen auf Adenin-Selektionsmedium ermöglicht. Die Selektion stärkster Protein-Interaktionen bietet jedoch der schwache Promotor des URA3-Gens, welcher mit einem „Silencer“ ein negativ-regulatorisches Element beinhaltet. Nur durch die erhöhte Ausbildung aktiv transkribierender Gal4-Komplexe, vermittelt durch eine starke und langlebige Proteininteraktion, kann eine ausreichende Menge an Uracil, zum Überleben auf Selektivmedium, synthetisiert werden. Die KF1-Hefe wurde seriell, zunächst mit dem jeweiligen Bait-Expressionsvektor und nach anschließendem Heranziehen einer 1 L Hefekultur mit 500 µg pGADT7-hTRX-(NNK)₁₂-Libraryvektoren pro Screen transformiert. Ziel der Arbeit war die Identifikation stärkster Protein-Wechselwirkungen, weshalb der Library-Screen bzw. die Selektion der Hefen unter Uracil-Mangel, auf SD-LTU Selektivagarplatten erfolgte (siehe Abb. 3-21A). Die Transformationseffizienz der 4 durchgeführten Screens lag im Bereich 3×10^3 bis 5×10^3 cfu/µg, sodass mit 500 µg Library-Vektoren pro Screen etwa $1,5 - 2,5 \times 10^6$ Hefe-Zellen transformiert werden konnten.

38 Hefeklonen (16 mit dem hStat5A-SH2/TA und 22 mit dem hStat5A-DBD Bait) konnten auf SD-LTU Selektivagarplatten selektioniert werden, wobei es sich in über der Hälfte der Fälle um falsch-positive Ergebnisse handelte, wie eine anschließende Sequenzierung der isolierten Prey-Expressionsvektoren ergab. Die übrigen Vektoren wiesen ein vollständiges Fusionsprotein aus Gal4-AD und hTRX mit korrekt eingebauter Peptidaptamer-Sequenz auf. Nach Retransformation dieser Prey-Expressionsvektoren in KF1-Hefezellen mit dem entsprechendem Bait bzw. entsprechender Stat5A-Zielstruktur und der anschließenden Validierung der Proteininteraktion durch Hefe-Zwei-Hybrid Protein-Interaktionsassays, war es am Ende eine 12mer Peptidaptamer-Sequenz, welche eine vielversprechende Interaktion mit der DNA-Bindedomäne des humanen Stat5A-Proteins aufwies (siehe Abb. 3-21B). Dieser Interaktion entsprechend wurde das

Ergebnisse

Peptidaptamer-Konstrukt als S5-DBD-PA (Stat5-DNA-Bindedomäne spezifisches Peptidaptamer) bezeichnet. Weitere identifizierte Peptidaptamer-Sequenzen wurden aufgrund geringer Bindungsaffinitäten in der Nachvalidierung oder der Präsenz, für die Proteinaufreinigung, problematischer Cysteinreste von einer weiteren Betrachtung ausgeschlossen.

A)



B)

Hefe-2-Hybrid: 12mer Peptidaptamer-Screeningergebnis

hStat5A-SH2/TA		hStat5A-DBD	
Sequenz	Affinität	Sequenz	Affinität
Arg-Phe-Ala-Pro-Leu-His-Ile-His-Leu-Thr-Ser-Ile	+	Gln-Gly-Ser-Trp-Thr-Ile-Asn-Ile-Ser-Lys-Arg-Leu (S5-DBD-PA)	+++
Arg-Ile-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Gly-Glu-Gly-Pro	+	Asp-Val-Leu-Asn-Val-Arg-Val-Thr-Trp-Asn-Tyr-Gly	+
Cys-Asp-Arg-Leu-Arg-Gly-Ala-Gly-Arg-Trp-Cys-Cys	+	His-Thr-Met-Arg-Trp-Cys-Leu-Arg-Glu-Gly-Gly-Ile	+
Ile-Ala-Cys-Thr-Cys-Thr-Gly-Pro-Met-Val-Leu-Ser	++	Ser-Val-Arg-Leu-Arg-Leu-His-His-Cys-Tyr-Gly-Asp	+
His-Cys-Val-Thr-Leu-Arg-Val-Gly-Gly-Leu-Arg-Phe	+	Phe-Val-Leu-Glu-Met-Arg-Phe-Gly-Gly-Val-Met-Asp	+
Lys-Ser-Val-Arg-Pro-Arg-Val-Gly-Gly-Arg-Met-Cys	+	Glu-Val-Pro-Val-Gln-Leu-Lys-Leu-Ala-Val-Tyr-Ser	+
		Val-Asp-Ser-Gly-Leu-Met-Leu-Leu-Glu-Glu-Cys-Leu	+

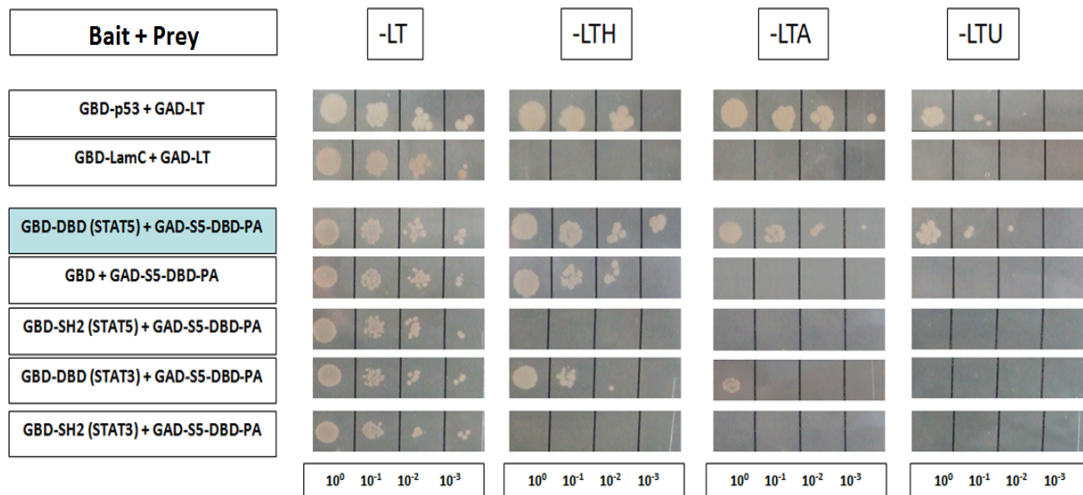
Abb. 3-21: Identifikation von 12mer Peptidaptamer-Sequenzen welche mit funktionellen Domänen des humanen Stat5A-Proteins interagieren.

A) Schematische Darstellung des durchgeführten Hefe-2-Hybrid Screens zur Identifikation von 12mer Peptidaptamer-Sequenzen, welche durch den hTRX-Scaffold präsentiert werden und mit funktionellen Domänen des humanen Stat5A-Proteins interagieren. KF1-Hefezellen, welche über 4 verschiedene Reportergene verfügen, wurden mit den klonierten Bait- (pGBKT7: Gal4DBD-hStat5A-DBD/SH2-TA) und Prey-Expressionsvektoren (pGADT7: Gal4-AD-hTRX-(NNK)₁₂) doppelt transformiert und auf Uracil-Mangelmedium, zur Identifikation von Protein-Interaktionen mit höchster Stringenz, ausgestrichen. Anschließend wurden die Plasmide selektionierter Hefekolonien isoliert, sequenziert und für eine Validierung der Protein-Interaktion in KF1-Hefe retransformiert. B) Auflistung der identifizierten 12mer Peptidaptamer-Sequenzen nach Ausschluss falsch positiver Ergebnisse (S5-DBD-PA: rot markiert). Nach Retransformation, mit dem Hefe-2-Hybrid Tropfplatten- und β-Galactosidasetest gegen die jeweilige Stat5-Target-Domäne validierte Bindungsaffinitäten sind von gering (+) bis stark (+++) gekennzeichnet.

3.2.1.6 VALIDIERUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN S5-DBD-PA UND DER DNA-BINDEDOMÄNE VON STAT5 MIT DEM HEFE-ZWEI-HYBRID SYSTEM

Über die Expression der verschiedenen Reportergene lassen sich mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System einfach und schnell quantitative Aussagen über die Intensität einer Protein-Interaktion unter intrazellulären Bedingungen treffen. Nach Transformation der Expressionsvektoren für das Gal4-DBD/hStat5A-DBD Bait- und des Gal4-AD/S5-DBD-PA Prey-Fusionskonstruktes in KF1-Hefezellen, wurde zunächst der Hefe-Zwei-Hybrid Tropfplattentest durchgeführt (siehe Kap. 2.2.2.3.3). Gemessen anhand des Wachstums seriell verdünnter KF1-Hefe auf allen 4 SD-Selektionsmedien, wies die Interaktion zwischen S5-DBD-PA und der Stat5A-DBD, im Vergleich mit der p53 + LargeT Positivkontrolle, eine nahezu identisch hohe Stärke auf (siehe Abb. 3-22A). Die starke Interaktion zwischen dem p53-Tumorsuppressorprotein und dem SV40 LargeT Antigen wurde bereits vor 20 Jahren mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System analysiert und wird seitdem routinemäßig als Positivkontrolle für Interaktions-Assays und Zwei-Hybrid Verfahren eingesetzt (Li & Fields, 1993). S5-DBD-PA wies keinerlei Spezifität gegen die Dimerisierungsdomänen (SH2/TA-Fragment) des humanen Stat5A und Stat3 Proteins auf, zeigte allerdings eine gewisse Affinität gegenüber der DNA-Bindedomäne von Stat3, welche ausreichte um unverdünnte KF1-Hefe auf Adenin-Mangelmedium wachsen zu lassen. Hierbei sei zu erwähnen, dass die DNA-Bindedomäne von Stat5A und Stat3 eine Sequenzhomologie von 42% aufweisen (ermittelt mit NCBI-BLAST®). Die Aminosäuresequenz der DNA-Bindedomäne der humanen Stat5A und Stat5B Isoformen ist zu 97% identisch, weshalb von einer vergleichbaren Spezifität des Peptidaptamers gegenüber Stat5B ausgegangen werden kann. Die Autoaktivierungskontrolle ließ zudem eine leichte Affinität von S5-DBD-PA gegenüber der reinen Gal4-DBD erkennen, welche jedoch marginal bzw. vernachlässigbar im Vergleich zu der hohen Intensität der Interaktion zwischen S5-DBD-PA und der Stat5A-DBD erschien. Zudem wurde diese Affinität durch Kopplung der SH2/TA-Fragmente aufgehoben, was eine S5-DBD-PA Affinität gegenüber der Gal4-DBD im fusionierten Zustand mit einer Protein-Zielstruktur ausschloss. Für eine zusätzliche Quantifizierung der Interaktionsstärke wurde die β -Galactosidase Aktivität nach Aktivierung des LacZ-Reportergens gemessen (siehe Kap. 2.2.2.3.4). Hierbei waren deutlichere Unterschiede zwischen dem Wert der Positivkontrolle und dem der Stat5A-DBD und S5-DBD-PA Interaktion feststellbar (siehe Abb. 3-22B). Der Anhand von Miller-Units (MU) ermittelte Wert der β -Galactosidase Aktivität lag jedoch trotzdem deutlich über den Werten der Kontrollen und lag mit MU= 7,09 ebenfalls deutlich über dem Schwellenwert einer Protein-Interaktion in KF1-Hefezellen von MU= >2.

A)



B)

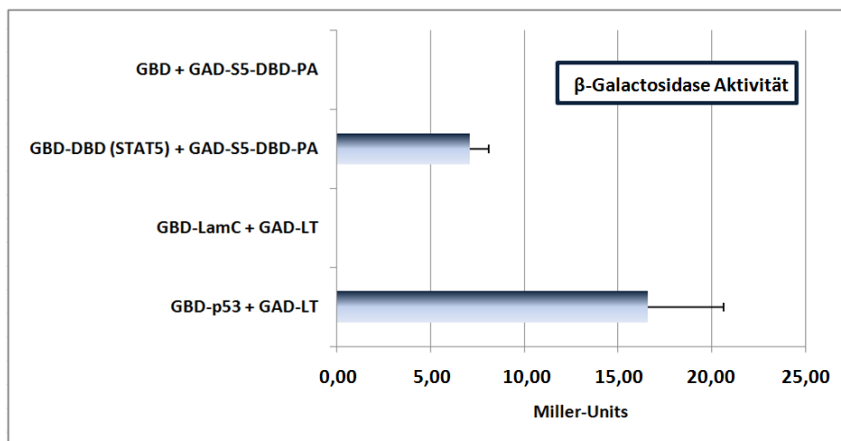


Abb. 3-22: Validierung der Interaktion zwischen S5-DBD-PA und der DNA-Bindedomäne des humanen Stat5A-Proteins mit dem Hefe-Zwei-Hybrid Tropfplattentest und β -Galactosidase-Assay

A) Hefe-Zwei-Hybrid Tropfplattentest: KF1-Hefezellen wurden mit Bait- (pGBKT7) und Prey- (pGADT7) Expressions-vektoren doppelt transformiert und unverdünnt (OD= 0,5) sowie 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt, zu je 5 μ l auf SD-Selektivagar getropft. Die Abbildung der Agarplatten richtet sich von links ausgehend nach zunehmender Stringenz einer Protein-Interaktion bzw. zunehmender Protein-Interaktionsstärke. Die Gene für die Synthese von Leucin (L) und Tryptophan (T) befinden sich als Marker auf den beiden Expressionsplasmiden. Als Reporter einer Protein-Interaktion dienen modifizierte Gene für die Synthese von Histidin (H), Adenin (A) und Uracil (U) im Genom der KF1-Hefe. Fusioniert mit der DNA-Bindedomäne von Gal4 (GBD) wurden die Dimerisierungs- (SH2 bzw. SH2/TA) und DNA-Bindedomänen (DBD) von Stat3 und Stat5A als Bait gegen das Gal4-AD (GAD) – S5-DBD-PA Prey-Fusionsprotein eingesetzt. Die Interaktionen zwischen p53 und LaminC (LamC) mit dem LargeT Antigen (LT) des SV40-Virus dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Die Interaktion zwischen GBD und GAD-S5-DBD-PA diente als Autoaktivierungskontrolle. **B)** Quantifizierung der Protein-Interaktionsstärke zwischen S5-DBD-PA und Stat5A-DBD durch Messung der β -Galactosidase Aktivität (β -Gal Assay) der KF1-Hefe nach Plasmidtransformation. Angabe in Miller-Einheiten (Miller-Units). Zuvor genannte Positiv- (p53+LT), Negativ- (LamC+LT) und Autoaktivierungskontrollen (GBD+S5-DBD-PA) wurden parallel gemessen. (n=3; MW \pm SD)

3.2.2 AUFREINIGUNG DES S5-DBD-PA PEPTIDAPTAMER-KONSTRUKTS NACH REKOMBINANTER EXPRESSION

Für eine weitere Anwendung als applizierbare Stat5-inhibitorische Testsubstanz, erfolgte eine rekombinante Herstellung des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts. Die Herstellung erfolgte in Bakterien, da die hohen rekombinanten Expressions-Level, wie sie in *E.coli* erzielt werden können, essentiell für eine effiziente Aufreinigung und den Erhalt ausreichender Proteinmengen für nachfolgende *in vitro* oder *in vivo* Applikationen waren. Wie einleitend bereits erwähnt, trägt das Scaffold-Protein, aufgrund der Möglichkeit erhöhter rekombinanter Expression, ebenfalls wesentlich zu einer vereinfachten Herstellung des Proteins bei. Thioredoxin erfüllt dieses essentielle Kriterium eines geeigneten Scaffold-Proteins in Bakterien, jedoch war eine Substitution von Cystein-Resten für die Aufreinigung des Peptidaptamer-Konstrukts als monomeres Protein unumgänglich. Aufgrund stattfindender Aggregationen über Disulfid-Interaktion und der daraus resultierenden Formierung biologisch- bzw. funktionell-inaktiver, Proteinaggregate während des Aufreinigungsprozesses, wurden die Cystein-Reste im katalytischen Zentrum des hTRX-Scaffolds (Cys³² und Cys³⁵) durch Glycine und drei weitere Cystein-Reste im C-terminalen Bereich (Cys⁶², Cys⁶⁹ und Cys⁷³) durch Serine ersetzt (hTRX Δ cys5). Diese Modifikation des hTRX-Scaffolds führte, aufgrund der Stabilisierung monomerer Peptidaptamer-Konstrukte während der Protein-Dialyse und nachfolgend in Lösung, zu einer stark verbesserten Aufreinigungs-Effizienz und dem Erhalt ausreichend hoher Proteinmengen (Borghouts et al., 2008a). Für die rekombinante Expression in *E.coli* erfolgte eine Umklonierung von S5-DBD-PA aus dem pGADT7-Prey-Expressionsvektor in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-30a(+) [Novagen] und pFLAG-2 [Sigma-Aldrich]. Für die spätere Aufnahme des rekombinanten S5-DBD-PA Peptidaptamers in die Zielzellen, wurde der hTRX Δ cys5-Scaffold im Zuge dieser Umklonierung am C-terminalen Ende mit einer Proteintransduktionsdomäne (PTD), bestehend aus 9 aufeinanderfolgenden L-Arginin-Resten, fusioniert. Der für eine Aufreinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie optimierte pET-30a(+) Vektor ermöglicht die Addition von zwei Histidin-Tags (6xHis), sowohl N- als auch C-terminal des rekombinant zu exprimierenden Transgens. Zudem verfügt der Vektor über einen starken IPTG-induzierbaren T7-Promotor für eine erhöhte rekombinante Expression (siehe Kap. 2.2.4.1). Die Transgen-Expression im pFLAG-2 Vektor wird über den *tac*-Hybridpromotor, bestehend aus den -35 und -10 Promotorelementen des starken *trp*- bzw. *lac*-Promotors, reguliert. Der *tac*-Promotor lässt sich ebenfalls über IPTG, in Folge der Dissoziation des LacI-Repressors, induzieren und ermöglicht eine effiziente Überexpression des rekombinanten Proteins. Über den pFLAG-2 Vektor konnte das Peptidaptamer-Konstrukt am N-Terminus mit einem FLAG Epitop-Tag

Ergebnisse

fusioniert werden, was eine effiziente Protein-Detektion über Antikörper ermöglicht. Zusätzlich wurde N-terminal eine NLS-Domäne für eine erhöhte nukleäre Translokation und C-terminal erneut eine 9-Arg PTD und ein 6xHis-Tag mit dem Peptidaptamer-Konstrukt fusioniert (siehe Abb. 3-23). Die Klonierung der Tags geschah in Vorarbeit durch Mitglieder der Arbeitsgruppe (Borghouts et al., 2012).

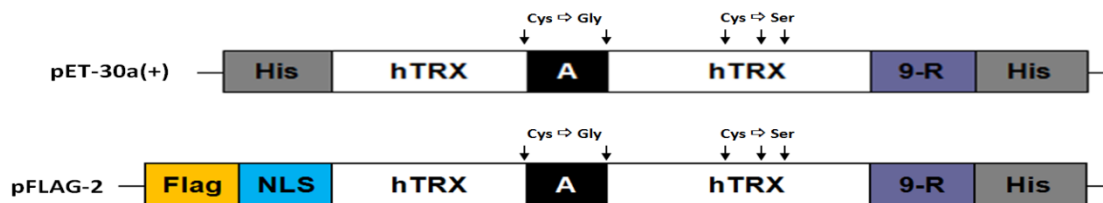
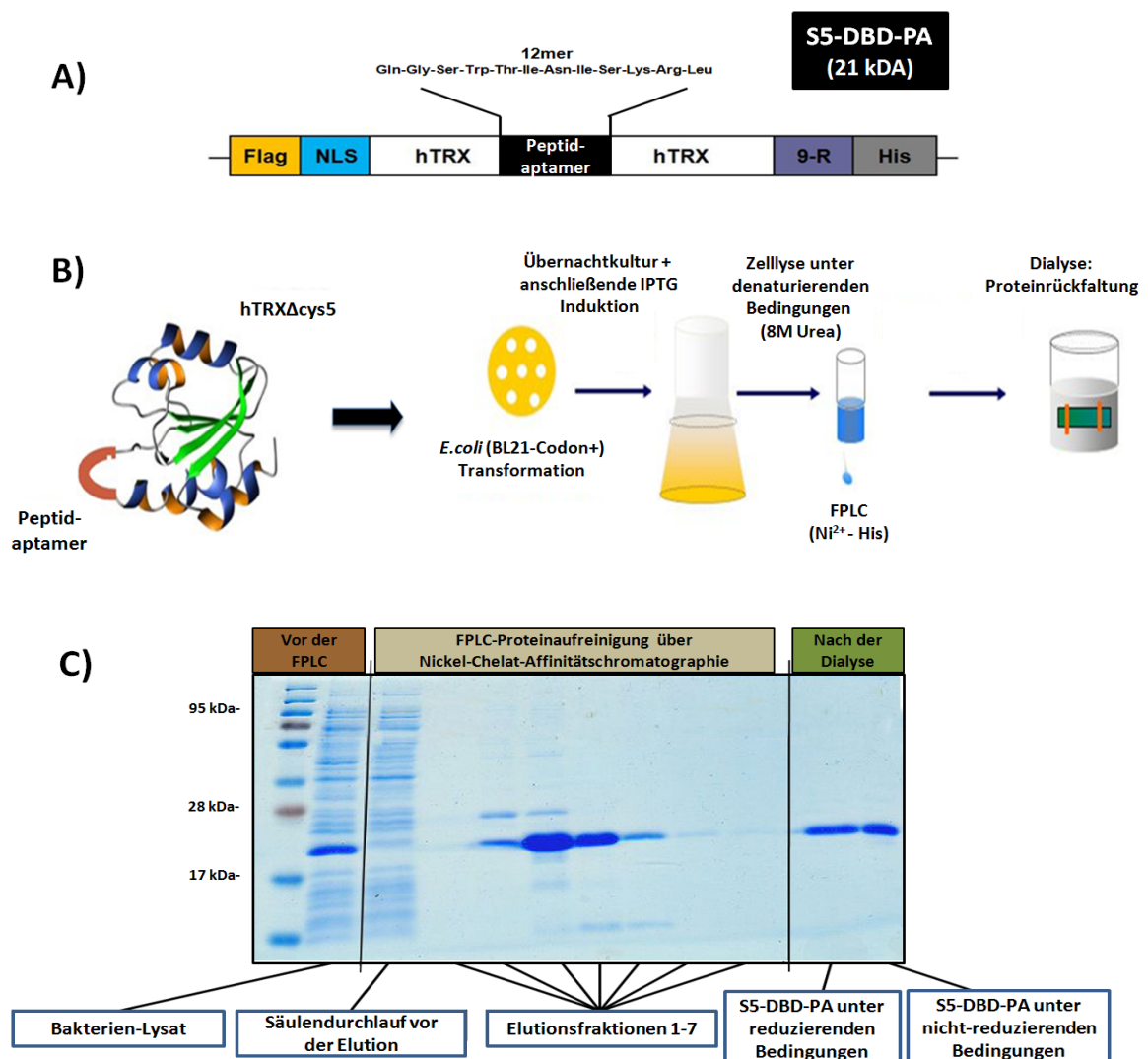


Abb. 3-23: Domänenstruktur der rekombinanten S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukte

Nach Beendigung des Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde das optimierte hTRX Δ cys5-Scaffoldprotein ohne Cystein-Reste, welches die Stat5-spezifische S5-DBD-PA Peptidaptamer-Sequenz (A) über das katalytische Zentrum auf der Oberfläche präsentiert, in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-30a(+) und pFLAG-2, für eine Aufreinigung als rekombinantes Protein, umklontiert. Ein 9-Arginin-Rest (9-R) als PTD und ein 6x-Histidin-Tag (His) für die Proteinaufreinigung wurden jeweils C-terminal mit dem Scaffold fusioniert. Am N-Terminus wurde im pET-30a(+)-Vektor ein zweites zusätzliches His-Tag und im pFLAG2-Vektor ein FLAG Epitop-Tag (Flag) sowie eine NLS-Domäne für erhöhte nukleäre Translokation mit dem hTRX Δ cys5-Scaffold fusioniert.

Da der Vergleich beider rekombinanter S5-DBD-PA Konstrukte leicht verstärkte Effekte im Falle des über den pFLAG-2 Vektor aufgereinigten Proteins, womöglich aufgrund erhöhter NLS-vermittelter nukleärer Translokation, aufzeigte (Ergebnisse nicht dargestellt) und zudem der Flag-Tag eine effiziente Detektion und erhöhte Anwendbarkeit des Proteins ermöglichte, wurden alle nachfolgend aufgeführten Experimente mit dieser Variante des S5-DBD-PA Peptidaptamers durchgeführt (siehe Abb. 3-24A). Unter Verwendung des speziell für die rekombinante Expression eukaryotischer Proteine optimierten *E.coli*-Stamms BL21⁺ (siehe Kap. 2.1.10 & 2.2.4.1), wurde das 21 kDa große S5-DBD-PA Protein, nach IPTG-Induktion und Bakterienlyse unter denaturierenden Bedingungen, über die Interaktion des Histidin-Tags mit Ni²⁺-Ionen (Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie) einer beladenen FPLC-Säule („Fast Protein Liquid Chromatography“), in einem FPLC-System [ÄktaTM-GE Healthcare] aufgereinigt. Unter Anwendung der Dialyse, wurde S5-DBD-PA im Anschluss rückgefaltet (siehe Abb. 3-24B). Die Stabilität monomerer S5-DBD-PA-Proteine in Lösung stellte das Qualitätskriterium bzw. die Grundlage für eine weitere Verwendung der rekombinant hergestellten Proteine in Zellkulturexperimenten dar. Sowohl die einzelnen Elutionsfraktionen, als auch die nach der Dialyse rückgefalteten Proteinproben wurden daher durch Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels hinsichtlich einer Formierung von Proteinaggregaten analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes S5-DBD-PA, mit einem

Cystein-freien Scaffold und einer Cystein-freien Target-spezifischen 12mer Peptidaptamer-Sequenz, als stabiles Monomer in Lösung verhält. Weder die Beladung des Gels mit S5-DBD-PA in einem reduzierenden Puffer noch in einem nicht-reduzierenden Puffer führte zu der Formierung sichtbarer Multimere (siehe Abb. 3-24C). Nichtsdestotrotz wurden in der Folge gefrorene Aliquots nach dem Auftauen stets abzentrifugiert, um eventuell auftretende Aggregationen während des Frier- und Tauprozesses abzutrennen, um dadurch, nach Messung der Proteinkonzentration, den Einsatz exakter Mengen S5-DBD-PA Proteins für jeweilige Experimente zu gewährleisten. Wie zuvor bereits erwähnt, weisen die DNA-Bindedomänen der homologen humanen Stat5A und Stat5B Isoformen eine 97%ige Sequenzidentität auf, weshalb von einer generellen, gegen Stat5 Homo- und Heterodimer gerichteten Aktivität des S5-DBD-PA Peptidaptamers ausgegangen werden kann (siehe Abb. 3-24D).



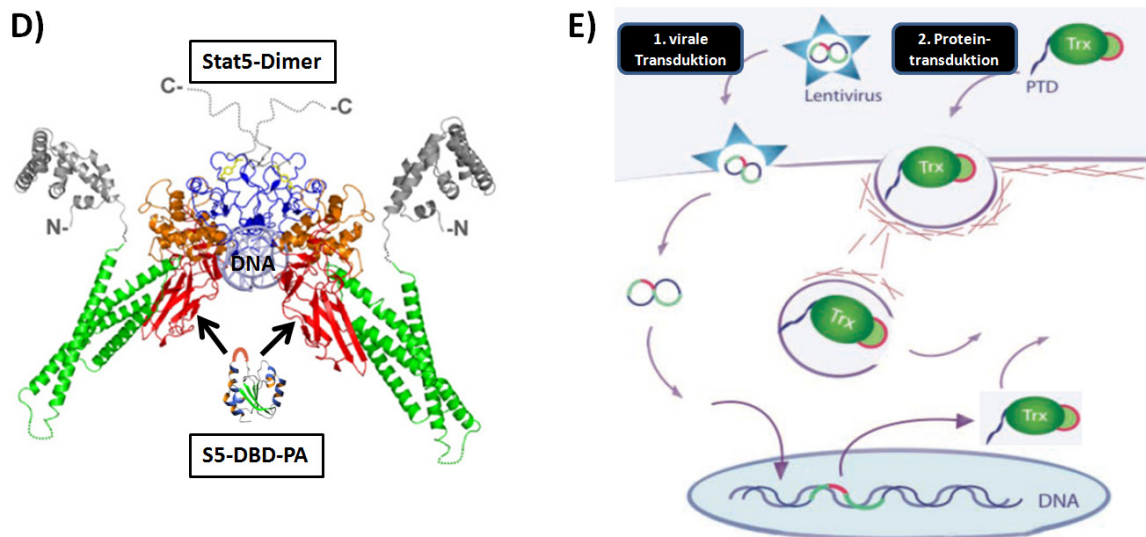


Abb. 3-24: Rekombinante Expression, Aufreinigung und Applikation des zellpenetrierenden Stat5-spezifischen Peptidaptamer-Konstrukts S5-DBD-PA

A) Die Domänenstruktur des rekombinanten 21 kDa großen S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts, welches über den pFLAG-2 Vektor kloniert wurde. Die Präsentation der spezifisch mit der DNA-Bindedomäne des humanen Stat5A-Proteins interagierende 12mer Peptidaptamer-Sequenz erfolgte im katalytischen Zentrum des hTRX Δ cys5-Scaffolds, welches N-terminal mit einem Flag-Tag und einer NLS-Domäne sowie C-terminal mit einer 9-Arg PTD und einem His-Tag fusioniert wurde. **B)** Aufreinigungsprozess des in *E. coli* rekombinant exprimierten Peptidaptamer-Konstrukts. Nach IPTG-Induktion und Bakterienlyse unter denaturierenden Bedingungen, wurde S5-DBD-PA über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie in einer FPLC-Säule aufgereinigt. Mittels Dialyse wurden die Proteine im Anschluss rückgefaltet. **C)** Ausschluss der Formierung von Proteinaggregaten während und nach dem Aufreinigungsprozess durch Coomassie-Färbung. Aufgereinigtes S5-DBD-PA wurde dafür nach der Dialyse sowohl in einem reduzierenden, als auch in einem nicht-reduzierenden Gel-Ladepuffer aufgenommen. **D)** Interaktion von S5-DBD-PA mit der DNA-Bindedomäne von Stat5. Schematische Darstellung der Kristallstruktur eines aktivierten und transkriptionell aktiven Stat5-Dimers, welcher auf der DNA-Doppelhelix sitzt (Mohr et al., 2012) und dem mit der in rot dargestellten Stat5-DBD interferierenden S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts. **E)** Schematische Darstellung der angewandten Methoden zur Übertragung von S5-DBD-PA in Tumorzelllinien. 1. Endogene S5-DBD-PA Expression in Tumorzellen nach lentiviraler Transduktion. 2. Applikation von S5-DBD-PA als rekombinant in Bakterien hergestelltes, zellpenetrierendes Peptidaptamer-Konstrukt. Modifiziert aus (Kunz et al., 2006)

In der Folge galt es die Effekte einer Interferenz von S5-DBD-PA mit der DBD von Stat5, hinsichtlich bestimmter Aspekte wie Veränderungen zellulärer Viabilität Stat5-abhängiger Tumorzelllinien oder Veränderungen der transkriptionellen Aktivität von Stat5 zu analysieren. Vor der Applikation des S5-DBD-PA Peptidaptamers als rekombinantes, zellpenetrierendes Protein (Proteintransduktion), erfolgte zunächst eine Validierung der Effekte einer endogenen S5-DBD-PA Expression nach lentiviralem Gentransfer (virale Transduktion), als eine zweite Möglichkeit der Übertragung von Peptidaptameren in Zielzellen (siehe Abb. 3-24E).

3.3 ANALYSE DER S5-DBD-PA EFFEKTE NACH LENTIVIRALEM GENTRANSFER

Wie zuvor die Stat5-gerichtete shRNA, wurde auch das S5-DBD-PA Transgen über VSV-G pseudotypisierte Lentiviren mit SIN-Konfiguration stabil ins Genom der Zielzellen integriert (siehe Kap. 2.2.3.3). Als Transfervektor wurde dafür der pSiEW-Vektor verwendet („SFFV-IRES-eGFP-WPRE“), welcher als HIV-1 Transfervektor ebenfalls wie der pLeGO-G Vektor aus dem HIV-1 Genom (ψ , LTRs, cPPT, RRE) abgeleitet wurde. Im pSiEW Vektor wird jedoch sowohl die Expression des Transgens als auch des eGFP-Fluoreszenzreporters gemeinsam über den starken SFFV-Promotor („spleen focus forming virus“) gesteuert, wobei eine stabile eGFP-Expression dabei über ein vorgeschaltetes IRES-Element („internal ribosomal entry site“) sicher gestellt wird. Über den Einbau eines mRNA-stabilisierenden WPRE-Elements („woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“), ist der pSiEW-Vektor zusätzlich für eine effiziente Transgen-Expression optimiert. Neben dem S5-DBD-PA-Peptidaptamer-Konstrukt erfolgte dabei eine Klonierung des hTRX Δ cys5-Scaffoldprotein-Konstruktes ohne Stat5-DBD-spezifische Peptidaptamer-Sequenz, dessen Expression in nachfolgenden Experimenten als Negativkontrolle diente (siehe Abb. 3-25). Anstelle der 12mer Peptidaptamer-Sequenz lag im katalytischen Zentrum der hTRX-Negativkontrolle die zuvor für die Klonierung der Oligonukleotid-Library eingebaute *Apal*/*Sma*I-Linkersequenz vor, bestehend aus einer über *Apal*- und *Sma*I-flankierten Target-unspezifischen 9mer Aminosäuresequenz (Ala-Ile-Gly-His-Met-Ser-Phe-Leu-Val).

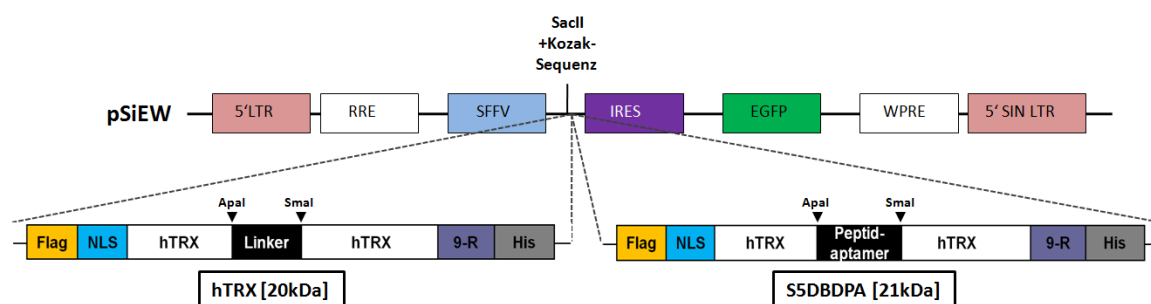


Abb. 3-25: Integration des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts und der hTRX-Negativkontrolle in den lentiviralen pSiEW-Transfervektor

In dem aus dem HIV-1 Genom abgeleiteten lentiviralen pSiEW Transfervektor mit SIN-Konfiguration wird sowohl die Transgen- als auch die eGFP-Fluoreszenzreporter-Expression über den starken SFFV-Promotor reguliert, wobei eine stabile eGFP-Expression durch ein vorgeschaltetes IRES-Element sichergestellt wird. Die Klonierung des S5-DBD-PA Peptidaptamer- und des hTRX-Scaffold-Konstruktes, als Negativkontrolle, erfolgte über *Sac*II im Leserahmen mit IRES und eGFP. Für die Erhöhung der Transgen-Expressionsraten durch verbesserte Translationsinitiation wurde in dieser Arbeit vor das Start-Codon zusätzlich eine [GCC-GCC-ACC]-Kozak-Sequenz eingebaut. Zusätzlich verfügt der pSiEW-Vektor über ein RRE- und WPRE-Element für eine erhöhte und stabile Transgen-Expression.

Ergebnisse

Nach der Produktion lentiviraler Partikel und der Bestimmung des Virustiters, wurden die Zielzellen, wie zuvor im Falle des Transfers Stat5-gerichteter shRNA, mit einer MOI=50 infiziert. Um sicherzustellen, dass S5-DBD-PA und das hTRX Scaffold-Kontrollprotein in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden, erfolgte eine Bestimmung beider Konstrukte auf RNA-Ebene durch qPCR-Analyse und auf Proteinebene im Western-Blot Verfahren. Die qPCR-Analysen ergaben im Schnitt, leicht erhöhte RNA-Level des hTRX-Konstruktes (Ergebnisse nicht dargestellt), welche nicht immer mit der Menge detektierter Proteine im Western Blot übereinstimmten. Beide Messungen ließen jedoch eine stabile Transgen-Expression bis zu mehreren Wochen nach der Transduktion erkennen. Waren die Expressionsunterschiede zwischen hTRX und S5-DBD-PA zu hoch, wurde die Versuchsreihe von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen.

3.3.1 VALIDIERUNG DER STAT5 – S5-DBD-PA PROTEIN-INTERAKTION NACH ENDOGENER EXPRESSION

Um die in Hefezellen identifizierte Interaktion zwischen S5-DBD-PA und der Stat5-DBD in humanen Tumorzelllinien zu bestätigen, wurde eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) beider Proteine, nach Infektion von K562-CML Zellen mit SiEW-kodierenden Lentiviren, durchgeführt (siehe Abb. 3-26). Nach der Präzipitation endogen exprimierter S5-DBD-PA-Proteine aus K562-Gesamtzelllysaten mit einem Flag-Antikörper, konnte im Anschluß gebundenes Stat5-Protein im Western Blot detektiert werden, während die Präzipitation des hTRX-Kontrollkonstruktes ohne spezifische Peptidaptamer-Sequenz keine Interaktion mit Stat5 erkennen ließ.

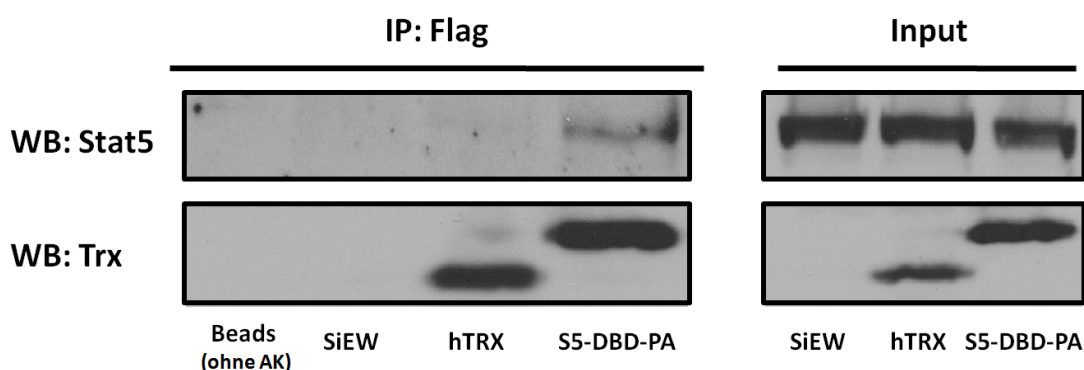


Abb. 3-26: Analyse der Interaktion zwischen S5-DBD-PA und Stat5 in K562-Zellen durch Co-IP

K562-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für SiEW-Leervektor, hTRX und S5-DBD-PA kodierten. 7 Tage nach der Infektion wurden Zelllysate angefertigt und für die Immunpräzipitation mit einem Flag-Tag Antikörper eingesetzt. Die Detektion von präzipitiertem S5-DBD-PA und gebundenem Stat5 erfolgte über einen Thioredoxin- und Stat5-Antikörper im Western Blot. Der Input repräsentiert ein Zehntel des für die Co-IP eingesetzten Volumens an Zelllysate. Um unspezifische Bindungen der Co-IP Beads auszuschließen, wurden diese ohne gekoppelten Antikörper mit S5-DBD-PA exprimierendem K562-Zelllysate inkubiert.

Für eine Visualisierung der intrazellulären Verteilung des endogen exprimiertem S5-DBD-PA Peptidaptamers, wurden SiEW-transduzierte K562-Zellen zusätzlich durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, nach Immunfluoreszenzfärbung, analysiert. Die Analyse ergab eine Korrelation zwischen eGFP- und S5-DBD-PA-Expression, entsprechend der gemeinsamen Expressionsregulation durch den SFFV-Promotor. S5-DBD-PA Protein ließ sich nahezu über die gesamte Zelle verteilt detektieren. Eine partielle Akkumulation des Peptidaptamer-Konstrukts innerhalb der Zelle war jedoch deutlich erkennbar (siehe Abb. 3-27A).

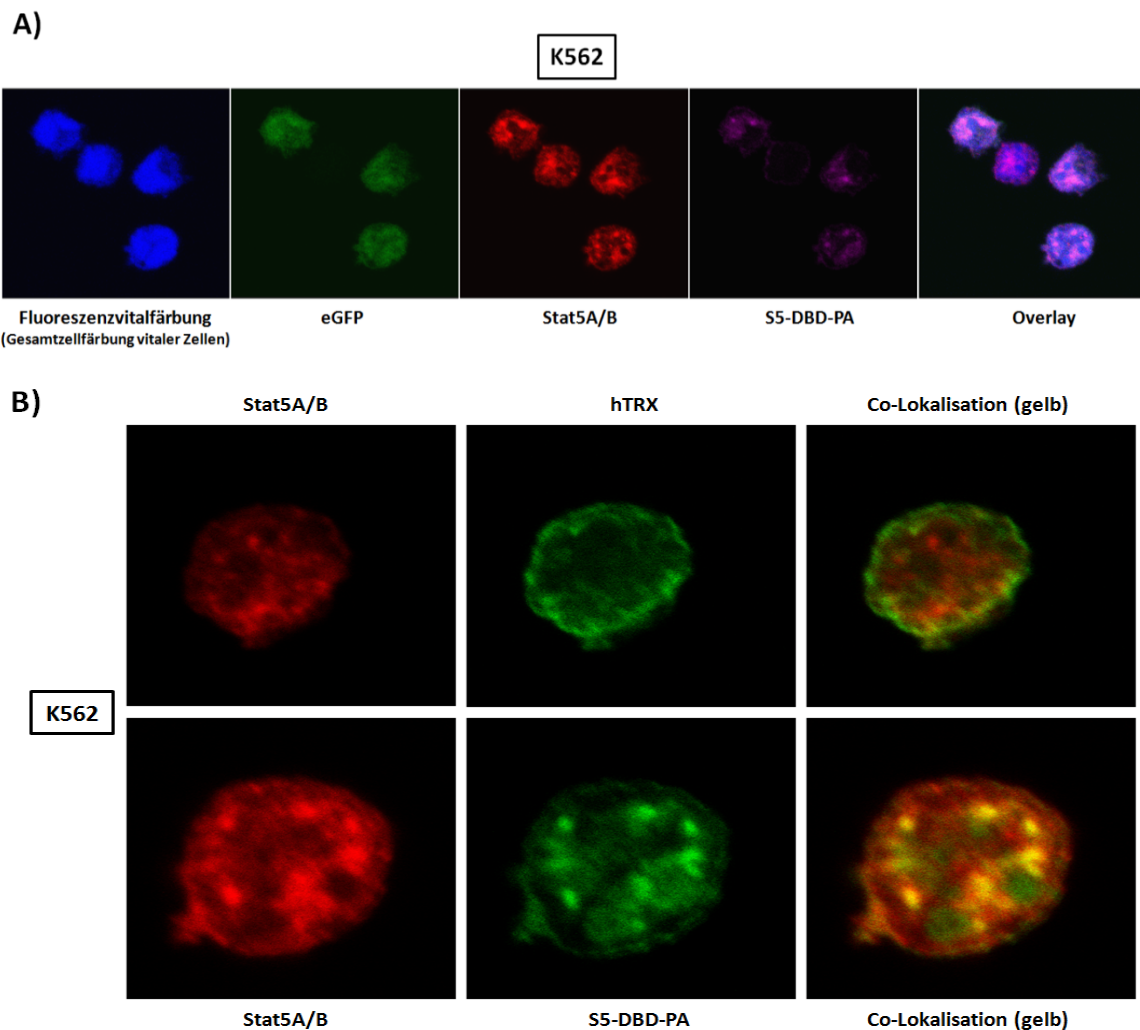


Abb. 3-27: Immunfluoreszenz-Analyse der S5-DBD-PA Peptidaptamer-Expression und Stat5 Co-Lokalisation in K562-Zellen nach lentiviralem Gen-Transfer

A) K562-Zellen wurden mit dem S5-DBD-PA kodierenden lentiviralen SiEW-Vektor transduziert und nach 7 Tagen durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Neben der Dokumentation der eGFP-Expression erfolgte eine Gesamtzellfärbung vitaler Zellen [eFluor®780 - Fixable Viability Dye] sowie eine S5-DBD-PA Proteinfärbung mit einem Flag- [α -mouse Alexa Fluor®546] und eine Stat5-Totalfärbung mit einem Stat5-Antikörper [α -rabbit Alexa Fluor®647]. **B)** Stat5 Co-Lokalisationsanalyse. Für eine Dokumentation der spezifischen Interaktion des S5-DBD-PA Peptidaptamers mit Stat5, wurden K562-Zellen parallel mit S5-DBD-PA und dem hTRX-Scaffold-Kontrollprotein kodierenden Lentiviren infiziert und nach 7 Tagen durch Immunfluoreszenzfärbung, mit den zuvor genannten Antikörpern, analysiert. Nach Überlagerung der Fluoreszenzen (Overlay) erscheint eine Co-Lokalisation beider Proteine in der Zelle gelb.

Hierbei sei zu erwähnen, dass sich undifferenzierte hämatopoetische bzw. leukämische Zellen durch einen geringen zytoplasmatischen Anteil auszeichnen, welcher sich durch Fluoreszenzmikroskopie vom Nukleus kaum abtrennbar erkennen lässt. Inwiefern die detektierten Areale angereicherten S5-DBD-PA Proteins das Zytoplasma oder den Zellkern betrafen, ließ sich daher nicht bestimmen. Bei genauerer Betrachtung einzelner Zellen war jedoch eine Korrelation zwischen S5-DBD-PA- und Stat5-Färbung erkennbar, was auf eine intrazelluläre Co-Lokalisation beider Proteine schließen ließ (siehe Abb. 3-27B). Im Vergleich dazu ließ die Expression des hTRX Scaffold-Kontrollproteins eine homogene und ubiquitäre Verteilung innerhalb der Zelle, mit einer Anreicherung an der Zellmembran, erkennen.

3.3.2 ANALYSE DES EINFLUSSES EINER ENDOGENEN S5-DBD-PA EXPRESSION AUF DIE TRANSKRIPTIONELLE AKTIVITÄT VON STAT5

Nach erfolgter Validierung der Protein-Interaktion, galt es im nächsten Schritt das inhibitorische Potential von S5-DBD-PA, in Bezug auf eine Inhibierung der Aktivität von Stat5 als Transkriptionsfaktor, zu analysieren. Aufgrund der spezifischen Interferenz des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstruktes mit der Stat5-DBD, konnte von einer kompetitiven Hemmung der Interaktion von Stat5 mit der DNA, in Folge einer Blockierung essentieller GAS-Element Bindungs- und Erkennungsstellen, ausgegangen werden (siehe Abb. 3-28A). Die Validierung der Stat5-DNA-Bindeaktivität nach lentiviralem Transfer des S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstruktes erfolgte mit dem Gelshift-Assay (EMSA, siehe Kap. 2.2.5.2.2). Für eine Induktion aktiv transkribierender Stat5-Dimere wurde die modifizierte B9-HeLa Zelllinie verwendet, welche sich aufgrund einer stabilen Stat5- und PrlR-Überexpression effizient für Stat5-Expressionsanalysen, nach Prl-Aktivierung (siehe Abb. 3.5), nutzen lässt. Nach Infektion der B9-HeLa Zellen mit dem lentiviralen SiEW-Transfervektor konnte eine stabile Expression des S5-DBD-PA Peptidaptamer- und hTRX Scaffold-Kontrollproteins, ohne eine erkennbare Beeinflussung zellulärer Viabilität, über mehrere Wochen erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Zehn Tage nach der Virustransduktion wurde Stat5 in den Zellen über Prl (100 ng/ml) induziert und die angefertigten Zelllysate für den Gelshift-Assay verwendet. Für die Stat5-DNA-Interaktionsstudie wurde ein Enhancer-Element des β -Casein-Promotors, welches sowohl von Stat5A- und Stat5B-Homodimeren als auch von Stat5A/B-Heterodimeren gebunden werden kann (Soldaini et al., 2000), als Oligonukleotid (siehe Kap. 2.1.7.5) eingesetzt. Im Vergleich zu den Kontrollen, ergab die Auswertung des Gelshift-Assays eine deutliche Reduktion des Komplexes aus aktivierten Stat5-Dimeren und Oligonukleotid-DNA in Gegenwart von S5-DBD-PA (siehe Abb. 3-28B).

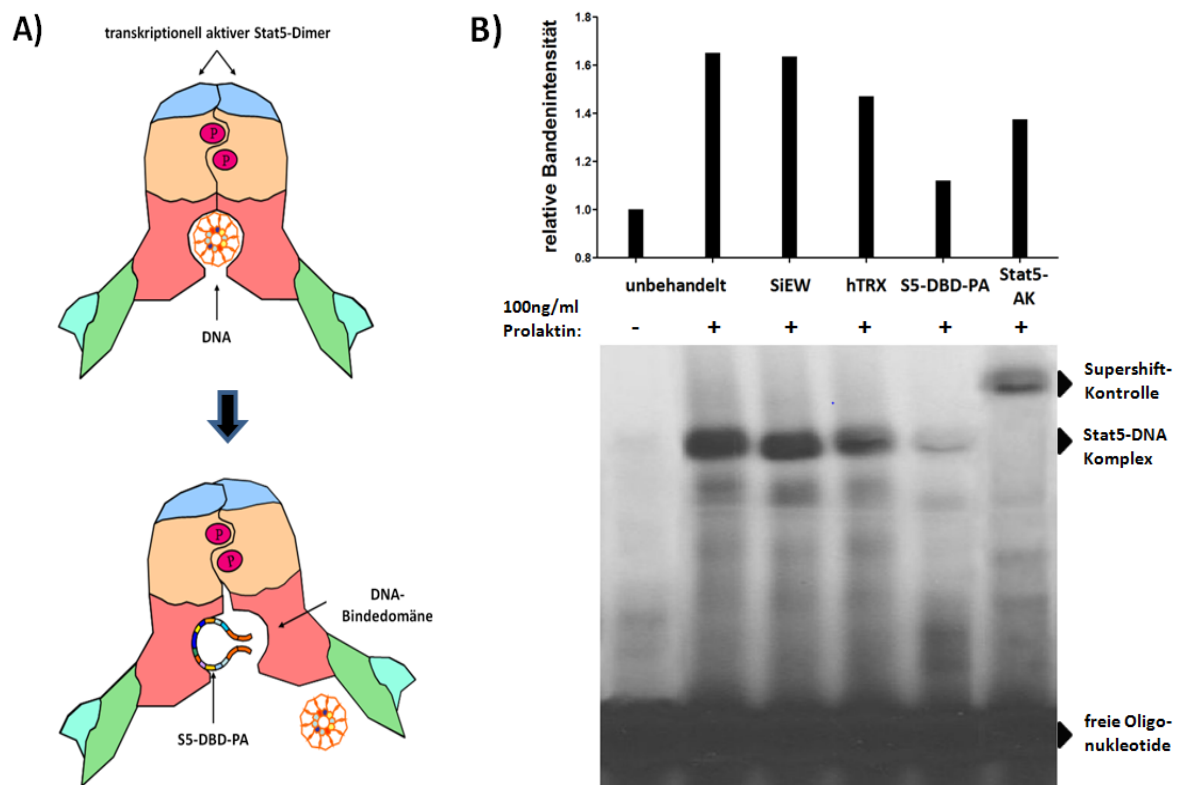


Abb. 3-28: Inhibition der Bindung von Stat5 an die DNA durch S5-DBD-PA

A) Schematische Darstellung der Stat5-inhibitorischen Wirkung von S5-DBD-PA. Über die spezifische Interaktion mit der Stat5-DBD wirkt das S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukt als ein kompetitiver Inhibitor der Stat5-DNA-Bindeaktivität. Über das Blockieren essentieller Oberflächenstrukturen verhindert S5-DBD-PA sowohl das Erkennen, als auch das Interagieren mit GAS-Enhancer-Elementen auf der DNA und in der Folge die transkriptionelle Aktivität von Stat5. **B)** Analyse der Stat5-inhibitorischen Wirkung von S5-DBD-PA im Gelshift-Assay (EMSA). B9-HeLa-Zellen wurden mit SiEW-Vektoren lentiviral transduziert (Leervektor, hTRX, S5-DBD-PA) und nach 10 Tagen mit Prl induziert. Nach 30 min wurde die Induktion gestoppt und die Zellen lysiert. Die mit P^{32} markierten Oligonukleotide repräsentierten ein Stat5-GAS-Enhancer-Element aus dem β -Casein Promotor und wurden bei RT für 30 min mit 3 μ g des Zell-Proteinextraktes inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die zusätzliche Inkubation mit einem Stat5-Antikörper („Supershift“) diente der Identifikation des Stat5-DNA-Komplexes. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit der Software ImageJ.

Um den daraus resultierenden Einfluss auf die Stat5-Zielgenexpression zu quantifizieren, wurden im Anschluss qRT-PCR Analysen transduzierter Zielzellen durchgeführt. Hierfür wurde erneut der Vergleich Bcr-Abl exprimierender K562- und Jak2(V617F) exprimierender HEL-Leukämiezellen herangezogen. Wie zuvor nach dem Transfer Stat5-gerichteter shRNA, ließ auch die lentivirale Transduktion des Stat5-interferierenden S5-DBD-PA Peptidaptamers gegenläufige Effekte im Vergleich beider Zelllinien erkennen, welche sich jedoch tendenziell mit den Resultaten des Stat5-Knockdown vergleichen ließen. Die S5-DBD-PA Expression resultierte in K562 Zellen in einer Inhibition der Expression antiapoptotischer und mitogener Gene, welche im Falle der CyclinD1-, Mcl-1- und Pim1,2-Gene signifikant gegenüber Leervektor oder hTRX-transduzierter

Zellen war (siehe Abb. 3-29). Das dieser Effekt auf die in das Thioredoxin-Scaffold integrierte, Stat5-spezifische 12mer Peptidaptamer-Sequenz zurückzuführen war, verdeutlichte die unbeeinflusste Expression der Zielgene nach Transduktion der hTRX-Scaffold-Kontrolle. Jedoch im Gegensatz zu der K562-Zelllinie waren in HEL-Zellen auf RNA-Ebene auch nach Expression des S5-DBD-PA Peptidaptamers keine Reduktionen der analysierten Zielgene, im Vergleich zu den Kontrollen, erkennbar. Die Expression von Mitgliedern der SOCS-Proteinfamilie sowie des T-Zell assoziierten FOXP3-Gens erwies sich, ebenfalls vergleichbar zu dem shRNA-Transfer, in beiden Zelllinien als unverändert nach der Virusinfektion. In HEL-Zellen löste die lentivirale Infektion erneut eine deutlich erkennbare Induktion der SOCS- und FOXP3-Genexpression aus. Inwiefern die Viabilität dieser beiden Leukämiezelllinien durch eine endogene S5-DBD-PA Expression beeinflusst wird, galt es nachfolgend zu analysieren.

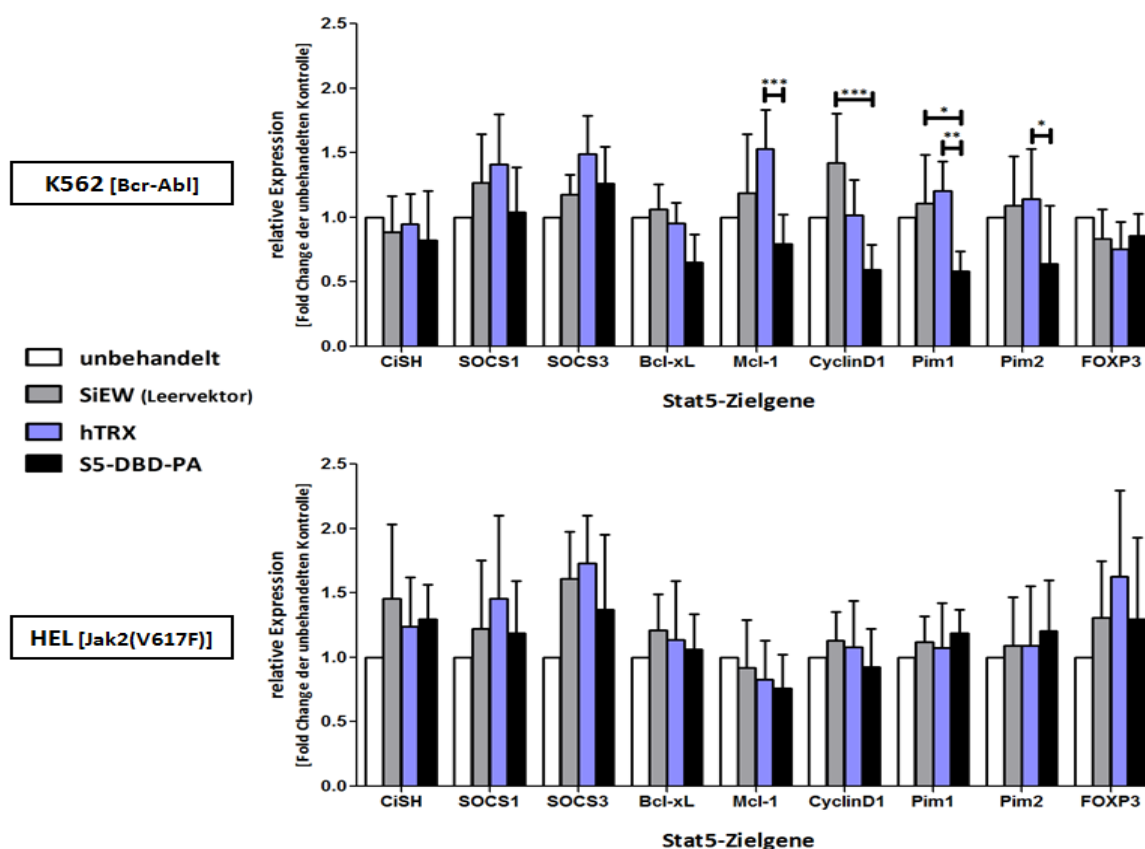


Abb. 3-29: Analyse der Stat5-Zielgenexpression nach endogener S5-DBD-PA Expression in Bcr-Abl positiven K562 und Jak2(V617F) positiven HEL-Zellen

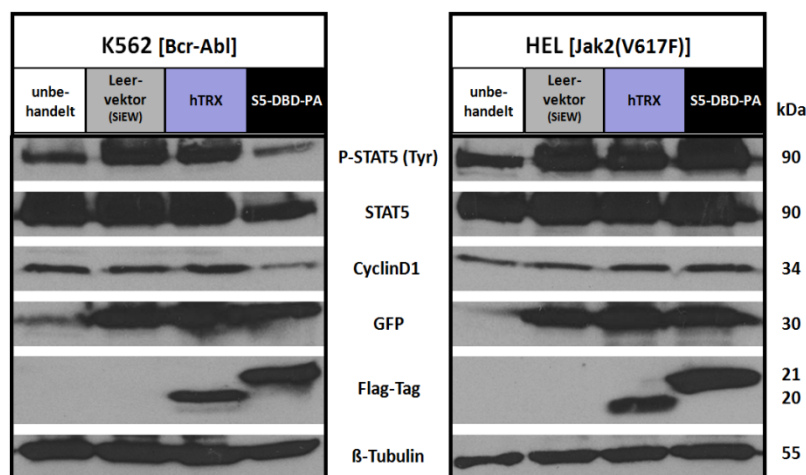
In 5 unabhängigen Versuchen wurde nach lentiviraler Transduktion die RNA von K562- und HEL-Zellen isoliert und nach reverser Transkription per qRT-PCR hinsichtlich der Expression verschiedener Stat5-Zielgene analysiert. Die für jedes einzelne Zielgen ermittelten ct-Werte wurden gegen das Referenzgen HPRT1 normalisiert und als relative Veränderung der Expression (Fold Change) gegenüber der unbehandelten Kontrolle angegeben. (n=5; MW±SEM). Angegeben sind signifikante Reduktionen der Stat5-Zielgenexpression in hTRX und S5-DBD-PA transduzierten Zellen gegenüber unbehandelter und SiEW und hTRX-transduzierter Zellen. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (2-way-ANOVA/Bonferroni post test)

3.3.3 ANALYSE DES EINFLUSSES EINER ENDOGENEN S5-DBD-PA EXPRESSION AUF DIE VIABILITÄT STAT5-ABHÄNGIGER TUMORZELLINIEN

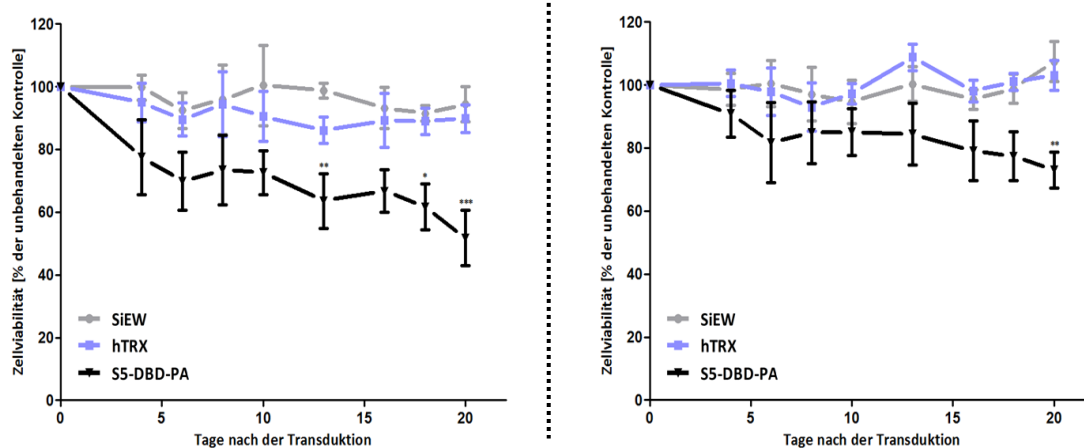
3.3.3.1 INHIBIERUNG DER VIABILITÄT VON K562- & HEL-ZELLEN DURCH S5-DBD-PA

Für eine Analyse antiproliferativer und Viabilitäts-inhibierender Effekte des S5-DBD-PA Peptidaptamers in K562- und HEL-Zellen, wurden erneut XTT-Messungen und Bestimmungen der kumulativen Zellzahl, nach lentiviraler Transduktion, herangezogen. Die parallel dazu durchgeführten Western-Blot Analysen ergaben in beiden Zelllinien eine leichte Induktion der Stat5-Tyrosinphosphorylierung nach Virusinfektion bzw. Integration des lentiviralen SiEW-Transfervektors (siehe Abb. 3-30A), als mögliche Folge einer Zytokin- bzw. IFN-vermittelten Tumorzellreaktion. Überraschend war dabei die Beobachtung, dass die Expression von S5-DBD-PA in K562-, jedoch nicht in HEL-Zellen, zu einer Inhibierung der Stat5-Aktivierung sowie zu einer leichten Reduktion der Stat5-Gesamtproteinmenge führte, welche auch in einer Inhibierung der CyclinD1-Expression resultierte.

A)



B)



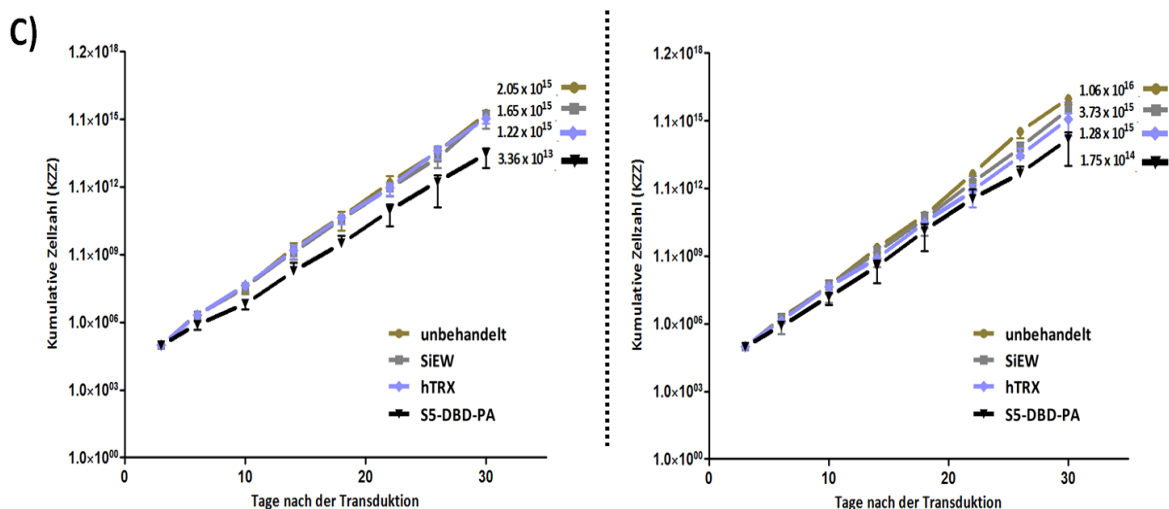


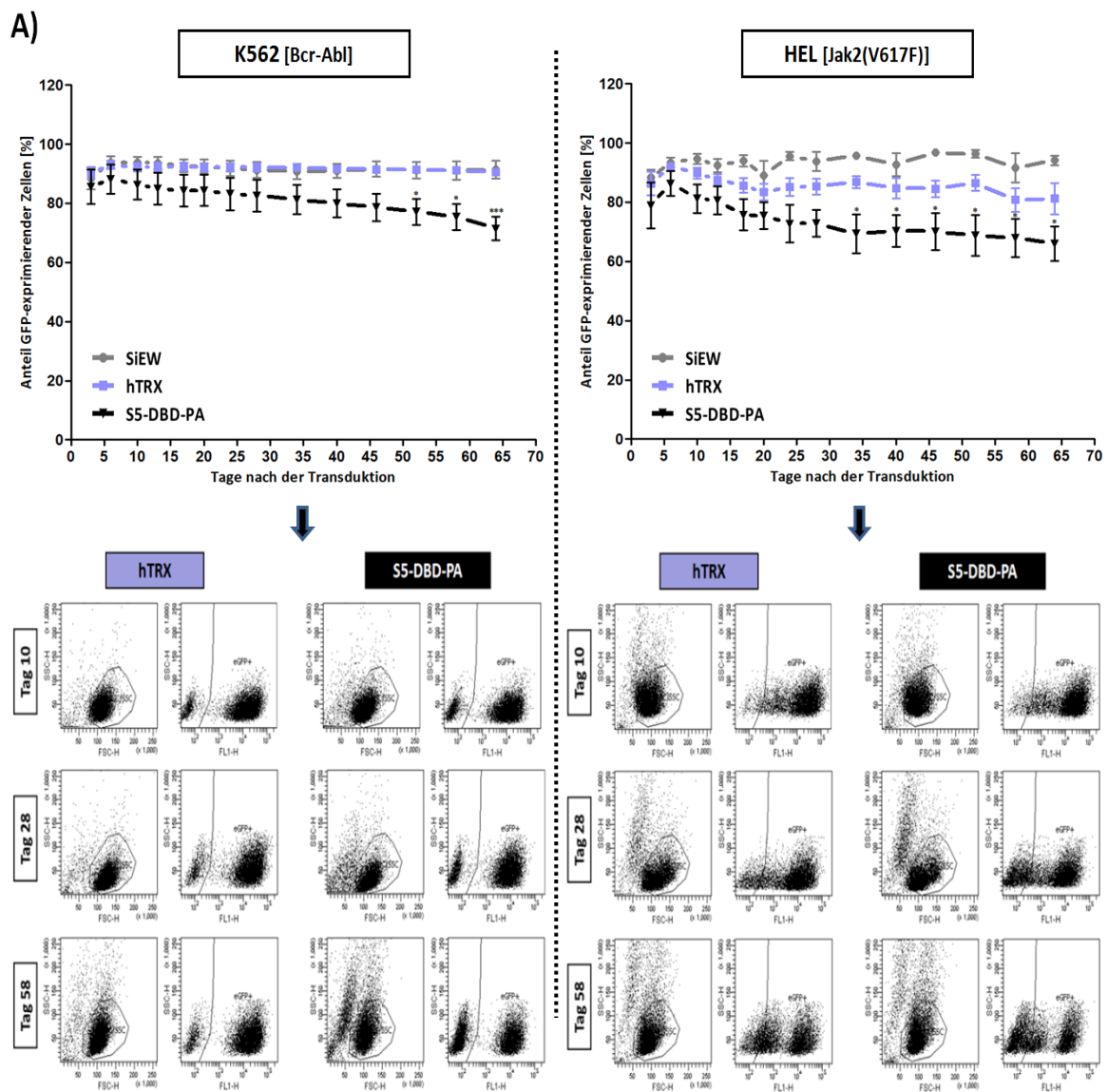
Abb. 3-30: Einfluss einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die Viabilität und das Wachstum von K562- und HEL-Zellen

K562- und HEL-Zellen wurden mit SiEW-Leervektor, -hTRX und S5-DBD-PA kodierenden, VSV-G pseudotypisierten Lentiviren transduziert (MOI=50). **A)** 7 Tage nach der Infektion wurden Zelllysate angefertigt und die Transgenexpression sowie Veränderungen der Stat5- und CyclinD1-Expression auf Proteinebene im Western Blot bestimmt. Über einen Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper wurde zudem die Stat5-Aktivierung dokumentiert. **B)** Veränderungen der Zellviabilität wurden mit dem XTT-Assay, über einen Zeitraum von 3 Wochen nach der Infektion, beobachtet. Die Zellen wurden hierfür 2 Tage nach der Transduktion in einer definierten Zellzahl ausgesät (2×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte) und die in einem Abstand von 2-3 Tagen gemessenen XTT-Werte transduzierter Zellen relativ zu den Werten unbehandelter Zellen dargestellt. Angegeben sind signifikante Veränderungen gegenüber der SiEW Leervektorkontrolle. (n=4; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (2-way-ANOVA/Bonferroni post test) **C)** Mit einer Passagierung und Zellzahlbestimmung im Abstand von 3-4 Tagen wurde die kumulative Zellzahl unbehandelter und mit Lentiviren infizierter (SiEW, hTRX, S5-DBD-PA) K562- und HEL-Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen ermittelt. Die Ergebnisse sind als Wachstumskurven, mit der nach Ablauf des Analysezeitraumes ermittelten Zellzahl, dargestellt. (n=3; MW±SD)

Die Analyse der Zellviabilität ließ in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion, nach S5-DBD-PA Expression, gegenüber Leervektor- und hTRX-Scaffold-Kontrollprotein exprimierenden Zellen erkennen, welche in K562-Zellen jedoch deutlich stärker ausfiel (siehe Abb. 3-30B). Nach Ablauf des Analysezeitraumes von drei Wochen waren die gemessenen XTT-Werte in K562-Zellen um bis zu 50 % und in HEL-Zellen um bis zu 30 % gegenüber unbehandelter Zellen reduziert, während sich die Zellen als unbeeinflusst von einer Expression des hTRX-Scaffold-Kontrollproteins erwiesen. Die Analyse des Wachstumsverhaltens ergab im Falle beider Zelllinien, trotz der zuvor ermittelten Unterschiede in Zellviabilität und Expression mitogener Stat5-Zielgene wie CyclinD1, einen antiproliferativen Effekt der S5-DBD-PA Expression im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Abb. 3-30C). Basierend auf der KZZ-Bestimmung, erwiesen sich HEL-Zellen dabei jedoch als sensibler gegenüber einer Leervektor- oder hTRX- Expression, wie der Vergleich mit der unbehandelten Zellpopulation ergab.

Die vor allem in der Bcr-Abl positiven K562 CML-Zelllinie beobachteten Zellzahl- und Vitalitäts-inhibierenden Effekte des S5-DBD-PA Peptidaptamers ließen weiterhin eine Apoptoseinduktion

nach viraler S5-DBD-PA Transduktion vermuten. Als ein ausschlaggebender und leicht zu analysierender Marker wurde hierfür zunächst die eGFP-Reporterexpression über einen längeren Zeitraum beobachtet und dokumentiert. In der Folge sind die Ergebnisse von sechs unabhängigen Versuchsreihen mit K562- und HEL-Zellen zusammengefasst. Die SiEW-Infektion beider Zelllinien mit einer MOI = 50 ergab im Schnitt Transduktionseffizienzen von 80-90% transduzierter Zellen innerhalb einer definierten Zellmenge. Im Gegensatz zu dem zuvor durchgeführten Stat5-Knockdown über shRNA-kodierende Lentiviren reduzierte sich die Anzahl eGFP-exprimierender Zellen des infizierten Zellpools hierbei nur geringfügig über den Analysezeitraum von ca. 9 Wochen (siehe Abb. 3-31A).



B)

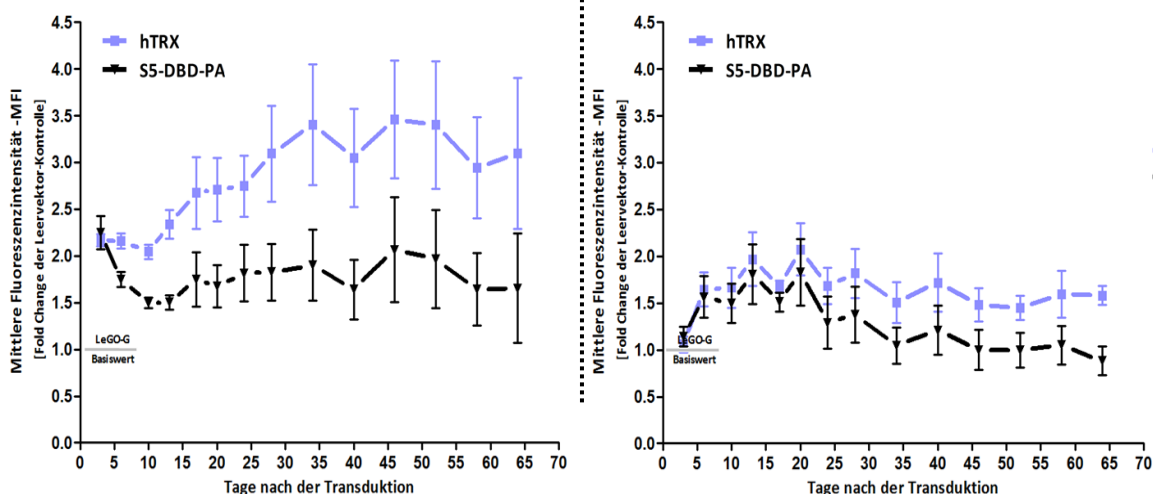


Abb. 3-31: Messung des Anteils GFP-exprimierender Zellen und der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität (MFI) nach Infektion der Zielzellen mit SiEW-Vektoren

A) K562- und HEL-Zellen wurden mit SiEW-Leervektor, -hTRX und S5-DBD-PA exprimierenden Lentiviren infiziert (MOI=50) und in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von ca. 9 Wochen hinsichtlich des Anteils GFP-positiver Zellen im FACS analysiert (n=6; MW±SD) *p<0,05, ***p<0,001 gegenüber SiEW-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test). Das SSC/FSC-Gating vitaler Zellen, mit dem jeweiligen Anteil GFP-exprimierender Zellen, ist für die Tage 10, 28 und 58 nach der Transduktion in exemplarischen FACS-Plots für die hTRX- und S5-DBD-PA-Transduktion dargestellt. **B)** Für eine Quantifizierung der GFP-Expression erfolgte eine parallele Messung von MFI-Werten. Die MFI-Werte hTRX- und S5-DBD-PA exprimierender Zellen sind als „Fold Change“ relativ zu den als Basis (=1) festgelegten MFI-Werten der SiEW-Leervektor-Kontrolle über die Zeit dargestellt. (n=6; MW±SD)

Nach Ablauf der Zeit wies der mit S5-DBD-PA kodierenden Lentiviren infizierte Zellpool, im Falle beider Zelllinien, noch einen durchschnittlichen Anteil von ca. 70% GFP-exprimierenden Zellen auf, was jedoch eine signifikante Reduktion gegenüber der Leervektor-Kontrolle, mit einem durchschnittlichen Anteil von $\geq 90\%$ GFP-exprimierender Zellen, darstellte. Auch in den FACS-Plots war diese Reduktion über die Zeit deutlich erkennbar, wobei nach FSC/SSC-Messung, vor allem im Falle der K562-Zelllinie, zusätzlich eine Zunahme von Zelltrümmern nach S5-DBD-PA Expression, als ein mögliches Indiz der Bildung apoptotischer Vesikel, erkennbar war. Im Falle hTRX-exprimierender K562-Zellen blieb der Anteil GFP-positiver Zellen, wie in der Leervektorkontrolle, nahezu unverändert bei ca. 90%. In HEL-Zellen führte die hTRX-Expression zu einer Reduktion GFP-exprimierender Zellen um ca. 10% gegenüber der Leervektorkontrolle, was sich auch im FACS-Plot, mit der Zunahme einer nicht- bzw. schwach GFP-exprimierenden Zellpopulation erkennen ließ. Nichtsdestotrotz konnte im Falle beider Zelllinien von einer stabilen S5-DBD-PA Expression in ca. 70% der Zellen auch nach 9 Wochen ausgegangen werden, da sowohl die Transgen- und GFP-Expression gemeinsam über den SFFV-Promotor reguliert wurde.

Da das Transgen und GFP im Falle des hier eingesetzten SiEW-Transfervektors durch eine mRNA kodiert wurden, erlaubte die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), als quantitativer Wert der durchschnittlichen Fluoreszenzreporter-Expression pro Zelle, auch einen Rückschluss auf die Intensität der hTRX- und S5-DBD-PA-Expression im infizierten Zellpool. In beiden Zelllinien lagen die MFI-Werte bei einer gekoppelten Transgen-Expression über denen der Leervektor-Kontrolle (siehe Abb. 3-31B). Ein Phänomen was zuvor bereits beobachtet wurde (Moreno-Carranza et al., 2009) und sich mit einer erhöhten GFP-Translation, in Folge einer verbesserten Exposition des IRES-Elementes auf dem mRNA-Strang, bei vorgeschalteter Transgen-Sequenz, erklären lässt. In K562-Zellen war dabei die Intensität der GFP-Expression in den ersten Tagen nach der Transduktion um das zweifache gegenüber der Leervektor-Kontrolle erhöht und stieg im Falle der Infektion mit hTRX-kodierenden SiEW-Vektoren um das drei- bis vierfache im Verlauf des Analysezeitraums von 9 Wochen an. Exprimierten die K562-Zellen S5-DBD-PA, war dieser Anstieg der GFP-Fluoreszenzintensität jedoch nicht feststellbar und die MFI-Werte waren konstant nur etwa um das eineinhalbfache gegenüber der Leervektorkontrolle erhöht, was auf einen Verlust stark GFP bzw. S5-DBD-PA exprimierender Zellen schließen ließ. In etwa ab dem 20. Tag nach der Transduktion wiesen HEL-Zellen vergleichbare Kurvenverläufe auf, wobei die Intensität der GFP-Expression generell geringer im Vergleich zu der K562-Zelllinie war. Dieses Ergebnis deutete, trotz phänotypischer Vergleichbarkeit, auf eine stärkere Aktivität des SFFV-Promotors in K562-Zellen hin. Jedoch ließ die Reduktion der GFP-Fluoreszenzintensität nach S5-DBD-PA Transduktion in beiden Zelllinien eindeutig erkennen, dass sich die nach Ablauf der 9 Wochen detektierten GFP-positiven Zellen durch eine schwächere GFP- bzw. Transgen-Expression, im Gegensatz zu hTRX-exprimierenden Zellen, auszeichneten. Dies deutete auf einen Apoptose-induzierenden Effekt von S5-DBD-PA, in Abhängigkeit von der Intensität der Expression nach Virustransduktion hin.

Diese Vermutung konnte nach Analyse der Apoptose-Induktion durch AnnexinV/7-AAD Doppelfärbung in K562-Zellen bestätigt werden. Obwohl auch die Expression des hTRX-Scaffoldproteins einen leichten Apoptose-induzierenden Effekt hervorruft, war die Anzahl früh- (7,48 %) und spätapoptotischer Zellen (4,41%), zehn Tage nach der S5-DBD-PA-Transduktion, deutlich gegenüber der hTRX-Kontrolle (2,3%, 1,76%) erhöht (siehe Abb. 3-32). In HEL-Zellen waren diese Unterschiede nicht erkennbar. Die zuvor gezeigten Analysen hinsichtlich der Veränderung von Proliferation, Viabilität und GFP-Expression lassen jedoch vermuten, dass eine Messung der Apoptose-Induktion in HEL-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt womöglich einen verstärkten Effekt von S5-DBD-PA hätte erkennen lassen.

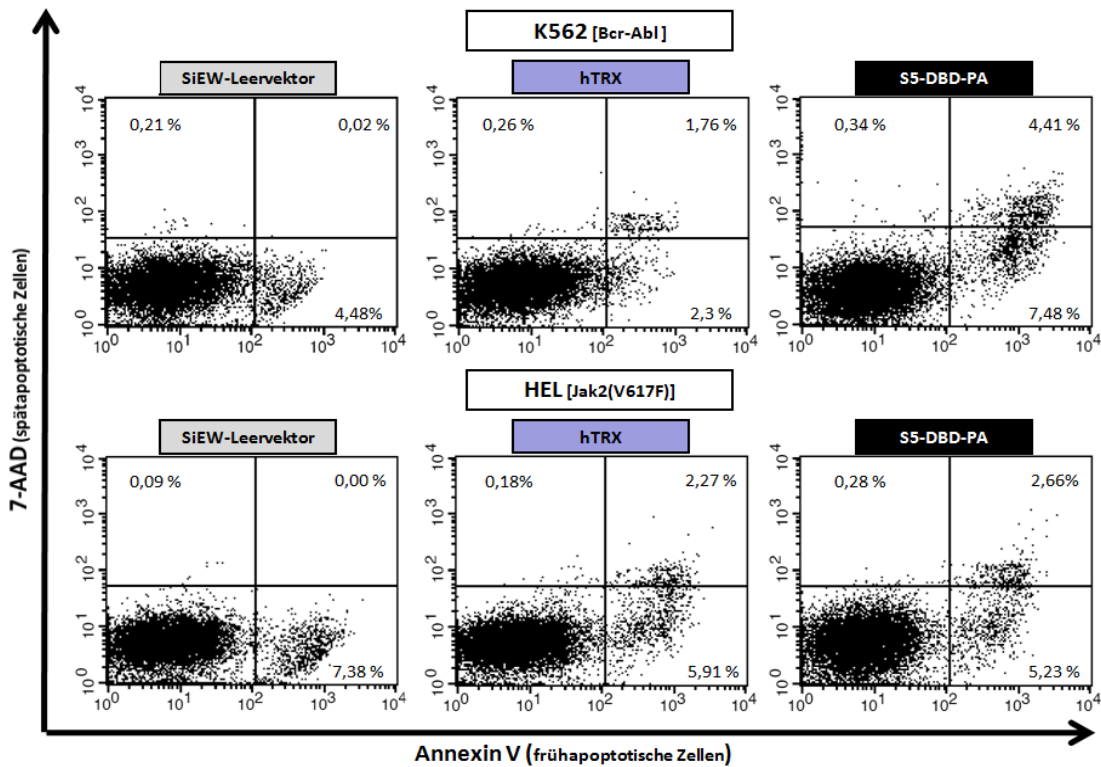
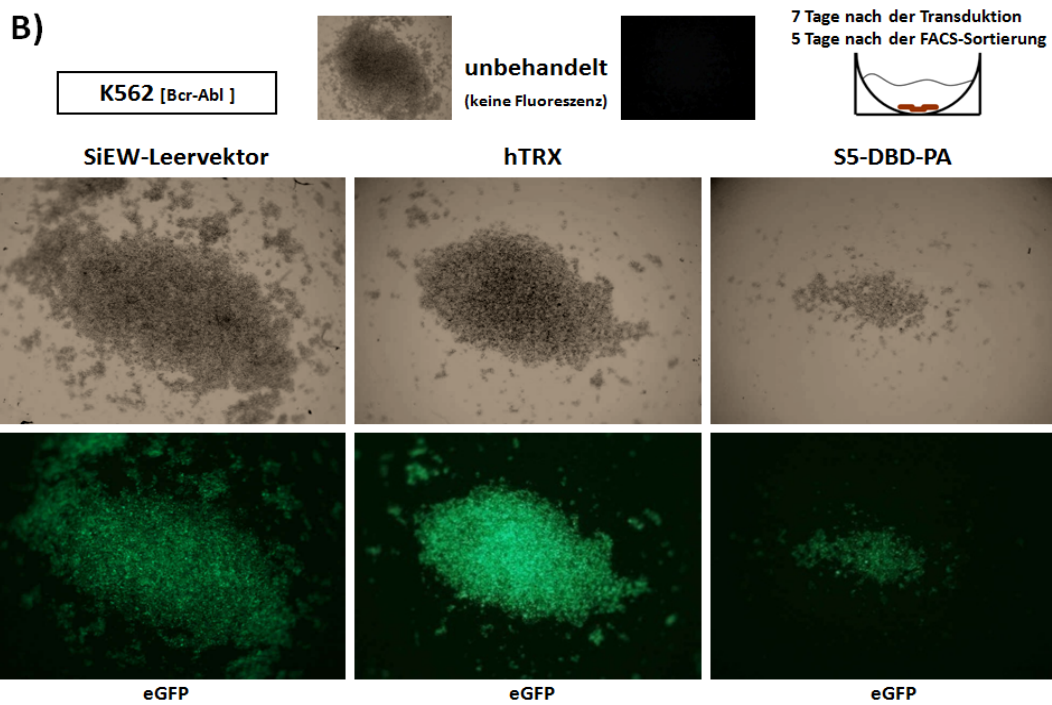
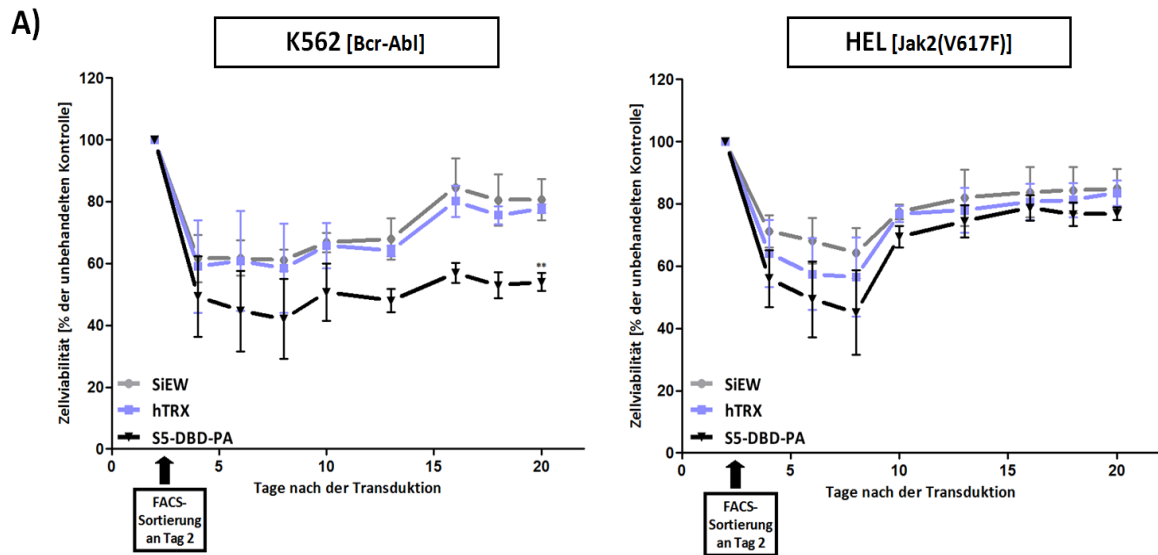


Abb. 3-32: Analyse der Apoptose-Induktion nach endogener S5-DBD-PA Expression in K562- und HEL-Zellen durch Annexin V/7-AAD Doppelfärbung

K562- und HEL-Zellen wurden mit Lentiviren transduziert welche für SiEW-Leervektor, -hTRX und -S5-DBD-PA kodierten. 10 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen mit Annexin V/7-AAD gefärbt und im FACS gemessen. Die Ergebnisse sind als Dot Plot-Diagramme dargestellt, welche nach Vorkalibrierung in 4 Quadranten aufgeteilt wurden. Unten-links: vitale Zellen (Annexin V/7-AAD-negativ), Unten-rechts: frühapoptotische Zellen (Annexin V-positiv, 7-AAD-negativ), Oben-links: nekrotische und spätapoptotische Zellen (Annexin V-negativ, 7-AAD-positiv), Oben-rechts: spätapoptotische Zellen (Annexin V/7-AAD-positiv)

Für die Analyse des Einflusses einer erhöhten S5-DBD-PA-Expression auf die Viabilität beider Zelllinien, wurden diese in separaten Versuchsreihen, zwei Tage nach der Virustransduktion, über FACS-Sortierung, hinsichtlich erhöhter GFP-Expression, selektioniert. Die anschließende XTT-Messung offenbarte in beiden Zelllinien generell einen stressinduzierenden und Vitalitätsbeeinflussenden Effekt des FACS-Sortierungsprozesses. Innerhalb von drei bis vier Tagen nach der Zellsortierung verringerten sich die gemessenen XTT-Werte um bis zu 50% gegenüber unbehandelter Zellen (siehe Abb. 3-33A). In etwa zwischen dem 7. und 10. Tag nach der Transduktion begannen die Zellen sich wieder zu erholen und die XTT-Messung hTRX- und Leervektor-transduzierter Zellen pegelte sich auf um ca. 20% gegenüber unbehandelter Zellen reduzierte Werte ein. Während diese einsetzende Erholung auch in S5-DBD-PA exprimierenden HEL-Zellen feststellbar war, resultierte die S5-DBD-PA Expression in GFP-selektionierten K562-Zellen in einem konstanten Verlust zellulärer Viabilität um ca. 50-60 % gegenüber unbehandelter Zellen. Das dieser verstärkte Verlust zellulärer Viabilität in Folge des FACS-Sortierungsprozesses

und anschließender S5-DBD-PA-Expression mit einer vermehrten Abnahme der Proliferation bzw. vermehrten Zunahme der Apoptose-Induktion in K562-Zellen einhergehend, verdeutlichte eine mikroskopische Dokumentation der Zellen 5 Tage nach der Zellsortierung bzw. 7 Tage nach der Virustransduktion (siehe Abb. 3-33B).



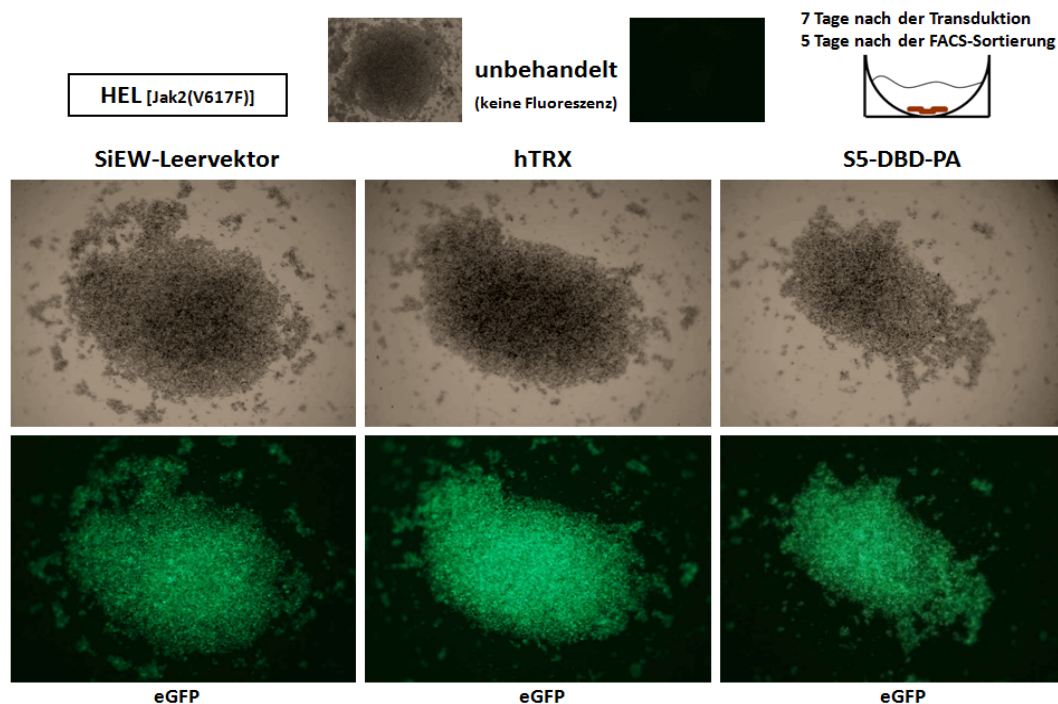


Abb. 3-33: Analyse des Einflusses einer endogenen S5-DBD-PA Expression nach FACS-Sortierung positiv transduzierter Zellen

K562- und HEL-Zellen wurden mit lentiviralen SiEW-Vektoren infiziert, welche für den Leervektor, hTRX oder S5-DBD-PA kodierte. 2 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen über eine erhöhte Expression des GFP-Reporter im FACS sortiert. **A)** Direkt nach der Sortierung wurden die transduzierten und sortierten Zellen, gemeinsam mit unbehandelten Zellen, in einer definierten Zellzahl in 96-Rundboden-Well Platten (2×10^3 Zellen / Well) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 Wochen hinsichtlich der Inhibition der Zellviabilität analysiert. ($n=3$; $MW \pm SD$) $**p < 0,01$ gegenüber SiEW-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test) **B)** 7 Tage nach der Virustransduktion bzw. 5 Tage nach der FACS-Sortierung wurde die am Boden des 96-Rundbodenwells abgesetzte Zellkolonie durch Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahmen mikroskopisch dokumentiert.

Um zu testen ob das S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukt synergistisch mit anderen Wirkstoffen eingesetzt werden kann, wurde in einem abschließenden Versuch der in K562-Zellen beobachtete antiproliferative und Apoptose-induzierende Effekt von S5-DBD-PA in Kombination mit einer Imatinib (Imatinib-Mesylate, Gleevec, STI571) Behandlung analysiert. Dieser niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitor wurde Ende der 90er Jahre zur Anwendung gegen Bcr-Abl identifiziert und entwickelt. Zusätzlich zu seiner hohen Effizienz zeichnet sich Imatinib durch seine vielseitige Anwendbarkeit aus und wird so als primärer Wirkstoff in der Behandlung Philadelphia-Chromosom bzw. Bcr-Abl positiver CML-Patienten oder z.B. im Falle von Tumoren (z.B. GIST) mit c-Kit oder PDGFR Mutation erfolgreich eingesetzt (Druker, 2002; Druker et al., 2006; Lopes & Bacchi, 2010). Die Bcr-Abl spezifische tumorsuppressive Wirkung von Imatinib war im Vergleich der K562- und HEL-Zelllinie deutlich erkennbar. Nach viraler Transduktion beider Zelllinien mit den SiEW-Vektoren wurden diese nach zwei Tagen mit Imatinib (500nM) inkubiert und hinsichtlich der Inhibition von Viabilität und Proliferation mit dem XTT-Assay analysiert.

Die Analyse der Stat5-Tyrosinphosphorylierung im Western Blot, fünf Tage nach Imatinib-Behandlung, zeigte eine deutliche Reduktion in K562-Zellen (siehe Abb. 3-34). In HEL-Zellen erwies sich die Stat5-Phosphorylierung und somit auch die Kinase-Aktivität der Jak2(V617F)-Mutante, wie zuvor bereits publiziert (Walz et al., 2006), von einer Imatinib-Behandlung unbeeinflusst. Zusätzlich konnte in K562-Zellen erneut eine leichte Reduktion der Stat5-Tyrosinphosphorylierung nach S5-DBD-PA Expression festgestellt werden, was in Kombination mit der Imatinib-Behandlung zu einem kompletten Verschwinden detektierbarer Mengen tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine führte.

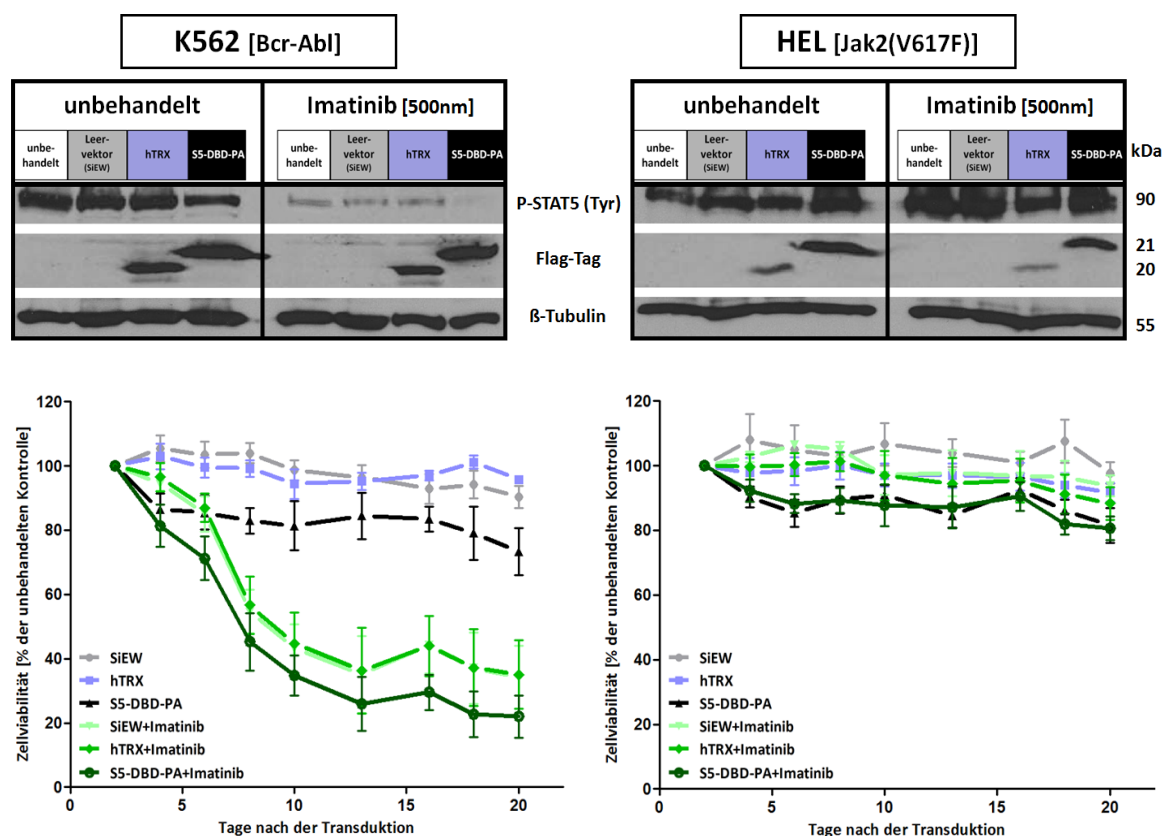


Abb. 3-34: Einfluss einer kombinatorischen S5-DBD-PA und Imatinib Behandlung auf die Viabilität Bcr-Abl exprimierender K562 und Jak2(V617F) exprimierender HEL-Zellen

Nach lentiviraler Transduktion (SiEW-Leervektor, -hTRX und -S5-DBDPA), wurden Bcr-Abl positive K562- und Bcr-Abl negative HEL-Zellen nach 2 Tagen mit und ohne der Zugabe von 500nM Imatinib kultiviert. Die Transgen-Expression sowie die Menge tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine wurde nach 7 Tagen (5 Tage nach Imatinib-Behandlung) im Western Blot bestimmt. Für die Analyse von Proliferation und Viabilität wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl, 2 Tage nach der Virustransduktion, mit/ohne Imatinib (500nm) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 Wochen mit dem XTT-Assay gemessen. (n=3; MW±SD)

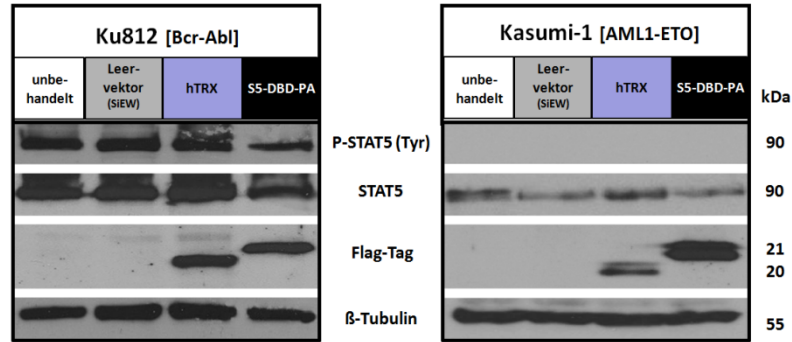
Als Folge der Reduktion der Stat5-Phosphorylierung, durch Bcr-Abl-Inhibierung, war eine drastische Abnahme der K562-Zellviabilität und -proliferation, vergleichbar mit den Effekten des Stat5-Knockdown (siehe Abb. 3-8), um bis zu 60-70% gegenüber unbehandelter Zellen erkennbar. Mit einer Inhibierung der Zellviabilität und -proliferation um ca. 80% gegenüber unbehandelter Zellen, führte die S5-DBD-PA Expression dennoch zu einer Steigerung der

Schadwirkung. Im Gegensatz dazu erwies sich die Viabilität von HEL-Zellen als völlig unbeeinflusst von einer Imatinib-Behandlung. Leichte S5-DBD-PA Effekte waren jedoch erneut erkennbar. Für einen zusätzlichen Vergleich der S5-DBD-PA Wirkung in Bcr-Abl positiven und negativen Leukämien wurde erneut die Ku812- und Kasumi-1 Zelllinie herangezogen.

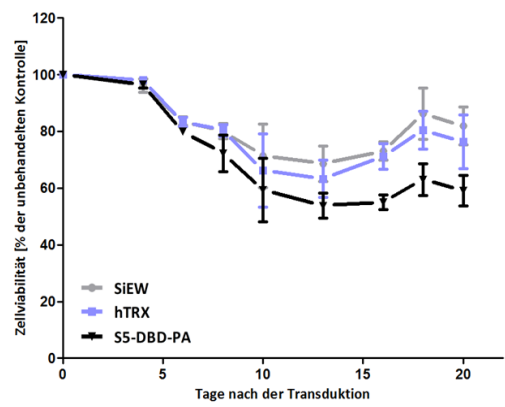
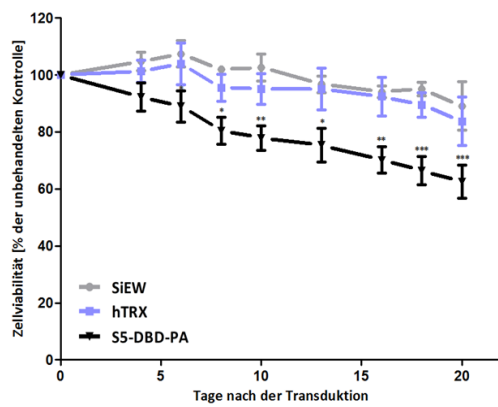
3.3.3.2 INHIBIERUNG DER VIABILITÄT VON KU812- & KASUMI-1-ZELLEN DURCH S5-DBD-PA

Wie zuvor in K562-Zellen, resultierte eine endogene S5-DBD-PA Expression auch in der Bcr-Abl positiven CML-Zelllinie Ku812 in einer leichten Reduktion der Stat5-Phosphorylierung und Proteinmenge, während dieser Effekt aufgrund einer geringen Stat5-Expression, ohne detektierbare Stat5-Aktivierung, in der AML1-ETO positiven Kasumi-1 AML-Zelllinie nicht beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3-35A). Damit einhergehend, führte die Expression von S5-DBD-PA zu einer konstanten und signifikanten Abnahme der Viabilität von Ku812-Zellen um ca. 40% gegenüber unbehandelter Zellen nach drei Wochen (siehe Abb. 3-35B). Die Vitalität und das Wachstumsverhalten von Kasumi-1 Zellen erwies sich als generell von der Virusinfektion beeinflusst. Zwei Wochen nach der Transduktion war die Viabilität SiEW-Leervektor, hTRX und S5-DBD-PA transduzierter Kasumi-1 Zellen um ca. 30-50 % gegenüber unbehandelter Zellen reduziert, ehe sich die Zellen im Anschluss erholten und dem Normalwert annäherten. Anhand der Kurvenverläufe ließ sich ein nur minimal zusätzlicher Effekt des Peptidaptamers erkennen. Dass die gemessenen Viabilitätswerte mit einer Veränderung der Proliferation einhergingen, zeigten die zusätzlich ermittelten kumulativen Zellzahlen. Nach Ablauf des Analysezeitraumes wiesen sowohl SiEW-Leervektor ($9,09 \times 10^{13}$) als auch hTRX ($4,72 \times 10^{13}$) und S5-DBD-PA ($7,89 \times 10^{12}$) exprimierende Kasumi-1 Zellen deutlich reduzierte Zellzahlen gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($3,28 \times 10^{15}$) auf (siehe Abb. 3-35C). Im Gegensatz dazu war die Zellzahl S5-DBD-PA exprimierender Ku812-Zellen wesentlich gegenüber den Kontrollen verringert, welche nahezu identische Wachstumskurven zeigten. Dabei schien ein antiproliferativer Effekt von S5-DBDPA vor allem in dem Zeitraum zwischen Tag 10 und Tag 20 nach der Transduktion entscheidend gewesen zu sein, da sich das Wachstum der Ku812-Zellen im Anschluss nahezu unverändert exponentiell fortsetzte. Dies deutete erneut auf ein sterben stark S5-DBD-PA exprimierender Zellen hin, was bei Betrachtung der Anzahl GFP-exprimierender Zellen und der Messung zugehöriger MFI-Werte unterstrichen wurde. In etwa ab dem 10. Tag nach Transduktion des S5-DBD-PA Peptidaptamers war ein konstanter und signifikanter Verlust GFP-exprimierender Ku812-Zellen zu erkennen, welcher jedoch nicht ab dem 20. Tag stoppte, sondern sich über den gesamten Analysezeitraum von 9 Wochen fortsetzte (siehe Abb. 3-35D).

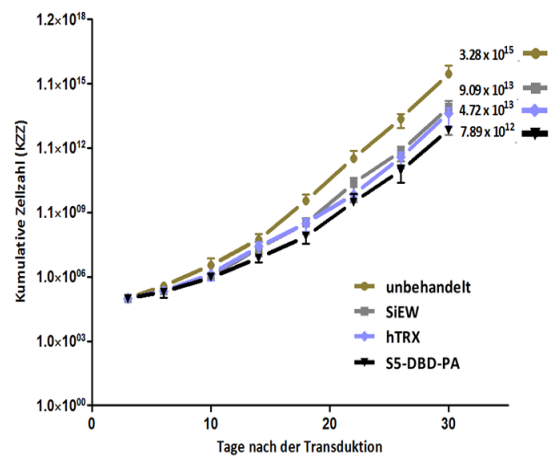
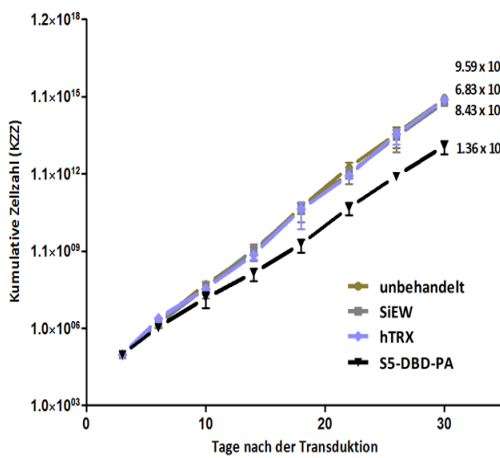
A)



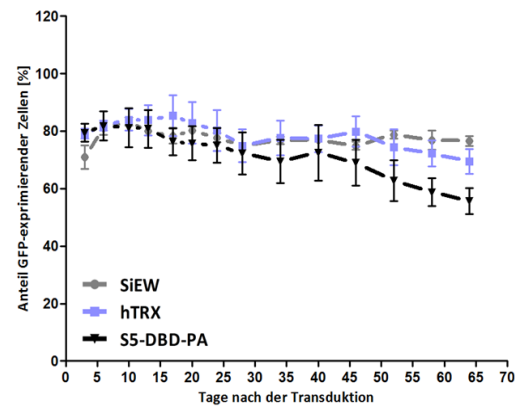
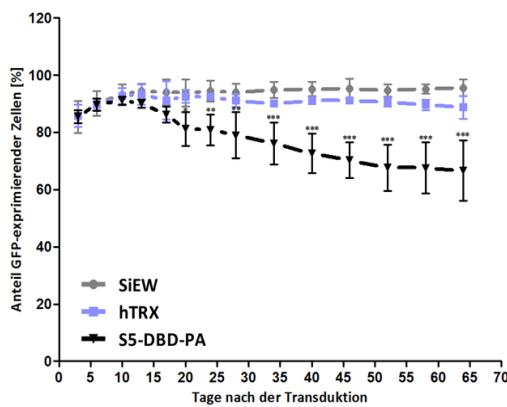
B)



C)



D)



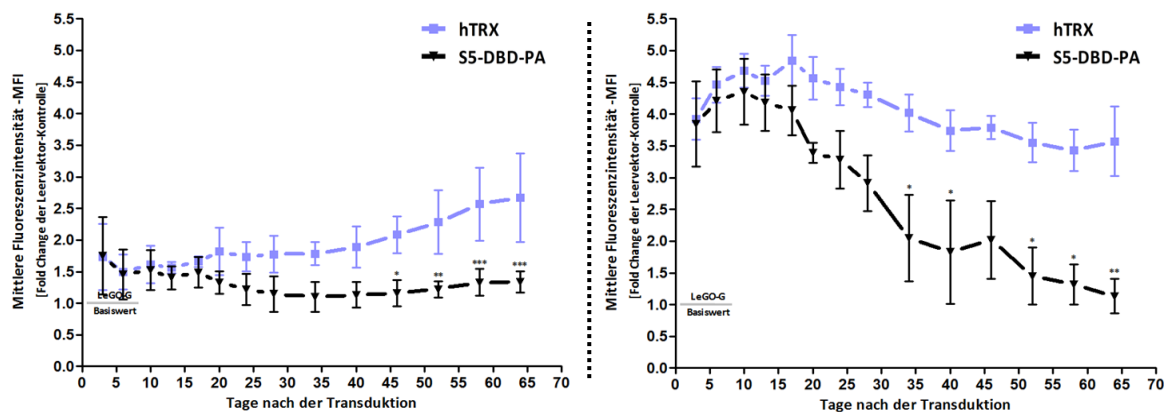


Abb. 3-35: Einfluss einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die Viabilität von Ku812- und Kasumi-1-Zellen

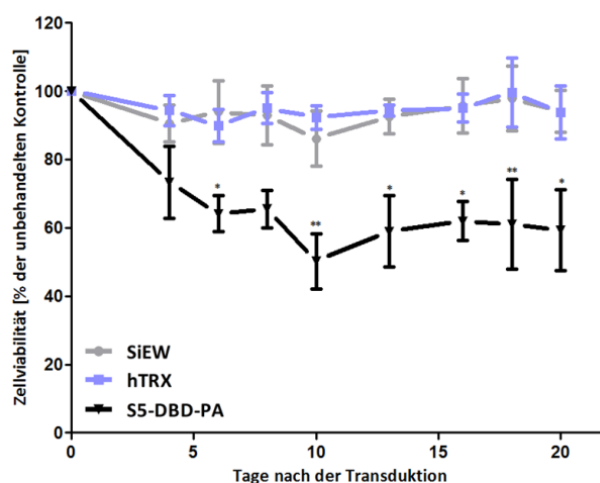
Bcr-Abl-positive Ku812 CML- und AML1-ETO-positive Kasumi-1 AML-Zellen wurden mit SiEW Leervektor-, hTRX- und S5-DBD-PA exprimierenden Lentiviren transduziert (MOI=50). **A)** 7 Tage nach der Transduktion wurden Zelllysate angefertigt und die Transgen- und Stat5-Expression im Western Blot überprüft. **B)** Veränderungen der Zellviabilität wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen mit Hilfe des XTT-Assay beobachtet. Die ermittelten XTT-Werte sind als prozentualer Anteil gegenüber der unbehandelten Kontrolle angegeben. (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 gegenüber SiEW-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test). **C)** Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der kumulativen Zellzahl über einen Zeitraum von 30 Tagen. Die Ergebnisse sind als Wachstumskurven, mit der nach Ablauf des Analysezeitraumes ermittelten Zellzahl, dargestellt. (n=3; MW±SD) **D)** Ebenfalls parallel dazu wurden der Anteil GFP-positiver Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (dargestellt als relative Veränderung der MFI-Werte gegenüber der SiEW-Leervektor Expression) des infizierten Zellpools über einen Zeitraum von ca. 9 Wochen im FACS gemessen. (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 gegenüber SiEW-Leervektorkontrolle und hTRX (2-way-ANOVA/Bonferroni post test)

Im Gegensatz zu der Kasumi-1 Zelllinie blieb der Anteil GFP-exprimierender Ku812 Zellen im Falle der transduzierten Kontrollen unverändert bei ca. 90%, wobei ein stetiger Anstieg der GFP-Fluoreszenzintensität hTRX- bzw. Transgen-exprimierender Zellen gegenüber der Leervektor-Kontrolle feststellbar war. Wie zuvor bereits erwähnt handelt es sich hierbei um ein häufig beobachtetes Phänomen einer über ein IRES-Element gekoppelten Transgen- und Fluoreszenzreporter-Expression. Dieser MFI-Anstieg war jedoch nicht im Falle der Transduktion von S5-DBD-PA in Ku812 Zellen feststellbar, was ebenfalls auf einen Verlust stark transduzierter bzw. verstärkt S5-DBD-PA exprimierender Zellen schließen ließ. In Kasumi-1-Zellen war die Intensität der GFP-Expression, im Falle einer gekoppelten hTRX und S5-DBD-PA Expression, bereits direkt nach der Transduktion um das vierfache gegenüber der Leervektor-Kontrolle erhöht. Überraschenderweise nahmen die MFI-Werte S5-DBD-PA exprimierender Zellen in etwa ab dem 25. Tag dramatisch ab, weshalb ein verzögerter Apoptose-induzierender Effekt des Peptidaptamers auch in dieser Zelllinie nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte. Inwiefern die Viabilität solider Tumorzelllinien von einer endogenen S5-DBD-PA Expression beeinflusst wird galt es in abschließenden Versuchsreihen zu untersuchen.

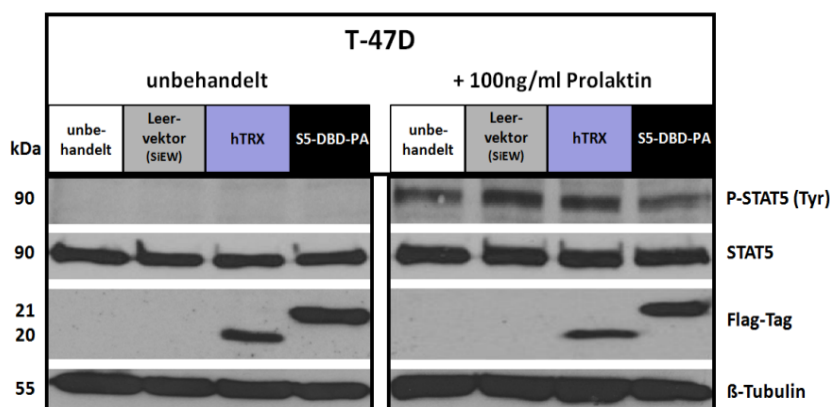
3.3.3.3 INHIBIERUNG DER VIABILITÄT SOLIDER TUMORZELLEN DURCH S5-DBD-PA

Für die Analyse antiproliferativer Effekte des S5-DBD-PA Peptidaptamers in soliden Tumorzellen wurden erneut die zuvor in den Stat5-Knockdown Experimenten eingesetzten A431 Melanom-, HCT116 kolorektalen Karzinom-, PC-3 Prostata- und T-47D Mammakarzinom-Zelllinien verwendet. Invasive T-47D Zellen weisen unter normalen Zellkulturbedingungen keine detektierbare Stat5-Aktivität auf. Hinsichtlich der Überlebensfähigkeit dieser Zellen offenbarte der Transfer Stat5-gerichteter shRNA jedoch eine Abhängigkeit gegenüber der Expression von Stat5 (siehe Abb. 3-16). Und trotz einer Unabhängigkeit des Wachstums dieser Zellen gegenüber einer Stat5-Tyrosinaktivierung und somit einer Unabhängigkeit gegenüber einer transkriptionellen Aktivität von Stat5, resultierte auch die endogene Expression des mit der DNA-Bindedomäne von Stat5 interferierenden S5-DBD-PA Peptidaptamers in einer signifikanten Inhibierung von Viabilität und Wachstum gegenüber nicht-infizierter Zellen (siehe Abb. 3-36A). Die Zellen zeigten sich jedoch unbeeinflusst von einer Expression der SiEW-Leervektor- und der unspezifischen hTRX-Scaffoldprotein-Kontrolle. Eine Beeinflussung der Stat5-Expression nach lentiviralem S5-DBD-PA Transfer konnte dabei nicht beobachtet werden (siehe Abb. 3-36B).

A)



B)



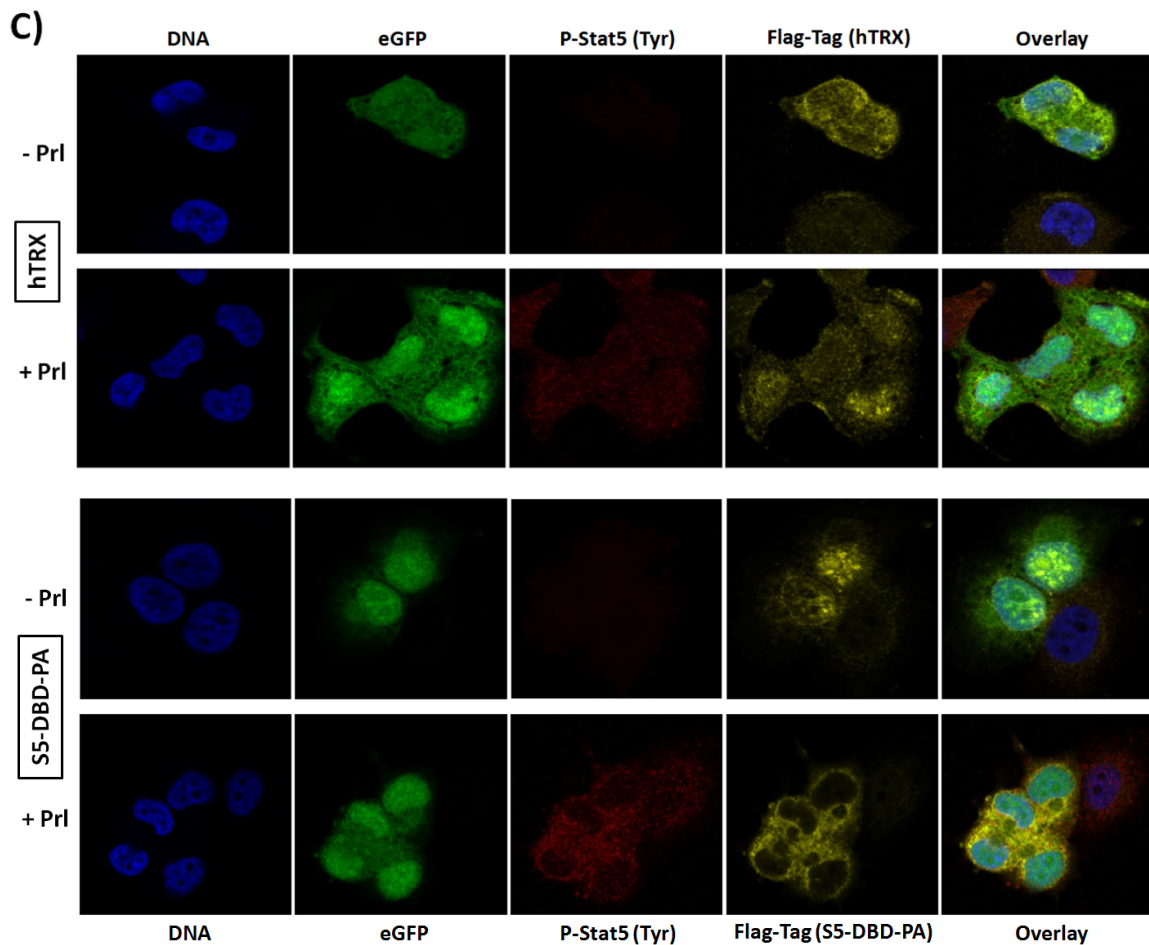


Abb. 3-36: Endogene Expression des S5-DBD-PA Peptidaptamers in T-47D Brustkrebszellen

T-47D Zellen wurden mit VSV-G pseudotypisierten, lentiviralen SiEW-Vektoren (Leervektor, -hTRX, -S5-DBD-PA) transduziert (MOI=20). **A)** Über einen Zeitraum von 3 Wochen nach der Infektion wurde eine Veränderung der Viabilität transduzierter T-47D Zellen durch regelmäßige XTT-Messung, gegenüber unbehandelter Zellen, analysiert. (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01 gegenüber SiEW-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test) **B)** 7 Tage nach der Infektion wurden Gesamtzellextrakte, mit und ohne eine vorherige, 30minütige Prolaktin-Induktion, hergestellt und im Western Blot hinsichtlich der Transgen- und Stat5-Expression sowie hinsichtlich einer Stat5-Aktivierung über einen Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper analysiert. **C)** Parallel dazu wurde ein Teil der Transgen-exprimierenden Zellen, mit und ohne Prolaktin-Induktion, für eine anschließende Immunfluoreszenzfärbung und Dokumentation durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie fixiert und permeabilisiert. Neben der DNA-Färbung mit DAPI erfolgte eine S5-DBD-PA/hTRX Proteinfärbung mit einem Flag- [α -mouse Alexa Fluor®546] und eine Färbung aktivierter Stat5-Dimere mit einem Alexa Fluor®647-gekoppeltem Phospho-Stat5-spezifischen Antikörper (P-Y694:Stat5A und P-Y699:Stat5B). Zusätzlich wurde die GFP-Reporterexpression detektiert.

Wie zuvor bereits gezeigt (siehe Abb. 3-5), lässt sich Stat5, aufgrund einer Überexpression des PrlR, innerhalb weniger Minuten nach Prl-Inkubation, über Jak2-vermittelte Tyrosinphosphorylierung, in T-47D-Zellen aktivieren. Da die den kritischen Tyrosinrest umgebenden SH2-Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomänen nicht von der Peptidaptamer-Interaktion betroffen sind, zeigte die Analyse transduzierter und Prolaktin-induzierter T-47D-Zellen im Western Blot eine erwartungsgemäß nahezu unbeeinflusste Stat5-Aktivierung nach S5-DBD-PA Expression (siehe Abb. 3-36B). Bei genauerer mikroskopischer Betrachtung, nach Prl-Induktion und Immunfluoreszenzfärbung mit einem Flag-Tag und Stat5-Phosphotyrosin-

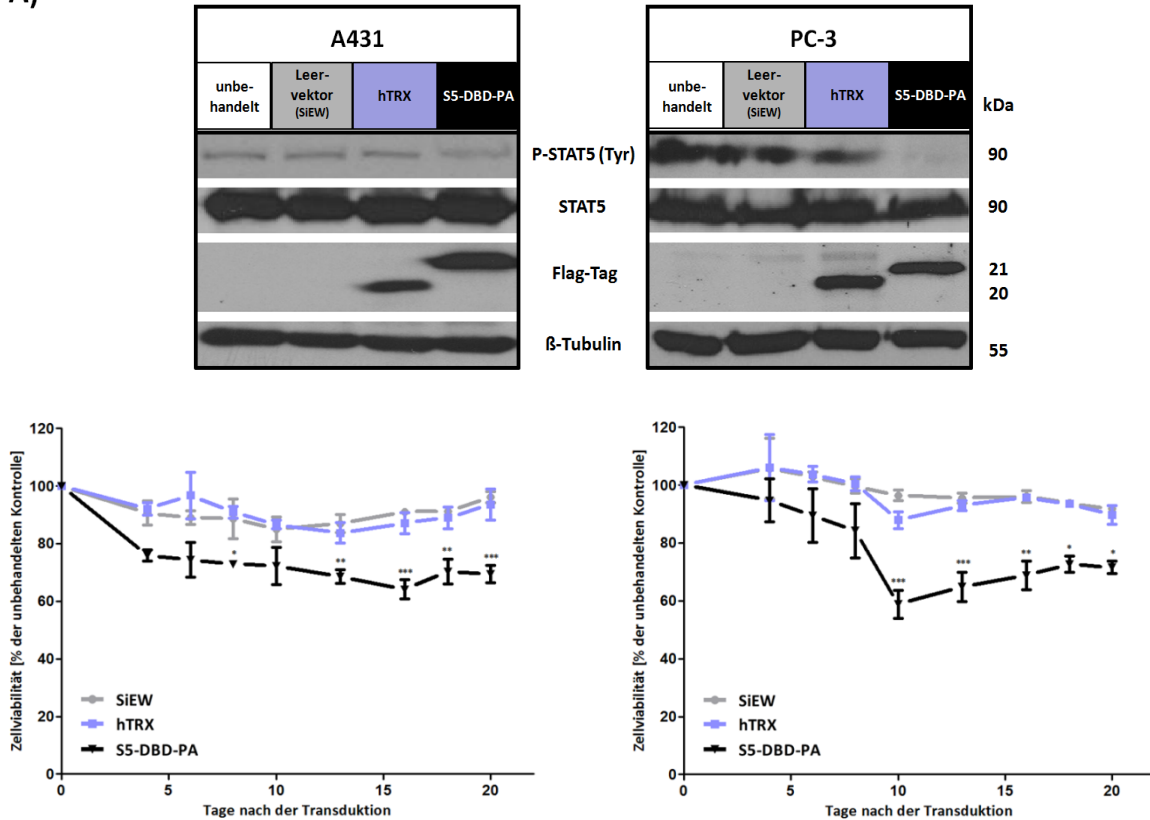
spezifischem Antikörper, offenbarte sich jedoch, hinsichtlich der zellulären Verteilung aktivierter Stat5-Proteine, ein markanter Unterschied zwischen S5-DBD-PA- und hTRX-exprimierenden Zellen (siehe Abb. 3-36C). Nach einer 30-minütigen Prl-Induktion konnte in T-47D-Zellen, welche das hTRX-Scaffold-Kontrollkonstrukt exprimierten, eine gleichmäßige, zytoplasmatische und nukleäre Verteilung aktivierter Stat5-Dimere festgestellt werden. Sowohl im induzierten als auch uninduzierten Zustand war das hTRX-Protein dabei ebenfalls größtenteils gleichmäßig in den einzelnen Subkompartimenten der Zelle verteilt detektierbar. S5-DBD-PA exprimierende T-47D Zellen wiesen nach 30-minütiger Prl-Behandlung jedoch eine vorrangige Lokalisation sowohl aktivierter Stat5-Dimere als auch des Peptidaptamers im Zytoplasma auf, was auf eine Inhibierung nukleärer Translokation schließen ließ. Im uninduzierten Zustand wiederum lag S5-DBD-PA vor allem im Nukleus akkumuliert vor.

Die wesentlich von einem Stat5-Knockdown beeinflussten A431- und PC-3-Zellen (siehe Abb. 3-15), ließen, wenn auch nicht so deutlich, ebenfalls einen signifikanten Wachstums- und Viabilitäts-inhibierenden Effekt durch endogen exprimiertes S5-DBD-PA, gegenüber uninfizierten Zellen, erkennen (siehe Abb. 3-37A). Nach dreiwöchiger XTT-Messung waren die Werte um ca. ein Drittel reduziert, während sich die Zellen nahezu unbeeinflusst von einer Leervektor- und hTRX-Transduktion zeigten. Auf Proteinebene konnten dabei keine Veränderungen der Stat5-, bzw. der Stat5A-Expression im Falle der PC-3 Zelllinie, nach S5-DBD-PA Transduktion, festgestellt werden. Jedoch ließen A431-Zellen eine leichte und PC-3 eine deutliche Reduktion der Stat5- bzw. Stat5A-Tyrosinphosphorylierung nach S5-DBD-PA Expression erkennen. Die hier analysierten Zelllysate wurden eine Woche nach der Virusinfektion gewonnen. Die XTT-Messung ergab eine rapide abnehmende Viabilität der PC-3 Zelllinie ab diesem Zeitpunkt, welche als eine mögliche Folge der detektierten Stat5-Inhibierung, zu diesem Zeitpunkt, betrachtet werden konnte, ehe sich die Zellpopulation in etwa ab dem 10. Tag, womöglich in Folge eines Herauswachsens nicht bzw. schwach S5-DBD-PA exprimierender Zellen, wieder leicht erholte. Die kolorektale Karzinomzelllinie HCT116 zeigte sich entsprechend einer nur geringen Stat5-Expression am wenigsten von einem Stat5-Knockdown beeinflusst (siehe Abb. 3-16). Dennoch führte eine Inhibierung der Stat5-Expression zu einer kurzzeitigen Abnahme der Proliferation bzw. Zellviabilität. Der virale Transfer des S5-DBD-PA Peptidaptamers ließ allerdings keinerlei Viabilitäts-inhibierenden Effekt erkennen (siehe Abb. 3-37B). HCT116-Zellen stellten somit die einzig getestete Zelllinie ohne erkennbaren Effekt des S5-DBD-PA Peptidaptamers dar. In den AML-Zelllinien HEL und Kasumi-1 wies sich eine S5-DBD-PA Expression innerhalb der ersten Wochen minimal auf die Überlebensfähigkeit der Zellen aus. Die durchgeführten GFP-Expressionsanalysen deuteten jedoch auf eine mögliche Beeinflussung nach anhaltender

Ergebnisse

Expression über einen längeren Zeitraum hin. Die deutlichsten Wachstums- und Viabilitäts-inhibierenden Effekte des Peptidaptamers waren in den Bcr-Abl exprimierenden K562 und Ku812 CML-Zelllinien sowie in den soliden Tumorzelllinien T-47D, PC-3 und A431 erkennbar.

A)



B)

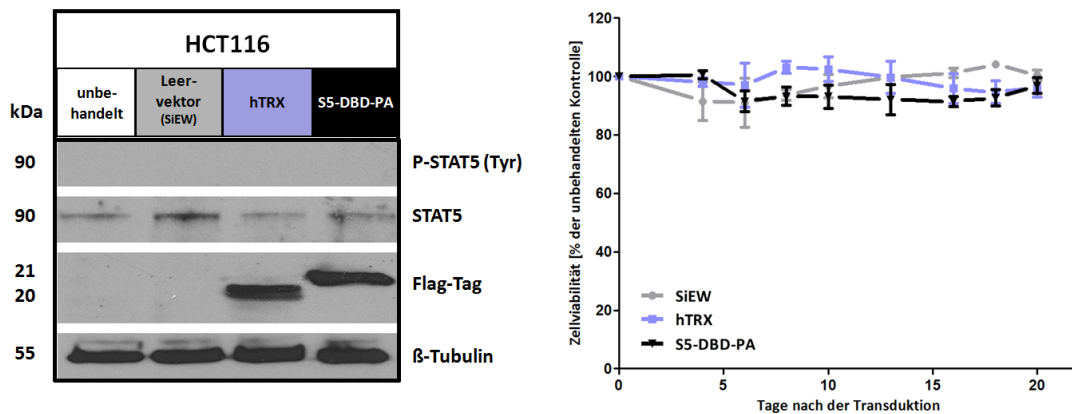


Abb. 3-37: Einfluss einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf die Viabilität von A431 Melanom-, PC-3 Prostatakarzinom und HCT116 kolorektalen Karzinomzellen

A) A431 und PC-3 Zellen wurden mit Leervektor, hTRX und S5-DBD-PA kodierenden SiEW-Vektoren transduziert und hinsichtlich einer Veränderung ihrer Viabilität mit unbehandelten Zellen, durch XTT-Messung, verglichen. 7 Tage nach der Transduktion erfolgte eine Dokumentation der Transgen- und Stat5-Expression im Western Blot. B) Selbige Experimente wurden mit HCT116-Zellen durchgeführt. (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 gegenüber SiEW-Leervektorkontrolle (2-way-ANOVA/Bonferroni post test)

In der Summe konnte S5-DBD-PA somit ein vielversprechendes therapeutisches Potential zugeschrieben werden. Die Bestätigung dieser Effekte durch Applikation des Peptidaptamer-Konstrukts als rekombinant hergestellter, zellpenetrierender Stat5-Inhibitor, stellte im nächsten Schritt eine Grundvoraussetzung für eine mögliche therapeutische Anwendung dar.

3.4 ANALYSE DER S5-DBD-PA EFFEKTE NACH PROTEINTRANSDUKTION

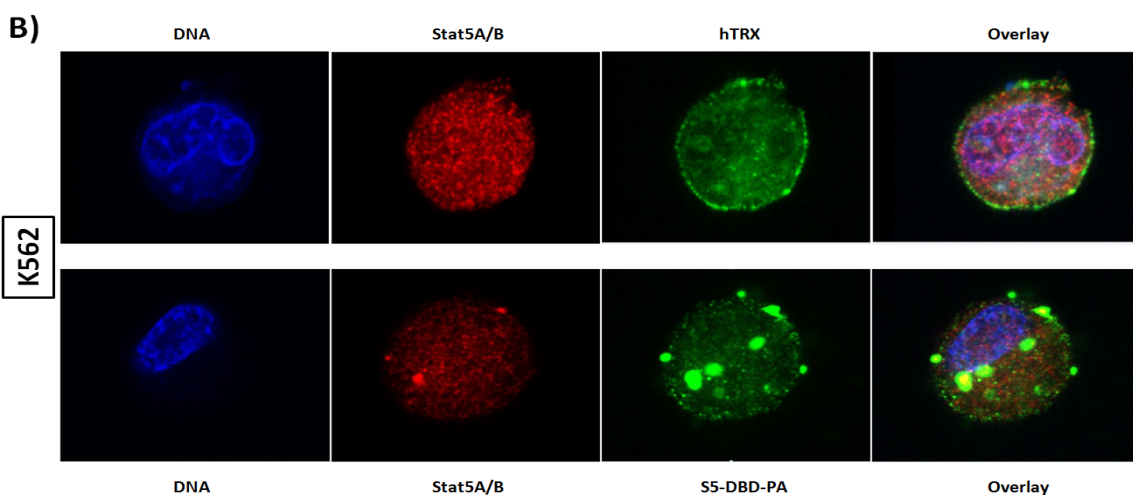
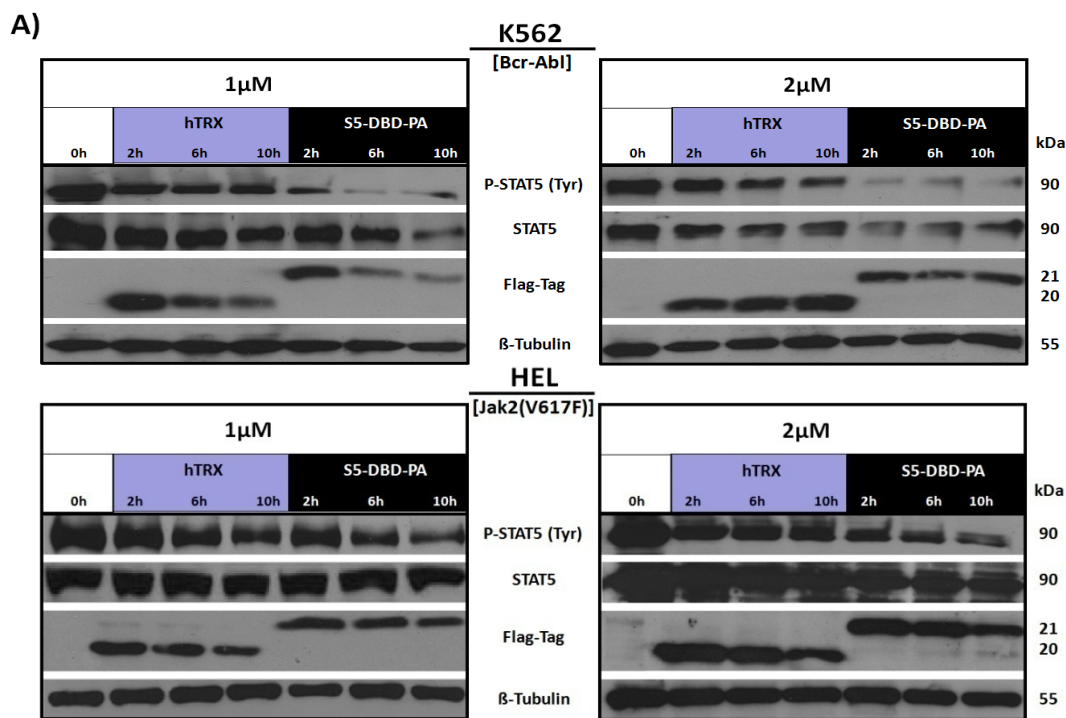
Wie unter Kap. 3.2.2 bereits gezeigt, ließ sich das über den pFLAG-2-Vektor klonierte S5-DBD-PA-Konstrukt, nach IPTG-Induktion in *E.coli*, in ausreichend großen Mengen rekombinant exprimieren und über den Histidin-Tag, durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie, in einem FPLC-System effizient aufreinigen. Die Verwendung des optimierten hTRX-Scaffoldproteins, ohne Cysteinreste, verhinderte zudem eine Aggregation während und nach der Dialyse und gewährleistete auch nachfolgend eine erhöhte Stabilität aktiver S5-DBD-PA-Monomere in Lösung. Als Grundvoraussetzung für eine Anwendung als applizierbarer Proteininhibitor galt es zunächst die zellpenetrierenden Eigenschaften des rekombinant hergestellten Peptidaptamer-Konstrukts zu untersuchen.

3.4.1 ANALYSE DER ZELLULÄREN AUFNAHME DES REKOMBINANT HERGESTELLTEN, ZELLPENETRIERENDEN S5-DBD-PA PEPTIDAPTAMERS

Für die S5-DBD-PA Proteintransduktion wurden neun aufeinanderfolgende Argininresten (9-R) als Proteintransduktionsdomäne (PTD) verwendet und mit dem Peptidaptamer-Konstrukt fusioniert (siehe Abb. 3-24A). Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die zellpenetrierende 9-R Peptidsequenz (CPP) eine effiziente zelluläre Aufnahme gekoppelter Proteine durch Rezeptor-unabhängige Makropinozytose ermöglicht (Suzuki et al., 2002; Wender et al., 2000). Für eine Analyse der zellulären Aufnahme des rekombinant hergestelltem S5-DBD-PA Peptidaptamer- und hTRX-Scaffold-Kontrollkonstruktes, welches wie zuvor bereits erwähnt eine unspezifische Peptidsequenz präsentierte, wurden K562- und HEL-Zellen zunächst, unter Addition beider Proteine zum Zellkulturmedium in einer Endkonzentration von 1 und 2 μM , über einen Zeitraum von 10 h inkubiert. Nach jeweils 2, 6 und 10 h wurden Lysate der in gleicher Anzahl ausgesäten Zelllinien angefertigt und im Western Blot untersucht. Hierbei sei zu erwähnen, dass vor jeder Anfertigung von Zell-Proteinextrakten nicht vollständig transduzierte

Ergebnisse

Proteine durch einen Waschschrift mit 0,2 M Essigsäure in PBS („Acid Wash“, siehe Kap. 2.2.4.2) von der Oberfläche der Zellmembran gewegewaschen wurden, um eine reine Analyse in die Zelle aufgenommener Proteine zu gewährleisten. Nach zweistündiger Inkubation waren sowohl in K562- als auch HEL-Zellen Proteinbanden beider Konstrukte und in beiden verwendeten Konzentrationen deutlich erkennbar, welche auch mit fortschreitender Inkubationsdauer in ihrer Intensität größtenteils unverändert blieben. Eine Ausnahme bildete hierbei die Inkubation von K562-Zellen mit den Konstrukten in der Konzentration 1 μ M. Hier war mit fortschreitender Dauer, vor allem im Falle des S5-DBD-PA Proteins, eine deutliche Abnahme der Bandenintensität erkennbar, was auf eine proteasomale Degradation schließen ließ (siehe Abb. 3-38A). Diese Reduktion wurde durch eine Inkubation der K562-Zellen mit der doppelten Proteinkonzentration aufgehoben, während HEL-Zellen nahezu unveränderte Level transduzierter Proteine aufwiesen.



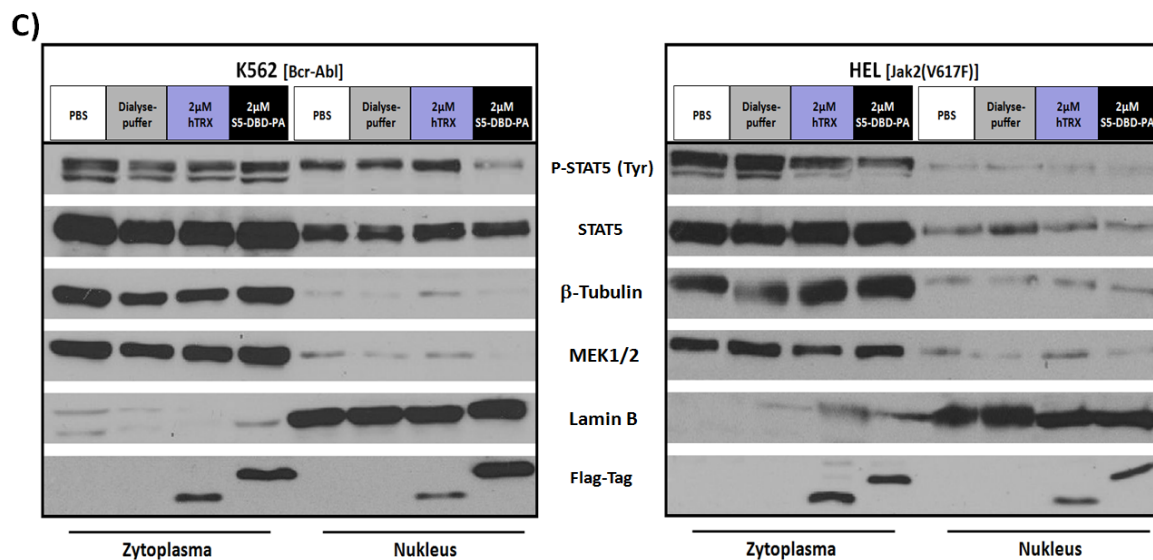


Abb. 3-38: Analyse der zellulären Aufnahme des rekombinant hergestellten, zellpenetrierenden Peptidaptamer-Konstrukts

A) Dokumentation der zellulären Aufnahme des zellpenetrierenden S5-DBD-PA Peptidaptamers und der hTRX-Scaffold-Kontrolle im Western Blot. Mit einer Endkonzentration von 1 und 2 μM wurden die rekombinanten Proteine zu dem Medium der in gleicher Zellzahl ausgesäten K562- und HEL-Zelllinie hinzugegeben. Nach 2, 6 und 10-stündiger Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden die Zellen einem Acid Wash unterzogen und lysiert. Unter Verwendung eines Flag-Tag-, Stat5- und Stat5-Phosphotyrosin-Antikörpers wurden die Proteinlysate im Anschluss hinsichtlich der Präsenz der rekombinanten Proteine sowie hinsichtlich der Stat5-Expression und Aktivierung im Western Blot analysiert. **B)** Analyse der zellulären Aufnahme des zellpenetrierenden S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts durch Immunfluoreszenz. K562-Zellen wurden für 4 h mit rekombinanten S5-DBD-PA und hTRX (jeweils 2 μM) inkubiert. Nach Durchführung eines Acid Wash wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und nach Immunfluoreszenzfärbung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop dokumentiert. Neben der DNA-Färbung mit DAPI erfolgte eine S5-DBD-PA/hTRX Proteinfärbung mit einem Flag- [α -mouse Alexa Fluor[®]546] und eine Stat5-Totalfärbung mit einem Stat5-Antikörper [α -rabbit Alexa Fluor[®]647]. **C)** Zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation der zellpenetrierenden Proteine in K562- und HEL-Zellen. Rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes hTRX und S5-DBD-PA wurden mit einer Endkonzentration von 2 μM zu dem Kulturmedium beider Zelllinien hinzugegeben. Nach 5h Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden die Zellen einem Acid Wash unterzogen und fraktionierte, zytoplasmische und nukleäre Zellextrakte gewonnen. Im Anschluss wurden die Extrakte im Western Blot hinsichtlich der Präsenz der rekombinanten Konstrukte und der Stat5-Expression analysiert. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung der Reinheit der Extrakte wurden Antikörper gegen die zytoplasmischen Marker MEK1/2 und β -Tubulin sowie gegen den nukleären Marker Lamin B eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit PBS und Dialysepuffer dienten als Negativkontrollen.

Bei Betrachtung der Stat5-Gesamtproteinmenge und der Menge tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine konnten mit fortschreitender Inkubationsdauer ebenfalls wesentliche Unterschiede zwischen beiden Zelllinien festgestellt werden. In K562-Zellen führte die S5-DBD-PA Inkubation zu einer deutlichen Reduktion der Menge aktivierter Stat5-Proteine, welche im Falle der 1 μM Inkubation mit der Abnahme des S5-DBD-PA Proteins korrelierte. Die Stat5-Gesamtproteinmenge schien dabei ebenfalls, im Falle einer 1 μM Inkubation nach 10 h und im Falle einer 2 μM Inkubation über nahezu die gesamte Dauer, leicht reduziert. Im Gegensatz dazu wiesen HEL-Zellen nur leichte Reduktionen tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteins nach 10-stündiger Inkubation auf. Für eine zusätzliche Dokumentation der hTRX- und S5-DBD-PA-

Ergebnisse

Proteintransduktion wurden die Konstrukte nach 4-stündiger Inkubation in K562-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung visualisiert und mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ausgewertet. S5-DBD-PA und hTRX ließen sich hierbei, wie auch Stat5, über die gesamte Zelle verteilt detektieren, wobei sich zytoplasmatische und nukleäre Bereiche dieser CML-Zelllinie erneut nicht klar unterscheiden ließen (siehe Abb. 3-38B). Im Gegensatz zu dem hTRX-Kontrollkonstrukt trat S5-DBD-PA dabei zum Teil akkumuliert auf, wobei diese Areale mit akkumulierten Stat5-Proteinen korrelierten und auf eine Co-Lokalisation hindeuteten. hTRX war teilweise verstärkt an der Zellmembran detektierbar, was zwar auf ein unzureichendes Entfernen nicht vollständig transduzierter Proteine durch den Acid Wash hindeutet, jedoch auch nach viralem hTRX-Transfer in K562-Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3-27).

Um die intrazelluläre Verteilung nach Proteintransduktion und die nukleäre Translokation der mit einer NLS-Domäne fusionierten Protein-Konstrukte genauer zu untersuchen, wurden fraktionierte Lysate von Bcr-Abl exprimierenden K562- und Jak2(V617F) exprimierenden HEL-Zellen nach 5-stündiger Inkubation mit den rekombinanten Proteinen (Endkonzentration: 2µM) sowie mit PBS und Dialysepuffer, als zusätzliche Kontrolle, angefertigt. Der Dialysepuffer, welcher nach Abschluss der Proteinaufreinigung aliquotiert und bis zur experimentellen Verwendung steril gelagert wurde, stellte dabei die S5-DBD-PA und hTRX Protein-Lösungsmittelkontrolle dar. S5-DBD-PA und hTRX ließen sich sowohl in den zytoplasmatischen als auch nukleären Proteinextrakten nachweisen, wobei die Menge nukleären hTRX-Proteins leicht reduziert war (siehe Abb. 3-38C). In K562-Zellen konnte erneut eine Reduktion der Stat5-Phosphotyrosin-Level nach S5-DBD-PA Inkubation festgestellt werden, welche sich überraschend jedoch nur auf die nukleäre Fraktion beschränkte. Dieses Ergebnis ließ ebenfalls eine Inhibierung der nukleären Translokation aktivierter Stat5-Dimere durch S5-DBD-PA Interaktion vermuten. Ebenfalls auffällig war die Beobachtung, dass sich die Präsenz aktivierter Stat5-Dimere in HEL-Zellen generell nahezu ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkte, was die basierend auf zuvor durchgeführten Stat5-Zielgenanalysen aufgestellte Theorie einer reduzierten transkriptionellen Aktivität von Stat5 in HEL-Zellen bekräftigte.

Die durchgeführten Experimente unterstrichen die zellpenetrierenden Eigenschaften der rekombinant hergestellten Protein-Konstrukte und bestätigten die zuvor, nach viralem Transfer beobachteten Effekte einer Stat5-Phosphotyrosin Inhibierung in K562-Zellen durch S5-DBD-PA. Im nächsten Schritt galt es die Stat5-Protein-Interaktion und die Inhibierung der Stat5-DNA-Bindeaktivität durch rekombinantes S5-DBD-PA zu bestätigen.

3.4.2 ANALYSE DER INTERAKTION MIT STAT5 UND INHIBIERUNG DER STAT5 DNA-BINDEAKTIVITÄT DURCH REKOMBINANT HERGESTELLTES S5-DBD-PA

Die Validierung der Protein-Interaktion zwischen Stat5 und rekombinanten S5-DBD-PA erfolgte in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen über Co-Immunopräzipitation (Co-IP). In einem ersten Experiment wurden die rekombinant hergestellten Proteine (1 μ M), sowie die Protein-Lösungsmittelkontrolle, mit ebenfalls rekombinanten humanen Stat5A-Protein (300nM, Abcam) in Co-IP Assaypuffer gemischt und für 2h bei RT *in vitro* inkubiert. Im Anschluss daran ließ sich Stat5A über einen Flag-Tag Antikörper mit S5-DBD-PA co-präzipitieren, wie eine deutliche Stat5-Bande im Western Blot ergab (siehe Abb. 3-39A). Die Präzipitation der hTRX-Scaffoldkontrolle ließ dabei eine geringe Menge unspezifisch gebundenen Stat5A-Proteins erkennen.

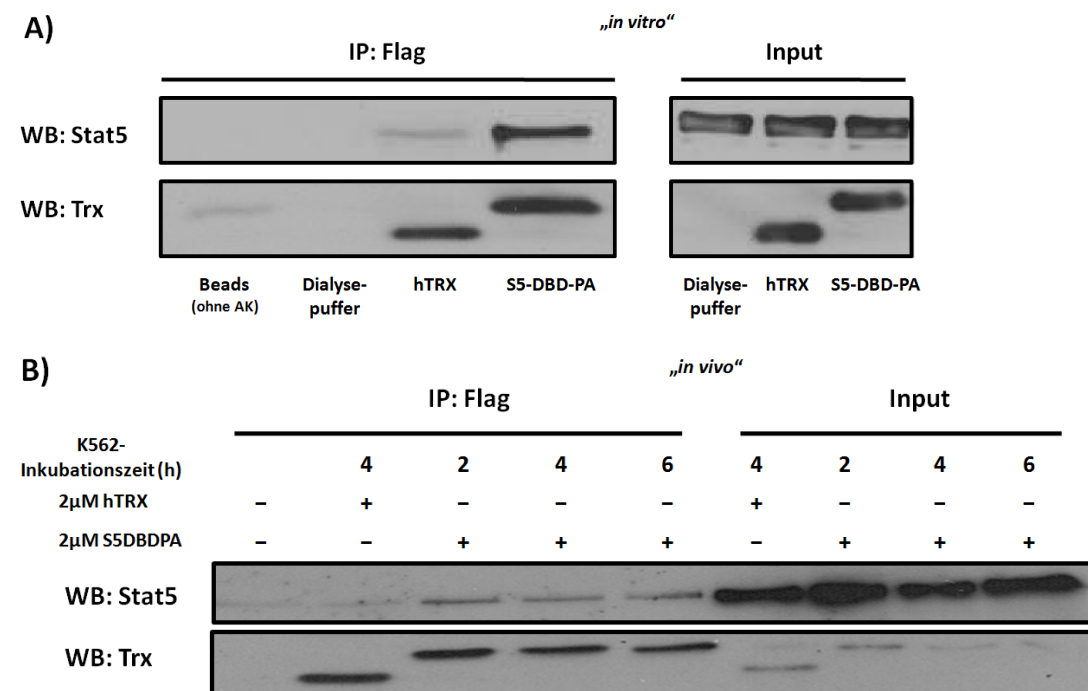


Abb. 3-39: Validierung der Interaktion zwischen Stat5 und dem rekombinant hergestellten S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukt über Co-IP

A) Rekombinantes humanes Stat5A-Protein (Endkonzentration: 300 nM) wurde mit rekombinant hergestelltem hTRX- bzw. S5-DBD-PA-Protein (Endkonzentration: 1 μ M; gleiches Volumen Dialysepuffer als Negativkontrolle eingesetzt) in Co-IP-Assaypuffer vermischt und für 2 h bei RT unter schütteln inkubiert (*„in vitro“*). Im Anschluss wurden die Konstrukte mit einem Flag-Tag Antikörper präzipitiert und gemeinsam mit der Menge gebundenen Stat5A-Proteins im Western Blot, mit einem Stat5- und Thioredoxin (Trx)-Antikörper, detektiert. Um unspezifische Bindungen der Co-IP Beads auszuschließen, wurden diese, ohne gekoppelten Antikörper, mit 1 μ M rekombinanten S5-DBD-PA inkubiert. **B)** K562-Zellen wurden mit 2 μ M rekombinant hergestelltem S5-DBD-PA für 6 h in RPMI-Mangelmedium (2%FCS), unter Zellkulturbedingungen, inkubiert. Alle 2 Stunden wurden Zelllysate mit intrazellulärem S5-DBD-PA, nach Acid Wash, angefertigt und in der Co-IP eingesetzt (*„in vivo“*). Die Inkubation der Zellen mit 2 μ M hTRX und dem gleichen Volumen Dialysepuffer über 4 h diente als Negativkontrolle. Der Input repräsentierte ein Zehntel des für die Co-IP eingesetzten Volumens an Zelllysate.

Ergebnisse

In einem nächsten Versuch erfolgte eine Präzipitation transduzierter S5-DBD-PA-Proteine aus K562-Zelllysaten (*in vivo*). Die Zellen wurden hierbei zuvor über 2, 4 und 6 h mit 2 μ M S5-DBD-PA inkubiert. Nach jedem der drei Zeitpunkte konnte eine vergleichbare Menge, unter intrazellulären Bedingungen gebundenen, Stat5-Proteins detektiert werden, während die Kontrollbehandlung der Zellen mit 2 μ M hTRX über 4 h keine deutliche Stat5-Interaktion erkennen ließ (siehe Abb. 3-39B).

Wie zuvor nach viralem S5-DBD-PA Transfer erfolgte die Bestimmung einer Inhibierung der Stat5-DNA-Bindeaktivität mit dem Gelshift-Assay (EMSA), unter Verwendung von Lysaten Prolaktin induzierter B9-HeLa-Zellen und eines radioaktiv markiertem Stat5-Enhancer Elements aus dem β -Casein Promotor. Hierbei wurden die rekombinanten hTRX- und S5-DBD-PA-Konstrukte erneut entweder direkt mit der Stat5-Probe bzw. dem B9-HeLa Lysat *in vitro* inkubiert oder zunächst in die Zellen transduziert um eine Aktivität unter intrazellulären Bedingungen (*in vivo*) nachzuweisen. Dabei konnten deutlich stärkere Stat5-inhibitorische Effekte des Peptidaptamer-Konstrukts unter *in vitro*-Bedingungen beobachtet werden (siehe Abb. 3-40A, rechtes Gel), was sich jedoch auch, wie in den zuvor durchgeführten Co-IP Experimenten, auf deutlich erhöhte Konzentrationen der relevanten Proteine im Versuchsansatz zurückführen ließ. Ebenfalls vergleichbar mit dem *in vitro*-Co-IP Versuch, war dabei auch ein geringerer Effekt der hTRX-Kontrolle erkennbar. Die Verwendung von Lysaten zuvor mit hTRX- und S5-DBD-PA (Endkonzentrationen: 1 und 2 μ M) transduzierter und anschließend induzierter B9-HeLa-Zellen zeigte einen dosisabhängigen, inhibitorischen Effekt des S5-DBD-PA Peptidaptamers hinsichtlich der Formierung von Stat5-DNA-Komplexen, was die Aktivität dieses rekombinanten Proteininhibitors nach zellulärer Transduktion unterstrich (siehe Abb. 3-40A, linkes Gel). Die Transduktion des hTRX-Kontrollproteins hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Interaktion zwischen Stat5 und der DNA.

Zusätzlich erfolgte eine Validierung der Inhibierung transkriptioneller Stat5-Aktivität mit dem Dual-Luziferase-Reporter Assay, unter Verwendung eines Stat5-regulierten Luziferase-Reporterplasmids (siehe Kap. 2.2.5.2.1 & 2.1.6.3). Hierfür wurden B9-HeLa-Zellen sowohl mit dem Firefly-Luziferase exprimierendem Reporterplasmid als auch mit einem Referenzplasmid transient co-transfiziert. Über eine konstitutive Renilla-Luziferase Expression ermöglichte das Referenzplasmid eine Einbeziehung von Transfektionseffizienz und Viabilität der Zellen nach der Transfektion, was die Genauigkeit der Messung wesentlich erhöhte. Nach einer 4-stündigen Inkubation der transfizierten B9-HeLa Zellen mit S5-DBD-PA und hTRX (Endkonzentration: 1 und 2 μ M), sowie mit dem gleichen Volumen an PBS und Dialysepuffer, wurde Stat5 über Prl aktiviert

und dessen transkriptionelle Aktivität nach weiteren 4 h über die gemessene Luziferaseaktivität quantifiziert (siehe Abb. 3-40B).

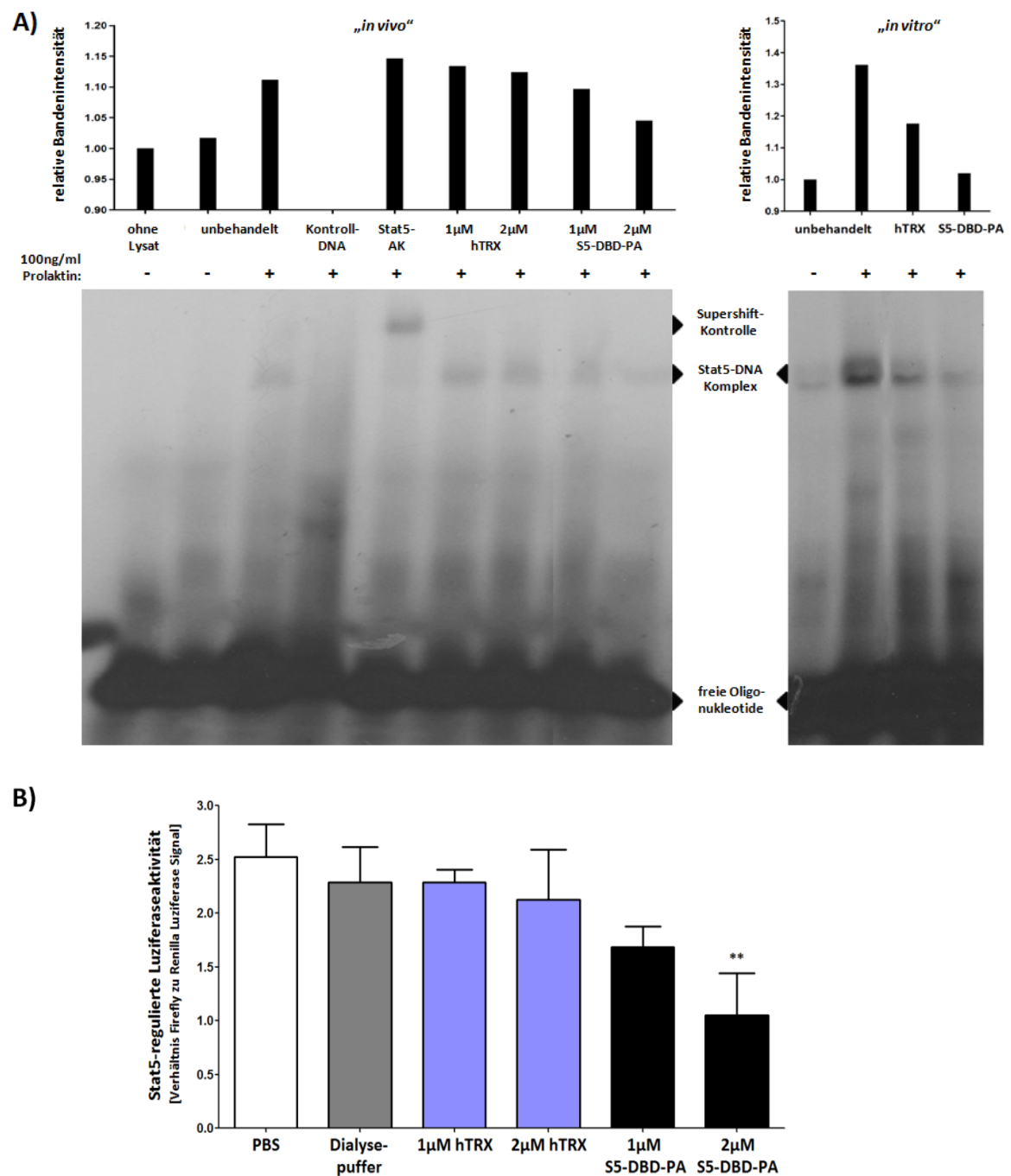


Abb. 3-40: Inhibition der Stat5 DNA-Bindeaktivität durch rekombinantes S5-DBD-PA

A) Analyse der Stat5-inhibitorischen Wirkung von S5-DBD-PA im Gelshift-Assay (EMSA). Nach dem Aussäen einer einheitlichen Zellzahl wurden B9-HeLa-Zellen mit rekombinanten S5-DBD-PA und hTRX (Endkonzentration: 1 und 2 μ M) für 5h in DMEM-Mangelmedium (2% FCS) inkubiert und anschließend für 30 min mit PrI induziert. Nach einem Acid Wash wurden die Zellen lysiert und 3 μ g des Zellextrakts, welches durch die Zellen aufgenommenes S5-DBD-PA und hTRX beinhaltet (*„in vivo“*) im EMSA, mit P^{32} markierter Stat5-spezifischer DNA, eingesetzt. Eine Lysat-freie Probe sowie Lysate induzierter und unbehandelter B9-HeLa-Zellen dienten als Kontrolle. Für die exakte Bestimmung des Stat5-DNA Komplexes wurden Lysate aktivierter B9-HeLa-Zellen zusätzlich mit einem Stat5-Antikörper (*„Supershift“*) oder einer Kontroll-DNA inkubiert. In einem 2. Versuch wurden 10 μ g eines Lysats aktivierter B9-HeLa-

Ergebnisse

Zellen mit 5 µg rekombinantem hTRX und S5-DBD-PA gemischt und für 2 h bei RT inkubiert („*in vitro*“). Im Anschluss wurden 3 µg des Proteingemischs im EMSA eingesetzt. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit der Software ImageJ. **B)** Dual-Luziferase-Reporter Assay zur Analyse der Stat5-inhibitorischen Wirkung von S5-DBD-PA. Nach dem Aussäen einer einheitlichen Zellzahl wurden B9-HeLa-Zellen mit einem Firefly-Luziferase Stat5-Reporterkonstrukt und einem konstitutiven Renilla-Luziferase Expressionsvektor co-transfiziert. Nach 36h wurden die Zellen mit PBS, Lösungsmittel-Kontrolle (Dialysepuffer) sowie den rekombinanten S5-DBD-PA und hTRX-Konstrukten (Endkonzentration: 1 und 2 µM) für 4h in DMEM-Mangelmedium (2% FCS) inkubiert und anschließend Stat5 durch PrI-Induktion (100ng/ml) aktiviert. Nach weiteren 4h wurden die Zellen lysiert und nach Substratzugabe die Aktivität beider Luziferasen seriell gemessen. Durch eine Normalisierung gegen die Renilla-Luziferase-Werte wurde die Transfektionseffizienz und Zellviabilität in die Messung einbezogen. (n=3; MW±SD) **p<0,01 gegenüber PBS-Kontrolle (1-way-ANOVA/ Bonferroni post test)

Nach Auswertung der Daten konnte erneut ein dosisabhängiger Effekt von S5-DBD-PA, mit einer signifikanten Inhibierung der Luziferase-Expression nach Behandlung der Zellen mit 2µM S5-DBD-PA, festgestellt werden. Die Luziferaseaktivität blieb von einer Inkubation der Zellen mit der hTRX-Kontrolle oder dem Protein-Lösungsmittel dabei nahezu unbeeinflusst.

Für eine abschließende Analyse des Einflusses einer S5-DBD-PA Behandlung auf die Stat5-Zielgenexpression, wurde erneut ein Vergleich zwischen K562- und HEL-Zellen herangezogen. Die Zellen wurden hierfür über drei Tage, mit einer viermaligen S5-DBD-PA- und hTRX-Applikation (nach 0, 24, 48 und 66 h) in der Konzentration 1µM und selbigem Volumen an Dialysepuffer inkubiert. Wie der virale Transfer von S5-DBD-PA und Stat5-gerichteter shRNA, wirkte sich auch eine Proteintransduktion des rekombinanten Peptidaptamer-Konstrukts wesentlich stärker auf die Zielgenexpression in der Bcr-Abl positiven K562-Zelllinie aus. Auffällig dabei war, dass die S5-DBD-PA Proteintransduktion auch zu einer Abnahme der Expression von SOCS-Proteinen und FOXP3 führte, was die Theorie einer Virusinfektion-vermittelten Induktion dieser Gene über andere Stat-Mitglieder unterstrich. In K562-Zellen führte die S5-DBD-PA Inkubation so zu einer signifikanten Reduktion der SOCS3-Expression gegenüber der hTRX- und Dialysepuffer-Kontrollbehandlung (siehe Abb. 3-41). Zudem ergab die Messung in K562-Zellen eine hochsignifikante Reduktion der CyclinD1-Expression gegenüber beiden Kontrollen, sowie eine Abnahme der Mcl-1 und Bcl-xL Expression, welche im letzteren Falle signifikant gegenüber der hTRX-Behandlung reduziert war. Überraschend zeigte sich jedoch die Expression der vor allem in hämatologischen bzw. leukämischen Zellen aktiven Serin/Threonin-Kinasen Pim1 und Pim2, im Gegensatz zum viralen S5-DBD-PA Transfer, von der Behandlung mit rekombinanten S5-DBD-PA unbeeinflusst. Bei Betrachtung der Expression von CiSH, SOCS1, Bcl-xL, Mcl-1 und CyclinD1, fielen die Stat5-inhibitorischen Effekte einer S5-DBD-PA Proteintransduktion, im Gegensatz zum viralen S5-DBD-PA Transfer, in HEL-Zellen deutlich stärker aus, waren im Vergleich zu der K562-Zelllinie jedoch nach wie vor gering.

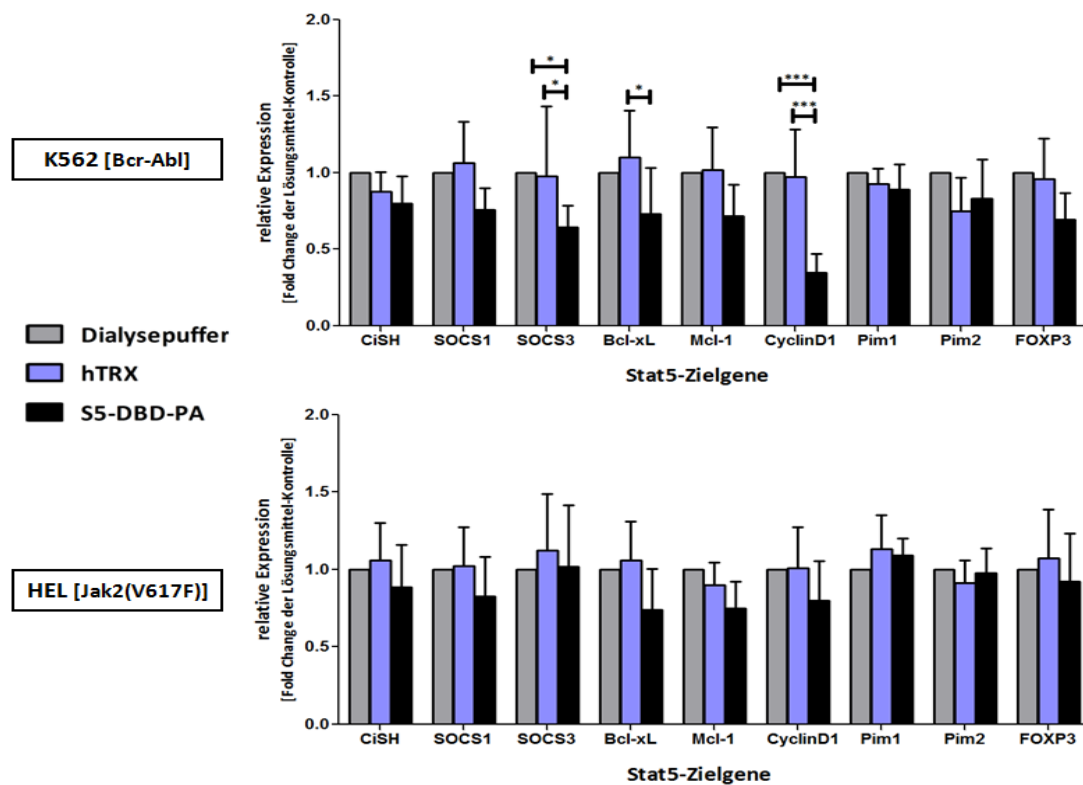


Abb. 3-41: Analyse der Stat5-Zielgenexpression in Bcr-Abl positiven K562 und Jak2(V617F) positiven HEL-Zellen nach Inkubation mit rekombinanten S5-DBD-PA

K562- und HEL-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit S5-DBD-PA, hTRX und Lösungsmittelkontrolle (Dialysepuffer) behandelt. Innerhalb dieses Zeitraums wurden die Proteine dabei 4mal (nach 0, 24, 48 und 66 h), mit einer Endkonzentration von 1 μ M und dem gleichen Volumen an Dialysepuffer, dem Zellkulturmedium hinzugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine RNA-Extraktion, welche nach reverser Transkription per qRT-PCR hinsichtlich der Expression verschiedener Stat5-Zielgene analysiert wurde. Die für jedes einzelne Zielgen ermittelten ct-Werte wurden gegen das Referenzgen HPRT1 normalisiert und als relative Veränderung der Expression (Fold Change) gegenüber der Protein-Lösungsmittelkontrolle angegeben. (n=4; MW \pm SD). Angegeben sind signifikante Reduktionen der Stat5-Zielgenexpression nach S5-DBD-PA Behandlung gegenüber der Lösungsmittel- und hTRX-Kontrolle. *p<0,05, ***p<0,001 (2-way-ANOVA/Bonferroni post test)

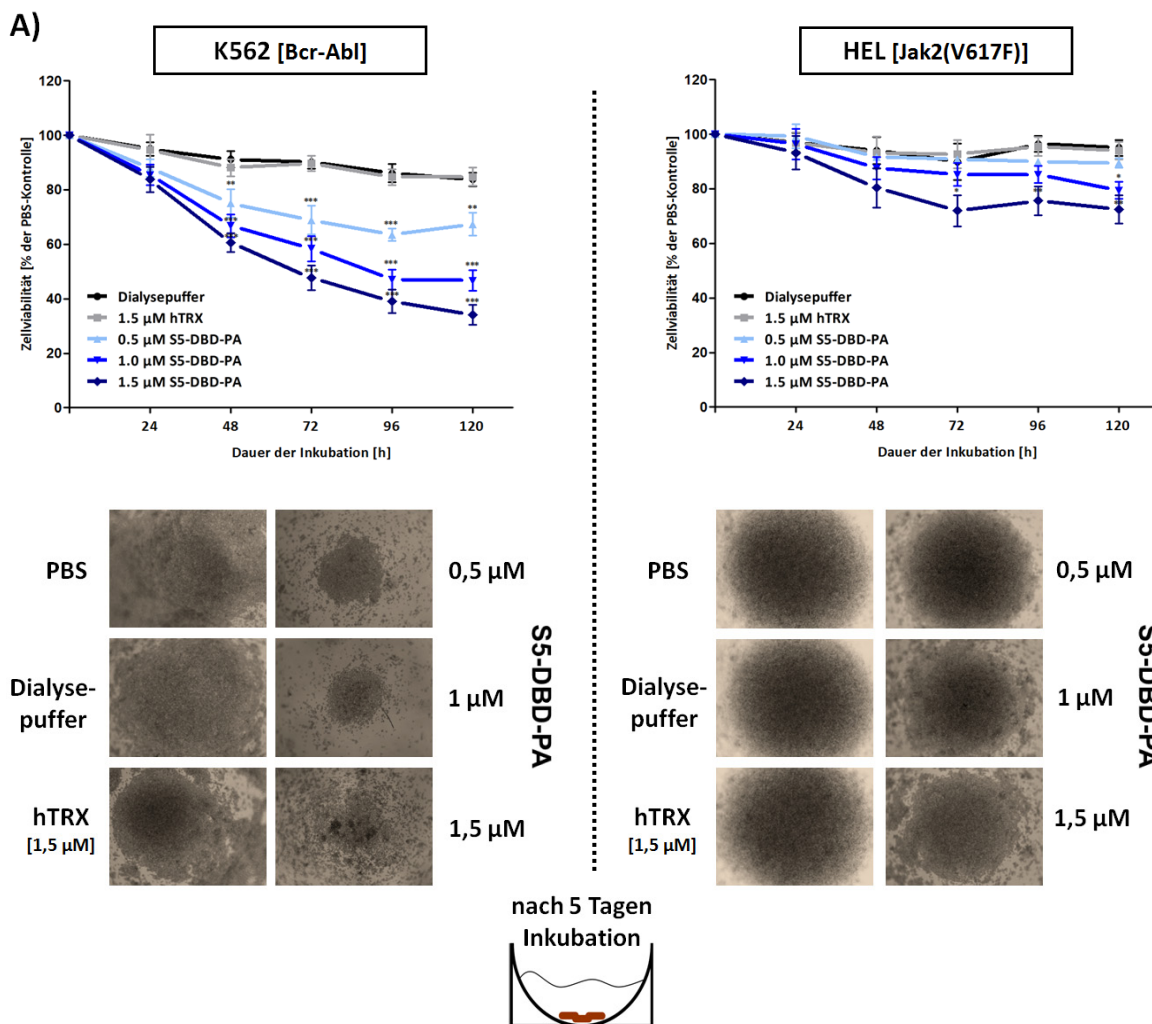
Die durchgeführten Experimente unterstrichen das Stat5-inhibitorische Potential des rekombinanten S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts, weshalb es abschließend zu analysieren galt, inwiefern sich die S5-DBD-PA-Proteintransduktion auf die Viabilität der verschiedenen, zuvor getesteten Tumorzelllinien auswirkt.

3.4.3 INHIBIERUNG DER VIABILITÄT VON TUMORZELLEN DURCH REKOMBINANTES S5-DBD-PA

Für die Analyse eines Einflusses des zellpenetrierenden Stat5-Inhibitors S5-DBD-PA auf die Überlebensfähigkeit von Tumorzellen, wurden alle getesteten Zelllinien über einen Zeitraum von fünf Tagen mit drei verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten Peptidaptamer-

Ergebnisse

Konstruktes (0,5; 1 und 1,5 μM) sowie mit dem hTRX-Scaffold-Kontrollkonstrukt in der höchsten Konzentration (1,5 μM), dem entsprechenden Volumen an Dialysepuffer als Lösungsmittelkontrolle und PBS inkubiert. Dabei wurden die rekombinanten Proteine täglich, in Kombination mit einem Mediumwechsel, in den angegeben Konzentrationen frisch appliziert. Veränderungen der Zellviabilität und des korrelierenden Zellwachstums wurden dabei über tägliche XTT-Messungen erfasst. Beim erneuten Vergleich der Bcr-Abl positiven K562-CML- und Jak2(V617F) positiven HEL-AML-Zelllinie traten wiederholt deutliche Unterschiede hinsichtlich eines Wachstums- und Viabilitäts-inhibierenden Einflusses des S5-DBD-PA Peptidaptamers auf, welche mit vorherigen Analysen korrelierten und einen Einfluss der Bcr-Abl Expression vermuten ließen. Obwohl in beiden Zelllinien die S5-DBD-PA Inkubation dosisabhängig signifikante Reduktionen der Zellviabilität gegenüber PBS-behandelter Zellen erkennen ließ, fiel der Effekt in K562-Zellen wesentlich drastischer aus, was mikroskopische Aufnahmen der am Boden von Rundboden-Wellplatten abgesetzten Suspensionszellen nach Ablauf des Inkubationszeitraums zusätzlich verdeutlichten (siehe Abb. 3-42A).



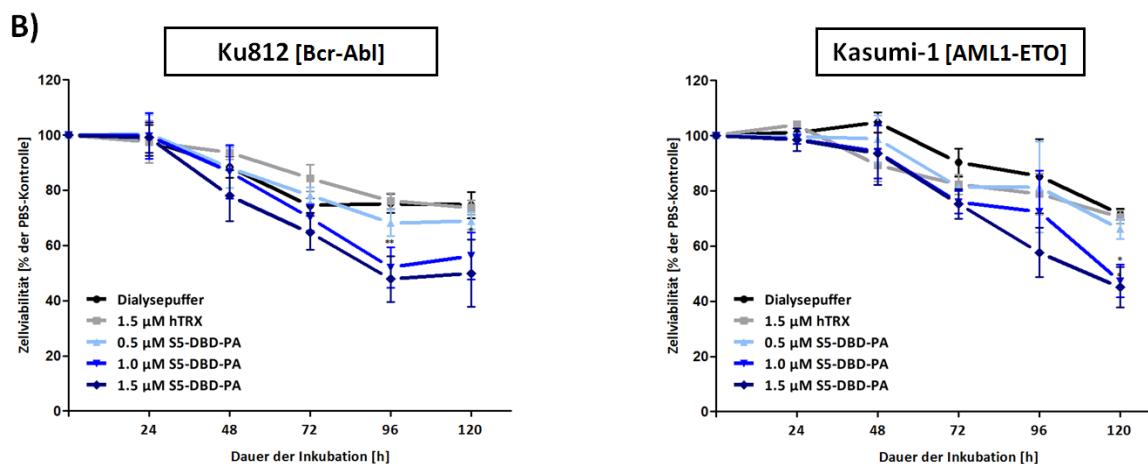


Abb. 3-42: Inhibierung der Viabilität von Leukämie-Zelllinien durch rekombinantes S5-DBD-PA

A) Bcr-Abl positive K562 CML- und Jak2(V617F) positive HEL AML-Zellen wurden über 5 Tage mit rekombinanten S5-DBD-PA in den Konzentrationen 0,5; 1 und 1,5 µM inkubiert und durch tägliche XTT-Messung hinsichtlich einer Veränderung von Viabilität und Wachstum analysiert. Hierfür wurden zu Beginn 5×10^3 Zellen pro Well einer 96-Rundboden-Wellplatte für Suspensionszellen ausgesät. Medium und S5-DBD-PA wurden täglich frisch hinzugegeben. Die tägliche Inkubation der Zellen mit PBS, Dialysepuffer und 1,5 µM hTRX dienten als Kontrollen, wobei die gemessenen XTT-Werte als relative Prozentwerte der PBS-Kontrolle angegeben wurden ($n=4$; $MW \pm SD$) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (2-way-ANOVA/Bonferroni post test). Nach Ablauf der 5 Tage wurden die Zellen, welche sich am Boden der Rundbodenwells abgesetzt hatten durch Phasenkontrast-Aufnahmen mikroskopisch dokumentiert. **B)** Nach gleichem Versuchsablauf erfolgte eine Analyse der antiproliferativen S5-DBD-PA-Effekte in Bcr-Abl positiven Ku812 CML- und AML1-ETO positiven Kasumi-1 AML-Zellen.

Im Vergleich zu der PBS-Negativkontrolle resultierte die tägliche Inkubation mit 1,5µM S5-DBD-PA, der höchsten verwendeten Konzentration, in einer Abnahme gemessener XTT-Werte um ca. 60-70 % im Falle der K562- und um 20-30 % im Falle der HEL-Zelllinie, während sich die Zellen in beiden Fällen von einer Applikation des hTRX-Kontrollproteins sowie des Protein-Lösungsmittels nahezu unbeeinflusst zeigten. Dass dies nicht der Regel entsprach, zeigte in der Folge der Vergleich von Ku812- und Kasumi-1-Zellen. Nach Ablauf des Analysezeitraums von 5 Tagen wiesen beide Zelllinien, sowohl durch eine tägliche Zugabe von 1,5 µM hTRX, als auch durch Zugabe des gleichen Volumens an Dialysepuffer zu dem Zellkulturmedium, um ca. 30% reduzierte XTT-Werte gegenüber der PBS-Behandlung auf (siehe Abb. 3-42B). Signifikant verstärkte Effekte einer S5-DBD-PA Behandlung in den Konzentrationen 1 und 1,5 µM waren trotz alledem messbar.

Abschließend wurde der Einfluss einer S5-DBD-PA Mediumapplikation auf das Wachstum solider Tumorzellen untersucht. Einhergehend mit der zuvor detektierten Präsenz aktivierter Stat5-Proteine (siehe Abb. 3-4) fielen die Effekte, mit einer dosisabhängig signifikanten Reduktion der Zellviabilität, in A431- und PC-3-Zellen am deutlichsten aus, wobei vor allem die ausschließlich Stat5A exprimierende PC-3 Prostatakarzinomzelllinie ein deutlich reduziertes Wachstum gegenüber den Kontrollen aufwies (siehe Abb. 3-43).

Ergebnisse

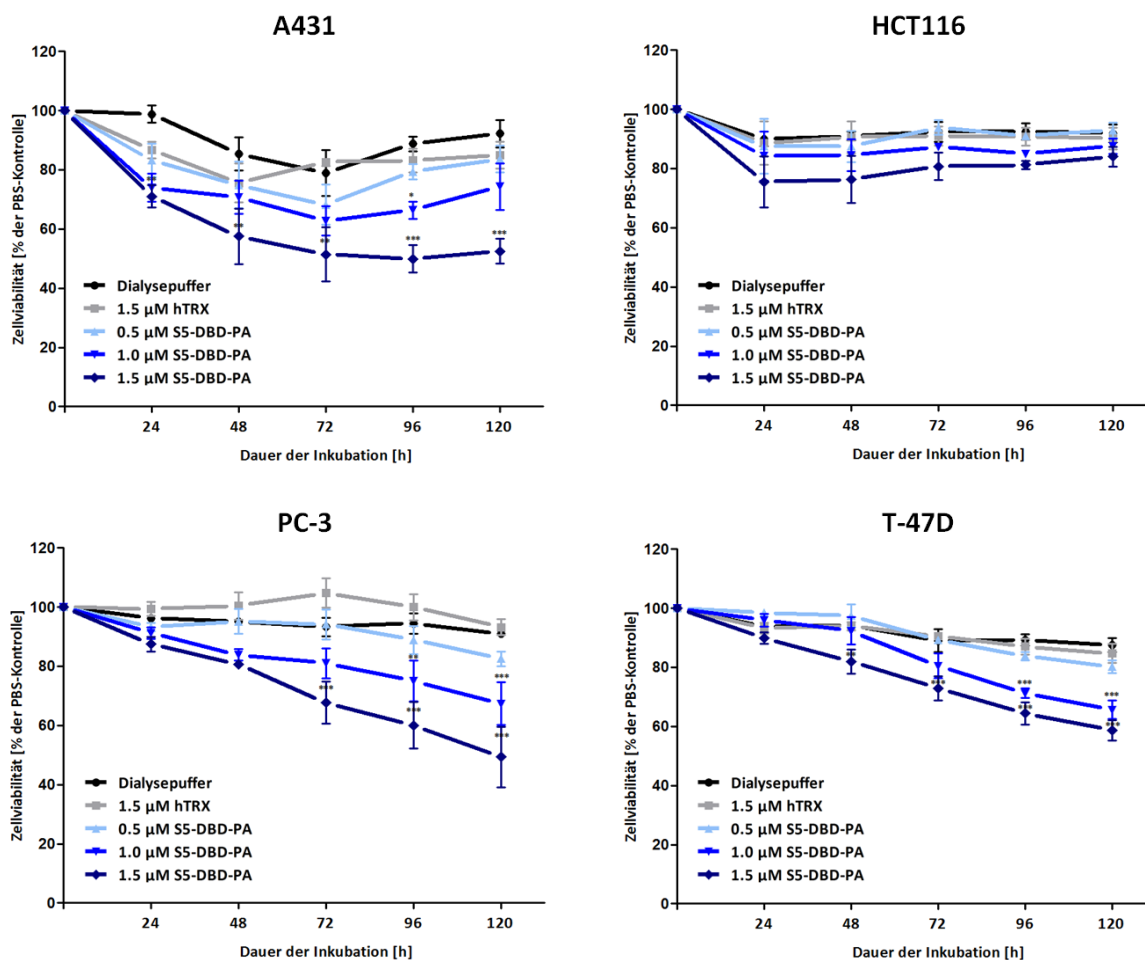


Abb. 3-43: Inhibition der Viabilität solider Tumorzellen durch rekombinantes S5-DBD-PA

A431 Melanom-, HCT116 kolorektale Karzinom-, PC-3 Prostatakarzinom und T-47D Mammakarzinom-Zelllinien wurden zu 3×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät, über 5 Tage mit rekombinanten S5-DBD-PA in den Konzentrationen 0,5; 1 und 1,5 µM inkubiert und durch XTT-Messung hinsichtlich einer Veränderung von Viabilität und Wachstum analysiert. Medium und S5-DBD-PA wurden dabei täglich frisch hinzugegeben. Zu Kontrolle wurde die Zellen mit PBS, Dialysepuffer und 1,5 µM hTRX inkubiert, wobei die gemessenen XTT-Werte als relative Prozentwerte der PBS-Kontrolle angegeben wurden. (n=3; MW±SD) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (2-way-ANOVA/Bonferroni post test)

Trotz deutlicher Effekte des Stat5-spezifischen Peptidaptamer-Konstruktes zeigten sich A431-Melanomzellen anfänglich auch von einer hTRX- und Dialysepuffer-Kontrollinkubation beeinflusst. Eine interessante Beobachtung dabei war, dass A431-Zellen in etwa ab dem 3. Tag der Inkubation eine zunehmend eintretende Toleranz gegenüber sämtlichen Behandlungen erkennen ließen, was auf eine mögliche Aktivierung kompensatorischer Signalkaskaden, als Überlebensmechanismus in Folge erhöhten Zellstress, hindeutete. Die Viabilität der T-47D Brustkrebszelllinie wurde durch eine S5-DBD-PA Inkubation in den Konzentrationen 1 und 1,5 µM ebenfalls signifikant inhibiert. Nach Ablauf des Analysezeitraums von 5 Tagen waren die gemessenen XTT-Werte hierbei um ca. 40% gegenüber der PBS-Behandlung reduziert, was in etwa dem Effekt einer endogenen S5-DBD-PA Expression nach viraler Transduktion entsprach

(siehe Abb. 3-36A). Hierbei sei erneut zu erwähnen, dass uninduzierte T-47D Zellen für den Versuch verwendet wurden, welche keine Stat5-Tyrosinphosphorylierung aufweisen. Die Beeinflussung der Viabilität dieser Zellen deutete daher auf eine weitere Stat5-inhibitorische Aktivität des Peptidaptamer-Konstrukts hin, unabhängig von einer Inhibierung der Stat5-DNA Interaktion. Die Viabilität der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116 wies, entsprechend einer nur geringen Stat5-Expression, keine signifikante Beeinflussung durch die S5-DBD-PA Inkubation auf. Dennoch waren geringe dosisabhängige S5-DBD-PA-Effekte zu erkennen, weshalb ein möglicher, wenn auch geringer, zytotoxischer Einfluss der S5-DBD-PA Proteintransduktion nicht völlig ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend zeigten die durchgeführten Experimente hinsichtlich einer Inhibierung der Stat5-DNA-Bindeaktivität und des Wachstums der hier getesteten Tumorzelllinien eine mehrheitliche Korrelation zwischen der Aktivität des rekombinant hergestellten S5-DBD-PA-Peptidaptamerkonstruktes nach Proteintransduktion und viral transduziertem und endogen exprimiertem S5-DBD-PA-Proteins und unterstrichen das therapeutische Potential dieses Stat5-Inhibitors.

4 DISKUSSION

Schätzungen zufolge werden in einem ausgewachsenen menschlichen Organismus täglich in etwa 60 bis 300 Milliarden neuer Zellen gebildet, wobei in etwa dieselbe Zellzahl, in Folge der Aufrechterhaltung eines homöostatischen Zustandes, über Prozesse wie Apoptose beseitigt wird. Auf molekularer Ebene wird diese Balance durch Signaltransduktionskaskaden streng reguliert. Trotz einer hohen Varianz auslösender extrazellulärer Signale (Zytokine, Wachstumsfaktoren, etc.), wird eine intrazelluläre Induktion von Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen nur durch wenige Signalkaskaden reguliert. Neben Kaskaden wie dem Pi3K/Akt-, dem Ras/Raf/Erk- oder dem PKC-Signalweg, stellt dabei die Jak/Stat-vermittelte Signaltransduktion eine zentrale Komponente der Regulation zellulärer Überlebensfähigkeit und Wachstums dar (Sharma & Settleman, 2010; Vogelstein & Kinzler, 2004). Als Konsequenz dessen ist eine Deregulation dieses Signalwegs sowohl mit der Ausbildung, als auch der Sicherung von Überlebensfähigkeit und Wachstum verschiedenster humaner Tumore assoziiert, weshalb Stat-Proteine, v.a. Stat3 und Stat5, als bedeutende Zielstrukturen in der Krebstherapie zu betrachten sind (Yu & Jove, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Inhibierung von deregulierten Faktoren Tumor-assoziiierter Signalkaskaden, in Folge einer gesteigerten Abhängigkeit („oncogene addiction“), einen Proliferationsstopp, gepaart mit einer Induktion der Apoptose, von Tumorzellen, nicht jedoch von Zellen gesunder Gewebe, hervorrufen kann (Weinstein & Joe, 2008). Im Gegensatz zu konventionellen Zielstrukturen in der Krebstherapie, wie mutierten oder überexprimiert vorliegenden Enzymen oder Membranrezeptoren, besitzen Transkriptionsfaktoren wie die Stat-Proteine jedoch nur bedingt Wirkstoff-zugängliche Oberflächenstrukturen (Imming et al., 2006; Russ & Lampel, 2005), was vor allem die Identifikation und das Design niedermolekularer Wirkstoffe erschwert. Der Einsatz interferierender Proteine und Peptide stellt hierbei einen unumgänglichen Lösungsansatz dar. Ohne eine strikte Abhängigkeit der Bindungs- und Wirksamkeit gegenüber bestimmter funktioneller Epitope, wie hydrophoben Bindetaschen von Enzymdomänen, ermöglichen die vielseitigen, makromolekularen Strukturen von Proteinen eine Interaktion mit größeren Grenzflächen anderer Proteine (Verdine & Walensky, 2007). Im Gegensatz zu einer Inhibierung durch niedermolekulare Substanzen ist die Toleranz einer spezifischen Protein-Protein Interaktion gegenüber punktuellen Veränderungen innerhalb der Zielstruktur des Targetproteins, in Folge von Mutationen, zudem erhöht. Durch den Einsatz proteinogener Therapeutika wird somit das Risiko einer möglichen Resistenzentwicklung von Tumoren, wie am

Diskussion

Beispiel Imatinib-resistenter Leukämien in Folge von Mutation der Bcr-Abl Kinasedomäne beobachtet (Soverini et al., 2011; Vaidya et al., 2011), gegenüber dem Inhibitor minimiert. Neben Antikörpern und scFv-Fragmenten sowie natürlich vorkommenden, inhibitorischen Protein-Interaktionspartnern, haben sich in den vergangenen Jahren die gegen verschiedenste Proteintargets anwendbaren Peptidaptamere als vielversprechende Variante therapeutischer Peptide und Proteine hervorgerufen. Neben der nahezu unbegrenzten Anwendungsvielfalt, welche aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Größe vor allem gegen intrazelluläre Zielstrukturen zu tragen kommt, bieten diese künstlichen Fusionsproteine, bestehend aus einem stabilen Scaffoldprotein und einer Target-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz, Vorteile eines simplen Designs, einer effizienten und kostengünstigen Synthese sowie die Fähigkeit einer Disulfidbrücken-unabhängigen Faltung, als ebenfalls essentielle Voraussetzung für eine intrazelluläre Anwendung (Colas, 2008). Das therapeutische Potential einer gezielten Peptidaptamer-Interaktion konnte anhand verschiedener Tumor-assoziiierter Proteine und Onkogene wie Cdk2, ErbB2, Ras, Rho GEF, MMP9, Grb2 oder E6 gezeigt werden (Bjorklund et al., 2004; Bouquier et al., 2009; Butz et al., 2000; Cohen et al., 1998; Kardinal et al., 2001; Kunz et al., 2006; Xu & Luo, 2002). Der Transfer der Peptidaptamere in die Tumorzellen erfolgte hierbei über virale oder direkte Transduktion als rekombinante, zellpenetrierende Proteinkonstrukte. Die dabei erzielten Effekte reichten von einer Induktion der Apoptose, über eine Abnahme von Proliferation, Migration und Invasivität der Tumorzellen *in vitro*, bis hin zu Reduktionen des Tumolvolumens von Xenotransplantaten.

Den Grundstein für das Thema dieser Arbeit legten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, denen es gelungen war eine Peptidaptamer-Sequenz über Hefe-Zwei-Hybrid Selektion zu isolieren, welche spezifisch mit einem für die Dimerisierung und Transaktivierung von Stat3 essentiellen Bereich interagiert. Über die Verwendung einer für die Peptidaptamer-Oberflächenpräsentation und Proteinaufreinigung optimierten Variante des humanen Thioredoxin-Proteins (hTRX) als Scaffold sowie der Verwendung eines zellpenetrierenden 9-L-Argininrestes als Proteintransduktionsdomäne (PTD), konnte ein effizient herstellbarer, stabiler und applizierbarer Stat3-Inhibitor („rS3-PA“) kreiert werden, welcher mit der Aktivierung und Dimerisierung von Stat3 interferiert und dadurch Wachstum, Migration und Invasivität Stat3-abhängiger Tumore inhibiert (Borghouts et al., 2012; Borghouts et al., 2008a). In überaktivierter Form sind die Mitglieder der Stat-Proteinfamilie Stat3 und Stat5 an der Regulation nahezu jeglicher, für das Überleben und die Progression von Tumoren essentieller Prozesse wie unkontrollierte Zellteilung, Migration und Invasivität, Umgehung von Apoptose und der Degradation durch das Immunsystem, Angiogenese sowie einer Reprogrammierung des

Energiestoffwechsels beteiligt. Aufgrund des häufigen Auftretens und des aggressiven Phänotyps von Tumoren mit konstitutiver Stat3-Aktivität, haben sich die experimentellen Ansätze einer Stat-gerichteten Krebstherapie bislang mehrheitlich auf eine Inhibierung dieses Vertreters der Stat-Proteinfamilie fokussiert (Gröner et al., 2008; Yue & Turkson, 2009). Jedoch ließen die vergangenen Jahre einen stetigen Zuwachs an Beobachtungen und Berichten über deregulierte Stat5-Aktivitäten in verschiedenen Tumorarten erkennen, welche mit der Ausbildung und dem Erhalt eines malignen Phänotyps in Verbindung gebracht wurden (siehe Kap. 1.3.2, Tab. 1.2). Auf Grundlage dessen war es Ziel dieser Arbeit eine Peptidaptamer-Sequenz zu identifizieren, welche, unter Anwendung des zuvor optimierten hTRX-Scaffoldproteins, in der Lage ist die Aktivität von Stat5 in Tumoren funktionell zu inhibieren und dadurch die Möglichkeit einer klinischen Anwendung bietet. Aufgrund widersprüchlicher Beobachtungen hinsichtlich Stat5-vermittelter Phänotypen von Tumoren unterschiedlicher Gewebe, welche von antiproliferativen und antiinvasiven Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens (Sultan et al., 2005; Yu et al., 2010) bis hin zu der Vermittlung aggressiven Wachstums in Leukämien und Prostatakarzinomen reichen (Lewis & Ward, 2008; Li et al., 2004), galt es dabei zunächst die Stat5-Abhängigkeit humaner Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit zu analysieren.

4.1 VALIDIERUNG DER STAT5-ABHÄNGIGKEIT LEUKÄMISCHER UND SOLIDER TUMORZELLEN

Die Ursachen einer aberranten Stat5-Aktivität in Tumoren sind vielseitig. Einer Vielzahl tumorassoziierter Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone, welche vorwiegend in Folge einer auto- und parakrinen Sekretion in der Tumormikroumgebung zirkulieren, konnte ein Stat5-aktivierender Einfluss nachgewiesen werden. Hierzu zählen verschiedene Interleukine mit wachstumsinduzierendem Einfluss sowie OSM, SCF, GM-CSF, EGF, GH, IGF-1, Flt-3L, Epo, Tpo, Prl, Leptin oder Insulin (Ferbeyre & Moriggl, 2011). Hinzukommen Synergismen mit Steroidhormonrezeptoren, welche über direkte Interaktion, wie im Falle einer häufig zu beobachtenden Androgenrezeptor-Interaktion in Hormon-refraktären Prostatakarzinomen (Tan et al., 2008), in einer Co-Aktivierung, mit gesteigerter nukleärer Translokation und transkriptioneller Aktivität von Stat5 resultieren. Der am besten dokumentierte Mechanismus aberranter Stat5-Aktivierung basiert jedoch auf einer Phosphorylierung durch mutierte, onkogene Tyrosinkinasen. Nahezu jegliche Form hämatologischer Neoplasien ist mit einer

konstitutiven Phosphorylierung von Stat5 durch mutierte Tyrosinkinase assoziiert, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen aberranter Stat5-Aktivität und der Selbsterneuerung und Expansion leukämischer Stamm- und Progenitorzellen nachgewiesen werden konnte (Heuser et al., 2009; Lewis & Ward, 2008; Walz et al., 2012). Die Formierung aktiver, dimerer Transkriptionsfaktoren über SH2-vermittelte reziproke Phosphotyrosin-Interaktion monomerer Stats, erfolgt im Falle der homologen Stat5 Isoformen über die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 694 des Stat5A- und 699 des Stat5B-Proteins, was eine Bildung jeweiliger Homodimere aber auch eine Bildung von Heterodimeren zur Folge haben kann (Horvath, 2000). Da die Mehrheit der in malignen Entartungen des Blutes auftretenden onkogenen Tyrosinkinase eine hohe Spezifität bzw. Affinität gegenüber Stat5 und seiner kritischen Tyrosinreste als Substrat aufweisen, verdeutlichten Zellextrakte transformierter und IL-3 unabhängig wachsender Ba/F3-Zellen (siehe Abb. 3-3). Die exemplarisch über Bcr-Abl, Npm-Alk und Tel-Jak Translokationsprodukte sowie über konstitutiv aktive Stat5A (S710F) und c-Kit Mutanten (D816V) transformierten Zellen zeigten eine deutliche Erhöhung der Stat5-Tyrosinphosphorylierung, während eine Phosphorylierung des kritischen Stat3-Tyrosinrestes 705, außer im Fall konstitutiver Jak2-Aktivität, nicht festgestellt werden konnte. Dabei korreliert die Stat5-Aktivierung mit der Ba/F3-Zelltransformation und der Fähigkeit IL3-unabhängigen Wachstums, wie unter anderem am Beispiel Stat5-vermittelter Bcl-xL Expression gezeigt werden konnte (Gesbert & Griffin, 2000). Mehr als die Hälfte der klinischen Fälle hämatologischer Neoplasien lassen sich auf eine Bcr-Abl Translokation oder eine konstitutive Aktivierung von Jak2, wie durch die Jak2(V617F)-Punktmutation, zurückführen, weshalb eine mit der Aktivierung von Stat5 zusammenhängende Betrachtung dieser Mechanismen leukämischer Transformation von vordergründigem Interesse war.

4.1.1 ANALYSE DER STAT5-ABHÄNGIGKEIT BCR-ABL EXPRIERENDER CML-ZELLINIEN

Die Bcr-Abl vermittelte Tyrosinphosphorylierung stellt den wohl am besten charakterisierten Stat5-Aktivierungsmechanismen im Zuge der Ausbildung einer Leukämie dar. Über ihre SH2-Domänen interagieren die Stat5A und B-Isoformen hierbei mit autophosphorylierten Tyrosinresten innerhalb der SH2-Domäne von Bcr-Abl, wobei diese Interaktion über die SH3-Domäne von Bcr-Abl zusätzlich stabilisiert wird (Nieborowska-Skorska et al., 1999). Gebundene Stat5-Proteine werden in der Folge durch die Abl-Kinase permanent phosphoryliert bzw.

aktiviert. Zusätzlich konnte in verschiedenen Studien ein indirekter, Bcr-Abl-vermittelter Stat5-Aktivierungsmechanismus identifiziert werden, welchem eine vorgeschaltete Aktivierung von Kinasen der Src-Familie (Src, Hck, Lyn) über Bcr-Abl zu Grunde liegt (Klejman et al., 2002; Nam et al., 2007; Wilson et al., 2002). Hierbei sei zu erwähnen, dass Bcr-Abl jedoch im Gegensatz zu anderen Leukämie-assoziierten Translokationsprodukten keinen Einfluss auf eine Jak2-Aktivierung hat, weshalb sich eine Inhibierung der Jak2-Stat5 Signalgebung durch Jak-Inhibitoren als ineffektiv bei der Behandlung einer chronisch myeloischen Leukämie (CML), im Vergleich zu Leukämien lymphatischen Ursprungs und myeloproliferativen Erkrankungen, erwiesen hat (Hantschel et al., 2012). Da CML-Patienten in etwa 95% der Fälle eine Bcr-Abl Expression in Folge der t(9;22)(q34;q11)-Chromosomentranslokation („Philadelphia-Chromosom“) aufweisen, rückt eine gezielte Stat5-Inhibierung hierbei in den Fokus. Trotz des aktivierenden Einflusses von Bcr-Abl gegenüber verschiedener, für das Wachstum von Tumoren entscheidender Signalmoleküle wie Src, PI3K oder MAP-Kinasen wie Raf (Steelman et al., 2004), konnten mehrere Studien eine Stat5-Abhängigkeit Bcr-Abl-vermittelter Transformation unmissverständlich belegen, wobei eine Steigerung der Stat5-Expression und Aktivität mit einem fortschreitenden Krankheitsbild und der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) korreliert (Hoelbl et al., 2010; Walz et al., 2012; Warsch et al., 2011). Unter Anwendung von Cre/loxP-Rekombinationssystemen, zur konditionellen Stat5-Gendeletion, konnten die Gruppen um Hoelbl, Walz und Ye et al. einen dominierenden Einfluss von Stat5 beim Erhalt von Überlebensfähigkeit und Repopulationskapazität Bcr-Abl-exprimierender Leukämien aufzeigen, wobei Hoelbl et al. hierbei eine entscheidende Rolle von Stat3 im Zuge durchgeführter Knockout-Studien ausschließen konnte (Hoelbl et al., 2006; Hoelbl et al., 2010; Walz et al., 2012; Ye et al., 2006). Im Zuge dieser doppelten Abhängigkeit der CML-Erkrankung von der Expression des klassischen Onkogens Bcr-Abl und des Transkriptionsfaktors Stat5 wurden hierbei auch die Begriffe einer gepaarten „oncogene-“ und „non-oncogene addiction“ angewandt. Einhergehend damit resultierte die in dieser Arbeit durchgeführte Inhibierung der Stat5-Expression, durch den kombinierten Einsatz Stat5A- und Stat5B-gerichteter shRNA, in einer deutlichen Reduktion von Wachstum und Viabilität Bcr-Abl positiver K562- und Ku812-CML-Zellen. Ein interessanter Aspekt hierbei war, dass sich die erzielten antiproliferativen Effekte in K562-Zellen, nach Inhibierung der Stat5-Expression, in ihrer Intensität mit der Auswirkung einer Bcr-Abl Inhibierung durch Imatinib-Behandlung vergleichen ließen (Vergleich Abb. 3-8 & 3-34). Ähnlich drastische Effekte eines RNA-Interferenz basierten Stat5-Knockdowns konnten zuvor bereits sowohl in K562- (Baskiewicz-Masiuk et al., 2003; Kosova et al., 2010; Wang et al., 2011), als auch Ku812- und primären CML-Zellen beobachtet werden (Warsch et al., 2011). Drei Wochen nach der

| Diskussion

Virusstransduktion wies der infizierte Zellpool jedoch sowohl eine Wiederkehr der Stat5-Expression, einhergehend mit Bcr-Abl vermittelter Tyrosinphosphorylierung, als auch eine Wiederkehr, gegenüber den Kontrollen, vergleichbarer Zellteilungsraten auf (Abb. 3-7 & 3-9). Der gleichzeitig, in etwa nach 10 Tagen, eintretende, rapide Rückgang der GFP-Expression, als Resultat einer signifikanten Abnahme GFP-exprimierender Zellen (Abb. 3-10 & 3-14), verdeutlichte, dass sich die Aufhebung des shRNA-Effektes auf einen einsetzenden Zelltod shRNA-exprimierender Zellen und auf ein gleichzeitiges Herauswachsen uninfizierter und schwach infizierter Zellen innerhalb des transduzierten Zellpools zurückführen ließ. Da beide Zelllinien, trotz Wiederkehr nahezu unveränderten Zellwachstumsverhaltens und Wiederkehr der Stat5-Expression, nach 9 Wochen noch einen Anteil GFP-exprimierender Zellen von 20% aufwiesen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Zellen um schwach infizierte Zellen handelte, welche zwar ausreichend eGFP für eine FACS-Detektion, jedoch aber eine unzureichende, durch die Zellen tolerierte Menge an shRNA exprimierten. Aufgrund einer separaten Regulation der eGFP-Expression über den SFFV- und der shRNA-Expression über den U6-Promotor konnte hierbei zusätzlich ein epigenetisch regulierter Silencing-Effekt des U6-Promotors durch die infizierten Zellen des nach Stat5-Knockdown „überlebenden“ Zellpools nicht ausgeschlossen werden. Eine Separierung der GFP-positiven Zellpopulation nach 9 Wochen über FACS-Sortierung würde hierbei nähere Hinweise liefern und sollte in einem nächsten Schritt analysiert werden. Hierbei sei erneut zu erwähnen, dass der Versuch einer FACS-Sortierung frisch transduzierter Zellen durchgeführt wurde, jedoch in Folge eines rapide einsetzenden Zelltods aufgrund erhöhter shRNA-Expression, gepaart mit einem erhöhten Zellstress durch den Sortierungsprozess, eine anschließend experimentelle Analyse nicht ermöglichte. Das die Inhibierung der Stat5-Expression in der Tat eine Apoptose-Induktion in Bcr-Abl exprimierenden CML-Zellen hervorruft, verdeutlichte die Apoptosefärbung transduzierter K562-Zellen nach 10 Tagen mit Annexin V und 7-AAD (Abb. 3-11). Das die zu diesem Zeitpunkt stark erhöhte 7-AAD Einzelfärbung auf einen Nekrose-ähnlichen, spätapoptotischen Zustand der „Sekundären Nekrose“ unter *in vitro*-Bedingungen und nicht auf einen zytotoxischen, Nekrose-induzierenden Effekt einer Übersättigung der zellulären shRNA-Prozessierungsmaschinerie durch eine zu hohe shRNA-Expression zurückgeführt werden konnte (Grimm et al., 2006), zeigte die Infektion der Zellen mit der gleichen Menge (MOI=50) Kontroll-shRNA kodierender Lentiviren, welche keinen zytotoxischen Effekt erkennen ließ (Abb. 3-12). In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass sich das Resultat einer leukämischen Transformation, hervorgegangen aus dem Zusammenspiel Bcr-Abl und Stat5-vermittelter Signalgebung, wesentlich auf eine erhöhte Expression mitotischer und antiapoptotischer Proteine wie CyclinD1 und Bcl-xL zurückführen

lässt. Hierbei diente die K562-Zelllinie ebenfalls als häufig genutztes zelluläres Testsystem, wobei die Administration von dominant-negativen Stat5-Mutanten oder Stat5-gerichteten Antisense- oder Decoy-Oligonukleotiden zu signifikanten Reduktionen der Expression dieser beider Gene führte (Baskiewicz-Masiuk et al., 2003; de Groot et al., 2000; Horita et al., 2000; Wang et al., 2011). Die in dieser Arbeit in K562-Zellen durchgeführte Inhibierung der transkriptionellen Stat5-Aktivität, durch viralen shRNA-Transfer, resultierte ebenfalls in einer deutlichen, teils signifikanten Reduktion der CyclinD1- und Bcl-xL-Expression gegenüber unbehandelter Zellen (Abb. 3-13). Zudem konnte eine Abnahme der Expression des Mcl-1 Gens, als ein weiteres antiapoptotisches Protein der Bcl-2 Familie, sowie der Stat5-regulierten, sowohl bei der Vermittlung leukämischer als auch normaler hämatopoetischer Proliferation beteiligten, Serin/Threonin-Kinasen Pim1 und Pim2 beobachtet werden. Der nach Stat5-Knockdown rapide einsetzende K562-Zelltod durch Apoptose, konnte somit als Resultat der Expressionsreduktion dieser Gene betrachtet werden und unterstrich den Einfluss von Stat5 auf die Überlebensfähigkeit Bcr-Abl exprimierender, myeloproliferativer Neoplasien.

4.1.2 ANALYSE DES STAT5-EINFLUSSES IM FALLE EINER AKUT MYELOISCHEN TRANSFORMATION DURCH JAK2(V617F)

Im Gegensatz zu der K562-Zelllinie, wirkte sich der Stat5-Knockdown im Falle einer Jak2(V617F)-vermittelten Stat5-Aktivierung in der akut erythroleukämischen HEL-Zelllinie (AML-M6 Erkrankung), trotz offensichtlich starker Beeinflussung zellulärer Viabilität, überraschend nur minimal auf die Expression dieser Zielgene aus. Die hinsichtlich einer Veränderung von Viabilität, Proliferation, GFP-Expression und Apoptose-Induktion parallel mit der K562-Zelllinie durchgeführten Analysen zeigten nahezu vergleichbare Abhängigkeiten von der Stat5-Expression beider Zelllinien. Diese Ergebnisse gingen einher mit vorherigen Beobachtungen, welche, vergleichbar mit der Ausbildung einer CML-Erkrankung nach Bcr-Abl Translokation, Stat5 als einen entscheidenden Faktor Jak2(V617F)-vermittelter leukämischer Transformation und der Ausbildung verschiedener Formen der AML- und myeloproliferativer Erkrankungen in Verbindung brachten (Funakoshi-Tago et al., 2010; Walz et al., 2012). Warum die Expression der hier analysierten Stat5-Zielgene, nach Stat5-Knockdown in der HEL-Zelllinie, jedoch nur im Falle des CyclinD1-Gens eine leichte Reduktion erkennen ließ, lässt Raum für Interpretation und bedarf weiterer Analysen. Die abweichenden Ergebnisse der Bcl-xL, Mcl-1, Pim1 und Pim2-Expression könnten, trotz vergleichbarer Morphologie erythroid-myeloischer Progenitorzellen,

auf mögliche Stat5-regulierte Expressionsunterschiede Bcr-Abl transformierter K562- und Jak2(V617F)-transformierter HEL-Zellen, im Zusammenspiel mit Zelllinien-spezifischen transkriptionellen Co-Faktoren, zurückgeführt werden. Diese Theorie wird unterstützt durch die Analyse einer Stat5-Deletion in Jak2(V617F)-positiven Knochenmarkszellen eines Mausmodells für Polycythaemia vera (PV), welche keine Veränderung der Bcl-xL Expression erkennen ließ (Walz et al., 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass Bcr-Abl im Gegensatz zu Jak2(V617F) eine Expansion und Differenzierung erythroider Zellen, wie im Falle einer PV- oder AML-M6-Erkrankung, unter anderem über erhöhte Ras/Raf/Mek/Erk und Stat5-vermittelte Signale inhibiert und eine Anämie zur Folge hat (Tokunaga et al., 2010). So resultiert eine Bcr-Abl Inhibierung neben der Apoptose-Induktion in einer erythroiden Differenzierung von K562- und Ku812-Zellen (Brozik et al., 2006; Kawano et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte in HEL-Zellen eine im Vergleich zu K562-Zellen signifikant erhöhte Expression des Erythroleukämie-assoziierten Transkriptionsfaktors PU.1 (Irino et al., 2011) sowie eine Erhöhung weiterer, Stat5-regulierter Faktoren wie dem Co-Repressor ID1 oder dem gp130-Liganden LIF festgestellt werden, welche zudem mit der Sicherung der Überlebensfähigkeit dieser Zelllinie in Verbindung gebracht wurden (Salas et al., 2011; Wood et al., 2009). Diese phänotypischen Unterschiede Bcr-Abl-vermittelter CML und Jak2(V617F)-vermittelter PV und AML(M6) bekräftigen die Theorie einer differentiellen Genexpressionsregulation durch Stat5, mit der Abhängigkeit beider Zelllinien gegenüber unterschiedlicher Stat5-Zielgene. Dabei darf jedoch auch nicht außer Acht gelassen werden, dass die konstitutiv aktive Jak2(V617F)-Mutante, im Gegensatz zu Bcr-Abl, auch weitere Mitglieder der Stat-Familie, v.a. Stat3, an ihren kritischen Tyrosinrest phosphoryliert (Abb. 3-2). Da die in dieser Arbeit analysierten Stat5-Zielgene mehrheitlich auch durch Stat3 reguliert werden können, wäre somit auch ein kompensatorischer Einfluss von Stat3 nach Stat5-Knockdown in der HEL-Zelllinie denkbar. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine durchgeführte Genexpressionsstudie von Patienten mit essentieller Thrombozythämie (ET), eine unreife Thrombozyten betreffende Form myeloproliferativer Erkrankungen. ET-Patienten welche keine Expression der Jak2(V617F)-Mutante aufwiesen, zeigten neben reduzierter Stat5-Aktivität auch eine deutliche Reduktion der Stat3-Tyrosinphosphorylierung, einhergehend mit signifikant reduzierter SOCS2- und Pim1-Expression (Schwemmers et al., 2007). Dies würde auch die unveränderte Expression der nach Stat5-Knockdown getesteten SOCS-Gene erklären, wobei zusätzlich zu der basal Stat3-vermittelten SOCS-Expression in Jak2(V617F) positiven HEL-Zellen, womöglich eine zelluläre IFN-Sekretion, als Reaktion auf die Virusinfektion, über die Aktivierung weiterer Mitglieder der Stat-Familie, v.a. Stat3 und Stat1, zu den gegenüber uninfizierten Zellen gesteigerten Expressionsraten der SOCS-Proteine geführt hat (Abb. 3-13). Die Hypothese, dass

das bestehende Vakuum Jak/Stat-vermittelter Signalgebung, in Folge des Verlustes eines Stat-Proteins, durch andere Mitglieder der Stat-Familie aufgefüllt bzw. aufgefangen werden kann, wird zusätzlich durch eine Studie von 2007 untermauert. Nach einer Deletion von Stat5 in Hepatozyten, konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Stat1 und Stat3 sowohl in der Lage waren Stat5-Bindungsstellen des aktivierten GH-Rezeptors zu besetzen, als auch in der Folge die normalerweise GH-Stat5-vermittelte Expression entsprechender Response-Gene zu induzieren (Cui et al., 2007b).

Als Folge einer Kompensation der transkriptionellen Stat5-Aktivität durch konstitutiv aktives Stat3, würde man in Jak2(V617)-positiven HEL-Zellen jedoch einen abgeschwächten antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Effekt durch den Transfer Stat5-gerichteter shRNA vermuten. Die Färbung der Zellen mit AnnexinV und 7-AAD, die Bestimmung der kumulativen Zellzahl (KZZ) und der Zellviabilität durch XTT-Messung sowie die Analyse der GFP-Expression des infizierten Zellpools offenbarte jedoch ein massives Absterben shRNA-exprimierender Zellen innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen nach der Transduktion. Dabei übertrafen die beobachteten antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Effekte der shRNA, in ihrer Intensität, teilweise sogar die erzielte Wirkung in der K562-Zelllinie, was neben einer Inhibierung der Expression alleinig durch Stat5-regulierter Gene auf zusätzliche, für das Überleben der Zellen essentielle Stat5-Aktivitäten in der HEL-Zelllinie schließen lässt. In den vergangenen Jahren mehrten sich Hinweise über nicht-kanonische Aktivitäten sowohl unphosphorylierter als auch phosphorylierter Stat-Proteine. Die Arbeitsgruppe um Harir, Moriggi und Gouilleux konnte sowohl nach Transplantation muriner Knochenmarkszellen, welche die konstitutiv aktive Stat5-Mutante cS5^f (S710F) exprimierten, als auch in primären hämatologischen Neoplasien myeloischen Ursprungs und in neoplastischen c-Kit(D816V) positiven Mastzellen eine vorrangig zytoplasmatische Lokalisation tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine identifizieren, was auf eine zusätzliche Funktion von Stat5 bei der Pathogenese der Leukämie schließen lässt. In diesem Zusammenhang konnte eine Korrelation zwischen Stat5-Aktivierung und der Steigerung, für eine leukämische Transformation entscheidender, PI3K/Akt/mTOR-Signalgebung festgestellt werden. Über eine direkte Interaktion tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine mit dem Adaptorprotein Gab2 und der regulatorischen p85-Untereinheit der PI3K kommt es zur Formierung eines aktiven Signalkomplexes welcher in der Folge, durch Phosphorylierung verschiedener Substrate, wie membrangebundene Phospholipide, die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt unterstützt (Harir et al., 2008; Harir et al., 2007). Durch Gab2-Deletion und die Anwendung von PI3K- und mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin, konnte die Existenz dieses Mechanismus in Gegenwart konstitutiver Stat5-

Aktivität, u. a. in K562-Zellen, bestätigt werden (Li et al., 2010). Anhand dessen liegt die Vermutung nahe, dass das hohe Maß an Stat5-Abhängigkeit der Jak2(V617F)-positiven HEL-Zelllinie, womöglich auf einer wesentlichen Unterstützung der wachstumsinduzierenden und antiapoptotischen PI3K/Akt/mTOR-Signalgebung basiert. Unterstützt wurde diese Vermutung durch das Anfertigen fraktionierter HEL-Zelllysate, welche, im Vergleich zu der K562-Zelllinie, eine nahezu ausschließliche Präsenz phosphorylierter Stat5-Proteine in Proteinextrakten des Zytoplasmas erkennen ließen (Abb. 3-38C). Auf welchem Wege eine Jak2(V617F)-Mutation in HEL-Zellen jedoch zu einer gesteigerten zytoplasmatischen Co-Faktor-Aktivität phosphorylierter Stat5-Proteine führt, während Stat5 in Bcr-Abl exprimierenden K562-Zellen sowohl in Kern als auch Zytoplasma aktiv ist, bleibt bis hier ungeklärt, bedarf jedoch weiterer, vergleichender Analysen unter Einbeziehung der Expression und Aktivität verschiedener Kaskaden bzw. einzelner Komponenten, wie Gab2/PI3K/Akt/mTOR. Im Gegensatz zu der leukämischen HEL-Zelllinie führte die Induktion einer stabilen Jak2(V617F)-Expression in Epithelzellen der Brustdrüse zu einer nukleären Akkumulation von P-Stat(Tyr), was den Einfluss des Zelltyps und des Stadiums einer Tumorerkrankung auf die Stat5-Aktivität und Lokalisation, im Zusammenspiel mit bestimmten zellulärer Komponenten, unterstreicht (Caffarel et al., 2012). Neuerliche Hinweise deuten darauf hin, dass die Stat5-Serinphosphorylierung und die Aktivität von Src-Kinasen an der zytoplasmatischen Retention von Stat5 in Leukämien beteiligt sind (Chatain et al., 2012) (Hoelbl-Kovacic et al., 2013; unveröffentlichte Daten)

4.1.3 ANALYSE DER STAT5-ABHÄNGIGKEIT AML1-ETO TRANSFORMIERTER AML & SOLIDER TUMORZELLEN

Mehr noch als die HEL-Zelllinie lieferten jedoch die getesteten Tumorzelllinien ohne bzw. mit minimaler Phosphotyrosin-vermittelter Stat5-Aktivität Hinweise auf essentielle, nicht-kanonische Stat5-Aktivitäten, nach durchgeführtem Stat5-Knockdown. Die basalen Unterschiede der Stat5-Tyrosinphosphorylierung unter normalen, serumhaltigen Zellkulturbedingungen, ohne zusätzliche Zytokin- oder Hormon-Supplementation, verdeutlichten den generellen Einfluss Leukämie-assoziiertes Onkoproteine auf die Stat5-Aktivierung, während einer Aktivierung von Stat5 in soliden Tumoren andere Mechanismen, wie Rezeptor-Überexpressionen oder auto- und parakrine Liganden-Sekretionen innerhalb der Tumormikroumgebung, zu Grunde liegen (Vergleich Abb. 3-2 & 3-4). Aufgrund einer nicht detektierbaren Stat5-Tyrosinphosphorylierung konnte zudem von einer Stat5-unabhängigen leukämischen Transformation der AML-Zelllinie

Kasumi-1, über das AML-assoziierte Translokationsprodukt AML1-ETO ausgegangen werden. Auch wenn die Vitalität der Kasumi-1 Zelllinie generell von einer Virusinfektion beeinflusst schien, resultierte der induzierte Stat5-Expressionsstopp nach shRNA-Transfer, wie auch in der T-47D Mammakarzinom und der epidermoiden Karzinomzelllinie A431, welche keine oder nur geringe Mengen an tyrosinphosphoryliertem Stat5 aufwiesen, in einer deutlichen Reduktion von Wachstum und Viabilität (Abb. 3-14 bis 3-16). Ein zytotoxischer Effekt übermäßiger shRNA-Expression, konnte hierbei erneut durch parallele Transduktion einer Kontroll-shRNA, unter Verwendung gleicher Viruspartikel-Mengen (Leukämiezellen: MOI=50 / adhärenzte Tumorzellen: MOI=20) ausgeschlossen werden. Am stärksten wirkte sich der shRNA-Transfer jedoch auf die Viabilität und Proliferation der PC-3 Zelllinie aus und führte zu einem kompletten Absterben der Zellen in der Zellkultur nach drei bis vier Wochen. Da diese Prostatakarzinomzelllinie in Folge einer Deletion des Stat3- und Stat5B-Gens durch eine alleinige Stat5A-Expression charakterisiert ist (Clark et al., 2003), lässt sich dieser Effekt unter anderem auf einen effizienteren Knockdown und eine fehlende Kompensation durch Stat3 zurückführen. Zusätzlich wiesen PC-3 Zellen im Vergleich der hier getesteten soliden Tumorzelllinien das höchste Maß an Stat5-Tyrosinphosphorylierung auf, was ebenfalls auf eine gesteigerte Stat5-Abhängigkeit dieser Zelllinie, hinsichtlich des Erhalts von Wachstum und Viabilität, hindeutete. Die Phosphorylierung von Stat5 bzw. Stat5A in PC-3 Zellen lässt sich auf autokrine Prl-Signale zurückführen (Dagvadorj et al., 2007) und wird zudem durch eine geringe Expression von SOCS-Proteinen stabilisiert (Evans et al., 2007). In Hormon-refraktären Prostatakarzinomen, wie der PC-3 Zelllinie, konnte eine coaktivierende Interaktion zwischen dem Androgenrezeptor (AR) und über autokrines Signaling aktivierte Stat5-Dimere festgestellt werden (Tan et al., 2008). Über eine gesteigerte nukleäre Translokation und transkriptionelle Aktivität beider Proteine resultiert diese Interaktion in aggressiven Wachstum und einer vermehrten Inhibierung der Apoptose. Dieser Mechanismus erscheint auch für die PC-3 Zelllinie als wahrscheinlich und würde eine zusätzliche Erklärung für das hohe Maß an Stat5-Abhängigkeit liefern. In der Literatur ließen sich keine vergleichenden Angaben RNA-Interferenz-basierter Ansätze einer Stat5-Inhibierung in PC-3 Zellen finden. Der Einsatz von Stat5-gerichteter siRNA oder Antisense-Oligonukleotiden in der ebenfalls Hormon- bzw. Androgen-resistenten DU145- als auch Androgen-sensitiven LNCaP-Prostatakarzinomzelllinie, offenbarte jedoch ähnlich drastisch Apoptose-induzierende Effekte (Gu et al., 2010; Thomas et al., 2011). Von einem viralen Transfer dominant-negativer Stat5-Mutanten erwies sich die Viabilität der PC-3 Zelllinie, im Gegensatz zu der Androgen-sensitiven LNCaP-Zelllinie, allerdings unbeeinflusst (Ahonen et al., 2003; Gu et al., 2010), was sich womöglich auf eine erhöhte Resistenz Hormon-refraktärer Prostatakarzinome gegenüber

dominant-negativem Stat5 in Folge coaktivierender AR-Interaktionen zurückführen lässt. In Melanomen und epidermoiden Karzinomen korreliert die Mehrheit über Amplifikationen von ErbB-Rezeptoren oder mutierten Tyrosinkinase wie Src oder Pyk2-vermittelte Stat5-Phosphorylierung mit der Zunahme aggressiven Wachstums und der Resistenzentwicklung gegenüber der standardmäßig angewandten adjuvanten IFN- α Behandlung (Hassel et al., 2008; Wellbrock et al., 2005). Der Einsatz einer dominant-negativen Stat5-Mutante (Hassel et al., 2008) oder von siRNA, entweder sowohl gegen Stat5A und Stat5B (Wellbrock et al., 2005) oder gegen das häufig verstärkt in Melanomen überaktive Stat5B (Mirmohammadsadegh et al., 2006), offenbarte eindeutige apoptoseinduzierende und wachstumshemmende Effekte einer Stat5-Inhibierung in Melanom-Zelllinien. Diese fielen in ihrer Intensität jedoch nicht so drastisch, wie im Falle des hier durchgeführten Stat5-Knockdowns in A431-Zellen aus. Im Gegensatz zu PC-3 und T-47D Zellen schien sich die A431-Zelllinie jedoch bereits nach etwa zwei Wochen von dem Stat5-Knockdown wieder zu erholen. Ein Silencing-Effekt des U6-Promotors sowie ein Entgegenwirken apoptotischer Signale durch eine kompensatorische Stat3-Aktivität oder eine Aktivierung weiterer antiapoptotischer Signalkaskaden erschienen hierbei als wahrscheinliche Mechanismen. Die ER- und PrlR-überexprimierende T-47D Zelllinie wurde in der Vergangenheit als Modellzelllinie für die Analyse gegenläufiger Stat3- und Stat5-Effekte in Brusttumoren eingesetzt. Hierbei konnte ein dominanter Einfluss von Stat5 in Gegenwart aktivierender Prl-Signale festgestellt werden, welcher dem aggressiv wachsenden und invasivem Stat3-vermitteltem Phänotyp durch die Regulation bestimmter Gene wie E-Cadherin oder Bcl6 entgegenwirkt und eine Differenzierung unterstützt (Walker et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde eine Inhibierung von Stat5, durch dominant-negative Mutanten oder RNA-Interferenz basierte Ansätze, in der Vergangenheit mehrheitlich zur Aufklärung der diesem Prozess zu Grunde liegenden Mechanismen, in Gegenwart aktivierender Liganden wie Prl oder ER, in T-47D Zellen angewendet (Fox et al., 2008; Gutzman et al., 2007). Yamashita, Gu und Sultan et al. konnten jedoch auch apoptoseinduzierende und antiproliferative Effekte einer dominant-negativen Stat5-Expression in uninduzierten T-47D Zellen zeigen (Gu et al., 2010; Sultan et al., 2005; Yamashita et al., 2003; Yamashita et al., 2004), welche jedoch mehrheitlich schwächer ausfielen im Vergleich zu den hier beobachteten Effekten eines Stat5-Knockdowns nach shRNA-Transduktion.

Zusammenfassend deutete die starke Beeinträchtigung zellulärer Viabilität nach shRNA-Transfer, v. a. im Falle der Kasumi-1 und T-47D Zelllinien, welche im uninduzierten Zustand eine erhöhte Stat5-Expression, aber kaum detektierbare Mengen an Stat5-Tyrosinphosphorylierung aufwiesen, auf eine generelle Abhängigkeit von der Stat5-Expression hin und lässt, hinsichtlich

der Regulation zellphysiologischer Prozesse, eine starke Einflussnahme bzw. hohe Funktionalität des Stat5-Proteins, zusätzlich zu der Aktivität als Transkriptionsfaktor, vermuten. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Analyse des Stat5-Knockdown in der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116, wo eine nicht detektierbare Stat5-Tyrosinphosphorylierung und generell geringe Stat5-Expression mit einem minimalen Effekt der shRNA korrelierte. Die Durchführung eines konditionalen Stat5-Knockouts in Maus-Epithelzellen der Darmmukosa resultierte in einer Auflösung von Tight Junctions und einem Verlust der Integrität der intestinalen Barriere in Folge der Aufhebung einer Stat5-genrepressorischen Aktivität und NF- κ B-vermittelter Myosinphosphorylierung (Gilbert et al., 2012). Dieser Effekt würde eine mögliche Erklärung für die anfänglich beobachtete Beeinflussung der HCT116-Viabilität durch Stat5-Knockdown liefern, welche durch IFN-vermittelte NF- κ B-Aktivierung nach Virusinfektion zusätzlich gesteigert wird und mit einer Auflösung des Zell-Monolayers einhergeht. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass sich HCT116-Zellen von einer Expression dominant-negativen aber DNA-bindenden Stat5's in der Vergangenheit komplett unbeeinflusst zeigten (Gu et al., 2010). Wie bereits erwähnt, haben sich in den vergangenen Jahren die Hinweise verdichtet, dass Stat-Proteine, zusätzlich zu ihrer transkriptionellen Aktivität, verschiedene, für das Überleben einer Zelle essentielle, regulatorische Funktionen ausüben können (Groner & Hennighausen, 2012; Mohr et al., 2012). Entgegen ursprünglicher Beobachtungen konnte zudem gezeigt werden, dass unphosphorylierte Stat1-, Stat3- und Stat5-Proteine nicht ausschließlich latent im Zytoplasma vorliegen, sondern sowohl als Monomere oder strukturell antiparallele Dimere (Bernado et al., 2009; Mao et al., 2005; Neculai et al., 2005), über einen Energie- und Carrier-unabhängigen Mechanismus, in der Lage sind permanent zwischen Zytoplasma und Nukleus zu translokieren (Iyer & Reich, 2008; Liu et al., 2005; Marg et al., 2004). Als Folge dessen konnten diese Vertreter der Stat-Familie, unabhängig von einer Tyrosinphosphorylierung, in allen Zellkompartimenten vorgefunden werden, was eine Ausübung nicht-kanonischer Funktionen unterstützt. Neben der zuvor anhand der Beispiele Gab2, PI3K und des AR genannten Aktivität von Stat5 als Co-Faktor bzw. Co-Aktivator, sind weitere nicht-kanonische Funktionen von Stat5 dokumentiert, deren Verlust in Folge des durchgeführten Stat5-Knockdown den stark wachstumshemmenden und apoptoseinduzierenden Effekt der shRNA erklären würde. In einer Studie von 2012 konnte gezeigt werden, dass unphosphoryliertes Stat5, v.a. Stat5A, in Gefäßendothel-, glatten Muskel- und MEF-Zellen mit dem Golgi-Apparat, dem rauen ER und Mitochondrien assoziiert vorliegt und sich essentiell auf den Erhalt von Struktur und Funktion dieser Organellen auswirkt. Ein Stat5-Knockdown mit siRNA resultierte in einer Deformierung dieser Organellen, mit der Ausdehnung und

Fragmentierung von Golgi-Zisternen, der Veränderung der tubulären ER-Struktur zu einer bläschenartigen zystoiden Struktur, einer Distorsion des Nukleus sowie einem Auflösen der Struktur und Funktion von Mitochondrien (Lee et al., 2012). Das äußere Erscheinungsbild dieser Zellen, mit einer Abrundung und dem Verlust zytoplasmatischer Fortsätze, ähnelte dabei der in dieser Arbeit dokumentierten A431- und PC-3-Morphologie 8 Tage nach dem viralen Transfer Stat5-gerichteter shRNA (Abb. 3-15). Durch eine coaktivierende Interaktion mit der E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, konnte zudem ein genregulatorischer Einfluss tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine in Mitochondrien identifiziert werden, welcher sich womöglich entscheidend auf mitochondriale Funktionen, Atmungskette und Energiestoffwechsel sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Zuständen auswirkt (Chueh et al., 2011; Chueh et al., 2010). Eine Präsenz des transkriptionell aktiven Stat5-E2 Komplexes im Nukleus wird dabei ebenfalls nicht ausgeschlossen. Obwohl es noch nicht gelungen ist den Mechanismus vollends auf Säugetierzellen zu übertragen (Brown & Zeidler, 2008; Li, 2008), muss im Zusammenhang mit nicht-kanonischen Stat5-Aktivitäten ebenfalls die in *Drosophila* entdeckte Formierung kondensierten Heterochromatins über die Komplexierung mit HP1 und dem Stat5-Ortholog Stat92E, im monomeren, unphosphorylierten Zustand, genannt werden (Shi et al., 2008; Yan et al., 2011). Denn sollte unphosphoryliertes Stat5 essentiell an der Formierung und Stabilisierung von Heterochromatin und dem daraus resultierenden Schutz vor genotoxischen Noxen beteiligt sein, würde dies eine weitere Erklärung für den apoptoseinduzierenden Effekt der shRNA liefern, welcher unabhängig von einer sonstigen essentiellen Stat5-Aktivität als Transkriptionsfaktor zusätzlich zu tragen käme. Die unter physiologischen Bedingungen, im Vergleich zu anderen Genen, zwar variierenden, aber dennoch ubiquitär im Organismus auftretenden hohen Stat5-Expressionsraten (im Schnitt 3×10^3 bis 1×10^5 Moleküle pro Zelle (Kornfeld et al., 2008)), lassen eine vielseitige Beteiligung von Stat5 an Regulationsmechanismen wie dem Erhalt von Struktur und Funktion von Mitochondrien, dem Golgi-Apparat oder Heterochromatin, neben der Aktivität als Transkriptionsfaktor, wahrscheinlich erscheinen. Bei einer Korrektheit dieser Mechanismen muss jedoch, u.a. bei Betrachtung der minimalen Stat5-Expression in HCT116-Zellen, von einer variierenden Stat5-Abhängigkeit unterschiedlicher Zelltypen, womöglich erneut in Folge einer Kompensation durch andere Stat-Proteine, ausgegangen werden.

Dennoch verdeutlichen die hier aufgeführten Studien nicht-kanonischer Funktionen im Zusammenhang mit verschiedenen Stat5-Knockout-Studien (Cui et al., 2007b; Grebien et al., 2008; Hoelbl et al., 2006; Kerenyi et al., 2008; Yao et al., 2006) und den in dieser Arbeit durchgeführten Knockdown-Experimenten die funktionelle Vielseitigkeit von Stat5 und die

daraus resultierende Abhängigkeit sowohl gesunder als auch neoplastischer Zellen, unterschiedlichster Gewebe, von der Stat5-Expression. Hinsichtlich einer therapeutischen Stat5-Intervention in Tumoren, untermauern diese Erkenntnisse die Notwendigkeit des Einsatzes tumorspezifischer Wirkstoffe oder solcher Wirkstoffe, welche spezifisch in Abhängigkeit vom Tumor nur bestimmte Funktionen von Stat5, wie der Cofaktor- oder DNA-Bindeaktivität, inhibieren und dadurch vom gesunden Gewebe toleriert werden.

4.2 EFFEKTE EINER INTERFERENZ DES S5-DBD-PA PEPTIDAPTAMER-KONSTRUKTS MIT DER DNA-BINDEDOMÄNE VON STAT5

4.2.1 ISOLATION DER S5-DBD-PA PEPTIDAPTAMER-SEQUENZ MIT DEM HEFE-ZWEI-HYBRID SYSTEM

Durch das Screening einer 12mer Peptidaptamer-Library mit dem Hefe-Zwei-Hybrid Verfahren, war es Ziel dieser Arbeit eine Peptidaptamer-Sequenz zu identifizieren, welche spezifisch entweder mit einer für die Transaktivierung und Dimerisierung verantwortlichen Region des humanen Stat5A-Proteins (SH2/TA) oder dessen DNA-Bindedomäne (DBD) (Abb. 3-17) interagiert und dadurch bestimmte Stat5-Funktionen inhibiert. Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus einem Stabilitäts- und Struktur-gebendem Scaffoldprotein und der Target-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz gehören Peptidaptamere, bzw. die zusätzlich mit funktionellen Tags fusionierten Peptidaptamer-Konstrukte, wie auch Antikörper oder scFv-Fragmente, der Klasse kombinatorischer Proteintherapeutika mit strukturell verankerter Protein-Erkennungssequenz an (Colas, 2008). Bei geeigneter Wahl eines nicht-toxischen und biologisch neutralen Scaffold-Proteins mit geringer Größe und anwendbarer Struktur, bietet die Präsentation der Peptidaptamer-Sequenz auf der Oberfläche des Scaffolds in einer starr verankerten, einzigartigen Konformation, neben einer erhöhten Stabilität und Löslichkeit sowie einer vereinfachten und effizienten rekombinanten Herstellung des Inhibitor-Konstruktes, wesentliche Vorteile einer erhöhten Affinität und Spezifität gegenüber der Protein-Zielstruktur (Crawford et al., 2003; Hoppe-Seyler & Butz, 2000; Ladner, 1995). Über die Addition einer Proteintransduktionsdomäne (PTD) sind Peptidaptamere, in Folge ihrer im Vergleich zu

Diskussion

Antikörpern geringen Größe und Disulfidbrücken-unabhängigen Faltung, zudem hinsichtlich einer Anwendung gegen intrazelluläre Zielstrukturen wie Stat5 optimiert (Colas, 2008; Crawford et al., 2003). Basierend auf dem Ziel einer Identifikation von Protein-Interaktionen in einer möglichst physiologischen Umgebung, mit der Einbeziehung posttranslationaler Proteinfaltung und sekundärer Modifikation unter intrazellulären Bedingungen in einem Eukaryonten, hat sich das Hefe-Zwei-Hybrid System, mit all seinen Variationen, als bevorzugtes Peptidaptamer Screening-Verfahren etabliert (Bickle et al., 2006; Hamdi & Colas, 2012). Unter Anwendung der NNK-Kodondefinition wurde eine vollständig randomisierte Peptidaptamer-Library synthetisiert (Abb. 3-18), welche das komplette Spektrum proteinogener Aminosäuren abdeckte. Für den Protein-Interaktionsscreen wurde die Library in das als Schleife aus der Proteinstruktur herausragende katalytische Zentrum des humanen Thioredoxin (hTRX)-Scaffoldproteins integriert. Hierfür wurde zunächst eine Linkersequenz, bestehend aus einer N- und C-terminal durch *Apal/SmaI*-Restriktionsschnittstellen flankierten, unspezifischen 9mer Aminosäuresequenz (Ala-Ile-Gly-His-Met-Ser-Phe-Leu-Val), in das katalytische Zentrum von hTRX kloniert. Über die Klonierung mit *Apal/SmaI* wurde die Library mono-direktional in der NNK-Kodon-Anordnung durch die Linkersequenz ersetzt, was die Stopcodon-Wahrscheinlichkeit auf 3,1 % je Basentriplett senkte und dadurch eine Selektion falsch-positiver Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid Screen wesentlich reduzierte (Abb. 3-20). Durch die Verwendung der Glycin und Prolin kodierenden Restriktionsschnittstellen *Apal* und *SmaI* konnte zudem von einer zusätzlichen Optimierung der Peptidaptamer-Präsentation ausgegangen werden, da eine gewisse Flexibilität des Glycins zum einen die strukturelle Toleranz einer beidseitigen Peptidaptamer-Verankerung, durch die Scaffold-Oberflächenstruktur, erhöht und Prolin sich zum anderen positiv auf ein Hervortreten der zu präsentierenden Peptidaptamersequenz aus der Oberflächenstruktur auswirkt (Borghouts et al., 2008a). Über den Einbau der Peptidaptamer-Sequenzen in das katalytische Zentrum von hTRX wurde zudem eine Aufhebung der hTRX-Enzymfunktion erzielt und die Verwendung eines biologisch neutralen Scaffold-Proteins gewährleistet. Der Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde mit dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm KF1 durchgeführt, welcher, durch einen schwachen Promotor des *Ura3*-Reportergens für die Uracil-Biosynthese, eine Identifikation stärkster Protein-Interaktionen auf hochstringenten Selektionsnährböden, unter Uracil-Mangel, ermöglichte. Insgesamt wurden 4 Library-Screens, je 2 gegen die SH2/TA- und die DBD-Zielstruktur durchgeführt, wobei je Screen etwa $1,5 - 2,5 \times 10^6$ Hefezellen mit klonierten Library-Vektoren transformiert werden konnten. Die Tatsache, dass am Ende dabei nur eine vielversprechende Peptidaptamer-Interaktion mit der Stat5-DBD unter hochstringenten Bedingungen identifiziert werden konnte, verdeutlichte die geringe

Wahrscheinlichkeit starker Proteininteraktionen zwischen kurzen Peptidaptamer-Sequenzen mit einer bestimmten Protein-Zielstruktur. Trotz des anschließenden Nachweises einer starken Proteininteraktion zwischen der identifizierten, durch den hTRX-Scaffold präsentierten 12mer Peptidaptamer-Sequenz als Prey und der Stat5-DBD als Bait, mit dem Hefe-Zwei-Hybrid Tropfplatten- und β -Galactosidase-Test (Abb. 3-22), muss bei einer Library-Gesamtdiversität von 3×10^{15} möglichen Sequenzen jedoch von einer Präsenz noch stärker interagierender Peptidaptamere ausgegangen werden. Entsprechend einer Sequenzhomologie von 42% ergab der Tropfplattentest eine zusätzliche, aber wesentlich geringere Affinität des Peptidaptamers gegenüber der DNA-Bindedomäne von Stat3. Eine Beeinflussung der Viabilität Stat3-abhängiger Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem Peptidaptamer konnte jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund einer 97%igen Identität der DBD-Aminosäuresequenz des humanen Stat5A- und Stat5B-Proteins ist von einer ebenfalls nahezu identischen Spezifität und Bindungsaffinität des Peptidaptamers gegenüber der Stat5B-DBD ausgegangen und auf eine zusätzliche Validierung verzichtet wurden.

4.2.2 *IN VITRO* APPLIZIERBARKEIT DES S5-DBD-PA PEPTIDAPTAMER-KONSTRUKTS

Wie einleitend bereits erwähnt wurde als Grundgerüst für eine Applikation des Stat5-DBD spezifischen Peptidaptamers (S5-DBD-PA), als rekombinantes, zellpenetrierendes Protein in humanen Zelllinien, eine zuvor durch Mitglieder der Arbeitsgruppe für die Proteinaufreinigung optimierte hTRX-Variante (hTRX Δ cys5) als Scaffold verwendet. Die Substitution von 2 Cysteinresten im aktiven Zentrum durch Glycine und weiterer 3 Cysteinreste im C-terminalen Teil des Proteins durch Serine (Abb. 3-23), führte in Folge einer Vermeidung des Ausfallens der Proteine durch Disulfid-Interaktion, während des Aufreinigungs- und Dialyseprozesses, zu einer deutlichen Effizienzsteigerung der Herstellung rekombinanter Peptidaptamer-Konstrukte. Der Austausch der für die Funktion als Redoxenzym entscheidenden Cystein-Reste im aktiven Zentrum, stellte dabei, zusätzlich zur Integration der Peptidaptamer-Sequenz, die biologische Neutralität des hTRX Δ cys5-Scaffolds sicher. Über die Verwendung des hTRX Δ cys5-Scaffolds wurde die Stabilisierung funktioneller S5-DBD-PA-Monomere in Lösung, sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen, gewährleistet (Abb. 3-24C). Erst in etwa ab dem 3. bis 4. Tag einer täglichen Medium-Applikation rekombinanter S5-DBD-PA-Proteine waren mikroskopisch abgesetzte Proteinaggregate geringer Größe auf dem Boden der

Zellkulturgefäße zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Ergänzend sei hierbei noch erwähnt, dass es sich bei dem als Prey-Fusionsprotein mit der Gal4-AD exprimiertem hTRX-Scaffold, für die Peptidaptamer-Selektion in Hefen, ebenfalls um die optimierte hTRX Δ cys5-Variante handelte. Wie essentiell das hTRX Δ cys5-Scaffoldprotein für eine inhibitorische Wirkung der Target-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz als Gesamtkonstrukt ist, zeigte eine vergleichende Studie mit dem Stat3-interferierenden rS3-PA Peptidaptamer. Während die Oberflächenpräsentation dieser 20mer Peptidaptamer-Sequenz, nach stabiler Integration in das katalytische Zentrum von hTRX Δ cys5, bereits bei einer Mediumkonzentration von etwa 2 μ M zu einem antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Effekt des rekombinanten Inhibitors in Stat3-abhängigen Tumorzelllinien führte, mussten zum Erzielen vergleichbarer Effekte 100 μ M der ungebundenen und flexiblen 20mer Peptidaptamer-Sequenz eingesetzt werden (Schoeneberger et al., 2011). Aufgrund der energetisch günstigeren Bindungseigenschaften strukturell verankerter Peptide, weisen Peptidaptamere mit Scaffold um bis zu 100-1000fach erhöhte Bindungsaffinitäten gegenüber strukturell flexiblen Peptidaptamer-Sequenzen auf (Geyer & Brent, 2000). Für die Aufnahme von S5-DBD-PA in die Zielzellen (Proteintransduktion) über den Rezeptor-unabhängigen, Lipid Raft-abhängigen Prozess der Makropinozytose (siehe Kap. 1.4), wurde das rekombinant hergestellte Konstrukt mit einer PTD, bestehend aus 9 aufeinanderfolgenden L-Argininresten (9-R), fusioniert (Abb. 3-24A). Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante 9-R gekoppelte Proteine um den Faktor 20 erhöhte Transduktionsraten gegenüber der ursprünglichen, aus dem HIV-TAT Protein abgeleiteten Arginin-reichen und zellpenetrierenden 9mer Peptidsequenz (CPP) aufweisen (Suzuki et al., 2002; Wender et al., 2000). Eine hohe Transduktionseffizienz des rekombinant hergestelltem S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstruktes und hTRX-Scaffold-Kontrollproteins, mit integrierter unspezifischer 9mer Linkersequenz, konnte in dieser Arbeit ebenfalls in den Zielzellen nach Medium-Applikation, wie im Falle Immunfluoreszenz-gefärbter K562 Zellen (Abb. 3-38B) nach 4-stündiger Inkubation (Endkonzentration: 4 μ M), beobachtet werden. Die dabei auftretende, relativ gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zelle ließ auf eine Freisetzung der Proteine aus Endo- und Lysosomen schließen. Das PTD-gekoppelte Proteine nach einer Aufnahme in die Zelle über Lipid Raft-abhängige Makropinozytose und anschließender endosomaler Einschnürung tatsächlich einer Degradation im Lysosom entkommen und biologisch aktiv sind, zeigte eine Studie mit lysosomalen Inhibitoren, welche keinen Einfluss auf die im Zytosol vorkommenden Mengen der Proteine und deren Aktivität hatten (Caron et al., 2004). Der genaue Mechanismus dieser endosomalen Freisetzung ist bislang nicht vollends aufgeklärt. Ein Einfluss Arginin-reicher PTDs bzw. CPPs erscheint hierbei, in Folge von Membranfusionen und pH-Wert gesteuerter

Porenbildung, jedoch ebenfalls maßgeblich (El-Sayed et al., 2009). Hierbei sei zu erwähnen, dass die Identifikation weiterer viraler Peptidsequenzen sowie bestimmter Peptidsequenzen bakterieller Toxine, welche eine endosomale Freisetzung vermitteln und daher für eine Applikation von biologischen Wirkstoffen auf Protein, RNA- oder DNA-Ebene nutzbar gemacht werden können, Gegenstand derzeitiger Forschung sind (Varkouhi et al., 2011) und in Zukunft zu einer Effizienzsteigerung von Peptidaptameren beitragen könnten.

Als weitestgehend Endosomen-unabhängig erweist sich eine endogene Peptidaptamer-Expression in Zielzellen durch viralen Gentransfer. Die Transduktion der Zielzellen mit VSV-G pseudotypisierten Lentiviren, unter Verwendung des aus dem HIV-1 Genom abgeleiteten SiEW Transfervektor mit SIN-Konfiguration (Abb. 3-25), führte zu einer stabilen Expression beider Konstrukte über einen mehrwöchigen Zeitraum. Die endogene Expression des hTRX-Scaffold-Kontrollkonstruktes zeigte dabei keine wesentliche Beeinflussung zellulärer Viabilität, was die biologische Neutralität und den nicht-toxischen Charakter des hTRX-Grundgerüsts und den dazu gehörigen funktionellen Flag, NLS, 9-R und Histidin-Tags unterstrich. Ein zytotoxischer Effekt der 9-R PTD, in Folge einer nach endogener Expression nicht auszuschließenden permanenten Interferenz mit Membranen zellulärer Organellen, konnte dadurch ebenfalls ausgeschlossen werden. Somit boten beide Varianten einer viralen Transduktion und Proteintransduktion die Möglichkeit einer effizienten Peptidaptamer-Applikation (Abb. 3-24E). Allerdings sei erwähnt das der virale S5-DBD-PA Transfer in murine Tumorzellen, neben schwächeren Infektionsraten bei gleicher Virusmenge (gemessen am Anteil GFP-positiver Zellen), generell deutlich schwächere Expressions-Level von S5-DBD-PA und hTRX hervorbrachte (Daten nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt ist für eine Anwendung in dem zellulären Background humaner Tumorzelllinien sowie für einen möglichen therapeutischen Einsatz im Menschen, auf das am häufigsten als Peptidaptamer-Scaffold verwendete, bakterielle Thioredoxin Ortholog (TrxA) verzichtet worden. Wie TrxA weist hTRX eine Länge von 105 Aminosäuren auf. Da die Aminosäuresequenzen beider Proteine jedoch nur zu 30% homolog sind (Borghouts et al., 2008a), wurde von einer erhöhten Immunogenität von TrxA im Menschen ausgegangen. Für eine Anwendung von S5-DBD-PA im zellulären Background muriner Tumorzellen erwies sich der hTRX-Scaffold, nach viraler Transduktion, jedoch als ungeeignet. Über den weitestgehend Zelltyp unabhängigen, starken SFFV-Promotor des SiEW-Transfervektors gesteuert, wiesen positiv transduzierte murine Tumorzellen eine stabile GFP-Expression auf. Trotz einer gemeinsamen Regulation durch den SFFV-Promotor und einer messbaren stabilen Transkription der transgenen mRNA, ließen sich, im Gegensatz zum GFP-Protein, jedoch nur geringste S5-DBD-PA und hTRX-Proteinmengen in den Zellen detektieren, was eine geplante Durchführung von Maus-

Transplantationsversuchen, mit lentiviral transduzierten leukämischen Knochenmarkszellen der Maus, unmöglich machte. Dieses Resultat ließ vermuten, dass hTRX einer stark erhöhten proteasomalen Degradation im Background muriner Zellen unterliegt. Um diese Hypothese zu überprüfen und um den Effekt einer endogenen S5-DBD-PA Expression *in vivo* zu ermöglichen, ist eine vergleichende, transgene Expression des murinen Thioredoxin Orthologs in einem nächsten Schritt erforderlich.

4.2.3 VALIDIERUNG DER S5-DBD-PA/STAT5-INTERAKTION

Über die Durchführung von Co-Immunopräzipitations-Experimenten konnte die in Hefen durch Zwei-Hybrid Interaktion identifizierte Bindung der Gal4(DBD)/Stat5-DBD und Gal4(AD)/S5-DBD-PA Fusionsproteine für das klonierte und in den Zielzellen eingesetzte S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukt bestätigt werden. Hierbei ließ sich Stat5 sowohl *in vitro*, aus einem Gemisch mit rekombinanten Proteinen, als auch unter intrazellulären Bedingungen („*in vivo*“), nach Proteintransduktion und viraler Transduktion von K562 CML-Zellen, mit dem S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukt, über einen Flag-Antikörper, co-immunopräzipitieren (Abb. 3-26 & 3-39). Dabei ließen sich minimale unspezifische Bindungen des hTRX-Scaffold-Kontrollproteins mit Stat5 feststellen, welche aber vorrangig im *in vitro*-Versuchsansatz erkenntlich waren und daher auf das stark erhöhte Mengenverhältnis, beider einzeln im Gemisch vorkommenden Proteine, zurückgeführt werden konnten. Als weiteres wesentliches Indiz einer intrazellulären Interaktion zwischen S5-DBD-PA und Sta5, ließ die Immunfluoreszenzfärbung lentiviral transduzierter K562-Zellen eine deutliche Co-Lokalisation von Stat5 und transgenem S5-DBD-PA, im Vergleich zu dem diffus verteiltem und scheinbar vermehrt mit der Zellmembran assoziiertem hTRX-Protein, erkennen (Abb. 3-27). Ein vergleichbares Ergebnis, wenn auch bei weitem nicht so deutlich, konnte nach 4-stündiger Proteintransduktion beobachtet werden (Abb. 3-38B), wobei sich die Wahl eines geeigneten Inkubationszeitraumes hierbei vermutlich entscheiden auf die Aussagekraft einer Co-Lokalisationsanalyse durch Immunfluoreszenzfärbung auswirkt. Inwiefern die detektierten Areale akkumulierter S5-DBD-PA/Stat5-Komplexe zytoplasmatische oder nukleäre Kompartimente betrafen, ließ sich mit der K562-Zelllinie, in Folge ihrer Morphologie unreifer myeloid-erythroider Progenitorzellen, mit einem nur geringen Zytoplasma-Anteil, konfokal-mikroskopisch nicht feststellen. Eine zusammenhängende Analyse der Stat5-Tyrosinphosphorylierung, durch Immunfluoreszenzfärbung lentiviral transduzierter T-47D Mammakarzinomzellen, in Abwesenheit und in Gegenwart von Prolaktin (Prl), offenbarte jedoch einen markanten Unterschied zwischen der zytoplasmatisch-nukleären Verteilung transgenem

S5-DBD-PA- und hTRX-Proteins (Abb. 3-36C). Während sich das hTRX-Scaffold-Kontrollprotein, unabhängig von einer Prl-Stimulation, nahezu gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt detektieren ließ, resultierte eine Stat5-Aktivierung, durch den in T-47D Zellen überexprimierten Prl-Rezeptor (PrlR), in einer deutlich erkennbaren Umverlagerung des zuvor vorrangig im Nukleus lokalisierten S5-DBD-PA Peptidaptamers ins Zytosol. Auffällig hierbei war, dass die über Tyrosinphosphorylierung formierten aktiven Stat5-Dimere, nach 30-minütiger Prl-Stimulation, ebenfalls nahezu ausschließlich im Zytosol detektierbar waren, während aktives Stat5 in Gegenwart von hTRX in allen Zellkompartimenten vorzufinden war. Die nach Prl-Stimulation visualisierte Co-Lokalisation von S5-DBD-PA und tyrosinphosphorylierten Stat5-Dimeren im Zytosol stellt zum einen ein weiteres Indiz permanenter und spezifischer Peptidaptamer-Interaktion dar und deutet zum anderen auf eine mögliche Inhibierung der nukleären Translokation aktivierter Stat5-Dimere durch die S5-DBD-PA Bindung hin. Die Quantifizierung der Stat5-Tyrosinphosphorylierung nach Prl-Stimulation von T-47D Zellen im Western Blot, ließ zudem eine leichte Reduktion in Gegenwart von interferierendem S5-DBD-PA erkennen (Abb. 3-36B). Beide Sachverhalte sollen im folgenden Kapitel diskutiert werden.

4.2.4 EINFLUSS DES S5-DBD-PA PEPTIDAPTAMERS AUF DIE STAT5-TYROSINPHOSPHORYLIERUNG UND NUKLEÄRE TRANSLOKATION

Die Inkubation von K562 und HEL Zellen mit rekombinanten S5-DBD-PA über 10 h, ließ einen überraschend inhibierenden Einfluss auf die Stat5-Tyrosinphosphorylierung sowie auf die Stat5-Proteingesamtmenge erkennen (Abb. 3-38A). Dieser Effekt betraf v.a. die Bcr-Abl exprimierende K562-Zelllinie, während HEL Zellen eine vergleichsweise nur geringfügige Reduktion, im Falle einer S5-DBD-PA Inkubation in der höheren Konzentration von 2 μ M, aufwiesen. Solch ein Phosphotyrosin-inhibierender Effekt konnte in der Vergangenheit durch Mitglieder der Arbeitsgruppe mit dem rS3-PA Peptidaptamer, als logische Konsequenz einer spezifischen Maskierung der SH2/TA-Region von Stat3 und des dazwischen liegenden kritischen Tyrosinrestes 705, beobachtet werden (Borghouts et al., 2012). Entsprechend einer Interferenz von S5-DBD-PA mit der Stat5-DBD, muss der hier beobachtete Einfluss auf die Phosphorylierung der zwischen der SH2- und TAD-Domäne liegenden, kritischen Tyrosinreste Tyr694 des Stat5A- und Tyr699 des Stat5B-Proteins (Abb. 1-1 & 3-24D) einem anderen Mechanismus zu Grunde liegen. Während der Stat3-Phosphotyrosin inhibierende Effekt von rS3-PA unabhängig vom Zelltyp zum Tragen kam, war hier ein deutlicher Unterschied zwischen der Bcr-Abl exprimierenden K562 und der

Jak2(V617F) exprimierenden HEL-Zelllinie erkennbar. Wie zuvor bereits erwähnt interagieren Stat5 und Bcr-Abl über ihre SH2-Domänen miteinander, wobei der SH3-Domäne des Bcr-Abl Fusionsproteins hierbei eine zusätzlich stabilisierende Rolle bei der Bindung zugesprochen wird, ehe Stat5A bzw. Stat5B an den jeweiligen Tyrosinresten durch die Abl-Kinasedomäne phosphoryliert werden. Obwohl die SH2-Domäne von Stat5 nicht durch S5-DBD-PA maskiert wird, wäre es denkbar, dass die Bindung von S5-DBD-PA an die DBD eines unphosphorylierten Stat5-Monomers zu einer sterischen Behinderung der Bcr-Abl Interaktion führt und womöglich essentielle Andockstellen blockiert werden. Eine Co-Immunoprecipitation von Bcr-Abl und Stat5 nach S5-DBD-PA Behandlung würde diese Theorie untermauern und sollte in einem nächsten Schritt durchgeführt werden. Da die Expression von Stat-Proteinen in der Regel durch Stat-Proteine selbst reguliert wird, kann die mit der reduzierten Stat5-Tyrosinphosphorylierung einhergegangene Abnahme der Stat5-Proteing Gesamtmenge als eine Folge sowohl direkter transkriptioneller Stat5-Inhibierung durch S5-DBD-PA, als auch einer indirekten Inhibitor-Wirkung durch das Blockieren Bcr-Abl-vermittelter Stat5-Aktivierung betrachtet werden. Dieser Mechanismus würde eine Erklärung für die stark variierenden S5-DBD-PA Effekte in K562 und HEL Zellen liefern, wobei im Umkehrschluss von einer S5-DBD-PA unabhängigen, Rezeptor-assoziierten Stat5 Aktivierung durch Jak2(V617F) in HEL Zellen auszugehen ist. HEL Zellen wiesen jedoch ebenfalls eine, wenn auch im Vergleich geringe, Reduktion der Stat5-Tyrosinphosphorylierung auf, weshalb der Mechanismus einer Inhibierung der Bcr-Abl-Stat5 Interaktion durch S5-DBD-PA nicht als alleinige Erklärung dienen kann. Im Falle der Inkubation von K562-Zellen mit S5-DBD-PA in der niedrigeren Konzentration von 1µM, war zudem eine parallel verlaufende Abnahme der im Western Blot detektierten Stat5-Phosphotyrosin- und der S5-DBD-PA Proteinbanden feststellbar, mit einer zusätzlichen Abnahme des Stat5-Gesamtprotein-Levels nach 10h. Durch die Zugabe der doppelten S5-DBD-PA Menge zu den K562 Zellen, konnte die Abnahme intrazellulärer S5-DBD-PA Level, über den Analysezeitraum von 10h, aufgehoben werden. Hierbei war jedoch neben der erneuten Abnahme der Stat5-Tyrosinphosphorylierung auch eine zusätzlich erhöhte Reduktion der Stat5-Proteing Gesamtmenge erkennbar. Diese Ergebnisse deuten auf eine ebenfalls stattfindende proteasomale Degradation der Stat5/S5-DBD-PA Komplexe hin, welche vorwiegend die S5-DBD-PA gebundenen monomeren und dimeren Stat5-Proteine mit Tyrosinphosphorylierung betreffen zu scheint. In Folge eines Verlustes kanonischer und nicht-kanonischer Funktionalität durch die Peptidaptamer-Interaktion, werden die Komplexe aus aktivierten Stat5-Dimeren und S5-DBD-PA, im Vergleich zu Komplexen aus unphosphorylierten Stat5-Monomeren und S5-DBD-PA, womöglich stärker durch die zytoplasmatische Proteasom-Maschinerie erkannt und abgebaut,

was jedoch in einem nächsten Schritt unter Anwendung von Proteasom-Inhibitoren detailliert aufgeklärt werden kann.

Eine stabile transgene Expression von S5-DBD-PA nach lentiviraler Transduktion brachte nahezu vergleichbare, zwischen beiden Zelllinien differentielle Effekte hervor, wobei die Stat5-Tyrosinphosphorylierung im Falle eines permanenten S5-DBD-PA Einflusses in HEL Zellen sogar erhöht gegenüber den Kontrollen (SiEW-Leervektor, SiEW-hTRX) erschien (Abb. 3-30A). Hierbei wäre erneut ein Mechanismus kompensatorischer Anpassung, durch eine im Vergleich zu K562 Zellen erhöhte Stat3-Aktivität, denkbar, welcher aus einer möglichen Inhibierung der transkriptionellen Aktivität und partiellen proteasomalen Degradation von Stat5 durch komplexiertes S5-DBD-PA resultiert und durch eine Stat3-vermittelte Stat5-Expression kompensiert wird. Die Theorie einer direkten und indirekten Inhibierung von Stat5 in K562 Zellen durch S5-DBD-PA, über direkte Interferenz mit der DNA-Bindeaktivität und Inhibierung der Bcr-Abl-vermittelten Stat5-Aktivierung sowie einer möglichen proteasomalen Degradation, konnte durch eine Imatinib-Behandlung nach Virustransduktion zusätzlich untermauert werden. Trotz einer starken Inhibierung der Stat5-Tyrosinphosphorylierung nach Imatinib-Behandlung, durch eine direkte Blockade der Abl-Kinasedomäne, wurde dieser Effekt durch eine zusätzliche Präsenz von S5-DBD-PA, gegenüber den Kontrollen, gesteigert (Abb. 3-34). In HEL Zellen wiederum erwies sich die Stat5-Tyrosinphosphorylierung sowohl von einer Imatinib-Behandlung als auch endogenen S5-DBD-PA Expression als unbeeinflusst. Neben der ebenfalls Bcr-Abl positiven Ku812-CML-Zelllinie (Abb. 3-35A), wirkte sich eine endogene S5-DBD-PA Expression auch inhibierend auf die Stat5-Tyrosinphosphorylierung der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 aus (Abb. 3-37A). Die in diesem Fall, wie zuvor erwähnt, alleinig Stat5A betreffende Tyrosinphosphorylierung, lässt sich nach Angaben der Literatur vorrangig auf autokrine Prl-Signale zurückführen (Dagvadorj et al., 2007). Da eine Inhibierung PrIR-Jak2-vermittelter Stat5-Phosphorylierung durch sterische Blockade der Rezeptorinteraktion, nach S5-DBD-PA/Stat5-DBD Interaktion, in Folge der zuvor beobachteten S5-DBD-PA-unabhängigen Stat5 Aktivierung durch die konstitutiv aktive Jak2(V617)-Mutante, unwahrscheinlich erscheint, unterstützt dieses Ergebnis die Theorie einer erhöhten proteasomalen Degradation S5-DBD-PA gebundener, tyrosinphosphorylierter Stat5-Dimere und -Monomere. Dabei könnte einer proteasomalen Degradation vorausgehend, S5-DBD-PA zudem einer funktionellen Inhibierung des Prostatakarzinom-assoziierten Signalkomplexes aus aktivierten Stat5-Dimeren und aktiviertem AR beitragen und dessen gemeinsame Translokation in den Nukleus inhibieren.

Das S5-DBD-PA, durch Interferenz mit der Stat5-DBD, in der Lage ist eine nukleäre Translokation aktivierter Stat5-Dimere zu inhibieren, erscheint bei Betrachtung der zuvor diskutierten konfokalen Immunfluoreszenz-Aufnahmen lentiviral transduzierter T-47D Zellen, mit und ohne Prl-Stimulation (Abb. 3-36C), als durchaus wahrscheinlich. Im Gegensatz zu der Coiled-Coil Domäne-vermittelten, Carrier-unabhängigen Translokation unphosphorylierter Stat-Monomere und antiparalleler Dimere, erfolgt eine mit wesentlich erhöhter Geschwindigkeit ablaufende nukleäre Translokation paralleler, über Phosphotyrosin-SH2-Interaktion formierter, transkriptionell aktiver Stat5-Dimere α -Importin/Karyopherin- β -abhängig (siehe Kap. 1.2.1). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Transport durch den Porenkomplex der Kernmembran über die spezifische Interaktion von α -Importinen mit einer, in Folge der Konformationsänderung parallel formierter Stat-Dimere, auf der Oberfläche der Stat-DBD exponierten NLS-Sequenz eingeleitet wird (Ma & Cao, 2006; McBride & Reich, 2003; Melen et al., 2003; Reich & Liu, 2006). Im Vergleich einzelner Stat-Proteine lassen sich diese NLS-Sequenzen im Bereich der Aminosäurereste 400 – 420 (ausgehend vom N-Terminus) finden und sind daher zentral in der DBD von Stat-Proteinen lokalisiert. Sollte die NLS-Sequenz von Stat5 durch S5-DBD-PA maskiert werden, würde dies eine Interferenz mit α -Importinen verhindern und eine nukleäre Translokation transkriptionell aktiver Stat5-Dimere inhibieren. Das S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukt verfügt zwar ebenfalls über eine NLS-Sequenz, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese, nach Interaktion mit der Stat5-DBD, ebenfalls unzugänglich ist. Zusätzlich unterstützt wurde diese Hypothese durch das Anfertigen zytoplasmatischer und nukleärer Proteinextrakte von K562-Zellen, welche über 5h mit rekombinanten S5-DBD-PA inkubiert wurden (Abb. 3-38C). In Gegenwart von S5-DBD-PA war die Menge an tyrosinphosphoryliertem Stat5-Protein bzw. an tyrosinphosphorylierten Stat5-Dimeren, gegenüber den Kontrollen, im Nukleus drastisch reduziert und im Zytoplasma leicht akkumuliert, während unphosphoryliertes Stat5-Protein auch im Nukleus detektierbar war. Obwohl die Intensität der nukleären und zytoplasmatischen P-Stat5(Tyr)-Proteinbanden in Summe womöglich nicht ganz der zuvor beobachteten Reduktion des K562- Gesamtzellextrakts, nach 5-stündiger S5-DBD-PA Inkubation, entsprach (Abb. 3-38A), konnte jedoch auch in diesem Experiment von einer deutlichen Inhibierung der Stat5-Tyrosinphosphorylierung gegenüber den Kontrollen ausgegangen werden. Die zuvor aufgestellten Hypothesen einer Inhibierung der Bcr-Abl-vermittelten Stat5-Aktivierung im Zytoplasma durch S5-DBD-PA sowie einer erhöhten proteasomalen Degradation S5-DBD-PA komplexierter, vorwiegend tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine, bleiben dadurch weiterhin bestehen. Denn in der Reihenfolge der Ereignisse kann, bei Korrektheit dieser Hypothesen, von einer initialen Inhibierung der Stat5-Dimer Translokation und Bcr-Abl-vermittelten Aktivierung

ausgegangen werden. Entscheidend hierbei ist auch, dass die Menge an P-Stat5(Tyr) im Zytoplasma, durch die zuvor bereits erwähnte, indirekt Bcr-Abl vermittelte und vermutlich S5-DBD-PA unabhängige Aktivierung über src-Kinasen (Klejman et al., 2002), zusätzlich stabilisiert wird. Die Detektion einer zusätzlichen Abnahme zytoplasmatischer P-Stat5(Tyr)-Level durch Inhibierung der Bcr-Abl Interaktion und Initiation proteasomaler Degradation ist demnach erst zu einem späteren Zeitpunkt bzw. nach einer anhaltenden Präsenz von S5-DBD-PA zu erwarten. Da der Proteasom-Proteinkomplex in Eukaryonten jedoch auch im Zellkern zu finden ist, schließt das Ergebnis eine zusätzliche proteasomale Degradation nukleären P-Stat5(Tyr)-Proteins nach S5-DBD-PA Interaktion nicht aus. Der unveränderte Level an unphosphoryliertem Stat5 im Nukleus S5-DBD-PA behandelter K562-Zellen könnte im Umkehrschluss zudem auf eine Inhibierung des nukleären Exports durch S5-DBD-PA zurückgeführt werden. Nach erfolgter Transkription werden aktivierte Stat-Dimere dephosphoryliert, dissoziieren von der DNA und translokieren über die Exposition eines NES-Signals, ebenfalls innerhalb der DBD (McBride & Reich, 2003), zurück ins Zytoplasma (siehe Kap. 1.2.1). Transkriptionell aktive Stat5-Dimere, welche zu Beginn der S5-DBD-PA Behandlung an die DNA gebunden vorlagen, könnten somit, nach Dephosphorylierung und Dissoziation von der DNA, durch die S5-DBD-PA Interaktion am Export gehindert werden. Im Gegensatz zu K562 Zellen weisen unstimulierte T-47D Zellen keine aktiv transkribierenden Stat5-Dimere auf. Die Immunfluoreszenz-Färbung lentiviral transduzierter T-47D Zellen, mit und ohne Prl-Stimulation, offenbarte eine rapide, nahezu komplette Umverlagerung und Akkumulation transgenem S5-DBD-PA Proteins aus dem Nukleus ins Zytoplasma, einhergehend mit der Induktion einer Stat5-Tyrosinphosphorylierung durch Prl (Abb. 3-36C), während rekombinantes S5-DBD-PA nach 5-stündiger Inkubation sowohl im Zytoplasma als auch Nukleus von K562-Zellen vorzufinden war. Basierend auf der S5-DBD-PA/Stat5-DBD Protein-Interaktion weisen diese Ergebnisse, im Zuge einer rapiden Phosphorylierung von Stat5 in der PrlR-überexprimierenden T-47D-Zelllinie, auf eine Interaktion zwischen S5-DBD-PA und unphosphorylierten Stat5-Monomeren im Nukleus von T-47D Zellen hin und lassen zum anderen einer Blockade des Exports unphosphorylierter Stat5-Dimere durch Interferenz mit S5-DBD-PA nach der Transkription als möglich erscheinen. Aufgrund einer, im Vergleich zu der endogenen S5-DBD-PA Expression, schubweise stark erhöhten S5-DBD-PA Proteinmenge in den K562 Zellen, nach 5-stündiger Proteintransduktion (Mediumkonzentration: 2µM), kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierten Proteinbanden einen Anteil ungebundener S5-DBD-PA-Proteine ohne Stat5, sowohl im Nukleus als auch Zytoplasma, beinhalten. Bei Betrachtung der hTRX-Proteinbanden fiel eine vorrangige Lokalisation im Zytoplasma auf, was mit vorherigen Immunfluoreszenzaufnahmen von K562-

Zellen einherging. Diese zeigten eine leichte hTRX-Akkumulation an der Zellmembran (Abb. 3-27B & 3-38B), welche sich womöglich auf eine unspezifische, jedoch nicht toxische Interaktion von hTRX mit der Zellmembran über die 9-R PTD zurückführen lässt. Hierbei sei erneut erwähnt, dass die Zellen, im Falle einer Behandlung mit den rekombinanten, zellpenetrierenden Protein-Konstrukten, vor jeder Analyse einem „Acid-Wash“ (siehe Kap. 2.2.4.2), zur Entfernung nicht vollständig aufgenommener, an der Außenseite der Zellmembran klebender Proteine, durchgeführt wurde. In HEL Zellen war der nukleäre hTRX-Anteil ebenfalls leicht reduziert (Abb. 3-38C). Wie unter Kap. 4.1.2 bereits diskutiert, wiesen HEL Zellen zudem eine nahezu ausschließliche Präsenz von Stat5- und P-Stat5(Tyr)-Protein im Zytoplasma auf, was eine Transkriptionsfaktor-unabhängige, aber dennoch essentielle Aktivität von Stat5, wie die identifizierte Unterstützung des PI3K/Akt-Signalwegs als interagierender Co-Faktor (Harir et al., 2007), im Zytoplasma dieser Jak2(V617F)-transformierten AML-Zelllinie unterstreicht. Sollte die S5-DBD-PA Interaktion keinen Einfluss auf die nicht-kanonischen zytoplasmatischen Aktivitäten von Stat5 in HEL Zellen haben, muss in Folge des Ausschluss einer Inhibierung der Stat5-Aktivierung und der nukleären Präsenz von Stat5, hierbei von einer proteasomalen Degradation, als alleinige Schadwirkung des gebundenen Peptidaptamers ausgegangen werden. Abschließend sei zu erwähnen, dass aufgrund der zusätzlich in Hefen detektierten, jedoch wesentlich geringeren Affinität von S5-DBD-PA gegenüber der Stat3-DBD (Abb. 3-22A), ein Einfluss auf die Stat3-Tyrosinphosphorylierung und -Gesamtproteinlevel in HEL Zellen überprüft wurde. Hierbei konnte allerdings keine Veränderung in Gegenwart von S5-DBD-PA, sowohl nach viraler als auch Proteintransduktion, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.5 INHIBIERUNG DER DNA-BINDEAKTIVITÄT VON STAT5 DURCH S5-DBD-PA

Unabhängig von den theoretischen Einflüssen der S5-DBD-PA Peptidaptamer-Interaktion auf die Stat5-Aktivierung, -Translokation und proteasomale Degradation, war es, im Falle der Verwendung der Stat5-DBD als Target-Domäne, Ziel dieser Arbeit die DNA-Bindeaktivität und somit die transkriptionelle Aktivität von Stat5 durch die Interferenz mit einem Peptidaptamer zu inhibieren. Da der mit der Stat5-DBD interferierende Peptidaptamer S5-DBD-PA die Bindung transkriptionell aktiver Stat5-Dimere an die DNA wesentlich beeinflusst, konnte anhand von Gelshift- (EMSA) und Dual-Luziferase-Reporter-Experimenten mit der modifizierten, stabil Stat5 und PrlR überexprimierenden B9-HeLa Zelllinie, nach Prl-Stimulation gezeigt werden. Als DNA-

Template wurde hierbei ein Stat5-Enhancer-Element des β -Casein-Promotors, welches sowohl von Stat5A- und Stat5B-Homodimeren als auch Stat5A/B-Heterodimeren gebunden werden kann (Soldaini et al., 2000), als radioaktiv markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid bzw. als regulatorisches Element der Firefly-Luziferase Expression in einem Reporter-Plasmid verwendet. Die Inkubation von B9-HeLa Zellen mit S5-DBD-PA-Mediumkonzentrationen von 1 und 2 μ M ließ dabei einen dosisabhängig zunehmenden Verlust der DNA-Bindeaktivität von Stat5, in Folge einer gesteigerten Interferenz mit S5-DBD-PA in der höheren Konzentration, erkennen (Abb. 3-40). Vergleichbar mit den durchgeführten Co-IP-Experimenten, ergab die EMSA-Auswertung eines *in vitro*-Inkubationsversuchs, ohne vorherige S5-DBD-PA Proteintransduktion in die Zielzellen, dabei wesentlich stärkere Signale bzw. einen wesentlich stärkeren Effekt in Folge eines stark erhöhten Mengenverhältnisses. Ebenfalls vergleichbar zu dem Co-IP-Experiment ließ sich in diesem Zusammenhang auch ein erhöhter unspezifischer Effekt des hTRX-Scaffold-Kontrollproteins feststellen. Das sich dieser Einfluss nicht auf die *in vivo* bzw. intrazellulären Bedingungen übertragen ließ, verdeutlichte das EMSA-Experiment mit lentiviral transduzierten B9-HeLa Zellen nach Prl-Stimulation. Hierbei war eine deutlich inhibitorische Wirkung transgenem S5-DBD-PA Proteins auf die Stat5-DNA-Bindeaktivität, jedoch nicht des hTRX-Kontrollproteins, erkennbar (Abb. 3-28B). Die Promotoren vieler Stat-Zielgene weisen eine Tandem-Wiederholung von GAS-Enhancer-Elementen (im Abstand von ca. 6-20 bp) auf und werden dadurch vermutlich alleinig über Stat-Tetramer-Komplexe reguliert, welche zudem, wie im Falle der Regulation des *Igk*-Gens durch Stat5 gezeigt, durch spezifische Rekrutierung von transkriptionellen Regulatoren (z.B. EZH2) über die Initiation bzw. Inhibierung der Genexpression entscheiden (Levy & Marie, 2012). Wie essentiell die Stat5-Tetramer-vermittelte Gen-Expression ist, konnte anhand der Regulation von Immunzell-Funktionen sowie der Selbsterneuerung und Expansion von hämatopoetischen und leukämischen Stamm- und Progenitorzellen, unter Verwendung von Knock-In und Deletionsmutanten der Stat5 N-terminalen Domäne, gezeigt werden (Li et al., 2007; Lin et al., 2012; Moriggl et al., 2005). Obwohl die Interaktion zwischen S5-DBD-PA und der Stat5-DBD die DNA-Bindung von Stat5 generell beeinflusst, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch sterische Blockade, der über die N-terminale Domäne vermittelten Dimer-Interaktion, die Tetramerisierung zusätzlich inhibiert wird. Um dies genauer zu analysieren, sollten die durchgeführten EMSA-Experimente in einem nächsten Schritt mit Oligonukleotiden durchgeführt werden, welche, wie durch Soldaini et al. zuvor gezeigt (Soldaini et al., 2000), einzelne und zusammenhängend hintereinander geschaltete GAS-Elemente beinhalten. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe ließen sich DNA-gebundene Stat5-Dimere und -Tetramere einfach per Gelshift unterscheiden. Ebenfalls nicht gänzlich ausgeschlossen

Diskussion

werden kann in diesem Zusammenhang, dass die Bindung von S5-DBD-PA eine Interaktion von Stat5 mit transkriptionellen Cofaktoren blockiert und dadurch eine Stat5-regulierte Expression zusätzlich verhindert.

Die Analyse der Stat5-Zielgenexpression in K562 Zellen ergab sowohl nach viralem Gentransfer (Abb. 3-29) als auch nach Inkubation mit rekombinanten, zellpenetrierenden S5-DBD-PA (Abb. 3-41), eine deutliche, teils signifikante, Reduktion wachstumsinduzierender und antiapoptotischer Stat5-Zielgene (v.a. CyclinD1). Die Ergebnisse entsprachen dabei annähernd dem Stat5-Knockdown Effekt in K562 Zellen (Abb. 3-13). Vergleichbare Einflüsse auf die Zielgene CyclinD1/D2, Bcl-xL, Mcl-1 und Pim1, konnten zuvor bereits mit niedermolekularen Bcr-Abl- (Imatinib, PD180970, Dasatinib) und Stat5-Inhibitoren (Pimozide, IQDMA) in K562, aber auch anderen Bcr-Abl exprimierenden CML-Zellen wie Ku812, beobachtet werden (Huang et al., 2002a; Jacquel et al., 2003; Nam et al., 2007; Nelson et al., 2011; Yang et al., 2008). Im Falle der Stat5-Inhibitoren ist dabei kein Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Stat5 durch direkte Interferenz mit der Stat5-DBD bekannt. Dadurch unterscheidet sich S5-DBD-PA zwar von den derzeit kommerziell verfügbaren Stat5-Inhibitoren, aufgrund der beobachteten, zuvor diskutierten Einflüsse von S5-DBD-PA auf die Inhibierung der Stat5-Translokation und Bcr-Abl vermittelten Aktivierung sowie auf eine mögliche Induktion proteasomaler Degradation, lässt sich die in K562-Zellen beobachtete Expressionsinhibierung dieser Zielgene vermutlich nur geringfügig auf eine direkte Interferenz mit der Bindung von Stat5 an die DNA zurückführen. Im Falle einer Modifikation der Stat5-vermittelten SOCS-, Pim- und FOXP3-Genexpression durch S5-DBD-PA, wirkten sich die zwei angewandten Transferverfahren der Virus- und Proteintransduktion teils überraschend unterschiedlich in K562-Zellen aus. Während eine 1- bis 3-wöchige endogene S5-DBD-PA Expression, aber auch der Stat5-Knockdown, zu einer deutlichen, teils signifikanten Reduktion der Pim1- und Pim2-Transkription führten, war nach 3-tägiger S5-DBD-PA Proteintransduktion keine Abnahme der Pim1 und Pim2 mRNA-Level gegenüber den Kontrollen feststellbar. Als Protoonkogene vermitteln Pim-Serin/Threonin-Kinasen, vorwiegend in hämatopoetischen und leukämischen Zellen, antiapoptotische und mitogene Signale, mit der Sicherung Wachstumsfaktor-unabhängigen Überlebens (Paukku & Silvennoinen, 2004). Als „immediate early“ Gene werden sie dabei über eine Vielzahl von Zytokinen induziert. Hierzu zählt auch eine IFN- γ vermittelte Pim-Induktion (Yip-Schneider et al., 1995), weshalb, wie im Falle der SOCS-Proteine, von einer Stimulation der Pim-Expression nach Virusinfektion, aufgrund zellulärer IFN-Sekretion, ausgegangen werden kann. Im Gegensatz zu den SOCS-Proteinen war jedoch sowohl nach lentiviralem Transfer Stat5-gerichteter shRNA als auch nach lentiviralem Transfer von S5-DBD-PA eine deutliche Reduktion der Pim1,2-Expression

erkennbar. Dieses Ergebnis deutet sowohl auf eine co- bzw. kompensatorische Regulation der SOCS-Expression durch andere IFN-aktivierte Mitglieder der Stat-Familie als auch auf eine strikte, nahezu ausschließlich über Stat5-regulierte Expression von Pim-Genen, nach zusätzlicher IFN-Stimulation, hin. Überraschend hierbei war jedoch das gegenläufige Ergebnis der 3-tägigen Behandlung von K562 Zellen mit rekombinanten S5-DBD-PA, zumal eine Inhibierung von Stat5 durch den niedermolekularen Wirkstoff Pimozide ($5\mu\text{M}$) in Ku812-Zellen bereits nach 18-stündiger Inkubation zu einer drastischen Reduktion der Pim-1 Expression geführt hatte (Nelson et al., 2011). Womöglich würde jedoch eine längere Behandlung von K562 Zellen, in Folge eines verzögerten Effektes (>3 Tage), bei gleichzeitiger Abwesenheit stimulierender IFN-Sekretion, oder eine Verdopplung entweder der Applikationshäufigkeit (8mal je $1\mu\text{M}$) oder der S5-DBD-PA Konzentration (4 mal je $2\mu\text{M}$) ebenfalls eine Reduktion der Pim1,2-Expression erkennen lassen. Im Gegensatz dazu war die Expression von CiSH, SOCS1, SOCS3 als auch von FOXP3, nach 3-tägiger S5-DBD-PA Proteintransduktion (4mal je $1\mu\text{M}$), gegenüber den Kontrollen teils signifikant reduziert, was die Hypothese einer IFN-vermittelten Regulation dieser Gene durch andere Stats nach viralem Transfer Stat5-gerichteter shRNA oder S5-DBD-PA unterstrich. Noch deutlicher war dieser Unterschied in der HEL-Zelllinie erkennbar, wobei hier jedoch erneut, sowohl nach Virus- als auch nach Proteintransduktion von S5-DBD-PA, kein signifikanter Einfluss auf die Inhibierung der hier analysierten Stat5-Zielgene erkennbar war. Ausgehend von einer kompensatorisch-konstitutiven Stat3-Aktivität und der zuvor detektierten, nahezu ausschließlichen zytoplasmatischen Lokalisation von Stat5, unterstreichen die Analysen der Stat5-Zielgenexpression, trotz einer durch Stat5-Knockdown identifizierten generellen Abhängigkeit von der Stat5 Expression, eine Unabhängigkeit Jak2(V617F)-transformierter HEL-Zellen von einer transkriptionellen Stat5 Aktivität. Hierdurch rückt der im Zuge der Pathogenese einer Leukämie identifizierte und assoziierte Mechanismus einer Co-Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs durch Formierung eines Siganlkomplexes aus P-Stat5(Tyr), Gab2 und PI3K zunehmend in den Vordergrund (Harir et al., 2008; Harir et al., 2007). Obwohl dieser Mechanismus auch in der K562-Zelllinie ebenfalls identifiziert werden konnte (Li et al., 2010), lassen diese Ergebnisse eine gesteigerte Abhängigkeit gegenüber antiapoptotischer und mitogener PI3K/Akt/mTOR-Signale, als Folge einer konstitutiven Jak2-Aktivität, vermuten. Genauere Aufschlüsse hierzu würde eine vergleichende Inkubation von K562 und HEL Zellen mit Akt und mTOR Inhibitoren liefern. Hinsichtlich einer gesteigerten nukleären Translokation aktivierter Stat5-Dimere im Falle Bcr-Abl vermittelter Leukämogenese, deuten aktuelle Ergebnisse auf einen entscheidenden Einfluss sekundärer Stat5-Modifikationen, im speziellen auf einen entscheidenden Einfluss der Stat5-Serinphosphorylierung, hin (Hoelbl-Kovacic et al., 2013; unveröffentlichte Daten). Zusätzlich wird

ebenfalls eine Beeinflussung durch src-Kinasen diskutiert (Chatain et al., 2012). Unter Einbeziehung aktueller Daten anderer Arbeitsgruppen ergibt sich somit folgendes Modell (Abb. 4.1) der Effekte einer Stat5-DBD/S5-DBD-PA Peptidaptamer-Interaktion im Vergleich des molekularbiologischen Hintergrundes Bcr-Abl transformierter K562 CML- und Jak2(V617F) transformierter HEL AML(M6)-Zellen.

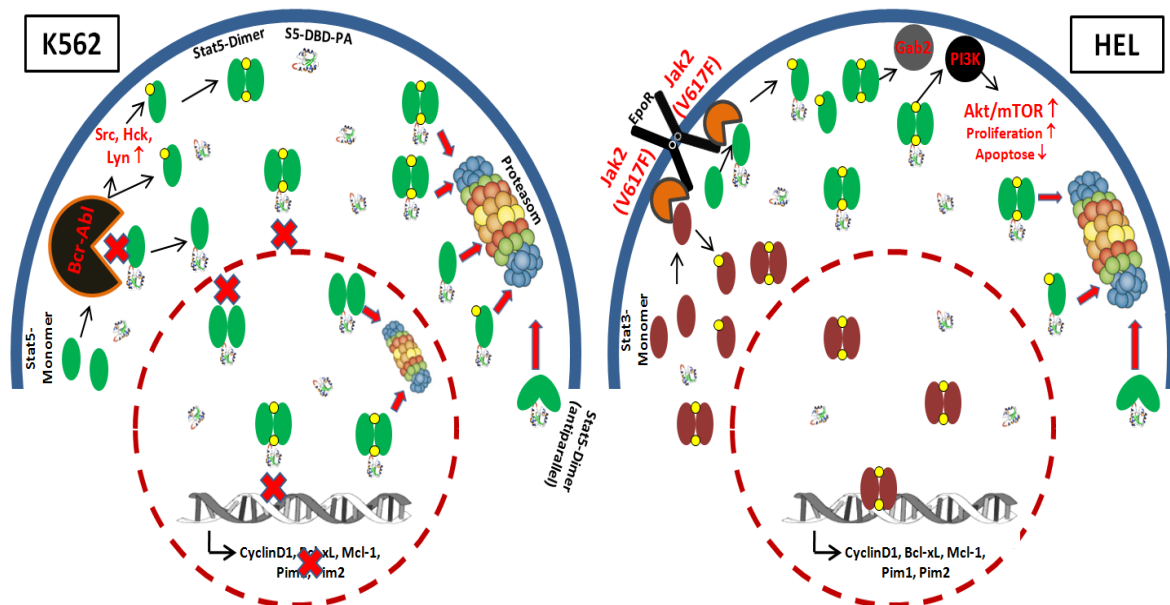


Abb. 4-1: Theoretisches Modell der Stat5-Aktivität und des Stat5-inhibitorischen Einflusses von S5-DBD-PA im Vergleich der Bcr-Abl exprimierenden K562- und Jak2(V617F) exprimierenden HEL-Zelllinie

Die ausschließlich im Zytoplasma lokalisierte (Goldman & Melo, 2008) onkogene Fusionskinase Bcr-Abl induziert sowohl direkt als auch indirekt, über die Aktivierung weiterer Kinasen (z.B. Src, Hck, Lyn), eine konstitutive Aktivierung von Stat5 in der K562-CML-Zelllinie. Aktive Stat5-Dimere translokieren in der Folge vermehrt in den Zellkern und induzieren die Expression mitogener und antiapoptotischer Gene wie CyclinD1 und Bcl-xL. In Folge der Interaktion des Peptidaptamers S5-DBD-PA mit der Stat5-DBD kommt es zu einer Reduktion direkt Bcr-Abl vermittelter Stat5-Tyrosinphosphorylierung (gelber Punkt), einer Inhibierung des nukleären Im- und Exports (Translokation) durch Maskierung einer NLS-Sequenz aktiver Stat5-Dimere bzw. durch Maskierung einer NES-Sequenz dephosphorylierter Stat5-Dimere im Nucleus sowie einer Inhibierung der Bindung von Stat5 an die DNA und schlussendlich zu einer Inhibierung der Expression von Stat5-Zielgenen. Parallel dazu wird die Aktivität von Stat5, nach erfolgter S5-DBD-PA Interaktion, durch die Induktion proteasomaler Degradation, vorwiegend tyrosinphosphorylierter Stat5-Proteine, sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus zusätzlich inhibiert. Die mit myeloproliferativen Erkrankungen und häufig mit dem Erythropoietin-Rezeptor (EpoR) assoziiert (Funakoshi-Tago et al., 2010) auftretende konstitutiv aktive Jak2(V617F) Mutante induziert in der akut erythroleukämischen (AML-M6) Zelllinie HEL eine permanente Tyrosinphosphorylierung von Stat5- und Stat3-Monomeren unabhängig von einer S5-DBD-PA Interaktion. Im Gegensatz zu Bcr-Abl exprimierenden CML-Zellen tragen die aktivierten Stat5-Dimere nicht in Folge einer transkriptionellen Aktivität im Nucleus, sondern über eine Co-Faktor Aktivität im Zytoplasma, wie durch die Interaktion mit Gab2 und PI3K und der daraus resultierenden Unterstützung mitogener und antiapoptotischer Akt/mTOR-Signalgebung, zu einem Erhalt des leukämischen Phänotyps der HEL-Zelllinie bei. Die Unabhängigkeit der HEL-Zelllinie von einer transkriptionellen Stat5-Aktivität wird dabei durch eine kompensatorische Stat3-Aktivität aufrecht erhalten. In Folge dessen entfaltet S5-DBD-PA durch die Interaktion mit der Stat5-DBD alleinig über eine Induktion proteasomaler Degradation eine inhibitorische Wirkung in HEL Zellen.

4.2.6 EINFLUSS VON S5-DBD-PA AUF DIE VIABILITÄT UND DAS WACHSTUM HUMANER TUMORZELLEN

Als Resultat einer erhöhten Abhängigkeit Bcr-Abl positiver CML-Zellen von der transkriptionellen Stat5-Aktivität, resultierte eine Interferenz von S5-DBD-PA mit der Stat5-DBD, sowohl nach viralem Gentransfer (Abb. 3-30B,C) als auch nach Zugabe des rekombinanten, zellpenetrierenden Peptidaptamerkonstrukts zu dem Zellkulturmedium (Abb. 3-42A), in einer signifikanten Reduktion der Viabilität und des Wachstums der K562-Zelllinie. Im Falle der 5-tägigen Proteintransduktion mit Mediumkonzentrationen von 0,5; 1 und 1,5 μM , ließen sich dabei deutlich dosisabhängige Effekte erkennen, während die Zellen von einer Inkubation mit dem hTRX-Scaffold-Kontrollprotein in der höchsten Konzentration von 1,5 μM und der Inkubation mit dem maximal eingesetztem Volumen an Proteinlösungsmittel nahezu unbeeinflusst blieben. Während die lentivirale Transduktion zu einer Reduktion von Wachstum und Viabilität des infizierten Zellpools von etwa 40-50% gegenüber unbehandelter Zellen führte, konnten selbige Effekte durch die tägliche Inkubation mit rekombinanten S5-DBD-PA in Konzentrationen von 0,5-1 μM bereits nach 5 Tagen erzielt werden. Dies ließ sich zum einen auf die gegenüber einer endogenen Expression stark erhöhte S5-DBD-PA Menge pro Zelle, aber auch auf Varianzen einer einmaligen Virusinfektion, mit unterschiedlichen Anteilen stark, schwach und nicht-infizierter Zellen, zurückführen. Gemessen an der GFP-Markereexpression konnten generell konstant hohe Transduktionseffizienzen von ca. 80-90% erzielt werden (Abb. 3-31A), verglichen mit dem Transfer Stat5-gerichteter shRNA (Abb. 3-10A), schienen die Zellen eine S5-DBD-PA Expression jedoch wesentlich besser zu tolerieren. So wies der infizierte K562-Zellpool nach 9 Wochen noch einen durchschnittlichen Anteil von ca. 70% GFP-exprimierenden Zellen auf, was gegenüber den Kontrollen jedoch einem signifikant reduzierten Wert entsprach. Eine Aufhebung der S5-DBD-PA Expression durch Promotor-Silencing konnte hierbei ausgeschlossen werden, da eine gemeinsame Regulation der GFP- und S5-DBD-PA Expression durch den SFFV-Promotor des lentiviralen SiEW-Transfervektors vorlag. Dementsprechend ließ sich aus der, gegenüber hTRX-exprimierenden K562 Zellen, deutlichen Abnahme der durchschnittlich pro Zelle ermittelten MFI-Werte (Abb. 3-31B) jedoch eine Reduktion der GFP und S5-DBD-PA Expression ableiten. Einhergehend mit diesen Ergebnissen ließ die Färbung von K562 Zellen mit AnnexinV und 7-AAD, 10 Tage nach der Virustransduktion, einen Apoptose-induzierenden Effekt der Stat5-Inhibierung nach S5-DBD-PA Expression erkennen (Abb. 3-32), weshalb von einem Verlust stark infizierter bzw. vermehrt S5-DBD-PA exprimierender Zellen innerhalb der ersten 2-3 Wochen und einem Herauswachsen nicht bzw. schwach infizierter Zellen, welche eine geringe

S5-DBD-PA Expression tolerieren und dennoch als GFP-positiv erscheinen, auszugehen ist. Ein Effekt, welcher sich auch anhand der kumulativen Wachstumskurve infizierter K562 Zellen ablesen ließ (Abb. 3-30C). Im Gegensatz dazu ließ die vergleichende Peptidaptamer Behandlung der akut erythroleukämischen Jak2(V617F)-exprimierenden HEL-Zelllinie, in Folge der von S5-DBD-PA offensichtlich weitestgehend unbeeinflussten, dennoch für die Sicherung der Überlebensfähigkeit essentiellen, zytoplasmatischen Stat5-Aktivität, deutlich geringere Effekte einer Inhibierung von Viabilität und Wachstum erkennen. Dennoch ergab die XTT-Viabilitäts- und Proliferationsmessung und die Bestimmung der kumulativen Zellzahl lentiviral transduzierter HEL-Zellen, gepaart mit der Analyse der GFP-Expression, einen im Vergleich zu den Kontrollen zusätzlichen, teils signifikant, inhibierenden Effekt. Dieser geringe, aber messbare Einfluss ergab sich auch aus der 5-tägigen Zellbehandlung mit rekombinanten S5-DBD-PA. Da im Falle einer Interferenz der S5-DBD-PA Peptidaptamer-Interaktion mit Stat5-vermittelter zytoplasmatischer Signalgebung von einer deutlicheren Beeinflussung zellulärer Viabilität auszugehen ist, unterstrichen diese Ergebnisse die Theorie einer alleinigen S5-DBD-PA Schädigung in HEL Zellen in Form einer Steigerung des Stat5-Proteinabbaus im Proteasom. Eine gewisse Beeinflussung zuvor diskutierter, nicht-kanonischer Stat5 Aktivitäten zum Erhalt von Golgi-, ER- sowie Mitochondrien-Struktur und Funktion kann dabei genau so wenig außer Acht gelassen werden, wie eine nicht gänzlich ausgeschlossene Beeinflussung der Stat3-Aktivität, in Folge geringer Stat3-DBD Spezifität, oder eine mögliche Beeinflussung weiterer zellulärer Faktoren durch unspezifische Seiteneffekte. Die AnnexinV/7-AAD Apoptosefärbung lentiviral transduzierter HEL und K562 Zellen nach 10 Tagen, ließ in diesem Zusammenhang auch einen geringen, auf unspezifische Seiteneffekte schließenden, Apoptose-induzierenden Effekt einer endogenen hTRX-Expression erkennen, welcher im Falle der HEL-Zelllinie durch eine S5-DBD-PA Expression nicht gesteigert werden konnte. Die Bestimmung der kumulativen Zellzahl und die Analyse der GFP-Expression viral transduzierter HEL-Zellen, ließ allerdings eine Steigerung der antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Wirkung endogener S5-DBD-PA Expression, in etwa nach 3 Wochen, vermuten, was sich womöglich auf eine verzögerte Auswirkung erhöhter proteasomaler S5-DBD-PA Degradation zurückführen lässt. Eine Differenzierung beider Zelllinien war im Verlaufe der Zeit dabei morphologisch nicht erkennbar. Durch die FACS-Sortierung GFP-exprimierender Zellen, wurde die innerhalb der ersten Wochen nach der Virustransduktion stark variierende S5-DBD-PA Schädigung, trotz einer generellen Beeinflussung der Zellvitalität durch den Sortierprozess, im Vergleich beider Zelllinien zusätzlich verdeutlicht (Abb. 3-33). Die Abhängigkeit der Intensität antitumorale S5-DBD-PA Effekte von der transkriptionellen Stat5-Aktivität, wurde ebenfalls bei dem Vergleich von Ku812 und Kasumi-1 Leukämiezellen

ersichtlich. Obwohl beide Zelllinien, nach durchgeführtem Stat5-Knockdown, eine generelle Abhängigkeit von der Stat5-Expression erkennen ließen (Abb. 3-14), resultierte der lentivirale S5-DBD-PA Transfer alleinig in der Bcr-Abl exprimierenden Ku812 CML-Zelllinie in einer deutlich signifikanten Inhibierung zellulärer Viabilität und Wachstums (Abb. 3-35). Vergleichbar mit der HEL-Zelllinie, wiesen AML1-ETO exprimierende Kasumi-1 AML(M2)-Zellen, ohne detektierbare Stat5-Tyrosinphosphorylierung, eine nur minimale Wachstumsinhibierung innerhalb der ersten 3 Wochen einer endogenen S5-DBD-PA Expression auf, ließen anhand eines plötzlich eintretenden und signifikanten Rückgangs der GFP-Fluoreszenzintensität, jedoch ebenfalls einen verzögerten Effekt permanenter Stat5-DBD/S5-DBD-PA Proteininteraktion vermuten. Wie zuvor nach der shRNA-Transduktion, zeigten Kasumi-1 Zellen dabei eine generell erhöhte Sensitivität gegenüber einer lentiviralen Infektion. Überraschend war jedoch, dass beide Zelllinien eine erhöhte Sensitivität gegenüber der täglichen Behandlung mit rekombinanten Proteinen und dem zugehörigen Lösungsmittel erkennen ließen (Abb. 3-42-B). Nach Abschluss der zum Ende des Protein-Aufreinigungsprozesses erfolgten Dialyse, ist neben den rekombinanten Proteinen und PBS(1x), alleinig von erhöhten Anteilen NaCl und Glycerol in dem für die Proteinerückfaltung und Lösung verwendeten Dialysepuffer auszugehen. Potentiell toxische Einflüsse des Puffers, sollten in Folge der nahezu vollständigen Abtrennung von Harnstoff- oder Arginin-freier Base Komponenten ausgeschlossen sein. Durch welche Pufferbestandteile die Vitalität dieser beiden Zelllinien beeinflusst wurde, lässt sich im Nachhinein nicht mehr nachvollziehen. Dennoch ließen die Ergebnisse auch hier einen in Abhängigkeit von der Dosis zusätzlich wachstumsinhibierenden Effekt des S5-DBD-PA Peptidaptamers, v.a. in Ku812 Zellen, erkennen.

Jüngeren Berichten zufolge, wird das transformierende Potential einer Bcr-Abl Translokation und der daraus resultierenden Stat5-vermittelten Expression wachstumsinduzierender und antiapoptotischer Gene in undifferenzierten und aggressiv proliferierenden CML-Zellen durch das Onkoprotein Muc1, welches als transmembranes Glykoprotein direkt mit Bcr-Abl interagiert, zusätzlich erhöht und stabilisiert. Die Analyse primärer CML-Blasten, aber auch der K562- und Ku812-Zelllinien, ergab eine für das Überleben der Zellen essentielle Überexpression von Muc1 (Kawano et al., 2007), was die erhöhte Effektivität des S5-DBD-PA Peptidaptamers, in Folge einer zusätzlich gesteigerten Abhängigkeit dieser beiden Zelllinien von der transkriptionellen Stat5-Aktivität, ergänzend erklären würde. Mit dem Ziel einer therapeutischen Ausnutzung dieser Abhängigkeit, konnten, neben Imatinib, weitere nicht Protein-basierte, niedermolekulare Bcr-Abl und Stat5-Inhibitoren (Dasatinib, PD180970, Pimozide, IQDMA), hinsichtlich eines wachstumsinhibierenden Potentials, erfolgreich in K562 und Ku812 Zellen getestet werden (Huang et al., 2002a; Nam et al., 2007; Nelson et al., 2011; Yang et al., 2008). Wobei mit Hinblick

auf eine klinische Anwendung, Substanzen wie die psychotropen Pimozide, unerwünschte Nebeneffekte im Patienten erwarten lassen. Das Auftreten von Mutationen des Bcr-Abl Gens, in Folge einer durch erhöhte Proliferation, gepaart mit einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), hervorgerufenen chromosomalen Instabilität (Goldman & Melo, 2008), und die damit verbundene Resistenzentwicklung gegenüber interferierender Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib, stellt ein wesentliches Problem bei der Behandlung von CML-Patienten dar (Soverini et al., 2011). Zudem Überleben CML-Stammzellen Bcr-Abl unabhängig, weshalb sich CML-Stammzellen ebenfalls als resistent gegenüber einer Imatinib- bzw. Tyrosinkinase-Inhibierung erweisen und daher separat behandelt werden müssen (Corbin et al., 2011; Hamilton et al., 2012). So konnte gezeigt werden, dass ein kombinierter Einsatz von Imatinib oder Dasatinib mit einem Farnesyltransferase-Inhibitor, welcher vorzugsweise in nicht- bzw. gering proliferierenden Zellen aktiv ist, zu einem Absterben von CML-Blasten durch Apoptose-Induktion in CML-Stamm und Progenitorzellen führt (Copland et al., 2008). Aufgrund der erhöhten Toxizität solcher Zytostatika sind patientenschonendere Therapien jedoch erforderlich. Da Imatinib-resistente CML-Zellen (mutierte oder Stammzellen) eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Inhibierung Bcr-Abl nachgeschalteter Effektor-Moleküle erkennen lassen, rücken kombinierte Ansätze, im Speziellen eine gepaarte Bcr-Abl und Stat5-Inhibierung (Hantschel et al., 2012), in der chemotherapeutischen Behandlung einer CML mehr und mehr in den Vordergrund. Das der Stat5-interferierende S5-DBD-PA Peptidaptamer in der Lage war synergistisch zu wirken, konnte anhand einer unterstützenden bzw. verstärkten Inhibierung von Wachstum und Viabilität Imatinib-behandelter K562 Zellen, nach lentiviralem S5-DBD-PA Transfer, gezeigt werden (Abb. 3-34). Ausgehend von einem breiten Imatinib-Wirkungsspektrum, sind additive Effekte einer kombinierten S5-DBD-PA Behandlung somit auch im Falle anderer Tumore mit beispielsweise c-Kit- oder PDGFR-Mutation (Lopes & Bacchi, 2010), wie gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), denkbar. Die Viabilität der Jak2(V617F) positiven HEL-Zelllinie erwies sich als unbeeinflusst von einer Imatinib-Behandlung und konnte hierbei erneut nur leicht durch S5-DBD-PA inhibiert werden. Eine Behandlung der HEL-Zelllinie mit dem Bcr-Abl- und Src-Kinaseinhibitor PD180970 kam zu selbigem Ergebnis eines unbeeinflussten Wachstums (Huang et al., 2002a). Gegenläufige Resultate ergab die vergleichende Behandlung der K562- und HEL-Zelllinie mit Jak-Kinaseinhibitoren. Während die Behandlung von HEL Zellen mit Jak-Kinaseinhibitoren einen rapiden Wachstumsstopp und eine Apoptose-Induktion hervorrief, erwiesen sich K562 Zellen von einer Jak-Inhibierung unbeeinflusst (Levine et al., 2005; Walz et al., 2006). Dieses Ergebnis lässt sich auf einen im Verlauf der CML-Pathogenese zunehmenden Verlust der Abhängigkeit gegenüber Jak2-vermittelter Stat5-Signale, nach initialer Bcr-Abl Translokation, zurückführen

(Hantschel et al., 2012), wobei Jak-Kinasen auch kein Substrat von Bcr-Abl sind. Dass im Falle Jak2(V617F)-vermittelter AML und myeloproliferativer Erkrankungen, zukünftig kombinierte Therapieansätze einer Jak2- und Stat5-Inhibierung ebenfalls in Betracht gezogen werden sollten, konnte anhand einer kombinierten Behandlung von HEL Zellen mit Jak-Inhibitoren und Pimozide (Stat5-Inhibitor III) gezeigt werden (Bar-Natan et al., 2012). Daher ist nicht auszuschließen, dass eine Behandlung endogen S5-DBD-PA exprimierender HEL Zellen mit Jak-Inhibitoren auch leicht additive Effekte einer Wachstumsinhibierung durch S5-DBD-PA hätten erkennen lassen.

Die Behandlung solider Tumorzelllinien mit S5-DBD-PA ergab sowohl nach viralem Gentransfer als auch nach 5-tägiger Medium-Supplementation des rekombinanten Peptidaptamer-Konstrukts eine signifikante Reduktion von Wachstum und Viabilität der zuvor durch den Stat5-Knockdown stark beeinflussten A431, PC-3 und T-47D Zelllinien (Abb. 3-36A, 3-37A & 3-43). Im Falle der epidermoiden A431 und PC-3 Prostatakarzinomzelllinie lassen sich diese Ergebnisse, aufgrund der Präsenz aktivierter Stat5-Dimere, mit einer Inhibierung der Stat5-DNA-Bindeaktivität und nukleären Translokation durch S5-DBD-PA erklären, welche den Verlust der Expression für das Überleben der Zellen essentieller Gene zur Folge hat. So konnte zuvor gezeigt werden, dass die Inhibierung autokriner Prl-Signale, wie im Falle der PC-3 Zelllinie, durch niedermolekulare Jak2-Inhibitoren sowie einer erhöhten AR-Aktivität durch den Stat5 Inhibitor I (N' -((4-Oxo-4H-chromen-3-yl)methylene)nicotinohydrazide) zu reduziertem Wachstum und zu einer, mit der Reduktion der Bcl-xL und CyclinD1 Expression einhergehenden, Apoptose-Induktion in Prostatakarzinomzellen geführt hat (Liao & Nevalainen, 2011). Angaben zu einer Behandlung von epidermoiden Karzinom- oder Melanomzellen mit niedermolekularen Stat5-Inhibitoren lassen sich in der Literatur nicht finden. Eine Stat5-Interferenz durch eine dominant-negative Stat5-Mutante in Melanomzellen verdeutlichte jedoch die Abhängigkeit von Karzinomen epidermalen Ursprungs gegenüber der transkriptionellen Stat5-Aktivität (Hassel et al., 2008). Dennoch lässt die Intensität der durch die S5-DBD-PA Behandlung erzielten Effekte, aufgrund der nur geringen Menge aktiv transkribierender P-Stat5(Tyr)-Dimere, zusätzliche Einflüsse des Peptidaptamers in A431 Zellen vermuten. Noch deutlicher wurde dies im Falle unstimulierter T-47D Mammakarzinomzellen. Trotz der Abwesenheit von Prl und aktiv transkribierender Stat5-Dimere, resultierte die Behandlung dieser Zellen mit S5-DBD-PA in einem Verlust zellulärer Viabilität und reduziertem Wachstum. Da der zuvor durchgeführte Stat5-Knockdown bereits eine Stat5-Abhängigkeit unstimulierter T-47D Zellen erkennen ließ, ist von einer erhöhten nicht-kanonischen Aktivität unphosphorylierter Stat5-Proteine auszugehen, welche von S5-DBD-PA zum Teil beeinflusst zu werden scheint. Auffällig hierbei war auch, dass sich, im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, eine endogene S5-DBD-PA Expression gegenüber

einer Inkubation mit erhöhten Mengen rekombinanten Proteins stärker auswirkte, was sich jedoch womöglich auf Zelltyps-abhängige Varianzen einer Transduktionseffizienz rekombinanter, zellpenetrierender Proteine und Peptide, im Zusammenhang mit variierenden Mengen endosomaler bzw. lysosomaler Vesikel, erklären lässt. Durch Immunfluoreszenzfärbung lentiviral transduzierter T-47D Zellen, konnte im uninduzierten Zustand eine vorrangige Lokalisation von S5-DBD-PA im Zellkern beobachtet werden (Abb. 3-36C). Da S5-DBD-PA nach 30 minütiger Prl-Stimulation, gemeinsam mit P-Stat5(Tyr) akkumuliert im Zytoplasma vorzufinden war, ist davon auszugehen, dass S5-DBD-PA bereits im uninduzierten Zustand mit unphosphorylierten oder alleinig Serin-phosphorylierten Stat5-Monomeren oder antiparallelen Stat5-Dimeren im Zellkern assoziiert vorlag. Dies ist insofern möglich, da unphosphorylierte Stat-Proteine, NLS- und NES- bzw. Carrier-unabhängig, permanent zwischen Zytoplasma und Nukleus translokieren und S5-DBD-PA zudem über eine NLS-Sequenz verfügt. Auf Grundlage dessen kann von einer vermehrt nukleären Aktivität unphosphorylierter Stat5-Proteine in T-47D Zellen, wie beispielsweise die zuvor beschriebene Beteiligung von Stat5 an der Heterochromatin-Formierung, ausgegangen werden. Ebenfalls möglich erscheint das unphosphorylierte oder Serin-phosphorylierte Stat5-Monomere als Co-Faktoren an der Formierung eines Transkriptionsinitiationskomplexes oder aber auch eines Expressions-reprimierenden Signalkomplexes beteiligt sind und die Aktivität dieses Komplexes durch die Peptidaptamer-Interaktion inhibiert wird. Dies sind jedoch rein spekulative Annahmen und bedürfen detaillierterer Analysen. Ein Abbau von Stat5/S5-DBD-PA Komplexen durch das Proteasom war dabei, in Folge unveränderter Stat5-Proteinmenge im Western Blot, nicht erkenntlich. Einflüsse unspezifischer Seiteneffekte des S5-DBD-PA Proteins, wie durch Interferenzen mit anderen zellulären Faktoren, können dabei ebenfalls weiterhin nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Eine Beeinflussung der Stat3-Tyrosinphosphorylierung wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls überprüft (Daten nicht gezeigt), erwies sich aber als unverändert. Hierbei sei erwähnt, dass sich im Zusammenhang mit dem Transfer von S5-DBD-PA und hTRX in die Zielzellen über Lentiviren, bewusst für die Klonierung des kompletten Peptidaptamer-Konstruktes, mit allen funktionalen Tags, in den SiEW-Transfervektor entschieden wurde. Hierdurch sollte die Vergleichbarkeit zu den Proteintransduktions-Experimenten mit dem rekombinanten Peptidaptamer-Konstrukt gewahrt werden und zudem eine erhöhte Effizienz der Inhibierung der Stat5-DNA-Bindeaktivität über die fusionierte NLS-Sequenz sichergestellt werden. In einem parallelen Versuch wurden dennoch die wachstumsinhibierenden Effekte einer transgenen Expression des reinen, über den hTRX Δ cys5-Scaffold präsentierten S5-DBD-PA Peptidaptamers, ohne funktionale Tags, u.a. in K562 Zellen überprüft. Die Ergebnisse ließen allerdings überraschend eine um ca. 20% geringere

wachstumshemmende Aktivität von S5-DBD-PA, gegenüber dem Transfer des kompletten Peptidaptamer-Konstruktes mit allen Tags, erkennen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis unterstrich zum einen eine zunehmende Effizienzsteigerung des Peptidaptamers durch Fusionierung einer NLS-Sequenz, konnte unspezifische Seiteneffekte der anderen Tags, v.a. der 9-R PTD, aber auch nicht gänzlich ausschließen. Dass eine endogene Expression oder Proteintransduktion des kompletten Peptidaptamer-Konstruktes jedoch keine zytotoxischen Effekte durch den Scaffold und die fusionierten Tags hervorruft, konnte durch die Mitführung der hTRX-Kontrolle und des mehrheitlich unbeeinflussten Wachstumsverhaltens der Zellen gezeigt werden. Zytotoxische Einflüsse der integrierten 12mer Peptidaptamer-Sequenz konnten zudem durch die unveränderte Viabilität und das unveränderte Wachstum der HCT116-Kontrollzelllinie ausgeschlossen werden (Abb. 3-37B & 3-43). Da diese kolorektale Karzinomzelllinie durch eine minimale Stat5-Expression, ohne detektierbare Tyrosinphosphorylierung, charakterisiert ist, unterstreichen diese Ergebnisse zudem die Stat5-Spezifität der Peptidaptamer-Sequenz und die Stat5-inhibierende Wirkung des S5-DBD-PA Konstruktes, welche sich, durch das Blockieren essentieller nicht-kanonischer Aktivitäten, zudem zelltypspezifisch, wie in T-47D Zellen, auch in Abwesenheit aktiv transkribierender Stat5-Dimere auf die Überlebensfähigkeit der Zellen auswirken kann. Zusammenfassend lassen die durchgeführten Experimente einer Stat5 Inhibierung durch RNA-Interferenz vermitteltem Expressionsstopp und Peptidaptamer-vermittelter Inhibierung vorwiegend nukleärer, transkriptioneller Stat5-Aktivität, eine Zelltyp nahezu unabhängig hohe multiple Aktivität und Funktionalität der Stat5A- und Stat5B-Proteine, zur Sicherung zellphysiologischer Prozesse und zellulärer Viabilität erkennen. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung verdeutlichten die Ergebnisse einerseits die Bedeutsamkeit einer rein Tumor-gerichteten Stat5-Intervention, zum Schutze gesunden Gewebes, und zum anderen die Bedeutsamkeit einer gezielten Auswahl von Inhibitoren, zur spezifischen, Tumortyp-abhängigen Interferenz mit bestimmten Funktionen von Stat5, als Kriterium für eine personalisierte Krebstherapie.

4.3 AUSBLICK – THERAPEUTISCHE ANWENDBARKEIT DER STAT5/S5-DBD-PA PEPTIDAPTAMER-INTERAKTION

Neben der zuvor bereits angesprochenen detaillierten Aufklärung der Mechanismen einer S5-DBD-PA vermittelten Schädigung (Inhibierung nukleärer Translokation und BcrAbl-vermittelter Aktivierung, Beeinflussung der proteasomalen Stat5-Degradation, gepaarte Analyse einer

Modifikation der Stat5-Tyrosin- und -Serinphosphorylierung sowie unspezifischer Seiteneffekte durch S5-DBD-PA), ist die *in vivo*-Validierung, der unter Zellkulturbedingungen identifizierten, Tumortyp-abhängigen wachstumshemmenden und apoptoseinduzierenden Eigenschaften des S5-DBD-PA Peptidaptamers, auf dem Weg zu einer therapeutischen Anwendung zwingend erforderlich. Methodisch umfasst dies sowohl eine Transplantation transgen S5-DBD-PA exprimierender Tumorzellen als auch eine Injektion rekombinanten S5-DBD-PA Proteins, unter Verwendung geeigneter Xenograft-Tumormodelle oder genetisch manipulierter Tumormäuse. Die DBD gehört zu den am höchsten konservierten Stat-Domänen und die Aminosäuresequenz der humanen Stat5A- bzw. Stat5-DBD ist zu 99 % mit dem Maus-Ortholog identisch, weshalb von einer vergleichbaren S5-DBD-PA Aktivität in der Maus ausgegangen werden kann. Die lentivirale Infektion Bcr-Abl positiver Pro-B-Zellen der Maus, zur *in vivo* Knochenmarkstransplantation und Leukämie-Induktion, ergab jedoch schwache S5-DBD-PA-Expressionsraten. Zur Aufhebung dieses Problems sollte in einem nächsten Schritt entweder ein anderes, bestenfalls induzierbares, virales Vektorsystem oder eine Umklonierung der Stat5-spezifischen Peptidaptamer-Sequenz, in das katalytische Zentrum des murinen Thioredoxin-Scaffolds, getestet werden. Aufgrund schwacher pharmakokinetischer Eigenschaften, rapider und effizienter renaler Filtration bzw. Clearance und proteolytischen Degradation in Blut und Lymphe sowie aufgrund einer Tumor-unspezifischen Verteilung im Organismus, gepaart mit PTD-vermittelter unspezifischer Zelltransduktion, sind der *in vivo* Anwendbarkeit rekombinanter therapeutischer Peptide und Proteine geringer Größe, im Falle einer Applikation durch i.v. Injektion, jedoch Grenzen gesetzt (Bidwell & Raucher, 2009). Trotz einer beobachteten Reduktion des Tumorwachstums subkutan inokulierter Glioblastomzellen in immundefizienten Mäusen, nach i.v. Injektion (täglich 7,5 mg/kg KG) des Stat3-spezifischen rS3-PA Peptidaptamers (Borghouts et al., 2012), konnten minimale Serum-Halbwertszeiten des bis auf die verkürzte Stat5-spezifische Peptidaptamer-Sequenz, strukturell gegenüber S5-DBD-PA identischen rS3-PA Peptidaptamers (2-10 min bei Injektion von 50µg) festgestellt werden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Zur Erhöhung der intravasalen Stabilität therapeutischer Peptide gibt es verschiedene Lösungsansätze. Zum einen lässt sich die Halbwertszeit von therapeutischen Peptiden und Proteinen, in Blut und Lymphe, durch das Verknüpfen mit polymeren, makromolekularen Seitenketten, wie Polyethylenglycol- (PEGylation) oder einer wiederholenden Polypeptidkette aus Prolin-Alanin-Serin Resten (PASylierung), wesentlich erhöhen (Jevsevar et al., 2010). Da diese makromolekularen Seitenketten eine Aufnahme durch die Zellen verhindern, findet diese Art der intravasalen Proteinstabilisierung jedoch nur im Falle einer therapeutischen Intervention mit Zelloberflächenmarkern bzw. Rezeptoren eine Anwendung. Im Falle der

Interferenz mit intrazellulären Zielstrukturen bieten sich weitere Möglichkeiten der Verwendung geeigneter Carrier, welche sowohl einen Schutz durch Einbau biologischer Wirkstoffe (Proteine, Peptide, Nukleinsäuren) als auch eine zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Freisetzung dieser Wirkstoffe ermöglichen. Hierzu zählen polymere, biologisch einsetzbare Nanopartikel wie Liposom-basierte Partikel, deren Identifikation, Entwicklung und Anwendung Gegenstand derzeitiger pharmakologischer und medizinischer Forschung sind (Jain et al., 2013). Neben dem Schutz vor Degradation und renaler Clearance sowie dem Besitz zellpenetrierender Eigenschaften, ist für eine krebstherapeutische Anwendung von Liposom- oder anderer Nanopartikel-verkapselter Protein-Therapeutika die Fähigkeit einer spezifischen Erkennung von Tumorzellen ein wesentlich entscheidendes Kriterium. Hierbei stellt die Identifikation von Tumorzell-erkennenden Peptidsequenzen mit zugleich zellpenetrierenden Eigenschaften, welche für eine Fusionierung mit der Oberfläche pharmakologischer, nicht-invasiver Carrier genutzt werden können, ebenfalls eine Herausforderung gegenwärtiger Forschung dar (El-Sayed et al., 2009; Kondo et al., 2012). Eine weitere Möglichkeit der therapeutischen Nutzbarmachung von Peptidaptameren wie S5-DBD-PA bietet der Gentransfer über virale Vektoren. Über die Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren mit Glykoproteinen, abgeleitet aus der Hülle des Masernvirus, und scFv-Fragmenten, welche spezifisch bestimmte Tumor-assoziierte Oberflächenmarker wie CD133 oder CD105 erkennen (Anliker et al., 2010; Ayala-Breton et al., 2012), könnte zukünftig ein Transfer von therapeutischen Peptiden, Proteinen oder Nukleinsäuren ermöglicht und zugleich eine Schädigung in gesundem Gewebe reduziert werden. Unabhängig von einer Optimierung der Peptidaptamer *in vivo* Applikation, kann S5-DBD-PA als Leitstruktur für ein Hochdurchsatz-Interaktionsscreening (HTS – „High-Throughput-Screening“) natürlicher und synthetischer niedermolekularer Verbindungen genutzt werden (Baines & Colas, 2006; Colas, 2008; Groner et al., 2012). Basierend auf der Annahme, dass eine niedermolekulare Verbindung, welche S5-DBD-PA an seiner Interaktionsschnittstelle mit der Stat5-DBD verdrängt, eine gleiche oder stärkere Stat5-inhibierende Aktivität aufweist, könnte die Stat5-DBD/S5-DBD-PA Peptidaptamer-Interaktion als Screening-Plattform für die Identifikation neuer chemotherapeutischer Wirkstoffe, mit erhöhter Stabilität und Bioverfügbarkeit, genutzt werden. Methoden wie der Alpha-Screen oder FRET-Assay („Fluorescence Resonance Energy Transfer“) bilden die Grundlage für HTS-Verfahren zur Identifikation von niedermolekularen Verbindungen, welche in der Lage sind mit Protein-Protein Interaktionen zu interferieren. Hierfür müssen beide Interaktionspartner mit fluoreszierenden Donor- und Akzeptor-Beads gekoppelt werden. Erste Analysen ergaben, dass die funktionellen Tags, im Speziellen die 9-R PTD, des rekombinanten S5-DBD-PA Peptidaptamer-Konstrukts im

| Diskussion

Fälle einer Anwendung im *in vitro* Alpha-Screen Verfahren ungeeignet sind (Daten nicht gezeigt), weshalb die Entfernung dieser Tags nach der Proteinaufreinigung, durch Thrombin-Spaltung, ebenfalls einen entscheidenden nächsten Schritt in der Nutzbarmachung des S5-DBD-PA Peptidaptamers darstellt.

LITERATURVERZEICHNIS

Abedi MR, Caponigro G & Kamb A (1998). *Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides*. Nucleic acids research 26, 623-630.

Ahonen TJ, Xie J, LeBaron MJ, Zhu J, Nurmi M, Alanen K, Rui H & Nevalainen MT (2003). *Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells*. The Journal of biological chemistry 278, 27287-27292.

Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C & Poli V (2001). *Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver*. Molecular and cellular biology 21, 1621-1632.

Anliker B, Abel T, Kneissl S, Hlavaty J, Caputi A, Brynza J, Schneider IC, Munch RC, Petznek H, Kontermann RE *et al.* (2010). *Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors*. Nature methods 7, 929-935.

Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, Modlin RL & Shuai K (2003). *PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4*. The Journal of biological chemistry 278, 21327-21330.

Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K & Kamada N (1991). *Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation*. Blood 77, 2031-2036.

Auernhammer CJ, Bousquet C & Melmed S (1999). *Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 6964-6969.

Ayala-Breton C, Barber GN, Russell SJ & Peng KW (2012). *Retargeting vesicular stomatitis virus using measles virus envelope glycoproteins*. Human gene therapy 23, 484-491.

Baines IC & Colas P (2006). *Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery*. Drug discovery today 11, 334-341.

Bar-Natan M, Nelson EA, Walker SR, Kuang Y, Distel RJ & Frank DA (2012). *Dual inhibition of Jak2 and STAT5 enhances killing of myeloproliferative neoplasia cells*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK 26, 1407-1410.

Barahmand-Pour F, Meinke A, Groner B & Decker T (1998). *Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast*. The Journal of biological chemistry 273, 12567-12575.

Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D & Kafatos FC (1999). *Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection*. The EMBO journal 18, 959-967.

Basham B, Sathe M, Grein J, McClanahan T, D'Andrea A, Lees E & Rascole A (2008). *In vivo identification of novel STAT5 target genes*. Nucleic acids research 36, 3802-3818.

Baskiewicz-Masiuk M, Masiuk M & Machalinski B (2003). *The influence of STAT5 antisense oligonucleotides on the proliferation and apoptosis of selected human leukaemic cell lines*. Cell proliferation 36, 265-278.

Baudler M, Scharl M & Altschmied J (1999). *Specific activation of a STAT family member in Xiphophorus melanoma cells*. Experimental cell research 249, 212-220.

Becker S, Groner B & Muller CW (1998). *Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA*. Nature 394, 145-151.

Begitt A, Droscher M, Knobeloch KP & Vinkemeier U (2011). *SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyperresponsiveness to IFNgamma*. Blood 118, 1002-1007.

Begitt A, Meyer T, van Rossum M & Vinkemeier U (2000). *Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 10418-10423.

Ben-Shlomo I, Yu Hsu S, Rauch R, Kowalski HW & Hsueh AJ (2003). *Signaling receptome: a genomic and evolutionary perspective of plasma membrane receptors involved in signal transduction*. Science's STKE : signal transduction knowledge environment 2003, RE9.

Benekli M, Baumann H & Wetzler M (2009). *Targeting signal transducer and activator of transcription signaling pathway in leukemias*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27, 4422-4432.

Bernado P, Perez Y, Blobel J, Fernandez-Recio J, Svergun DI & Pons M (2009). *Structural characterization of unphosphorylated STAT5a oligomerization equilibrium in solution by small-angle X-ray scattering*. Protein science : a publication of the Protein Society 18, 716-726.

Beuvink I, Hess D, Flotow H, Hofsteenge J, Groner B & Hynes NE (2000). *Stat5a serine phosphorylation. Serine 779 is constitutively phosphorylated in the mammary gland, and serine 725 phosphorylation influences prolactin-stimulated in vitro DNA binding activity*. The Journal of biological chemistry 275, 10247-10255.

Bhattacharya S & Schindler C (2003). *Regulation of Stat3 nuclear export*. The Journal of clinical investigation 111, 553-559.

Bickle MB, Dusserre E, Moncorge O, Bottin H & Colas P (2006). *Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures*. Nature protocols 1, 1066-1091.

Bidwell GL, 3rd & Raucher D (2006). *Enhancing the antiproliferative effect of topoisomerase II inhibitors using a polypeptide inhibitor of c-Myc*. Biochemical pharmacology 71, 248-256.

Bidwell GL, 3rd & Raucher D (2009). *Therapeutic peptides for cancer therapy. Part I - peptide inhibitors of signal transduction cascades*. Expert opinion on drug delivery 6, 1033-1047.

Bitler BG & Schroeder JA (2010). *Anti-cancer therapies that utilize cell penetrating peptides*. Recent patents on anti-cancer drug discovery 5, 99-108.

Bjorklund M, Heikkila P & Koivunen E (2004). *Peptide inhibition of catalytic and noncatalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion*. The Journal of biological chemistry 279, 29589-29597.

Borghouts C, Delis N, Brill B, Weiss A, Mack L, Lucks P & Groner B (2012). *A membrane penetrating aptamer inhibits STAT3 function and suppresses the growth of STAT3 addicted tumor cells*. JAK-STAT 1, 44-54.

Borghouts C, Kunz C, Delis N & Groner B (2008a). *Monomeric recombinant peptide aptamers are required for efficient intracellular uptake and target inhibition*. *Molecular cancer research : MCR* 6, 267-281.

Borghouts C, Kunz C & Groner B (2005a). *Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics*. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 11, 713-726.

Borghouts C, Kunz C & Groner B (2005b). *Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy*. *Expert opinion on biological therapy* 5, 783-797.

Borghouts C, Kunz C & Groner B (2008b). *Peptide aptamer libraries*. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 11, 135-145.

Borghouts C, Tittmann H, Delis N, Kirchenbauer M, Brill B & Groner B (2010). *The intracellular delivery of a recombinant peptide derived from the acidic domain of PIAS3 inhibits STAT3 transactivation and induces tumor cell death*. *Molecular cancer research : MCR* 8, 539-553.

Bouquier N, Fromont S, Zeeh JC, Auziol C, Larrousse P, Robert B, Zeghouf M, Cherfils J, Debant A & Schmidt S (2009). *Aptamer-derived peptides as potent inhibitors of the oncogenic RhoGEF Tgat*. *Chemistry & biology* 16, 391-400.

Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J & Brattain DE (1981). *Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma*. *Cancer research* 41, 1751-1756.

Bromberg J (2002). *Stat proteins and oncogenesis*. *The Journal of clinical investigation* 109, 1139-1142.

Brown S & Zeidler MP (2008). *Unphosphorylated STATs go nuclear*. *Current opinion in genetics & development* 18, 455-460.

Brozik A, Casey NP, Hegedus C, Bors A, Kozma A, Andrikovics H, Geiszt M, Nemet K & Magocsi M (2006). *Reduction of Bcr-Abl function leads to erythroid differentiation of K562 cells via downregulation of ERK*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1090, 344-354.

Buser AC, Obr AE, Kabotyanski EB, Grimm SL, Rosen JM & Edwards DP (2011). *Progesterone receptor directly inhibits beta-casein gene transcription in mammary epithelial cells through promoting promoter and enhancer repressive chromatin modifications*. *Molecular endocrinology* 25, 955-968.

Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M & Hoppe-Seyler F (2000). *Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6693-6697.

Caffarel MM, Zaragoza R, Pensa S, Li J, Green AR & Watson CJ (2012). *Constitutive activation of JAK2 in mammary epithelium elevates Stat5 signalling, promotes alveologenesis and resistance to cell death, and contributes to tumorigenesis*. *Cell death and differentiation* 19, 511-522.

Cain JA, Xiang Z, O'Neal J, Kreisel F, Colson A, Luo H, Hennighausen L & Tomasson MH (2007). *Myeloproliferative disease induced by TEL-PDGFRB displays dynamic range sensitivity to Stat5 gene dosage*. *Blood* 109, 3906-3914.

- Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N & Russo A (2003). *STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis*. Journal of cellular physiology 197, 157-168.
- Cao S, Wang C, Zheng Q, Qiao Y, Xu K, Jiang T & Wu A (2011). *STAT5 regulates glioma cell invasion by pathways dependent and independent of STAT5 DNA binding*. Neuroscience letters 487, 228-233.
- Caron NJ, Quenneville SP & Tremblay JP (2004). *Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-fusion proteins*. Biochemical and biophysical research communications 319, 12-20.
- Carron C, Cormier F, Janin A, Lacronique V, Giovannini M, Daniel MT, Bernard O & Ghysdael J (2000). *TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia*. Blood 95, 3891-3899.
- Chai SK, Nichols GL & Rothman P (1997). *Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients*. Journal of immunology 159, 4720-4728.
- Chatain N, Ziegler P, Fahrenkamp D, Jost E, Moriggl R, Schmitz-Van de Leur H & Muller-Newen G (2012). *Src family kinases mediate cytoplasmic retention of activated STAT5 in BCR-ABL-positive cells*. Oncogene.
- Chatterjee-Kishore M, Kishore R, Hicklin DJ, Marincola FM & Ferrone S (1998). *Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression*. The Journal of biological chemistry 273, 16177-16183.
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Jr. & Kuriyan J (1998). *Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA*. Cell 93, 827-839.
- Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Shimoda M, Matsuoka M & Aiso S (2009). *Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons*. Molecular psychiatry 14, 206-222.
- Chien CM, Yang SH, Lin KL, Chen YL, Chang LS & Lin SR (2008). *Novel indoloquinoline derivative, IQDMA, suppresses STAT5 phosphorylation and induces apoptosis in HL-60 cells*. Chemo-biological interactions 176, 40-47.
- Choudhary C, Brandts C, Schwable J, Tickenbrock L, Sargin B, Ueker A, Bohmer FD, Berdel WE, Muller-Tidow C & Serve H (2007). *Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD*. Blood 110, 370-374.
- Chueh FY, Leong KF, Cronk RJ, Venkitachalam S, Pabich S & Yu CL (2011). *Nuclear localization of pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2), a mitochondrial enzyme, and its role in signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)-dependent gene transcription*. Cellular signalling 23, 1170-1178.
- Chueh FY, Leong KF & Yu CL (2010). *Mitochondrial translocation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in leukemic T cells and cytokine-stimulated cells*. Biochemical and biophysical research communications 402, 778-783.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P & Shuai K (1997). *Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3*. Science 278, 1803-1805.

- Clark DE, Williams CC, Duplessis TT, Moring KL, Notwick AR, Long W, Lane WS, Beuvink I, Hynes NE & Jones FE (2005). *ERBB4/HER4 potentiates STAT5A transcriptional activity by regulating novel STAT5A serine phosphorylation events*. The Journal of biological chemistry 280, 24175-24180.
- Clark J, Edwards S, Feber A, Flohr P, John M, Giddings I, Crossland S, Stratton MR, Wooster R, Campbell C et al. (2003). *Genome-wide screening for complete genetic loss in prostate cancer by comparative hybridization onto cDNA microarrays*. Oncogene 22, 1247-1252.
- Coelen RJ, Jose DG & May JT (1983). *The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of the primate retroviruses SSV 1/SSAV 1 and BaEV*. Archives of virology 75, 307-311.
- Cohen BA, Colas P & Brent R (1998). *An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 14272-14277.
- Colas P (2008). *The eleven-year switch of peptide aptamers*. Journal of biology 7, 2.
- Colas P & Brent R (1998). *The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology*. Trends in biotechnology 16, 355-363.
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J & Brent R (1996). *Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2*. Nature 380, 548-550.
- Collins SJ (1987). *The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression*. Blood 70, 1233-1244.
- Collum RG, Brutsaert S, Lee G & Schindler C (2000). *A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 10120-10125.
- Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R & Ballmer-Hofer K (2003). *Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans*. The Journal of biological chemistry 278, 35109-35114.
- Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr., Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN et al. (1995). *Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes*. Genomics 29, 225-228.
- Copland M, Pellicano F, Richmond L, Allan EK, Hamilton A, Lee FY, Weinmann R & Holyoake TL (2008). *BMS-214662 potently induces apoptosis of chronic myeloid leukemia stem and progenitor cells and synergizes with tyrosine kinase inhibitors*. Blood 111, 2843-2853.
- Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW & Druker BJ (2011). *Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity*. The Journal of clinical investigation 121, 396-409.
- Cotarla I, Ren S, Zhang Y, Gehan E, Singh B & Furth PA (2004). *Stat5a is tyrosine phosphorylated and nuclear localized in a high proportion of human breast cancers*. International journal of cancer Journal international du cancer 108, 665-671.
- Courapied S, Sellier H, de Carne Trecesson S, Vigneron A, Bernard AC, Gamelin E, Barre B & Coqueret O (2010). *The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition*. The Journal of biological chemistry 285, 26765-26778.

- Crawford M, Woodman R & Ko Ferrigno P (2003). *Peptide aptamers: tools for biology and drug discovery*. Briefings in functional genomics & proteomics 2, 72-79.
- Croker BA, Kiu H & Nicholson SE (2008). *SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway*. Seminars in cell & developmental biology 19, 414-422.
- Cui X, Zhang L, Luo J, Rajasekaran A, Hazra S, Cacalano N & Dubinett SM (2007a). *Unphosphorylated STAT6 contributes to constitutive cyclooxygenase-2 expression in human non-small cell lung cancer*. Oncogene 26, 4253-4260.
- Cui Y, Hosui A, Sun R, Shen K, Gavrilova O, Chen W, Cam MC, Gao B, Robinson GW & Hennighausen L (2007b). *Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration*. Hepatology 46, 504-513.
- Cui Y, Riedlinger G, Miyoshi K, Tang W, Li C, Deng CX, Robinson GW & Hennighausen L (2004). *Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation*. Molecular and cellular biology 24, 8037-8047.
- Dagvadorj A, Collins S, Jomain JB, Abdulghani J, Karras J, Zellweger T, Li H, Nurmi M, Alanen K, Mirtti T et al. (2007). *Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via Janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway*. Endocrinology 148, 3089-3101.
- Dagvadorj A, Kirken RA, Leiby B, Karras J & Nevalainen MT (2008). *Transcription factor signal transducer and activator of transcription 5 promotes growth of human prostate cancer cells in vivo*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14, 1317-1324.
- Daniel NN, Pernis A & Rothman PB (1995). *Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene*. Science 269, 1875-1877.
- Davey HW, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Hilton DJ & Adams TE (1999). *STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver*. Molecular and cellular endocrinology 158, 111-116.
- Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR & Kouzarides T (2009). *JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin*. Nature 461, 819-822.
- de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Jove R & Koenderman L (1999). *STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells*. Blood 94, 1108-1112.
- de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW & Koenderman L (2000). *STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells*. Molecular cell biology research communications : MCBRC 3, 299-305.
- Decker T & Kovarik P (2000). *Serine phosphorylation of STATs*. Oncogene 19, 2628-2637.
- Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M & Thrasher AJ (2002). *High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter*. Human gene therapy 13, 803-813.

Demaria M, Giorgi C, Lebedzinska M, Esposito G, D'Angeli L, Bartoli A, Gough DJ, Turkson J, Levy DE, Watson CJ *et al.* (2010). *A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction.* Aging 2, 823-842.

Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G & Prochiantz A (1996). *Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent.* The Journal of biological chemistry 271, 18188-18193.

Desrivieres S, Kunz C, Barash I, Vafaizadeh V, Borghouts C & Groner B (2006). *The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition.* Journal of mammary gland biology and neoplasia 11, 75-87.

Dong J, Tong T, Reynado AM, Rosen JM, Huang S & Li Y (2010). *Genetic manipulation of individual somatic mammary cells in vivo reveals a master role of STAT5a in inducing alveolar fate commitment and lactogenesis even in the absence of ovarian hormones.* Developmental biology 346, 196-203.

Druker BJ (2002). *STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy.* Trends in molecular medicine 8, S14-18.

Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM *et al.* (2006). *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.* The New England journal of medicine 355, 2408-2417.

Du W, Wang YC, Hong J, Su WY, Lin YW, Lu R, Xiong H & Fang JY (2012). *STAT5 isoforms regulate colorectal cancer cell apoptosis via reduction of mitochondrial membrane potential and generation of reactive oxygen species.* Journal of cellular physiology 227, 2421-2429.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D & Naldini L (1998). *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.* Journal of virology 72, 8463-8471.

Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M & Bucher P (2001). *DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites.* The Journal of biological chemistry 276, 6675-6688.

Eilon T & Barash I (2009). *Distinct gene-expression profiles characterize mammary tumors developed in transgenic mice expressing constitutively active and C-terminally truncated variants of STAT5.* BMC genomics 10, 231.

El-Sayed A, Futaki S & Harashima H (2009). *Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment.* The AAPS journal 11, 13-22.

Engblom D, Kornfeld JW, Schwake L, Tronche F, Reimann A, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R & Schutz G (2007). *Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression.* Genes & development 21, 1157-1162.

Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, Jiang K, Bailey RD, Garcia R, Jove R, Djeu JY, Loughran TP, Jr. & Wei S (2001). *Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils.* Journal of immunology 166, 7486-7495.

Evans MK, Yu CR, Lohani A, Mahdi RM, Liu X, Trzeciak AR & Egwuagu CE (2007). *Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals.* Oncogene 26, 1941-1948.

Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B & Barsoum J (1994). *Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 664-668.

Fearon ER & Vogelstein B (1990). *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 61, 759-767.

Felsher DW (2008). *Tumor dormancy and oncogene addiction*. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 116, 629-637.

Ferbeyre G & Moriggl R (2011). *The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes*. Biochimica et biophysica acta 1815, 104-114.

Fields S & Song O (1989). *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature 340, 245-246.

Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppe M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram F & Giacca M (2003). *Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins*. The Journal of biological chemistry 278, 34141-34149.

Foerg C, Ziegler U, Fernandez-Carneado J, Giralto E, Rennert R, Beck-Sickinger AG & Merkle HP (2005). *Decoding the entry of two novel cell-penetrating peptides in HeLa cells: lipid raft-mediated endocytosis and endosomal escape*. Biochemistry 44, 72-81.

Fox EM, Bernaciak TM, Wen J, Weaver AM, Shupnik MA & Silva CM (2008). *Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells*. Molecular endocrinology 22, 1781-1796.

Frantsve J, Schwaller J, Sternberg DW, Kutok J & Gilliland DG (2001). *Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation*. Molecular and cellular biology 21, 3547-3557.

Friedbichler K, Kerenyi MA, Kovacic B, Li G, Hoelbl A, Yahiaoui S, Sexl V, Mullner EW, Fajmann S, Cerny-Reiterer S et al. (2010). *Stat5a serine 725 and 779 phosphorylation is a prerequisite for hematopoietic transformation*. Blood 116, 1548-1558.

Funakoshi-Tago M, Tago K, Abe M, Sonoda Y & Kasahara T (2010). *STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant*. The Journal of biological chemistry 285, 5296-5307.

Furth PA, Nakles RE, Millman S, Diaz-Cruz ES & Cabrera MC (2011). *Signal transducer and activator of transcription 5 as a key signaling pathway in normal mammary gland developmental biology and breast cancer*. Breast cancer research : BCR 13, 220.

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F et al. (1979). *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia*. Blood 54, 713-733.

Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S et al. (2001). *Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells*. Oncogene 20, 2499-2513.

George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W, 2nd, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P et al. (2008). *Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma*. Nature 455, 975-978.

Gesbert F & Griffin JD (2000). *Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5*. Blood 96, 2269-2276.

Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C & Groner B (2004). *The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5*. The Journal of biological chemistry 279, 3563-3572.

Geyer CR & Brent R (2000). *Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries*. Methods in enzymology 328, 171-208.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H & Parks WP (1973). *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. Journal of the National Cancer Institute 51, 1417-1423.

Gilbert S, Zhang R, Denson L, Moriggl R, Steinbrecher K, Shroyer N, Lin J & Han X (2012). *Enterocyte STAT5 promotes mucosal wound healing via suppression of myosin light chain kinase-mediated loss of barrier function and inflammation*. EMBO molecular medicine 4, 109-124.

Goldman JM & Melo JV (2008). *BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work?* Acta haematologica 119, 212-217.

Graham FL, Smiley J, Russell WC & Nairn R (1977). *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. The Journal of general virology 36, 59-74.

Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, Kolbe T, Becker V, Dolznig H, Pfeiffer K, Klingmuller U, Muller M, Beug H et al. (2008). *Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2*. Blood 111, 4511-4522.

Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J & Schreiber RD (1995). *Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process*. Immunity 2, 677-687.

Grimley PM, Dong F & Rui H (1999). *Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation*. Cytokine & growth factor reviews 10, 131-157.

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F & Kay MA (2006). *Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways*. Nature 441, 537-541.

Groner B (2002). *Transcription factor regulation in mammary epithelial cells*. Domestic animal endocrinology 23, 25-32.

Groner B & Gouilleux F (1995). *Prolactin-mediated gene activation in mammary epithelial cells*. Current opinion in genetics & development 5, 587-594.

Groner B & Hennighausen L (2012). *The versatile regulation of cellular events by Jak-Stat signaling: from transcriptional control to microtubule dynamics and energy metabolism*. Horm Mol Biol Clin Invest 10, 193-200.

Groner B, Lucks P & Borghouts C (2008). *The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment*. Seminars in cell & developmental biology 19, 341-350.

Groner B, Weber A & Mack L (2012). *Increasing the range of drug targets: interacting peptides provide leads for the development of oncoprotein inhibitors*. Bioengineered 3, 320-325.

Literaturverzeichnis

Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, Leiby B, Bonuccelli G, Lisanti MP, Addya S, Fortina P, Dasgupta A, Hyslop T *et al.* (2010). *Transcription factor Stat3 stimulates metastatic behavior of human prostate cancer cells in vivo, whereas Stat5b has a preferential role in the promotion of prostate cancer cell viability and tumor growth.* The American journal of pathology 176, 1959-1972.

Gupta S, Yan H, Wong LH, Ralph S, Krolewski J & Schindler C (1996). *The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals.* The EMBO journal 15, 1075-1084.

Gururaja TL, Narasimhamurthy S, Payan DG & Anderson DC (2000). *A novel artificial loop scaffold for the noncovalent constraint of peptides.* Chemistry & biology 7, 515-527.

Gutzman JH, Rugowski DE, Nikolai SE & Schuler LA (2007). *Stat5 activation inhibits prolactin-induced AP-1 activity: distinct prolactin-initiated signals in tumorigenesis dependent on cell context.* Oncogene 26, 6341-6348.

Haan S, Kortylewski M, Behrmann I, Muller-Esterl W, Heinrich PC & Schaper F (2000). *Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation.* The Biochemical journal 345 Pt 3, 417-421.

Hamdi A & Colas P (2012). *Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery.* Trends in pharmacological sciences 33, 109-118.

Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, Zhang B, Myssina S, Allan EK, Nicolini FE, Muller-Tidow C, Bhatia R, Brunton VG *et al.* (2012). *Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival.* Blood 119, 1501-1510.

Hanahan D & Weinberg RA (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell 144, 646-674.

Hantschel O, Warsch W, Eckelhart E, Kaupe I, Grebien F, Wagner KU, Superti-Furga G & Sexl V (2012). *BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia.* Nature chemical biology 8, 285-293.

Harir N, Boudot C, Friedbichler K, Sonneck K, Kondo R, Martin-Lannere S, Kenner L, Kerenyi M, Yahiaoui S, Gouilleux-Gruart V *et al.* (2008). *Oncogenic Kit controls neoplastic mast cell growth through a Stat5/PI3-kinase signaling cascade.* Blood 112, 2463-2473.

Harir N, Pecquet C, Kerenyi M, Sonneck K, Kovacic B, Nyga R, Brevet M, Dhennin I, Gouilleux-Gruart V, Beug H *et al.* (2007). *Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias.* Blood 109, 1678-1686.

Hassel JC, Winnemoller D, Scharl M & Wellbrock C (2008). *STAT5 contributes to antiapoptosis in melanoma.* Melanoma research 18, 378-385.

Haura EB, Turkson J & Jove R (2005). *Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer.* Nature clinical practice Oncology 2, 315-324.

Heim MH (1999). *The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus.* Journal of receptor and signal transduction research 19, 75-120.

Hennighausen L & Robinson GW (2008). *Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B.* Genes & development 22, 711-721.

Hetschko H, Voss V, Seifert V, Prehn JH & Kogel D (2008). *Upregulation of DR5 by proteasome inhibitors potently sensitizes glioma cells to TRAIL-induced apoptosis*. The FEBS journal 275, 1925-1936.

Heuser M, Sly LM, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Lai C, Weng A, Leung M, Lin G, Brookes C, Fung S et al. (2009). *Modeling the functional heterogeneity of leukemia stem cells: role of STAT5 in leukemia stem cell self-renewal*. Blood 114, 3983-3993.

Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H & Scheidereit C (2002). *Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity*. The Journal of experimental medicine 196, 605-617.

Hoelbl A, Kovacic B, Kerényi MA, Simma O, Warsch W, Cui Y, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R & Sexl V (2006). *Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation*. Blood 107, 4898-4906.

Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, Fajmann S, Grebien F, Warsch W, Stengl G et al. (2010). *Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia*. EMBO molecular medicine 2, 98-110.

Holmgren A (1995). *Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide*. Structure 3, 239-243.

Hoppe-Seyler F & Butz K (2000). *Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine*. Journal of molecular medicine 78, 426-430.

Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Denk C, Fitscher BA, Klevenz B, Tomai E & Butz K (2001). *Peptide aptamers: new tools to study protein interactions*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 78, 105-111.

Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Tomai E & Butz K (2004). *Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function*. Current molecular medicine 4, 529-538.

Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F & Fernandez-Luna JL (2000). *Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL*. The Journal of experimental medicine 191, 977-984.

Horvath CM (2000). *STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals*. Trends in biochemical sciences 25, 496-502.

Horvath CM, Stark GR, Kerr IM & Darnell JE, Jr. (1996). *Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex*. Molecular and cellular biology 16, 6957-6964.

Huang M, Dorsey JF, Epling-Burnette PK, Nimmanapalli R, Landowski TH, Mora LB, Niu G, Sinibaldi D, Bai F, Kraker A et al. (2002a). *Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells*. Oncogene 21, 8804-8816.

Huang S, Bucana CD, Van Arsdall M & Fidler IJ (2002b). *Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells*. Oncogene 21, 2504-2512.

- Iavnilovitch E, Cardiff RD, Groner B & Barash I (2004). *Deregulation of Stat5 expression and activation causes mammary tumors in transgenic mice*. International journal of cancer Journal international du cancer 112, 607-619.
- Ilaria RL, Jr. & Van Etten RA (1996). *P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members*. The Journal of biological chemistry 271, 31704-31710.
- Imming P, Sinning C & Meyer A (2006). *Drugs, their targets and the nature and number of drug targets*. Nature reviews Drug discovery 5, 821-834.
- Iorns E, Lord CJ, Turner N & Ashworth A (2007). *Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery*. Nature reviews Drug discovery 6, 556-568.
- Irino T, Uemura M, Yamane H, Umemura S, Utsumi T, Kakazu N, Shirakawa T, Ito M, Suzuki T & Kinoshita K (2011). *JAK2 V617F-dependent upregulation of PU.1 expression in the peripheral blood of myeloproliferative neoplasm patients*. PloS one 6, e22148.
- Iyer J & Reich NC (2008). *Constitutive nuclear import of latent and activated STAT5a by its coiled coil domain*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 22, 391-400.
- Jacquel A, Herrant M, Legros L, Belhacene N, Luciano F, Pages G, Hofman P & Auberger P (2003). *Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17, 2160-2162.
- Jain A, Jain A, Gulbake A, Shilpi S, Hurkat P & Jain SK (2013). *Peptide and protein delivery using new drug delivery systems*. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems 30, 293-329.
- James P, Halladay J & Craig EA (1996). *Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast*. Genetics 144, 1425-1436.
- Jevsevar S, Kunstelj M & Porekar VG (2010). *PEGylation of therapeutic proteins*. Biotechnology journal 5, 113-128.
- Jinawath N, Vasoontara C, Jinawath A, Fang X, Zhao K, Yap KL, Guo T, Lee CS, Wang W, Balgley BM et al. (2010). *Oncoproteomic analysis reveals co-upregulation of RELA and STAT5 in carboplatin resistant ovarian carcinoma*. PloS one 5, e11198.
- John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell JE, Jr. & Leonard WJ (1999). *The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5*. Molecular and cellular biology 19, 1910-1918.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF & Jones LW (1979). *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Investigative urology 17, 16-23.
- Kanovsky M, Raffo A, Drew L, Rosal R, Do T, Friedman FK, Rubinstein P, Visser J, Robinson R, Brandt-Rauf PW et al. (2001). *Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 12438-12443.
- Kardinal C, Konkol B, Lin H, Eulitz M, Schmidt EK, Estrov Z, Talpaz M, Arlinghaus RB & Feller SM (2001). *Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2-Sos complexes*. Blood 98, 1773-1781.

- Kawano T, Ito M, Raina D, Wu Z, Rosenblatt J, Avigan D, Stone R & Kufe D (2007). *MUC1 oncoprotein regulates Bcr-Abl stability and pathogenesis in chronic myelogenous leukemia cells*. Cancer research 67, 11576-11584.
- Kawata T, Shevchenko A, Fukuzawa M, Jermyn KA, Totty NF, Zhukovskaya NV, Sterling AE, Mann M & Williams JG (1997). *SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium*. Cell 89, 909-916.
- Kerenyi MA, Grebien F, Gehart H, Schifrer M, Artaker M, Kovacic B, Beug H, Moriggl R & Mullner EW (2008). *Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1*. Blood 112, 3878-3888.
- Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S & Brenner HJ (1979). *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. European journal of cancer 15, 659-670.
- Kingston RE, Chen CA & Okayama H (2003). *Calcium phosphate transfection*. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 20, Unit 20 23.
- Kishi K (1985). *A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors*. Leukemia research 9, 381-390.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J & Schindler CW (2002). *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. Gene 285, 1-24.
- Klejman A, Schreiner SJ, Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Wilson M, Smithgall TE & Skorski T (2002). *The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells*. The EMBO journal 21, 5766-5774.
- Koide A, Bailey CW, Huang X & Koide S (1998). *The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins*. Journal of molecular biology 284, 1141-1151.
- Kondo E, Saito K, Tashiro Y, Kamide K, Uno S, Furuya T, Mashita M, Nakajima K, Tsumuraya T, Kobayashi N et al. (2012). *Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems*. Nature communications 3, 951.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST & van Oers MH (1994). *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood 84, 1415-1420.
- Kornfeld JW, Grebien F, Kerenyi MA, Friedbichler K, Kovacic B, Zankl B, Hoelbl A, Nivarti H, Beug H, Sexl V et al. (2008). *The different functions of Stat5 and chromatin alteration through Stat5 proteins*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 13, 6237-6254.
- Kosova B, Tezcanli B, Ekiz HA, Cakir Z, Selvi N, Dalmizrak A, Kartal M, Gunduz U & Baran Y (2010). *Suppression of STAT5A increases chemotherapeutic sensitivity in imatinib-resistant and imatinib-sensitive K562 cells*. Leukemia & lymphoma 51, 1895-1901.
- Kovacic B, Stoiber D, Moriggl R, Weisz E, Ott RG, Kreibich R, Levy DE, Beug H, Freissmuth M & Sexl V (2006). *STAT1 acts as a tumor promoter for leukemia development*. Cancer cell 10, 77-87.
- Kramer OH & Heinzl T (2010). *Phosphorylation-acetylation switch in the regulation of STAT1 signaling*. Molecular and cellular endocrinology 315, 40-48.

Literaturverzeichnis

Kunz C, Borghouts C, Buerger C & Groner B (2006). *Peptide aptamers with binding specificity for the intracellular domain of the ErbB2 receptor interfere with AKT signaling and sensitize breast cancer cells to Taxol*. Molecular cancer research : MCR 4, 983-998.

Lacronique V, Boureux A, Monni R, Dumon S, Mauchauffe M, Mayeux P, Gouilleux F, Berger R, Gisselbrecht S, Ghysdael J et al. (2000). *Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells*. Blood 95, 2076-2083.

Ladner RC (1995). *Constrained peptides as binding entities*. Trends in biotechnology 13, 426-430.

Laurence A, Pesu M, Silvennoinen O & O'Shea J (2012). *JAK Kinases in Health and Disease: An Update*. The open rheumatology journal 6, 232-244.

LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF & McCoy JM (1993). *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. Bio/technology 11, 187-193.

Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC & Gougeon ML (1997). *Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods*. Journal of immunological methods 209, 111-123.

Lee JE, Yang YM, Liang FX, Gough DJ, Levy DE & Sehgal PB (2012). *Nongenomic STAT5-dependent effects on Golgi apparatus and endoplasmic reticulum structure and function*. American journal of physiology Cell physiology 302, C804-820.

Lee TK, Man K, Poon RT, Lo CM, Yuen AP, Ng IO, Ng KT, Leonard W & Fan ST (2006). *Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition*. Cancer research 66, 9948-9956.

Leist M & Nicotera P (1997). *The shape of cell death*. Biochemical and biophysical research communications 236, 1-9.

Leong PL, Xi S, Drenning SD, Dyer KF, Wentzel AL, Lerner EC, Smithgall TE & Grandis JR (2002). *Differential function of STAT5 isoforms in head and neck cancer growth control*. Oncogene 21, 2846-2853.

Leverrier Y, Thomas J, Mathieu AL, Low W, Blanquier B & Marvel J (1999). *Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells*. Cell death and differentiation 6, 290-296.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S et al. (2005). *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis*. Cancer cell 7, 387-397.

Levy DE & Darnell JE, Jr. (2002). *Stats: transcriptional control and biological impact*. Nature reviews Molecular cell biology 3, 651-662.

Levy DE & Marie IJ (2012). *STATus report on tetramers*. Immunity 36, 553-555.

Lewis RS & Ward AC (2008). *Stat5 as a diagnostic marker for leukemia*. Expert review of molecular diagnostics 8, 73-82.

Li B & Fields S (1993). *Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 7, 957-963.

Li G, Miskimen KL, Wang Z, Xie XY, Tse W, Gouilleux F, Moriggl R & Bunting KD (2010). *Effective targeting of STAT5-mediated survival in myeloproliferative neoplasms using ABT-737 combined with rapamycin*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK 24, 1397-1405.

Li G, Wang Z, Zhang Y, Kang Z, Haviernikova E, Cui Y, Hennighausen L, Moriggl R, Wang D, Tse W et al. (2007). *STAT5 requires the N-domain to maintain hematopoietic stem cell repopulating function and appropriate lymphoid-myeloid lineage output*. Experimental hematology 35, 1684-1694.

Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, Ealley EL, Zhang Y, Nurmi M, Singh B et al. (2004). *Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade*. Cancer research 64, 4774-4782.

Li L & Shaw PE (2002). *Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines*. The Journal of biological chemistry 277, 17397-17405.

Li WX (2008). *Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling*. Trends in cell biology 18, 545-551.

Liao J, Fu Y & Shuai K (2000). *Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 5267-5272.

Liao Z & Nevalainen MT (2011). *Targeting transcription factor Stat5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer*. American journal of translational research 3, 133-138.

Lin JX, Li P, Liu D, Jin HT, He J, Ata Ur Rasheed M, Rochman Y, Wang L, Cui K, Liu C et al. (2012). *Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function*. Immunity 36, 586-599.

Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD & Shuai K (1998a). *Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 10626-10631.

Liu L, McBride KM & Reich NC (2005). *STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 8150-8155.

Liu X, Gallego MI, Smith GH, Robinson GW & Hennighausen L (1998b). *Functional rescue of Stat5a-null mammary tissue through the activation of compensating signals including Stat5b*. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research 9, 795-803.

Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B & Hennighausen L (1995). *Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 8831-8835.

- Lockyer HM, Tran E & Nelson BH (2007). *STAT5 is essential for Akt/p70S6 kinase activity during IL-2-induced lymphocyte proliferation*. Journal of immunology 179, 5301-5308.
- Lopes LF & Bacchi CE (2010). *Imatinib treatment for gastrointestinal stromal tumour (GIST)*. Journal of cellular and molecular medicine 14, 42-50.
- Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD & Nelson BH (2000). *The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5*. Journal of immunology 164, 2533-2541.
- Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A & Odum N (2003). *Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease*. The Journal of biological chemistry 278, 16777-16781.
- Lozzio CB & Lozzio BB (1975). *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood 45, 321-334.
- Lu Z, Murray KS, Van Cleave V, LaVallie ER, Stahl ML & McCoy JM (1995). *Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions*. Bio/technology 13, 366-372.
- Luchtefeld M, Drexler H & Schieffer B (2001). *Role of G beta-subunit in angiotensin II-type 1 receptor signaling*. Biochemical and biophysical research communications 280, 756-760.
- Ma J & Cao X (2006). *Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements*. Cellular signalling 18, 1117-1126.
- Ma J, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Tan AL & Cao X (2003). *A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation*. The Journal of biological chemistry 278, 29252-29260.
- Mack L, Brill B, Delis N, Borghouts C, Weber A & Groner B (2012). *Stat3 is activated in skin lesions by the local application of imiquimod, a ligand of TLR7, and inhibited by the recombinant peptide aptamer rS3-PA*. Horm Mol Biol Clin Invest 10, 265-272.
- Magne S, Caron S, Charon M, Rouyez MC & Dusanter-Fourt I (2003). *STAT5 and Oct-1 form a stable complex that modulates cyclin D1 expression*. Molecular and cellular biology 23, 8934-8945.
- Makinen PI, Koponen JK, Karkkainen AM, Malm TM, Pulkkinen KH, Koistinaho J, Turunen MP & Yla-Herttuala S (2006). *Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain*. The journal of gene medicine 8, 433-441.
- Mandal M, Powers SE, Maienschein-Cline M, Bartom ET, Hamel KM, Kee BL, Dinner AR & Clark MR (2011). *Epigenetic repression of the Igk locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2*. Nature immunology 12, 1212-1220.
- Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE, Jr. & Chen X (2005). *Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding*. Molecular cell 17, 761-771.
- Marg A, Shan Y, Meyer T, Meissner T, Brandenburg M & Vinkemeier U (2004). *Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1*. The Journal of cell biology 165, 823-833.

- Martin P & Papayannopoulou T (1982). *HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression*. Science 216, 1233-1235.
- Martino A, Holmes JHT, Lord JD, Moon JJ & Nelson BH (2001). *Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2*. Journal of immunology 166, 1723-1729.
- Maston GA, Evans SK & Green MR (2006). *Transcriptional regulatory elements in the human genome*. Annual review of genomics and human genetics 7, 29-59.
- Matozaki S, Nakagawa T, Kawaguchi R, Aozaki R, Tsutsumi M, Murayama T, Koizumi T, Nishimura R, Isobe T & Chihara K (1995). *Establishment of a myeloid leukaemic cell line (SKNO-1) from a patient with t(8;21) who acquired monosomy 17 during disease progression*. British journal of haematology 89, 805-811.
- Matsumura I, Ishikawa J, Nakajima K, Oritani K, Tomiyama Y, Miyagawa J, Kato T, Miyazaki H, Matsuzawa Y & Kanakura Y (1997). *Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5*. Molecular and cellular biology 17, 2933-2943.
- Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C, Downward J, Pestell RG & Kanakura Y (1999). *Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells*. The EMBO journal 18, 1367-1377.
- Mayerhofer M, Gleixner KV, Hoelbl A, Florian S, Hoermann G, Aichberger KJ, Bilban M, Esterbauer H, Krauth MT, Sperr WR et al. (2008). *Unique effects of KIT D816V in BaF3 cells: induction of cluster formation, histamine synthesis, and early mast cell differentiation antigens*. Journal of immunology 180, 5466-5476.
- McBride KM, Banninger G, McDonald C & Reich NC (2002). *Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha*. The EMBO journal 21, 1754-1763.
- McBride KM & Reich NC (2003). *The ins and outs of STAT1 nuclear transport*. Science's STKE : signal transduction knowledge environment 2003, RE13.
- Melen K, Fagerlund R, Franke J, Kohler M, Kinnunen L & Julkunen I (2003). *Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein*. The Journal of biological chemistry 278, 28193-28200.
- Mertens C & Darnell JE, Jr. (2007). *SnapShot: JAK-STAT signaling*. Cell 131, 612.
- Meyer T, Hendry L, Begitt A, John S & Vinkemeier U (2004). *A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors*. The Journal of biological chemistry 279, 18998-19007.
- Miceli R, Myszkowski D, Mao J, Sathe G & Chaiken I (1996). *The coiled coil stem loop miniprotein as a presentation scaffold*. Drug design and discovery 13, 95-105.
- Mirmohammadsadegh A, Hassan M, Bardenheuer W, Marini A, Gustrau A, Nambiar S, Tannapfel A, Bojar H, Ruzicka T & Hengge UR (2006). *STAT5 phosphorylation in malignant melanoma is important for survival and is mediated through SRC and JAK1 kinases*. The Journal of investigative dermatology 126, 2272-2280.
- Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH & Verma IM (1998). *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. Journal of virology 72, 8150-8157.

Miyoshi K, Shillingford JM, Smith GH, Grimm SL, Wagner KU, Oka T, Rosen JM, Robinson GW & Hennighausen L (2001). *Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium*. The Journal of cell biology 155, 531-542.

Mohr A, Chatain N, Domszalai T, Rinis N, Sommerauer M, Vogt M & Muller-Newen G (2012). *Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling*. European journal of cell biology 91, 524-532.

Moreno-Carranza B, Gentsch M, Stein S, Schambach A, Santilli G, Rudolf E, Ryser MF, Haria S, Thrasher AJ, Baum C *et al.* (2009). *Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells*. Gene therapy 16, 111-118.

Moriggl R, Gouilleux-Gruart V, Jahne R, Berchtold S, Gartmann C, Liu X, Hennighausen L, Sotiropoulos A, Groner B & Gouilleux F (1996). *Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype*. Molecular and cellular biology 16, 5691-5700.

Moriggl R, Sexl V, Kenner L, Duntsch C, Stangl K, Gingras S, Hoffmeyer A, Bauer A, Piekorz R, Wang D *et al.* (2005). *Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis*. Cancer cell 7, 87-99.

Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR & David M (2001). *Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription*. Cell 104, 731-741.

Murriel CL & Dowdy SF (2006). *Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules*. Expert opinion on drug delivery 3, 739-746.

Nakajima H, Brindle PK, Handa M & Ihle JN (2001). *Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription*. The EMBO journal 20, 6836-6844.

Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM & Trono D (1996). *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science 272, 263-267.

Nam S, Williams A, Vultur A, List A, Bhalla K, Smith D, Lee FY & Jove R (2007). *Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells*. Molecular cancer therapeutics 6, 1400-1405.

Neculai D, Neculai AM, Verrier S, Straub K, Klumpp K, Pfitzner E & Becker S (2005). *Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer*. The Journal of biological chemistry 280, 40782-40787.

Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, Gashin LB, Terrell S, Klitgaard JL, Santo L, Addorio MR *et al.* (2011). *The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors*. Blood 117, 3421-3429.

Nevalainen MT, Ahonen TJ, Yamashita H, Chandrashekar V, Bartke A, Grimley PM, Robinson GW, Hennighausen L & Rui H (2000). *Epithelial defect in prostates of Stat5a-null mice*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 80, 993-1006.

Nevalainen MT, Xie J, Torhorst J, Bubendorf L, Haas P, Kononen J, Sauter G & Rui H (2004). *Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 22, 2053-2060.

Ng DC, Lin BH, Lim CP, Huang G, Zhang T, Poli V & Cao X (2006). *Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin*. The Journal of cell biology 172, 245-257.

Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Xue L, Zhang Q, Raghunath PN, Hoser G, Wasik MA, Morris SW & Skorski T (2001). *Role of signal transducer and activator of transcription 5 in nucleophosmin/ anaplastic lymphoma kinase-mediated malignant transformation of lymphoid cells*. Cancer research 61, 6517-6523.

Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B & Skorski T (1999). *Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis*. The Journal of experimental medicine 189, 1229-1242.

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D et al. (2002). *Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis*. Oncogene 21, 2000-2008.

O'Shea JJ, Gadina M & Schreiber RD (2002). *Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway*. Cell 109 Suppl, S121-131.

O'Shea JJ & Murray PJ (2008). *Cytokine signaling modules in inflammatory responses*. Immunity 28, 477-487.

Oates AC, Wollberg P, Pratt SJ, Paw BH, Johnson SL, Ho RK, Postlethwait JH, Zon LI & Wilks AF (1999). *Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line*. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 215, 352-370.

Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM & Hynes NE (1999). *ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases*. The Journal of biological chemistry 274, 17209-17218.

Onishi M, Nosaka T, Misawa K, Mui AL, Gorman D, McMahon M, Miyajima A & Kitamura T (1998). *Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation*. Molecular and cellular biology 18, 3871-3879.

Ortmann RA, Cheng T, Visconti R, Frucht DM & O'Shea JJ (2000). *Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation*. Arthritis research 2, 16-32.

Ota N, Brett TJ, Murphy TL, Fremont DH & Murphy KM (2004). *N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation*. Nature immunology 5, 208-215.

Ouchi T, Lee SW, Ouchi M, Aaronson SA & Horvath CM (2000). *Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 5208-5213.

Papin JA, Hunter T, Palsson BO & Subramaniam S (2005). *Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties*. Nature reviews Molecular cell biology 6, 99-111.

Park SH, Liu X, Hennighausen L, Davey HW & Waxman DJ (1999). *Distinctive roles of STAT5a and STAT5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of STAT5a gene disruption*. The Journal of biological chemistry 274, 7421-7430.

- Park WY, Ahn JH, Feldman RA & Seo JS (1998). *c-Fes tyrosine kinase binds to and activates STAT3 after granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulation*. *Cancer letters* 129, 29-37.
- Pascal A, Riou JF, Carron C, Boucaut JC & Umbhauer M (2001). *Cloning and developmental expression of STAT5 in Xenopus laevis*. *Mechanisms of development* 106, 171-174.
- Pauku K & Silvennoinen O (2004). *STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5*. *Cytokine & growth factor reviews* 15, 435-455.
- Pauku K, Yang J & Silvennoinen O (2003). *Tudor and nuclease-like domains containing protein p100 function as coactivators for signal transducer and activator of transcription 5*. *Molecular endocrinology* 17, 1805-1814.
- Paul CP, Good PD, Winer I & Engelke DR (2002). *Effective expression of small interfering RNA in human cells*. *Nature biotechnology* 20, 505-508.
- Peck AR, Witkiewicz AK, Liu C, Stringer GA, Klimowicz AC, Pequignot E, Freydin B, Tran TH, Yang N, Rosenberg AL *et al.* (2011). *Loss of nuclear localized and tyrosine phosphorylated Stat5 in breast cancer predicts poor clinical outcome and increased risk of antiestrogen therapy failure*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 2448-2458.
- Pecquet C, Nyga R, Penard-Lacronique V, Smithgall TE, Murakami H, Regnier A, Lassoued K & Gouilleux F (2007). *The Src tyrosine kinase Hck is required for Tel-Abl- but not for Tel-Jak2-induced cell transformation*. *Oncogene* 26, 1577-1585.
- Peirce SK, Chen WY & Chen WY (2001). *Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR*. *The Journal of endocrinology* 171, R1-4.
- Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y & Witte ON (1991). *BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner*. *Cell* 66, 161-171.
- Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J *et al.* (1993). *BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein*. *Cell* 75, 175-185.
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F *et al.* (1999). *'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators*. *Nature* 400, 256-261.
- Pfitzner E, Jahne R, Wissler M, Stoecklin E & 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*. *Molecular endocrinology* 12, 1582-1593.
- Phelan A, Elliott G & O'Hare P (1998). *Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22*. *Nature biotechnology* 16, 440-443.
- Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, Westby M, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Dagleish AG & Gibson FM (1996). *The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques*. *Blood* 87, 2244-2251.
- Pires-daSilva A & Sommer RJ (2003). *The evolution of signalling pathways in animal development*. *Nature reviews Genetics* 4, 39-49.

Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M & Drexler HG (2006). *JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK 20, 471-476.

Quesnelle KM, Boehm AL & Grandis JR (2007). *STAT-mediated EGFR signaling in cancer*. Journal of cellular biochemistry 102, 311-319.

Raccurt M, Tam SP, Lau P, Mertani HC, Lambert A, Garcia-Caballero T, Li H, Brown RJ, McGuckin MA, Morel G *et al.* (2003). *Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma*. British journal of cancer 89, 524-532.

Rane SG & Reddy EP (2002). *JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis*. Oncogene 21, 3334-3358.

Rasclé A & Lees E (2003). *Chromatin acetylation and remodeling at the Cis promoter during STAT5-induced transcription*. Nucleic acids research 31, 6882-6890.

Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, Katayama S, Bajic VB, Tan K, Akalin A, Schmeier S, Kanamori-Katayama M, Bertin N *et al.* (2010). *An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man*. Cell 140, 744-752.

Reich NC & Liu L (2006). *Tracking STAT nuclear traffic*. Nature reviews Immunology 6, 602-612.

Ren S, Cai HR, Li M & Furth PA (2002). *Loss of Stat5a delays mammary cancer progression in a mouse model*. Oncogene 21, 4335-4339.

Russ AP & Lampel S (2005). *The druggable genome: an update*. Drug discovery today 10, 1607-1610.

Saharinen P, Ekman N, Sarvas K, Parker P, Alitalo K & Silvennoinen O (1997). *The Bmx tyrosine kinase induces activation of the Stat signaling pathway, which is specifically inhibited by protein kinase Cdelta*. Blood 90, 4341-4353.

Sakharkar MK, Sakharkar KR & Pervaiz S (2007). *Druggability of human disease genes*. The international journal of biochemistry & cell biology 39, 1156-1164.

Salas EM, Garcia-Barchino MJ, Labiano S, Shugay M, Perez-Encinas M, Quinteiro C, Garcia-Delgado M, Vizmanos JL & Novo FJ (2011). *LIF, a Novel STAT5-Regulated Gene, Is Aberrantly Expressed in Myeloproliferative Neoplasms*. Genes & cancer 2, 593-596.

Sampath D, Castro M, Look DC & Holtzman MJ (1999). *Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma*. The Journal of clinical investigation 103, 1353-1361.

Sanchez-Ceja SG, Reyes-Maldonado E, Vazquez-Manriquez ME, Lopez-Luna JJ, Belmont A & Gutierrez-Castellanos S (2006). *Differential expression of STAT5 and Bcl-xL, and high expression of Neu and STAT3 in non-small-cell lung carcinoma*. Lung cancer 54, 163-168.

Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S & Takeda J (1999). *Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis*. The EMBO journal 18, 4657-4668.

Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA & Yoshimura A (1999). *Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase*

by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes to cells* : devoted to molecular & cellular mechanisms 4, 339-351.

Schepers H, van Gosliga D, Wierenga AT, Eggen BJ, Schuringa JJ & Vellenga E (2007). *STAT5 is required for long-term maintenance of normal and leukemic human stem/progenitor cells*. *Blood* 110, 2880-2888.

Schindler C, Shuai K, Prezioso VR & Darnell JE, Jr. (1992). *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor*. *Science* 257, 809-813.

Schindler C & Strehlow I (2000). *Cytokines and STAT signaling*. *Advances in pharmacology* 47, 113-174.

Schmidt D & Muller S (2003). *PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation*. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 60, 2561-2574.

Schoeneberger H, Weiss A, Borghouts C, Brill B, Delis N & Groner B (2011). *The integration of a Stat3 specific peptide aptamer into the thioredoxin scaffold protein strongly enhances its inhibitory potency*. *Horm Mol Biol Clin Invest* 5, 1-9.

Schwaller J, Parganas E, Wang D, Cain D, Aster JC, Williams IR, Lee CK, Gerthner R, Kitamura T, Frantsve J *et al.* (2000). *Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2*. *Molecular cell* 6, 693-704.

Schwemmers S, Will B, Waller CF, Abdulkarim K, Johansson P, Andreasson B & Pahl HL (2007). *JAK2V617F-negative ET patients do not display constitutively active JAK/STAT signaling*. *Experimental hematology* 35, 1695-1703.

Senft C, Priester M, Polacin M, Schroder K, Seifert V, Kogel D & Weissenberger J (2011). *Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells*. *Journal of neuro-oncology* 101, 393-403.

Sharma SV & Settleman J (2010). *Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and "oncogenic shock"*. *Biochemical pharmacology* 80, 666-673.

Shi CS & Kehrl JH (2004). *Pyk2 amplifies epidermal growth factor and c-Src-induced Stat3 activation*. *The Journal of biological chemistry* 279, 17224-17231.

Shi S, Larson K, Guo D, Lim SJ, Dutta P, Yan SJ & Li WX (2008). *Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability*. *Nature cell biology* 10, 489-496.

Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D & Darnell JE, Jr. (1994). *Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions*. *Cell* 76, 821-828.

Shuai K & Liu B (2003). *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. *Nature reviews Immunology* 3, 900-911.

Shuai K & Liu B (2005). *Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system*. *Nature reviews Immunology* 5, 593-605.

Sironi JJ & Ouchi T (2004). *STAT1-induced apoptosis is mediated by caspases 2, 3, and 7*. *The Journal of biological chemistry* 279, 4066-4074.

Skerra A (2000). *Lipocalins as a scaffold*. *Biochimica et biophysica acta* 1482, 337-350.

Soldaini E, John S, Moro S, Bollenbacher J, Schindler U & Leonard WJ (2000). *DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites*. Molecular and cellular biology 20, 389-401.

Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcon P, Martin de Ana A, Monterrubio M, Martinez C, Rodriguez-Frade JM & Mellado M (2003). *Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses*. European journal of immunology 33, 1328-1333.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S & Brennan M (1973). *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. Journal of the National Cancer Institute 51, 1409-1416.

Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, Pane F, Muller MC, Ernst T, Rosti G et al. (2011). *BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet*. Blood 118, 1208-1215.

Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K & Hiddemann W (2003). *Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 9, 2140-2150.

Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA et al. (1997). *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature 387, 917-921.

Stelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE & McCubrey JA (2004). *JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis*. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK 18, 189-218.

Sternberg DW, Tomasson MH, Carroll M, Curley DP, Barker G, Caprio M, Wilbanks A, Kazlauskas A & Gilliland DG (2001). *The TEL/PDGFBetaR fusion in chronic myelomonocytic leukemia signals through STAT5-dependent and STAT5-independent pathways*. Blood 98, 3390-3397.

Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F & Groner B (1996). *Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor*. Nature 383, 726-728.

Strehlow I & Schindler C (1998). *Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation*. The Journal of biological chemistry 273, 28049-28056.

Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH & Itakura K (1981). *Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78, 6613-6617.

Sugioka R, Shimizu S, Funatsu T, Tamagawa H, Sawa Y, Kawakami T & Tsujimoto Y (2003). *BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo*. Oncogene 22, 8432-8440.

Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, Ealley EL, Nevalainen MT & Rui H (2005). *Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells*. Oncogene 24, 746-760.

Sung SC, Fan TJ, Chou CM, Leu JH, Hsu YL, Chen ST, Hsieh YC & Huang CJ (2003). *Genomic structure, expression and characterization of a STAT5 homologue from pufferfish (Tetraodon fluviatilis)*. European journal of biochemistry / FEBS 270, 239-252.

Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K & Sugiura Y (2002). *Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides*. The Journal of biological chemistry 277, 2437-2443.

Takahashi S, Harigae H, Kaku M, Sasaki T & Licht JD (2004). *Flt3 mutation activates p21WAF1/CIP1 gene expression through the action of STAT5*. Biochemical and biophysical research communications 316, 85-92.

Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T & Akira S (1997). *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 3801-3804.

Tan SH, Dagvadorj A, Shen F, Gu L, Liao Z, Abdulghani J, Zhang Y, Gelmann EP, Zellweger T, Culig Z *et al.* (2008). *Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells*. Cancer research 68, 236-248.

ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M & Shuai K (2002). *Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase*. Molecular and cellular biology 22, 5662-5668.

Thomas C, Zoubeydi A, Kuruma H, Fazli L, Lamoureux F, Beraldi E, Monia BP, MacLeod AR, Thuroff JW & Gleave ME (2011). *Transcription factor Stat5 knockdown enhances androgen receptor degradation and delays castration-resistant prostate cancer progression in vivo*. Molecular cancer therapeutics 10, 347-359.

Tokunaga M, Ezo S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, Shibata M, Tanimura A, Oritani K, Matsumura I *et al.* (2010). *BCR-ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1*. The Journal of biological chemistry 285, 31774-31782.

Trempe GL (1976). *Human breast cancer in culture*. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer, 33-41.

Tronche F, Opherck C, Moriggl R, Kellendonk C, Reimann A, Schwake L, Reichardt HM, Stangl K, Gau D, Hoeflich A *et al.* (2004). *Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth*. Genes & development 18, 492-497.

Ueno H, Sasaki K, Miyagawa K, Honda H, Mitani K, Yazaki Y & Hirai H (1997). *Antisense repression of proto-oncogene c-Cbl enhances activation of the JAK-STAT pathway but not the ras pathway in epidermal growth factor receptor signaling*. The Journal of biological chemistry 272, 8739-8743.

Ungureanu D, Vanhatupa S, Kotaja N, Yang J, Aittomaki S, Janne OA, Palvimo JJ & Silvennoinen O (2003). *PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1*. Blood 102, 3311-3313.

Vafaizadeh V, Klemmt P, Brendel C, Weber K, Doebele C, Britt K, Grez M, Fehse B, Desrivieres S & Groner B (2010). *Mammary epithelial reconstitution with gene-modified stem cells assigns roles to Stat5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation*. Stem cells 28, 928-938.

Vaidya S, Ghosh K & Vundinti BR (2011). *Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review*. European journal of haematology 87, 381-393.

van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ & Lucia MS (2003). *Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines*. The Prostate 57, 205-225.

Varkouhi AK, Scholte M, Storm G & Haisma HJ (2011). *Endosomal escape pathways for delivery of biologicals*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 151, 220-228.

Verdine GL & Walensky LD (2007). *The challenge of drugging undruggable targets in cancer: lessons learned from targeting BCL-2 family members*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13, 7264-7270.

Verma NK, Dourlat J, Davies AM, Long A, Liu WQ, Garbay C, Kelleher D & Volkov Y (2009). *STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells*. The Journal of biological chemistry 284, 12349-12362.

Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J & Darnell JE, Jr. (1996). *DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites*. The EMBO journal 15, 5616-5626.

Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Jr. & Kuriyan J (1998). *Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4*. Science 279, 1048-1052.

Vogelstein B & Kinzler KW (2004). *Cancer genes and the pathways they control*. Nature medicine 10, 789-799.

Wadia JS, Stan RV & Dowdy SF (2004). *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis*. Nature medicine 10, 310-315.

Wagner KU & Schmidt JW (2011). *The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer*. Journal of carcinogenesis 10, 32.

Wakao H, Gouilleux F & Groner B (1994). *Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response*. The EMBO journal 13, 2182-2191.

Wakao H, Schmitt-Ney M & 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*. The Journal of biological chemistry 267, 16365-16370.

Walker SR, Nelson EA & Frank DA (2007). *STAT5 represses BCL6 expression by binding to a regulatory region frequently mutated in lymphomas*. Oncogene 26, 224-233.

Walker SR, Nelson EA, Zou L, Chaudhury M, Signoretti S, Richardson A & Frank DA (2009). *Reciprocal effects of STAT5 and STAT3 in breast cancer*. Molecular cancer research : MCR 7, 966-976.

Walz C, Ahmed W, Lazarides K, Betancur M, Patel N, Hennighausen L, Zaleskas VM & Van Etten RA (2012). *Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice*. Blood 119, 3550-3560.

Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, Gramlich JL, Neuberg DS, Podar K, Griffin JD & Sattler M (2006). *Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition*. The Journal of biological chemistry 281, 18177-18183.

Literaturverzeichnis

Wang X, Zeng J, Shi M, Zhao S, Bai W, Cao W, Tu Z, Huang Z & Feng W (2011). *Targeted blockage of signal transducer and activator of transcription 5 signaling pathway with decoy oligodeoxynucleotides suppresses leukemic K562 cell growth*. DNA and cell biology 30, 71-78.

Wang YZ, Wharton W, Garcia R, Kraker A, Jove R & Pledger WJ (2000). *Activation of Stat3 preassembled with platelet-derived growth factor beta receptors requires Src kinase activity*. Oncogene 19, 2075-2085.

Wang Z, Li G, Tse W & Bunting KD (2009). *Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement*. Blood 113, 4856-4865.

Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, Fajmann S, Cerny-Reiterer S, Holbl A, Gleixner KV, Dworzak M, Mayerhofer M, Hoermann G *et al.* (2011). *High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia*. Blood 117, 3409-3420.

Weber A, Borghouts C, Delis N, Mack L, Brill B, Bernard AC, Coqueret O & Groner B (2012). *Inhibition of Stat3 by peptide aptamer rS3-PA enhances growth suppressive effects of irinotecan on colorectal cancer cells*. Horm Mol Biol Clin Invest 10, 273-279.

Weber K, Bartsch U, Stocking C & Fehse B (2008). *A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 16, 698-706.

Wegenka UM, Buschmann J, Lutticken C, Heinrich PC & Horn F (1993). *Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level*. Molecular and cellular biology 13, 276-288.

Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A *et al.* (2009). *Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration*. Science 323, 793-797.

Weinstein IB (2000). *Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis*. Carcinogenesis 21, 857-864.

Weinstein IB & Joe A (2008). *Oncogene addiction*. Cancer research 68, 3077-3080; discussion 3080.

Weiss A, Brill B, Borghouts C, Delis N, Mack L & Groner B (2012). *Survivin inhibition by an interacting recombinant peptide, derived from the human ferritin heavy chain, impedes tumor cell growth*. Journal of cancer research and clinical oncology 138, 1205-1220.

Wellbrock C, Weisser C, Hassel JC, Fischer P, Becker J, Vetter CS, Behrmann I, Kortylewski M, Heinrich PC & Scharl M (2005). *STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells*. Current biology : CB 15, 1629-1639.

Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L & Rothbard JB (2000). *The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 13003-13008.

Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH & Gilliland DG (2006). *Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model*. Blood 107, 4274-4281.

Wierenga AT, Vellenga E & Schuringa JJ (2008). *Maximal STAT5-induced proliferation and self-renewal at intermediate STAT5 activity levels*. Molecular and cellular biology 28, 6668-6680.

Wilson MB, Schreiner SJ, Choi HJ, Kamens J & Smithgall TE (2002). *Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis*. Oncogene 21, 8075-8088.

Wofford JA, Wieman HL, Jacobs SR, Zhao Y & Rathmell JC (2008). *IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival*. Blood 111, 2101-2111.

Wolf D & Rotter V (1985). *Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 790-794.

Wood AD, Chen E, Donaldson IJ, Hattangadi S, Burke KA, Dawson MA, Miranda-Saavedra D, Lodish HF, Green AR & Gottgens B (2009). *ID1 promotes expansion and survival of primary erythroid cells and is a target of JAK2V617F-STAT5 signaling*. Blood 114, 1820-1830.

Woodman R, Yeh JT, Laurenson S & Ko Ferrigno P (2005). *Design and validation of a neutral protein scaffold for the presentation of peptide aptamers*. Journal of molecular biology 352, 1118-1133.

Wu TR, Hong YK, Wang XD, Ling MY, Dragoi AM, Chung AS, Campbell AG, Han ZY, Feng GS & Chin YE (2002). *SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei*. The Journal of biological chemistry 277, 47572-47580.

Xi S, Zhang Q, Gooding WE, Smithgall TE & Grandis JR (2003). *Constitutive activation of Stat5b contributes to carcinogenesis in vivo*. Cancer research 63, 6763-6771.

Xie B, Zhao J, Kitagawa M, Durbin J, Madri JA, Guan JL & Fu XY (2001). *Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion*. The Journal of biological chemistry 276, 19512-19523.

Xiong H, Su WY, Liang QC, Zhang ZG, Chen HM, Du W, Chen YX & Fang JY (2009). *Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 89, 717-725.

Xu CW & Luo Z (2002). *Inactivation of Ras function by allele-specific peptide aptamers*. Oncogene 21, 5753-5757.

Yamaji D, Na R, Feuermann Y, Pechhold S, Chen W, Robinson GW & Hennighausen L (2009). *Development of mammary luminal progenitor cells is controlled by the transcription factor STAT5A*. Genes & development 23, 2382-2387.

Yamashita H, Iwase H, Toyama T & Fujii Y (2003). *Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer cells*. Oncogene 22, 1638-1652.

Yamashita H, Nishio M, Ando Y, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, Kobayashi S, Fujii Y & Iwase H (2006). *Stat5 expression predicts response to endocrine therapy and improves survival in estrogen receptor-positive breast cancer*. Endocrine-related cancer 13, 885-893.

Yamashita H, Nishio M, Fujii Y & Iwase H (2004). *Dominant-negative Stat5 inhibits growth and induces apoptosis in T47D-derived tumors in nude mice*. Cancer science 95, 662-665.

Yan R, Small S, Desplan C, Dearolf CR & Darnell JE, Jr. (1996). *Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development*. Cell 84, 421-430.

Yan SJ, Lim SJ, Shi S, Dutta P & Li WX (2011). *Unphosphorylated STAT and heterochromatin protect genome stability*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 25, 232-241.

Yang E, Wen Z, Haspel RL, Zhang JJ & Darnell JE, Jr. (1999). *The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription*. Molecular and cellular biology 19, 5106-5112.

Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE & Stark GR (2007). *Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB*. Genes & development 21, 1396-1408.

Yang R & Barouch LA (2007). *Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences*. Circulation research 101, 545-559.

Yang SH, Chien CM, Su JC, Chen YL, Chang LS & Lin SR (2008). *Novel indoloquinoline derivative, IQDMA, inhibits STAT5 signaling associated with apoptosis in K562 cells*. Journal of biochemical and molecular toxicology 22, 396-404.

Yao Z, Cui Y, Watford WT, Bream JH, Yamaoka K, Hissong BD, Li D, Durum SK, Jiang Q, Bhandoola A *et al.* (2006). *Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 1000-1005.

Yao Z, Kanno Y, Kerényi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, Laurence A, Robinson GW, Shevach EM, Moriggl R *et al.* (2007). *Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3*. Blood 109, 4368-4375.

Ye D, Wolff N, Li L, Zhang S & Ilaria RL, Jr. (2006). *STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice*. Blood 107, 4917-4925.

Yip-Schneider MT, Horie M & Broxmeyer HE (1995). *Transcriptional induction of pim-1 protein kinase gene expression by interferon gamma and posttranscriptional effects on costimulation with steel factor*. Blood 85, 3494-3502.

Yu H & Jove R (2004). *The STATs of cancer--new molecular targets come of age*. Nature reviews Cancer 4, 97-105.

Yu H, Pardoll D & Jove R (2009). *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nature reviews Cancer 9, 798-809.

Yu JH, Zhu BM, Wickre M, Riedlinger G, Chen W, Hosui A, Robinson GW & Hennighausen L (2010). *The transcription factors signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) and STAT5B negatively regulate cell proliferation through the activation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2b (Cdkn2b) and Cdkn1a expression*. Hepatology 52, 1808-1818.

Yue P & Turkson J (2009). *Targeting STAT3 in cancer: how successful are we?* Expert opinion on investigational drugs 18, 45-56.

Zhang L, Zhao Z, Feng Z, Yin N, Lu G & Shan B (2012). *RNA interference-mediated silencing of Stat5 induces apoptosis and growth suppression of hepatocellular carcinoma cells*. Neoplasia 14, 302-309.

Zhang X & Darnell JE, Jr. (2001). *Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene*. The Journal of biological chemistry 276, 33576-33581.

Zhang Y, Diaz-Flores E, Li G, Wang Z, Kang Z, Haviernikova E, Rowe S, Qu CK, Tse W, Shannon KM *et al.* (2007). *Abnormal hematopoiesis in Gab2 mutant mice*. Blood 110, 116-124.

Zhu M, John S, Berg M & Leonard WJ (1999). *Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling*. Cell 96, 121-130.

Ziegler A & Seelig J (2004). *Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters*. Biophysical journal 86, 254-263.

Zimmermann M & Meyer N (2011). *Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes*. Methods in molecular biology 740, 57-63.

Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L & Trono D (1998). *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. Journal of virology 72, 9873-9880.

Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L & Trono D (1997). *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nature biotechnology 15, 871-875.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Aminoactinomycin
9-R	PTD bestehend aus einer Sequenz von 9 L-Arginin-Resten
aa	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Akt	Proteinkinase B
ALL	Akut lymphatische Leukämie
AML	Akut myeloische Leukämie
AMP	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celcius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Cfu	<i>Colony forming units</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalovirus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CPP	Zellpenetrierendes Peptid (<i>cell penetrating peptide</i>)
cPPT	<i>central polypurine tract</i>
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA (cDNA)	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (komplementäre DNA)
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
Env	Virus-Hüllprotein (<i>virus envelope protein</i>)
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietinrezeptor
ER	Estrogenrezeptor
ET	Essentielle Thrombozythämie
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) oder Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Gramm
Gab2	<i>GRB2-associated binding protein 2</i>
Gag	Gruppenspezifisches Antigen (<i>group specific antigen</i>)
GAS	<i>gamma interferon activated site</i>
GH	Wachstumshormon (<i>growth hormon</i>)
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor (<i>Gastrointestinal stromal tumor</i>)

Abkürzungsverzeichnis

GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein (<i>glycoprotein</i>)
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GTFs	<i>General transcription factors</i>
h	Stunde
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus-1 (<i>human immunodeficiency virus-1</i>)
HLA	Humane Leukozyten-Antigene (<i>human leukocyte antigens</i>)
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (<i>hemtopoietic stem cell</i>)
hTRX	humanes Thioredoxin
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
ID1	<i>DNA-binding protein inhibitor 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
i.v.	intravenös
Jak	Janus-Kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare (kilobase pair)
KG	Körpergewicht
KZZ	Kumulative Zellzahl
L	Liter
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LOF	<i>loss of function</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Molar
MEF	embryonale Fibroplasten der Maus (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
n	<i>number</i>
NES	Nukleäres Exportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
OSM	Oncostatin M
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphoinositol-3 kinase
Pol	Polymerase oder virale Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease)
Prl	Prolaktin
PrlR	Prolaktinrezeptor
PTD	Proteintransduktionsdomäne
PV	Polycythaemia vera
RE	Response Element
Rev	<i>regulator of virion expression</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt im „Roswell Park Memorial Institute“
RRE	<i>Rev-responsive element</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
S5-DBD-PA	Stat5-DNA-Bindedomäne interferierender Peptidaptamer
SCF	Stammzellenfaktor (<i>stem cell factor</i>)
sec	Sekunde (<i>second</i>)
SFFV	<i>Spleen focus forming virus</i>
SH2	Src-homologe 2 Domäne (<i>Src-homology 2 domain</i>)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIN	self-inactivating
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
Stat	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SV40	Simian-Virus 40
TA	Transaktivierungs-Domäne
Tab.	Tabelle
Tat	<i>Transactivator of transcription</i>
Tpo	Thrombopoietin
TpoR	Thrombopoietinrezeptor
tRNA	<i>transfer RNA</i>
u.a.	unter anderem
UAS	<i>upstream activating sequences</i>
UTR	untranslatierte Region (<i>untranslated region</i>)
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSV-G	Glykoprotein der Vesikular-Stomatitis Virushülle
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WPRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro
ψ	Psi-Verpackungssignal retroviral genomischer RNA

PUBLIKATIONEN

ORIGINALARTIKEL

Axel Weber, Corina Borghouts, Richard Moriggl, Christian Brendel, Natalia Delis, Boris Brill, Vida Vafaizadeh and Bernd Groner

Inhibition of the transcription factor Stat5 with a peptide aptamer specifically recognizing its DNA binding domain. In Bearbeitung (vorraussichtlich im Juni/Juli 2013 eingereicht)

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis, Boris Brill, Anne-Charlotte Bernard, Olivier Coqueret and Bernd Groner

The inhibition of Stat3 by the peptide aptamer rS3-PA enhances the growth suppressive effects of irinotecan on colorectal cancer cells Horm Mol Biol Clin Invest 10, 273–279 (2012)

Bernd Groner, Axel Weber and Laura Mack

Increasing the range of drug targets: Interacting peptides provide leads for the development of oncoprotein inhibitors Bioengineered. Nov-Dec;3(6):320-5 (2012)

Laura Mack, Boris Brill, Natalia Delis, Corina Borghouts, Axel Weber and Bernd Groner

Stat3 is activated in skin lesions by the local application of imiquimod, a ligand of TLR7, and inhibited by the recombinant peptide aptamer rS3-PA Horm Mol Biol Clin Invest 10, 265–272 (2012)

Thomas Hofmann, Axel Weber, Julia Sauer, Michael Glej, and Beatrice Louise Pool-Zobel
Formation of Tumour Promoting and Tumour Inhibitory Products during Gut Flora Mediated Fermentation of Inulin-Type Fructans and Wheat Bran J. Clin. Biochem. Nutr., Suppl. 43, 1–5, (2008)

VORTRÄGE

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis, Boris Brill, Laura Mack, Christian Brendel and Bernd Groner

Inhibition of Stat5 DNA-binding activity in leukemia by the use of a specifically interfering peptide aptamer construct

5th German-Israeli Cancer Research School „Metabolism and Cancer“ 2012, Pichl (AUT)

POSTERPRÄSENTATIONEN

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis and Bernd Groner

Inhibition of Stat3 with multifunctional peptide aptamers

15th International AEK Cancer Congress, Berlin 2009

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis and Bernd Groner

Inhibition of Stat proteins with multifunctional peptide aptamers

1st UCT-Science Day, Frankfurt 2009

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis, Joachim Koch and Bernd Groner

Inhibition of Stat3 and Stat5 functions with multifunctional peptide aptamers

FEBS Special Meeting on Jak-Stat Signaling: from Basics to Disease, Wien 2010

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis, Boris Brill, Christian Weiser and Bernd Groner

Targeted inhibition of Stat5 activity in leukemia by the use of a specific peptide aptamer construct

2nd UCT-Science Day, Frankfurt 2010

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis, Boris Brill, Christian Weiser and Bernd Groner

Targeted inhibition of Stat5 activity in leukemia by the use of a specific peptide aptamer construct

ESF-EMBO Symposium: Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions, Sant Feliu de Guixols (Spanien) 2010 (Reisestipendium erhalten)

Axel Weber, Laura Mack, Boris Brill, Natalia Delis, Astrid Weiß, Corina Borghouts and Bernd Groner

Interference with protein-interactions: Inhibition of Stat-signaling by specific peptide ligands in cancer

16th International AEK Cancer Congress, Düsseldorf 2011

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis, Boris Brill, Laura Mack, Christian Weiser and Bernd Groner

Inhibition of Stat5 DNA-binding activity in leukemia by the use of a specifically interfering peptide aptamer construct

3rd UCT-Science Day, Frankfurt 2011

Axel Weber, Corina Borghouts, Christian Brendel, Natalia Delis, Boris Brill, Laura Mack, Christian Weiser and Bernd Groner

Inhibition of Stat5 DNA-binding activity in leukemia by the use of a specifically interfering peptide aptamer construct

CGT-Meeting: Perspectives in Cell- and Gene-Based Medicines, Frankfurt 2012

Axel Weber, Corina Borghouts, Natalia Delis, Boris Brill, Laura Mack, Christian Brendel and Bernd Groner

Inhibition of Stat5 DNA-binding activity in leukemia by the use of a specifically interfering peptide aptamer construct

4th UCT-Science Day, Frankfurt 2012

DANKSAGUNG

Zum Ende möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die am Gelingen dieser Doktorarbeit beteiligt waren und die mich während der letzten Jahre unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Groner, der mir die Möglichkeit gab, unter hervorragenden Bedingungen am Georg-Speyer-Haus an diesem für mich spannendem Thema zu arbeiten und zu promovieren. In diesem Zusammenhang möchte ich Bernd Groner ebenfalls für seine stetige Diskussionsbereitschaft und Kompetenz, seine Vorbildfunktion in puncto Arbeitseinsatz und für die Möglichkeit, an zahlreichen relevanten Fachtagungen teilnehmen zu können, danken.

Für die externe Betreuung und die Unterstützung vor allem zum Ende meiner Promotion, möchte ich ebenfalls Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz herzlich danken.

Die angenehme Arbeitsatmosphäre, im Zusammenspiel mit der Beratung und Unterstützung in fachlichen aber auch privaten Fragestellungen, hat ebenfalls wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, weshalb ich mich zunächst ganz besonders bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, Corina Borghouts, Natalia Delis, Laura Mack, Boris Brill, Bianca Gilbert, Vida Vafaizadeh, Chul Min Yang, Tomohiro Chiba, Denise Löscher, Viktoria von Manstein und Petra Bernardi bedanken möchte. Aber auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts gilt mein Dank!

Hierbei möchte ich noch die Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Manuel Grez hervorheben, welche mich mit benötigten Zelllinien und Plasmiden versorgten. Allem voran gilt mein Dank in diesem Zusammenhang Dr. Christian Brendel für die fachlich kompetente und menschlich herausragende Unterstützung sowie weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, Uta Müller-Kuller, Dr. Christian Wichmann und Tefik Merovci, welcher die FACS-Sortierung übernommen hatte. Innerhalb des Instituts möchte ich mich weiterhin bei der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Jörn Lausen bedanken, welche mich mit Materialien bei der Durchführung des Luziferase- und Gelshift-Assays unterstützten. Darüber hinaus möchte ich mich für fruchtbare Gespräche, welche weit über den Tellerrand hinausgingen, bei Herrn Prof. Dr. Winfried Wels und Herrn PD Dr. Joachim Koch rechtherzlich bedanken.

Herrn Dr. Richard Moriggl (LBI-CR, Wien) und Frau Prof. Dr. Veronika Sexl (Vetmeduni, Wien) möchte ich für die Bereitstellungen von Zelllinien, essentiellen Informationen und sonstiger Unterstützung danken. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Olivier Coqueret für die externe Kooperation und die angenehme Zeit in seiner Arbeitsgruppe in Angers (FRA).

Ich danke meinen Praktikanten Christian Weiser und Constanze Schneider die mich in der täglichen Laborarbeit und der Ausführung von Experimenten wesentlich unterstützt haben.

Einen großen unterstützenden Beitrag im Hintergrund haben meine lieben Eltern Reinhold & Wera Weber und meine Schwestern Anja & Kathy mit ihren Familien geleistet. Sie haben mir den Rücken freigehalten und hatten stets ein offenes Ohr. Letzteres gilt auch für viele meiner Freunde, wobei ich mich vor allem für die gute Laune, Aufmunterung und außerfachlichen Gespräche bei Christoph Tonk, Fridjof Möller, Richard König, Toniva Meier und Tobias Kühr bedanken möchte.

Abschließend danke ich der Frau an meiner Seite Grit. Nachdem Sie zum Ende meiner Promotionszeit in mein Leben getreten ist, war Sie mein täglicher Kraftspender beim Schreiben und Fertigstellen der Doktorarbeit.

EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Inhibierung von Stat5 in Tumoren durch RNA-Interferenz und spezifische Interaktion eines Peptidaptamer-Konstruktes mit der DNA-Bindedomäne.“

selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche gekennzeichnet.

Frankfurt am Main, den 13.06.2013



.....

Axel Weber

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Axel Weber

Anschrift: Breslauer Straße 11
 60598 Frankfurt am Main
 Geburtstag: 06. Juli 1981
 Geburtsort: Erfurt
 Familienstand: ledig



Promotion

01/2008 – 02/2013 Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus („Institute for Biomedical Research“) in Frankfurt am Main, in der Arbeitsgruppe „Interferenz mit Signaltransduktionswegen in Tumorzellen“ von Prof. Dr. Bernd Groner. Thema: „Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von Stat5 durch RNA-Interferenz und spezifische Interaktion eines Peptidaptamer-Konstruktes mit der DNA-Bindedomäne“

Studium

10/2001 – 09/2007 Studium der Ernährungswissenschaften (Trophologie) an der Friedrich-Schiller Universität in Jena. Abschluss „Diplom-Ernährungswissenschaftler“ (Diplom-Trophologe, Note: sehr gut)

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie und Krebsprävention, unter der Leitung von Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel, mit dem Titel „Entwicklung einer Methode für die in vitro Fermentation von Nahrungsbestandteilen und Untersuchungen zur Charakterisierung der Fermentationsprodukte“

Schulbildung und Zivildienst

09/1988 – 06/1992 Grundschule Erfurt-Stotternheim
 09/1992 – 06/2000 Martin-Luther-Gymnasium, Erfurt
 Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Note: 1,9)
 08/2000 – 07/2001 Zivildienst in einem Seniorenclub in Erfurt

Engagement und fachverwandte Tätigkeiten während der Promotion

10/2009 – 10/2010 Engagement als Instituts-Doktorandensprecher
 11/2010 – 12/2010 Auslandsaufenthalt: DAAD/INCA gefördertes Kooperationsprojekt (Joint Transnational Research Program on Cancer) mit der Arbeitsgruppe von Prof. Olivier Coqueret am Paul-Papin Cancer Institute Angers, Frankreich. Thema: „Peptide aptamers as supporting tools in chemotherapy“

- Tätigkeit als Tutor: Betreuung von Diplomanten und Praktikanten
- Vorlesung „Evolutionäre Verfahren: Yeast Two Hybrid System“ (5 x 1 h) begleitend zum Fortgeschrittenen-Praktikum BCII für Studenten der Biochemie (2010-2012)
- Teilnahme an verschiedenen wissenschaftlichen Fachtagungen mit der Beteiligung durch Posterpräsentationen und Kurzvorträgen (siehe Publikationsliste)
- Beteiligung an Patentantrag/Patent „Novel Stat3 activation inhibitors“