Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Markus Tiedge

SUMOlierung von STAT5a in hämatopoetischen Zellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

vorgelegt an der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

von

Marcus Weimer

aus Sveg (Schweden)

Rostock, 2010

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0136-7

Datum: 20.09.2011

Gutachter 1: Prof. Dr. med.habil.Robert Jaster
Gastroenterologisches Forschungslabor
Schillingallee 70
18057 Rostock

Gutachter 2: PD Dr. Med.habil. Michael Steiner
Klinikum Südstadt
Abteilung für Labordiagnostik
Südring 81
18059 Rostock

Gutachter 3: PD Dr. rer.nat.habil. Thomas Bittorf
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Schillingallee 70
18057 Rostock

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS 3

1 EINLEITUNG 5

2 STAND DER FORSCHUNG 7
2.1 Posttranslationale Modifikation von Proteinen 7
2.2 Protein-SUMOlierung 7
2.2.1 Funktionelle Bedeutung der SUMO-Modifikation von Proteinen 8
2.2.2 Enzymatische Mechanismen der SUMOlierung 9
2.2.3 Mechanismen der De-SUMOlierung 11
2.2.4 Regulation der SUMOlierung 11
2.3 Regulation der der Genexpression 12
2.4 Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie 13
2.5 Zytokine und Zytokinrezeptoren 15
2.6 Erythropoetin 16
2.7 Erythropoetin-Rezeptor und STAT5a-abhängige Signaltransduktion 16

3 ZIELSETZUNG 19

4 MATERIAL UND METHODEN 20
4.1 Zellkulturtechniken 20
4.1.1 Zelllinien und Kulturmedium 20
4.1.2 Kultivierung 20
4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen 20
4.1.4 Probengewinnung 21
4.1.5 Transfektion 21
4.2 *In-vitro*-Mutation von STAT5a 22
4.2.1 Expressionsvektor und STAT5a-cDNA 22
4.2.2 SUMOlierungs-Loci von STAT5a 22
4.2.3 Ableitung der Primer 22
4.2.4 *In-vitro*-Mutagenese 23
4.3 Nachweis der Genexpression 24
4.3.1 mRNA-Nachweis mittels RTQ-PCR 24
4.3.1.1 RNA-Isolierung 24
4.3.1.2 Reverse Transkription der Gesamt-RNA 25
4.3.1.3 Real-Time-PCR 25
4.3.2 Proteinnachweis durch Immunblotting 26
4.3.2.1 Zellgewinnung und Immunpräzipitation 26
4.3.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 27
4.3.2.3 Blotting 27
4.3.2.4 Immunreaktionen 28
4.3.2.5 Detektion mittels ECL 28

4.3.3 Untersuchung der Induktion der Transkription durch Luciferase Reportergen Assays 28
4.3.3.1 Versuchsbeschreibung 29
4.3.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) 30
4.3.4.1 Puffer und Reagenzien 30
4.3.4.2 Gewinnung von Kernextrakten 31
4.3.4.3 Vorbereitung der Oligonukleotide, Markierung der Sonde und Shift-Assay 31

5 ERGEBNISSE 33
5.1 SUMOlierung von STAT5a in hämatopoetischen Zellen 33
5.1.1 Expression von STAT5a in Ba/F3-Zellen 33
5.1.2 Modifizierung von STAT5a in Ba/F3-Zellen durch SUMOlierung 34
5.2 Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen bei der SUMOlierung von STAT5a 35
5.2.1 Identifizierung von SUMOlierungs-Orten 35
5.2.2 Herstellung von SUMOlierungs-negativen Mutanten von STAT5a 36
5.2.3 Transiente Expression der mutierten STAT5a-Varianten in Ba/F3-Zellen 37
5.3 Funktionelle Untersuchungen von mutiertem STAT5a 38
5.3.1 DNA-Bindung von mutiertem STAT5a 38
5.3.2 Analyse der Transaktivierungseigenschaften von mutiertem STAT5a 40
5.4 Analyse von Genexpressionsveränderungen im enzymatischen System der SUMOlierung 41
5.4.1 Real-Time-PCR 41

6 DISKUSSION 46

7 ZUSAMMENFASSUNG 54

8 LITERATURVERZEICHNIS 56

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 63

10 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG 64

11 WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF 65

12 THESEN 66

13 DANKSAGUNG 68

1. Einleitung

Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen werden vor allem durch gezielte Veränderungen der Genexpression reguliert. Dabei werden nach Bindung extrazellulärer Liganden an Rezeptoren der Zelloberfläche intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst und nachfolgend die Expression bestimmter Proteine dem veränderten Bedarf der Zelle angepasst. Eine zentrale Rolle spielen Transkriptionsfaktoren - Proteine, die gezielt durch Signalwege angesteuert werden und nach Bindung an regulatorische Elemente der DNA zu einer gesteigerten oder reduzierten Expression von Genen führen. Demnach bestimmt in erster Linie die Rezeptorexpression an der Oberfläche und deren Kommunikation mit intrazellulären Signalwegen das Schicksal einer Zelle.

Die Dysregulation beteiligter Mechanismen besitzt dementsprechend das Potenzial zur Initiation pathologischer Zustände bis hin zur Entartung von Zellen. Von der weiteren Analyse dieser Zusammenhänge sind deshalb in der Zukunft auch neue Therapiekonzepte assoziierter Erkrankungen zu erwarten.

Proteine werden nach ihrer Synthese häufig sehr stark posttranslational modifiziert. Dies hat eine enorme Zunahme der Proteinvariabilität zur Folge. Ein in der Evolution der Proteine vielfach verwendetes Konzept ist die enzymatische Kopplung an kleine Proteine. Nach der Identifizierung und Analyse des Ubiquitins zu Beginn der 80er Jahre, einem kleinen Protein, das nach Kopplung an andere Proteine deren Eigenschaften verändert, wurde später ein ähnliches Protein entdeckt und SUMO (*s*mall *u*biquitin-like *mo*difier) genannt. Aufgrund der Strukturgemeinsamkeiten und einem sehr ähnlichen System zur SUMOlierung /De-SUMOlierung wurden zunächst auch äquivalente Funktionen vermutet. Anders als beim Ubiquitin dienen SUMO-Proteine jedoch nicht primär zur Markierung von zum Abbau bestimmten Proteinen.

Inzwischen sind diverse Funktionen für SUMO-Proteine aufgeklärt worden. Dazu zählen die Mitwirkung beim nukleär/zytosolischen Transport, eine Rolle bei der Proteinstabilität, aber auch der Regulation der Transkription. Hier steht vor allem die Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren im Vordergrund. SUMO ist als Interaktionspartner mehrerer Transkriptionsfaktoren identifiziert worden und

beeinflusst den Transport, die Aktivität und die DNA-Bindung der betreffenden Proteine.

Im Signaltransfer der Zytokine, die als extrazelluläre Liganden vor allem im hämatopoetischen System die Regulation zellulärer Prozesse steuern, spielen Transkriptionsfaktoren der STAT (***s***ignal ***t***ransducer and ***a***ctivator of ***t***ranscription) - Familie eine herausragende Rolle. Nach Rezeptoraktivierung werden diese Faktoren rekrutiert, ihrerseits aktiviert und nach Dimerisierung in den Zellkern transloziert, wo sie zytokinspezifisch entsprechende Veränderung der Genexpression initiieren. Bisher ist nur von einem Vertreter der STAT-Familie, dem STAT1, eine Modifikation durch SUMO-Proteine gezeigt worden. In dieser Arbeit wird deshalb der Frage nachgegangen, ob ein weiteres STAT-Protein, das STAT5a, durch das System der SUMOlierung beeinflusst wird. Aus medizinischer Sicht könnten in der Zukunft Erkenntnisse zur Regulation von Transkriptionsfaktoren in hämatopoetischen Zellen die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung von Erkrankungen dieses Systems unterstützen.

2. Stand der Forschung

2.1 Posttranslationale Modifikation von Proteinen

Eine maßgebliche Ursache für die Vielfalt der Proteine innerhalb des Proteoms einer Zelle ist die posttranslationale Modifikation. Dazu zählt ein Komplex von Mechanismen, der nach abgeschlossener Synthese die Aktivität, Stabilität und Lokalisation von Proteinen modifiziert. Zu den bisher am besten untersuchten posttranslationalen Modifikationen gehören die reversible Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung und Methylierung von spezifischen Aminosäure-Resten. Darüber hinaus können Proteine aber auch durch das Anheften sogenannter Modifikatorproteine verändert werden. Als ein solches Modifikatorprotein wurde das Ubiquitin identifiziert und ein Zusammenhang zum intrazellulären Proteinabbau aufgezeigt (Hochstrasser, 1996). Im Laufe weiterer Untersuchungen wurden weitere, Ubiquitin-ähnliche Proteine (UBLs) entdeckt, darunter auch das Ubiquitin-ähnliche Protein PIC 1 (Boddy et al., 1996), welches im späteren Verlauf der Arbeiten den Namen SUMO erhielt (***s***mall ***u***biquitin-like ***mo***difier). Neben der Ubiquitinierung ist dies inzwischen der am besten untersuchte Mechanismus der posttranslationalen Veränderung durch Anheften von Modifikatorproteinen.

2.2 Protein-SUMOlierung

SUMO ist ein in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiertes, aus ca. 100 Aminosäuren bestehendes Protein. In menschlichen Geweben enthält die SUMO-Proteinfamilie drei Proteinspezies: SUMO-1, SUMO-2 und SUMO-3. SUMO-1 ist in der Sequenz zu 50% identisch mit SUMO-2/3 und liegt in konjugierter Form, an Proteine gebunden vor. SUMO-2 und -3, weisen eine 95%ige Homologie auf, unterscheiden sich aber nicht in ihrer Funktion. Beide liegen in unkonjugierter Form vor (Johnson, 2004). SUMO-1 wird reversibel kovalent an Lysylreste von Substratproteinen gebunden. Dabei entsteht eine Isopeptidbrücke zwischen dem C-Terminus des SUMO-Proteins und einem Lysylrest des Akzeptorproteins (Müller, 2001). Die SUMOlierungskonsensus-Sequenz der Zielproteine hat typischerweise die Struktur: ΦKxE/D. Dabei ist Φ ein aliphatischer Rest, K die Aminosäure Lysin, x eine beliebige Aminosäure und E/D jeweils eine saure Aminosäure (Johnson, 2004). SUMO kann darüberhinaus auch nicht-kovalent mit seinen Substraten über spezifische SUMO-

Interaktionsmotive in Verbindung treten. Untersuchungen der Bindungspartner von SUMO haben ergeben, dass bestimmte hydrophobe Aminosäuresequenzen in der Lage sind, nicht-kovalent mit SUMO zu interagieren (Hecker et al., 2006).

2.2.1 Funktionelle Bedeutung der SUMO-Modifikation von Proteinen

Die strukturelle Verwandtschaft zum Ubiquitin hat zunächst dazu geführt, dass die wesentliche Funktion der SUMOlierung in einer Hemmung des durch Ubiquitin-Bindung bedingten proteasomalen Abbaus vermutet wurde. Tatsächlich gibt es Befunde, die diese These stützen. SUMO-1-Modifikation des Proteins IκBα führt z.B. zur Blockierung der Ubiquitinierung und der nachfolgenden Degradation (Desterro et al., 1998). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Rolle von SUMO und das Verhältnis zum Ubiquitin-bedingten Proteinabbau komplexer ist als zuerst angenommen. Inzwischen wurde SUMO konjugiert an Ubiquitin in Zellen nachgewiesen und es wird angenommen, dass SUMO auch als Marker für den Proteinabbau dienen kann, also unter Umständen auch agonistisch zum Ubiquitin wirkt (Geoffrey et al., 2009).

Des Weiteren wurde zunächst vermutet, dass die Funktion von SUMO vor allem auf den Zellkern beschränkt ist. Als Zielmoleküle wurden an DNA-Reparatur und Transkription beteiligte Enzyme, sowie Transkriptionsfaktoren identifiziert (Müller S. et al., 2004). Die Untersuchung von RanGAP1, einem am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligten Protein, hat gezeigt, dass nur die SUMOlierte Variante von RanGAP1 Affinität zu den Kernporen aufweist, während sich das unmodifizierte Protein im Zytoplasma befindet (Matunis et al., 1996). Diese und andere Befunde machten eine Beteiligung der SUMOlierung an der Regulation intrazellulärer Transportsysteme wahrscheinlich. Für RanBP2, ein ebenfalls an die Kernporen gebundenes Protein, konnte gezeigt werden, dass es sowohl eine nukleozytoplasmatische Transportfunktion als auch eine E3-Ligase-Aktivität (siehe unten) besitzt (Pichler, 2002). Im Rahmen weiterer Forschungen wurden darüberhinaus SUMO-Zielproteine gefunden, die fundamentale Prozesse der Zelle, wie z.B. den Ionentransport oder die Mitochondrienteilung, steuern.

Insgesamt zeigen die bisher bekannten Daten, dass die SUMOlierung eine reversible Proteinmodifikation ist, deren funktioneller Stellenwert durchaus mit dem der Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung zu vergleichen ist (Meulmeester et al., 2008).

2.2.2 Enzymatische Mechanismen der SUMOlierung

Die Ähnlichkeit auf der Ebene der Proteinstruktur zwischen SUMO und Ubiquitin setzt sich auch im beteiligten Enzymsystem fort. In Analogie zur Ubiquitinierung wird die SUMOlierung durch spezifische enzymatische Schritte realisiert. Dazu zählen das SUMO aktivierende Enzym SAE, das SUMO konjugierende Enzym SCE und die SUMO-Ligasen. Diese Enzyme sind der Enzymkaskade E1, E2 und E3 (siehe Abb. 1), welche die Konjugation von Ubiquitin katalysiert, weitgehend homolog.

Als E1-Enzym dient das Heterodimer Aos1/Uba2, welches in drei Schritten die ATP-abhängige Aktivierung von SUMO bewerkstelligt (Johnson, 2004). Von E1 wird SUMO dabei auf Ubc9 unter Ausbildung eines Thiolesters übertragen. Aus dieser Bindung wird SUMO später an den Lysylrest des entsprechenden Substrats übergeben. Ubc9 ist das bisher einzige identifizierte SUMO-konjugierende Enzym. Seine Rolle im System liegt offenbar vor allem in der Erkennung des aliphatischen Rests vor dem Lysin des Akzeptorproteins (Bernier-Villamor, 2002). Auto-SUMOlierung von Ubc9 bewirkt über SUMO-Interaktionsmotive eine starke Zunahme der SUMOlierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (Knipscheer et al., 2008).

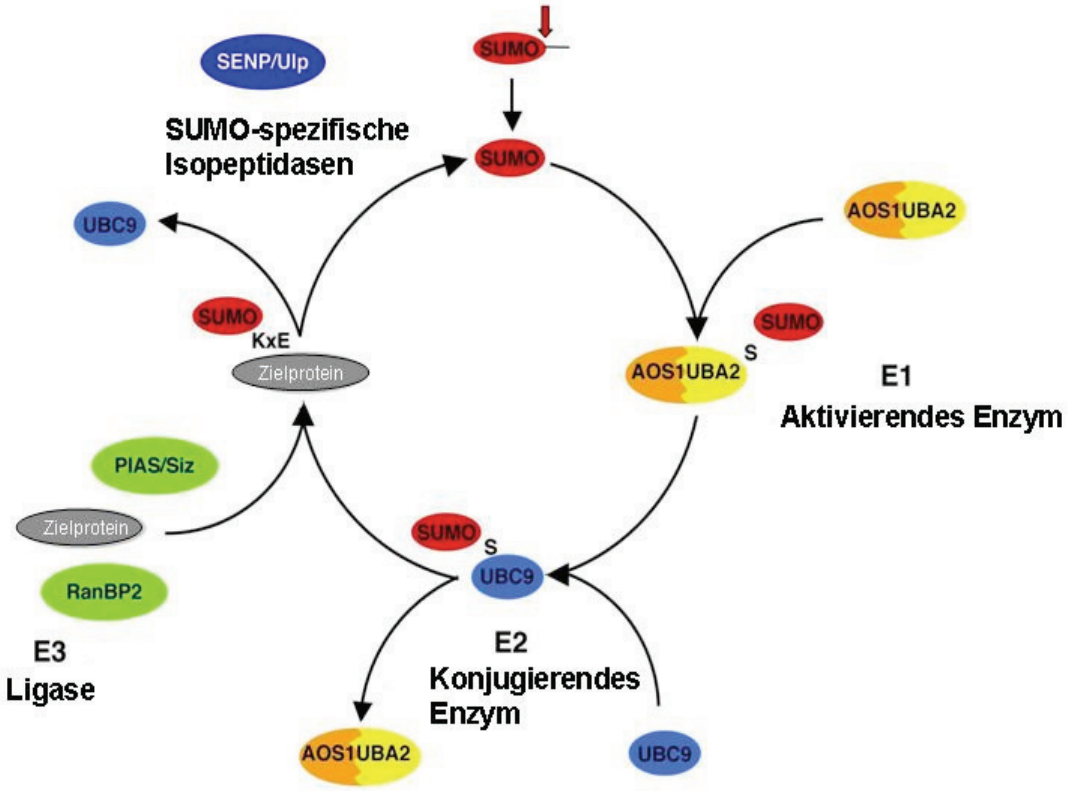

Abb. 1. Enzymsystem der SUMOlierung. E1-Enzyme aktivieren ATP-abhängig das SUMO-Protein. E2-Enzyme konjugieren und die E3-Ligasen präsentieren die Bindungspartner. Einzelheiten siehe Text.

E3-Ligasen haben im Rahmen der SUMOlierung und der Ubiquitinierung eine wichtige Aufgabe in der Selektion der Zielproteine. Sie gehen jedoch keine kovalente Bindung mit SUMO ein sondern vermitteln und fördern die SUMO-Konjugierung, indem sie das aktivierte an Ubc9 gebundene SUMO mit dem Zielprotein in Kontakt bringen. Zu den E3-Ligasen zählen mit den Kernporen assoziierte Proteine wie RanBP2 (siehe 2.2.1) und die PIAS (***p****rotein* ***i****nhibitor of* ***a****ctivated* ***S****TAT*)-Proteine, die in 4 Isoformen existieren. Die funktionelle Bedeutung der PIAS-Proteine wurde ursprünglich darin gesehen, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu terminieren. So führt die Ko-Expression von PIASy und einem

assoziierten Transkriptionsfaktor zu einer starken Repression der Aktivität des Transkriptionsfaktors LEF1 durch SUMOlierung (Sachdev et al., 2001). Demzufolge wurde postuliert, dass PIAS eine E3-Ligase-Aktivität besitzt. Für die Transkriptionsfaktoren c-Jun und p53 wurde tatsächlich ein solcher Mechanismus nachgewiesen. Die durch PIAS bewirkte SUMOlierung dieser Transkriptionsfaktoren hatte eine geringere DNA-Bindungsaktivität zur Folge (Schmidt et al., 2002). Gegenwärtig wird demzufolge PIAS als E3-Ligase und der PIAS/SUMO-Komplex als wichtiger Teil der Regulation von Transkriptionsfaktoren angesehen (Schmidt et al., 2003).

2.2.3 Mechanismen der De-SUMOlierung

Die Dynamik des Prozesses impliziert natürlich auch die Existenz von Mechanismen zur gezielten Entfernung der Markierung durch SUMO. Die verantwortlichen Enzyme gehören zur Familie der ULP1-Enzyme (Ubiquitin-like Protease) und wurden zuerst in Hefen entdeckt (Li et al., 1999). Bei Säugetieren sind sieben Subtypen dieser sogenannten Sentrin/SUMO-spezifischen Proteasen (SENP) vorhanden. Diese Enzyme werden als SENP 1-3 bzw. 5-8 bezeichnet. Ziel ihrer Aktivität ist die Beendigung der Wirkung der Protein-Protein Modifikation und die Bereitstellung von freiem SUMO. Die Isopeptidasen sind allerdings nicht alle spezifisch für SUMO (Melchior, 2003). SENP 1, ein Isoenzym dieser Proteinfamilie, wurde in erhöhter Konzentration in neoplastischem Prostata-Gewebe nachgewiesen. Es hat sich gezeigt, dass SENP-1 das androgenabhängige Zellwachstum direkt beeinflusst und somit eine Rolle in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms vermutet werden kann (Bawa-Khalfe, 2007).

2.2.4 Regulation der SUMOlierung

Die Regulation des SUMO-Systems ist aufgrund der Komplexität noch relativ schlecht verstanden. Trotz des überschaubaren enzymatischen Systems sind noch viele Fragen offen. Klar ist, dass die Regulation der Expression beteiligter Enzyme, ihrer Stabilität und ihrer Lokalisation eine wesentliche Rolle spielt. Darüberhinaus wurden Hinweise auf eine überlappende Steuerung durch andere posttranslationale Modifikationen gefunden. So steht fest, dass Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung an der Regulation der SUMOlierung beteiligt sind (Johnson, 2004). Eine zielgerichtete Hemmung der SUMOlierung durch Phosphorylierung konnte z.B. bei dem Transkriptionsfaktor c-Jun nachgewiesen werden (Müller et al., 2000). Die oben beschriebene Interaktion mit den E3-Ligasen der PIAS-Familie ist ein wichtiger Teil der Regulation der SUMOlierung (Rytinki et al., 2009).

Weitere Beispiele für ähnliche Mechanismen zur Regulation und ihrer Komplexität sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Auslösender Mechanismus	**Wirkung auf SUMO**	**Referenz**
DNA-Reparaturenzyme	fördern die SUMOlierung der Thymin-DNA-Glykosylase	(Hardeland et al., 2002)
Fehlen freier Sauerstoffradikale	Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Uba2 und Ubc9 und Inhibition der Konjugation	(Liu et al., 2008)
nhRSUME; ein durch Hypoxie induziertes Protein	RSUME interagiert mit dem SUMO-Ubc9-Komplex und fördert die Konjugation	(Carbia-Nagashima et al., 2007)
Phosphorylierung von Elk-1 durch MAP-Kinase	De-SUMOlierung und Aktivierung von TF Elk-1	(Yang et al., 2003)

Tabelle 1. Beispiele der Regulation der SUMOlierung

2.3 Regulation der Genexpression

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ist bei der Genregulation in vielfältiger Weise beteiligt. Eukaryotische Gene werden auf Transkriptionsebene durch das komplexe Zusammenwirken einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren reguliert. Diese, z.T. zytosolisch vorliegenden Proteine, werden ligandenabhängig vor allem über posttranslationale Veränderungen, insbesondere Phosphorylierung/Dephosphorylierung aktiviert. Darüberhinaus sind weitere Mechanismen wie die Ubiquitinierung und SUMOlierung von Transkriptionsfaktoren Gegenstand der aktuellen Forschung. Bisherige Daten sprechen dafür, dass die Modifikation der Transkriptionsfaktoren durch SUMO im Zusammenwirken mit Ko-Repressoren in der Regel zu einer Inhibition der Genexpression führt (Gill, 2005).

2.4 Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie

Proteine der STAT-Familie (***s***ignal ***t***ransducer and ***a***ctivator of ***t***ranscription) sind latent zytosolische Transkriptionsfaktoren, die nach ihrer Aktivierung in den Zellkern translozieren (Fu et al., 1992). STATs spielen im Rahmen der Signaltransduktion vieler Zytokine, wie z.B. IL-3, IL-7 und EPO eine entscheidende Rolle, indem sie eine direkte Verbindung zwischen Rezeptor und Zellkern herstellen. Derzeit sind 7 verschiedene Mitglieder der STAT-Familie bekannt (STAT-1, -2, -3, -4, -5a, -5b und -6), die jeweils spezifisch mit Zytokinrezeptoren interagieren. Die STAT-Proteine besitzen 7 Domänen unterschiedlicher Funktion. Durch kristallographische Untersuchungen von STAT-1 sind die Zusammenhänge zwischen Funktion und räumlicher Struktur relativ genau aufgeklärt (Chen et al., 1998).

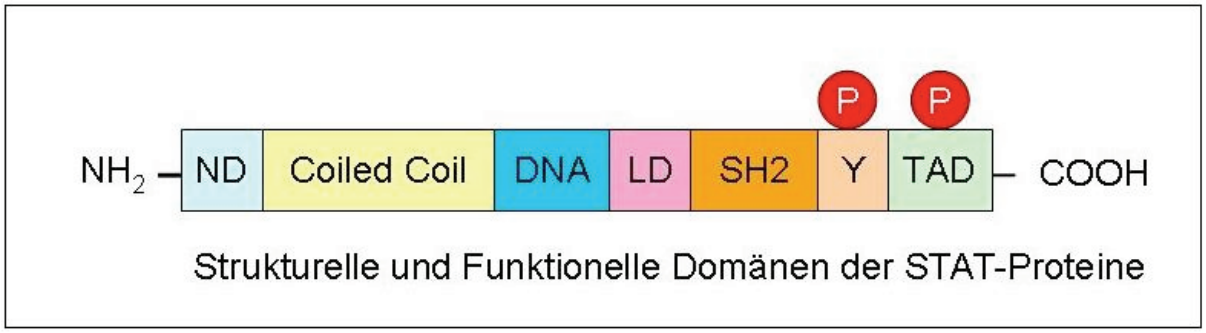

Abb. 2. Domänen der STAT-Proteine. siehe Text.

Wie der Abb. 2 zu entnehmen ist befindet sich aminoterminal die ND-Domäne, welche Dimer-Dimer Interaktionen bei der Bildung von tetrameren STAT-Molekülen vermittelt. Als Tetramer weisen STATs eine stärkere DNA-Bindung an schwachen Promotern auf (Kisseleva et al., 2002). Die Coiled-Coil-Domäne vermittelt Interaktionen mit anderen Transkriptionsregulatoren. Die eigentliche DNA-Bindungsdomäne befindet sich ungefähr zwischen den Aminosäuren 300-500 und determiniert die Spezifität der STATs (Bromberg et al., 2000), gefolgt von einer Linker-Domäne und der für die Interaktion mit dem Rezeptor entscheidenden SH2-Domäne.

Am C-Terminus befinden sich die für die Signaltransduktion entscheidenden Domänen. Die src-Homology-Domäne (SH2) besitzt eine hohe Affinität zum aktivierten Zytokinrezeptor (siehe unten). C-terminal befindet sich auch die Transaktivierende Domäne (TAD), welche

für die Kommunikation mit dem Transkriptionsapparat verantwortlich ist. Im C-terminalen Bereich liegt darüberhinaus ein phosphorylierbarer Tyrosylrest. Bei Liganden-abhängiger Aktivierung von Zytokinrezeptoren binden STATs über die SH-2-Domänen an zytoplasmatische Phosphotyrosylreste des Rezeptors (siehe unten) und werden ihrerseits von rezeptorassoziierten Kinasen phosphoryliert. STATs formen in phosphoryliertem Zustand Homo-/Heterodimere, dissoziieren vom Rezeptor (Greenlund AC et al., 1995) und translozieren in den Zellkern, wo die aktivierten STATs als Transkriptionsfaktoren diverse Gene aktivieren bzw. inhibieren (Levy. et al., 2002). Kürzlich erschienene Publikationen deuten auf eine Erweiterung der bisher bekannten Mechanismen zur Aktivierung der STATs hin. So sollen STATs auch in unphosphoryliertem Zustand dimerisieren können und in dieser Form inaktiv im Zytosol vorliegen. Auch der nukleäre Transport wird als konstitutiv betrachtet und setzt keine Phosphorylierung voraus (Sehgal, 2008). Weitere Untersuchungen zu STATs haben die Auffassung bestätigt, dass auch unphosphorylierte STAT-Moleküle eine aktive Rolle in der Signaltransduktion einnehmen können (Yang et al., 2008). Die eingangs beschriebenen Mechanismen sind jedoch dadurch nicht widerlegt, sonder eher erweitert worden.

Als negative Regulatoren der aktivierten STATs gelten die oben erwähnten PIAS-Proteine. Des Weiteren wird bei Zytokinaktivierung der STATs zeitgleich die Rekrutierung von SOCS (***s**upressor **o**f **c**ytokine **s**ignaling*) vollzogen. Diese Moleküle binden an rezeptorassoziierte Kinasen und verhindern die Aktivierung weiterer STATs (Levy et al., 2002).

Aus Untersuchungen an STAT1 ist bekannt, dass STATs potenzielle Substrate der SUMOlierung sein können (Ungureanu et al., 2005). Wie unter 2.2 beschrieben, bindet SUMO an definierte Lysin-haltige Sequenzen (**Φ**KxE/D), die in STAT-1 nachgewiesen wurden. Die SUMOlierung von STAT-1 hat eine hemmende Wirkung auf die STAT-1-vermittelte Transkription, da die Mutation von Lys703, der SUMOlierungs-Stelle mit der höchsten Wahrscheinlichkeit, eine gesteigerte Genexpression zur Folge hat. Da die SUMOlierung von STAT-1 auch unter optimalen Bedingungen relativ schwach ist, vermuten andere Arbeitsgruppen, dass die Mutation von STAT-1 (Lys703K->R) aufgrund von strukturellen Veränderungen des Proteins eine erhöhte DNA-Bindung erzeugt und die fehlende SUMOlierung eher eine untergeordnete Rolle spielt (Song et al., 2006).

In dieser Arbeit steht der Transkriptionsfaktor STAT5a im Mittelpunkt. Die biologische Bedeutung von STAT5a wird im Folgenden kurz beschrieben. *In-vivo*-Experimente mit

STAT5 haben gezeigt, dass der Jak-STAT-Signalweg elementar ist für die Entwicklung der weiblichen Brustdrüse und die Laktation. STAT-3 und STAT-5 scheinen eine antagonistische Funktion zu besitzen und die relative Aktivität bestimmt die Entwicklungszyklen des Brustdrüsengewebes (Liu et al., 1997). Im Rahmen der EPO-Signaltransduktion ist STAT5 für das Überleben von hämatopoetischen Zellen von Bedeutung (Bittorf et al., 2000). Stark erhöhte Aktivitäten von STAT5a wurden in Tumorzellen der akuten myeloischen Leukämie nachgewiesen (van Etten et al., 2007). STAT5a ist funktionell bisher am besten im Zusammenhang mit dem Erythropoetinrezeptor-Signalweg untersucht und soll deshalb unter 2.7 in diesem Zusammenhang näher dargestellt werden.

2.5 Zytokine und Zytokinrezeptoren

Zytokine (Griechisch; *Cyto*-Zelle, *Kinos*-Bewegung) sind Glycoproteine, die Wachstum und Differenzierung von Zellen steuern. Zu den Zytokinen zählen Interleukine, Erythropoetin, Thrombopoetin, G-CSF und weitere Faktoren, die hämatopoetische und immunologische Systeme regulieren. Das in dieser Arbeit überwiegend verwendete IL-3 wurde bei Untersuchungen von murinen T-Zellen entdeckt (Ihle et al., 1981). IL-3 wirkt ähnlich wie GM-CSF auf Stammzellen des Knochenmarks und fördert die Differenzierung von myeloischen Zellreihen (Metcalf, 2008).
Für die Entfaltung intrazellulärer Effekte von Zytokinen ist die Interaktion mit Zytokinrezeptoren verantwortlich. Zytokinrezeptoren werden anhand der Konfiguration der Zytokinbindungsdomäne in mehrere Klassen eingeteilt (Schindler et al., 1995).

1: Zytokinrezeptoren im engeren Sinne, Klasse I
2: Interferonrezeptoren, Klasse II
3: Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität

Allen Rezeptoren gemeinsam ist das Vorhandensein einer extrazellulären Ligand-bindenden und einer intrazellulären, signalkompetenten Domäne. IL-3 vermittelt seine Wirkung über einen Rezeptor der Gruppe I. Der wohl am intensivsten untersuchte Zytokinrezeptor ist der Erythropoetinrezeptor. Anhand dieses Proteins soll die Rezeptorfunktion und Signaltransduktion beschrieben werden.

2.6 Erythropoetin

Die fetale Blutbildung der Säugetiere findet in Knochenmark, Milz und Leber statt. Postnatal kommt hauptsächlich dem Knochenmark die Aufgabe der Bildung und Reifung von neuen Blutzellen zu. Dies geschieht unter anderem durch die Stimulation erythroider Vorläuferzellen durch Erythropoetin (Epo). Epo ist ein Glykoproteinhormon mit einem Molekulargewicht von 34 kDa, das erythroide Vorläuferzellen zu Proliferation und Differenzierung anregt. Die Synthese von Epo erfolgt in der Niere und wird durch Hypoxie gesteigert (Schuster, 1989). Neuere Daten zur biologischen Funktion von Epo haben gezeigt, dass Epo-Rezeptoren nicht nur in erythroiden Vorläuferzellen exprimiert werden, sondern auch in Endothelzellen, im Gehirn und anderen Geweben zu finden sind (Noguchi, 2008).

2.7 Erythropoetin-Rezeptor und STAT5a-abhängige Signaltransduktion

Der Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) ist ein Zytokinrezeptor der Klasse I. Als Transmembranprotein liegt der EpoR vor Aktivierung teils als Monomer und teils in dimerisierter Form vor. Bei Bindung eines Epo-Moleküls an die extrazelluläre Domäne verändert diese ihre Tertiärstruktur so, dass sowohl die transmembranöse, als auch die intrazelluläre Domäne sich räumlich annähern (Remy, 1999). Dies hat eine Aktivierung von Janus-Kinasen (Jak) zur Folge. Jaks bilden eine Familie von rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen, die durch Autophosphorylierung aktiviert werden und anschließend Tyrosylreste von Signalmolekülen (wie z.B. STAT) phosphorylieren und somit Signalkaskaden initiieren (Darnell et al., 1994). Die intrazellulären Domänen des EpoR besitzen Tyrosylreste, die dabei zunächst als Substrat von Jak2 dienen (siehe Abb. 3) und anschließend Voraussetzung für die Bindung weiterer Signalmoleküle sind.

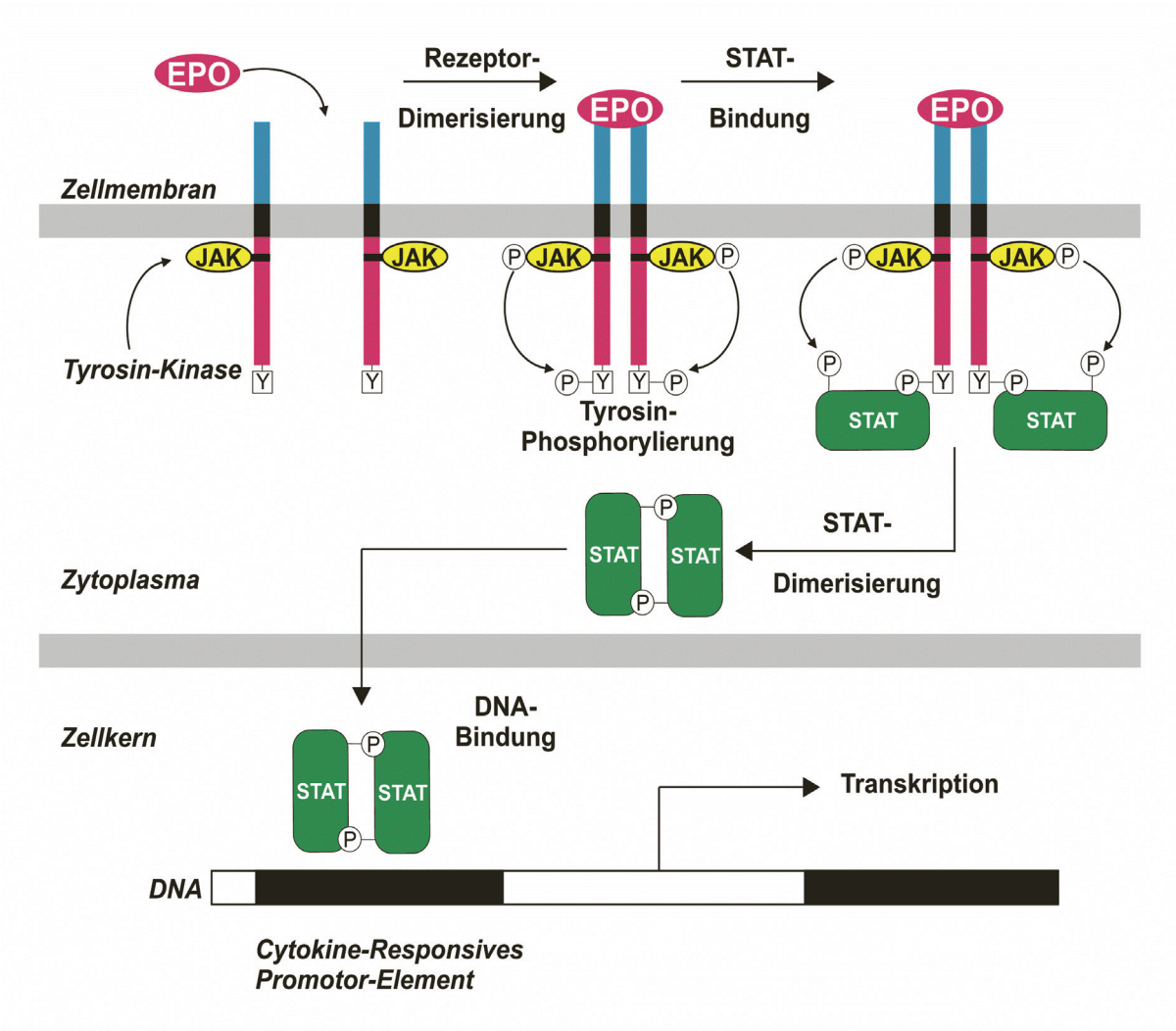

Abb. 3. Signaltransduktion des EpoR. Siehe Text.

Nach Aktivierung des EpoR durch Phosphorylierung der Tyrosylreste werden zytosolische Proteine durch die Interaktion mit deren SH2- Domänen rekrutiert. Jeder aktivierte Zytokinrezeptor bindet selektiv verschiedene STATs (Pellegrini, 1997). Der EpoR interagiert mit der SH2-Domäne von STAT5a, das nach Bindung durch Jak2 phosphoryliert wird. Danach erfolgt die Dissoziation vom Rezeptor und die Dimerisierung des aktivierten STAT5a. STAT5a bildet im Zytosol Homodimere durch reziproke Interaktion von Phosphotyrosylresten mit den SH2-Domänen (Cheung et al., 2001).

Kurz nach Aktivierung und Dimerisierung akkumuliert STAT5a im Zellkern (Levy et al., 2002), um dort als Transkriptionsfaktor seine Wirkung zu entfalten. Die SUMOlierung der Transkriptionsfaktoren findet vermutlich im Laufe der Translokation in den Zellkern statt.

Wie beschrieben (2.2.1), könnte nicht nur die direkte SUMOlierung von STAT5a von regulatorischer Bedeutung sein, sondern auch die Beeinflussung des nukleozytoplasmatischen Transports. Da die SUMOlierung die Transkriptionsaktivität der STATs beeinflussen kann wird in dieser Arbeit auch der Frage nachgegangen, ob dies möglicherweise auch für den Transkriptionsfaktor STAT5a zutrifft. Der Fokus dieser Arbeit richtet sich demnach auf die Untersuchung der SUMOlierung von STAT5a und die Aufklärung der entsprechenden Struktur-Funktionsbeziehungen im STAT5a-Molekül.

3. Zielsetzung

Die Transkriptionsfaktor-abhängige Regulation der Genexpression nimmt eine Schlüsselstellung bei der Steuerung des hämatopoetischen Systems durch Zytokine ein. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren ist dabei ein Produkt multipler Vorgänge, die ihren Ausgangspunkt in der Ligand-abhängigen Dimerisierung der entsprechenden Rezeptoren haben.

Die Rekrutierung von Proteinen der STAT-Familie zählt zum Repertoire aller Zytokinrezeptoren. Neben der Regulation ihrer Aktivität durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung gibt es Hinweise auf die Beteiligung weiterer posttranslationaler Mechanismen, u.a. die Kopplung mit SUMO-Proteinen. Eine SUMOlierung ist allerdings bisher nur bei STAT1 nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob auch der Transkriptionsfaktor STAT5 durch dieses System beeinflusst wird.

Im Einzelnen stehen folgende Fragen im Vordergrund:

1. Ist die aus Vorversuchen postulierte Modifikation von STAT5a durch SUMO-Proteine in hämatopoetischen Zellen zytokinabhängig?
2. Gibt es zytokinabhängige Veränderungen im enzymatischen System der SUMOlierung?
3. Kann die Modifikation von STAT5a im Molekül lokalisiert werden und welche Bedeutung haben potenzielle SUMO-Bindungsstellen?
4. Welche Rolle spielt die SUMOlierung von STAT5a für dessen Funktionen bei der Regulation der Genexpression?

4. Material und Methoden

4.1 Zellkulturtechniken

4.1.1 Zelllinien und Kulturmedium

Für die durchgeführten Experimente wurden Zellen der Linie Ba/F3 verwendet. Ba/F3-Zellen sind murine IL-3-abhängige pro-B-Zellen (Palacios et al., 1985). Die Zellen wachsen obligat faktorabhängig und sterben durch Apoptose, wenn den Zellen der Wachstumsfaktor entzogen wird. Die Zellen wurden in RPMI Medium (Biochrom) unter Zusatz von 10% (v/v) FKS kultiviert. Darüber hinaus wurde Gentamycin [1 % (v/v)] als Antibiotikum verwendet. Als IL-3-Quelle wurden 4% (v/v) eines IL-3-haltigen Überstandes von BPV-Zellen supplementiert. Für die Herstellung des konditionierten BPV-Mediums wurden BPV -Zellen in einer Dichte von $1x10^6$ Zellen/ml in IMDM-Medium (GibcoBRL), welches zu 20% (v/v) mit Pferde-Serum versetzt wurde, eingesät. Nach drei Tagen Wachstum unter Standardbedingungen wurden die Zellen abzentrifugiert (2x bei 3000 U/min (GS-6R Centrifuge, Beckman). Der Überstand wurde steril filtriert und bei -20 ^oC gelagert.

4.1.2 Kultivierung

Die Zellen wurden in einem Inkubator (Heraeus Instruments), bei gesättigter Atmosphäre und 37 ^oC unter CO_2-Begasung (5% (v/v)), kultiviert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte täglich, die Zellen wurden jeweils in einer Dichte von $1,5x10^5$ Zellen/ml eingesät. Die Zählung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblaulösung (0,2 % (w/v) in 0,9% NaCl) gemischt und die Zellkammer entsprechend beladen.

4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch Erwärmung im Wasserbad auf 37^oC. Danach wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und nach Zentrifugation und Resuspension für mindestens drei Tage vor Versuchsbeginn unter Standardbedingungen kultiviert bis die geforderte Zellzahl vorhanden war. Zum Einfrieren wurden $1x10^6$ bis $1{\cdot}10^7$ Zellen in 1 bis 2 ml Einfrierlösung (FKS, 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen (2 ml, Greiner) überführt, in Kryoboxen (Nalgene) auf -70 C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

4.1.4 Probengewinnung

Alle Zellen wurden nach Kultivierung zunächst gezählt und die benötigte Gesamtmenge der Kultur entnommen. Um Wachstumsfaktoren und FKS auszuwaschen wurden die Zellen 5 min bei 1000 U/min (GS-6R Zentrifuge, Beckman) zentrifugiert und in serumfreiem Medium resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Zellkonzentration von 5x 10^5 Zellen/ml eingestellt. Darauf erfolgte die Zytokin-Restimulation mit rekombinantem murinen IL-3 (4% (v/v)) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten sowie direkt vor der Stimulation entnommen.

4.1.5 Transfektion

Fremd-DNA kann durch Transfektion in eukaryotische Zellen übertragen werden. Wird die transfizierte DNA in der Mitose repliziert und das zugehörige Genprodukt auch in den nachfolgenden Generationen synthetisiert, spricht man von Zellen mit stabiler ektoper Expression. Die Genexpression gilt als transient, wenn die Fremd-DNA nur vorübergehend in den Zellen exprimiert wird. Um eine Transfektion zu ermöglichen, muss man das zu exprimierende Gen in einen eukaryotischen Expressionsvektor subklonieren, welcher unter anderem einen Promoter, eine Sequenz zur Termination der Transkription sowie Gensequenzen zur Selektion in Eukaryoten und Procaryoten enthält..

Eine Möglichkeit, die Zellen zur Aufnahme von DNA zu befähigen, ist die Elektroporation. Zur transienten Expression wurden Vektoren der pcDNA3-Familie (Invitrogen) verwendet. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die Zellen in serumfreiem Medium gewaschen und in einer Konzentration von 1x10^7 Zellen / 0,8 ml in Elektroporations-Küvetten (0,4 cm Elektrodenabstand, BioRad) überführt. Danach wurden 15 µg der zu transfizierenden cDNA hinzugegeben und die Suspension für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 350 V und 960 µF elektroporiert (Gene Pulser und Capitance Extender, BIO-RAD). Im Anschluss an die Elektroporation erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für 10 min bei Raumtemperatur, wonach sie in Kulturmedium überführt und unter den jeweiligen Kulturbedingungen gehalten wurden.

4.2 *In-vitro*-Mutation von STAT5a

4.2.1 Expressionsvektor und STAT5a-cDNA

Die cDNA des murinen Wildtyps von STAT5a, N-terminal modifiziert durch einen Myc-tag und kloniert in den Vektor pcDNA3.1(-) (Invitrogen), wurde freundlicherweise von PD Dr. Bittorf (Institut für Medizinische Biochemie, Rostock) bereitgestellt und diente als Ausgangsmaterial für die Mutagenese.

4.2.2 SUMOlierungs-Loci von STAT5a

Die typische Konsensus-Sequenz für SUMOlierungen besteht in der Aminosäuresequenz **Φ**KxE/D. Dabei stellt **Φ** einen aliphatischen Rest dar, K ist die Aminosäure Lysin, x ist eine beliebige Aminosäure und E/D ist eine saure Aminosäure. Unter Anwendung des Programms SUMOplot™ analysis (Abgent, San Diego, CA, USA) wurde die Suche nach potenziellen Sequenzen im Protein STAT5a durchgeführt. Drei Loci mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit konnten identifiziert werden (siehe Tabelle 2).

Position:	Gruppe:	Wahrscheinlichkeit:
K384	QAKSL **LKNE** NTRNE	0.9056
K516	ALNMK **FKAE** VQSNR	0.8500
K86	GFLLK **IKLG** HYATQ	0.7722

Tabelle 2. Potenzielle Orte der SUMOlierung von STAT5a.

4.2.3 Ableitung der Primer

Das Kodon für Lysin/K ist AAG und sollte an der jeweiligen Position in Arginin/R (AGG) mutiert werden. Arginin und Lysin zählen zu den basischen Aminosäuren. Die strukturelle Ähnlichkeit sollte demzufolge mutationsbedingte Konformationsänderungen reduzieren. Die Mutation wird durch zwei synthetische Oligonukleotid-Primer erzeugt. Diese sind jeweils komplementär zu den DNA-Strängen mit Ausnahme einer Base, die die gewünschte Mutation erzeugt. Anhand der Sequenz von STAT5a wurden die entsprechenden Sequenzen abgeleitet. Die verwendeten Oligonukleotide (Biotez Berlin-Buch GmbH) sind nachfolgend dargestellt.

K86R (K1R) substitution	5´-AAG ATC **AGG** CTG GGG CAG TAT G- 3´
	5´-CAG **CCT** GAT CTT CAG CAA AAA CC- 3´
K384R (K2R) substitution	5´-CCT GCT C**AG G**AA TGA GAA CAC C- 3´
	5´-TCA TT**C CT**G AGC AGG GAC TTG G- 3´
K516R (K3R) substitution	5´-GAA ATT C**AG G**GC TGA AGT ACA G- 3´
	5´-AGC **CCT** GAA TTT CAT GTT GAG C- 3´

4.2.4 *In-vitro*-Mutagenese

Die Mutagenese erfolgte unter Verwendung des „QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene. Die zu mutierende DNA liegt in einem doppelsträngigen Vektor vor. Die Mutation wird durch die bereits beschriebenen Oligonukleotid-Primer erzeugt. Diese Primer sind jeweils komplementär zu den DNA-Strängen mit Ausnahme einer oder mehrerer Basen, die die gewünschte Mutation erzeugen. Durch Einsatz der Pfu-DNA Polymerase werden die Mutationen in das Plasmid inseriert. Die mutierte DNA wird anschließend in *E. coli* transformiert, amplifiziert und durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Das Verfahren wird im Folgenden beschrieben. Die Synthese der Mutanten wird durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

2,5 µl,	1x Reaktionspuffer (Stratagene),
≈50 ng	cDNA STAT5a,
je 50 ng	Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH),
1 µl	dNTP mix (Stratagene),
1 µl	QuikChange® Multi enzyme blend (Stratagene) u.a. DNA Polymerase

wurden bis auf 25 µl mit *Aqua bidest.* aufgefüllt und mit 25 µl Wachs (Chill-Out 14, MJ Research) überschichtet.

Es sollten vier verschiedene Mutanten hergestellt werden, 3 Mutanten mit den jeweiligen einzelnen Mutationen an den oben beschriebenen SUMOlierungsstellen von STAT5a sowie eine Mutante, bei der alle drei Lysylreste in Arginin mutiert werden. In Tabelle 3 sind die entsprechenden PCR-Bedingungen dargestellt.

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95 °C	1 min
30	95 °C 55 °C 95 °C	1 min 1 min 2 min / kb plasmid

Tabelle 3. PCR-Bedingungen der *in-vitro*-Mutagenese

Nach erfolgter PCR wurde das Gemisch ohne Wachs in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 4 Units der Restriktionsendonuklease DpnI (Promega) bei 37°C für 90 min inkubiert. DpnI verdaut methylierte DNA und sorgt dadurch für die Elimination des parentalen Stranges. Die mutierte DNA wurde anschließend nach Anweisungen des Herstellers in ultrakompetente *E.coli* -Zellen transformiert, amplifiziert und nach Aufreinigung der Plasmide durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

4.3 Nachweis der Genexpression

4.3.1 mRNA-Nachweis mittels RTQ-PCR

Die RTQ-PCR ist ein hochsensitives Verfahren zum Nachweis und der Quantifizierung spezifischer mRNA.

4.3.1.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte durch TRIZOL LS-Reagenz nach der Vorschrift des Herstellers (Invitrogen). Zuerst wurde das Zellpellet mit 1 ml TRIZOL lysiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform wurden wässrige und organische Phase separiert. Nach einer weiteren dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 4 ^{o}C für 15 Minuten zentrifugiert (12.000 g). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit Isopropylalkohol ausgefällt. Durch eine 10minütigen Inkubation und anschließende Zentrifugation bei 4 ^{o}C (12.000 g) wurde die RNA im Anschluss pelletiert und mit 1ml 75%igem Ethanol gewaschen,

anschließend getrocknet und in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der Konzentration der Gesamt-RNA erfolgte unter Benutzung eines Spektrophotometers (Amersham Biosciences) bei 260 nm.

4.3.1.2 Reverse Transkription der Gesamt-RNA

Für die Durchführung der RTQ-PCR ist die Synthese von cDNA erforderlich. Die benötigten Chemikalien wurden von der Firma GibcoBRL bezogen (Superscript II RT). Etwa 1 µg der Gesamt-RNA-Präparation wurde mit 0,5 µl 50 µM Oligo-(dT)-Primer versetzt und mit deionisiertem Wasser auf 4,5 µl aufgefüllt, vermischt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Um die mRNA in cDNA zu übersetzen, wurde das Enzym Reverse Transkriptase eingesetzt. Der Oligo-(dT)-Primer bestand aus 17 Thymidinresten und bindet komplementär an die 3'-gelegenen Poly-Adenin-Sequenzen der Gentranskripte. Weiterhin wurden folgende Reagenzien gemischt: 2 µl 5 x Erststrang-Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM pro Komponente), 1 U RNase-Inhibitor (GibcoBRL) sowie 100 U Superscript II RT. Dieser Mix wurde dann mit dem RNA-Primer-Mix vermischt und für 1 h bei 42 °C inkubiert. Nach einer 15minütigen Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C konnte der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden.

4.3.1.3 Real-time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während oder am Ende eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Messung beruht auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers. Die verwendeten TaqMan-Sonden (Applied Biosystems) besitzen an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende einen Farbstofflöscher. Durch die räumliche Nähe entsteht kein Signal. Tritt die Sonde jedoch in Kontakt mit DNA wird sie durch die *Taq*-Polymerase verändert. Dadurch löst sich der Fluoreszenzfarbstoff von der Sonde und ein messbares Signal entsteht. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Nur in der linearen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Für die Quantifizierung wurde 1 µl cDNA mit 250 µl *Aqua dest.* verdünnt. Daraufhin wurden 9 µl der verdünnten cDNA mit 11 µl Master-Mix (Taq-Man ®, Applied Biosystems)

vermischt, welches als Universalmix für die PCR dient. Mit Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase als Referenzamplifikat wurden daraufhin im Verhältnis 1/10 der gewünschte Primer (Applied Biosystems) mit dem Universalmix auf eine 96-well Platte pipettiert. Die PCR wurde unter Verwendung der Software „7000 System Detection Software“ (Applied Biosystems) und des PCR-Geräts ABI-Prism (Applied Biosystems) durchgeführt. Anhand Tabelle 4 sind die Bedingungen der RTQ-PCR dargestellt.

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95 °C	10 min
40	95 °C 60 °C	15 sec 1 min

Tabelle 4. PCR-Bedingungen der RT-PCR

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der oben genannten Software.

4.3.2 Proteinnachweis durch Immunblotting

Die Immunblotting-Methode ermöglicht den empfindlichen und spezifischen Nachweis von Proteinen in komplexen Gemischen.

4.3.2.1 Zellgewinnung und Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode zur Anreicherung von Proteinen aus einem Zell-Lysat. Zunächst wurden die Zellen in serumfreiem Medium gewaschen. Der Lysepuffer wurde hergestellt aus 1x PBS, 1% Triton-X 100 und 1 Tablette Proteaseinhibitoren „complete“ (Roche) auf 10 ml Puffer. 1x 10^7 Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und 15 min bei 4 ^oC lysiert. Nach 15minütiger Zentrifugation (14.000 rpm) konnte der Überstand (Zell-Lysat) in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Im Zell-Lysat ist die Gesamtheit der intrazellulären Proteine enthalten. Als nächster Schritt wurde der gewünschte Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml zugegeben und über Nacht bei 4 ^oC inkubiert. Am Folgetag wurde durch Zugabe von ProteinA-Agarose-beads der Protein-Antikörper-Komplex gebunden, das gewonnene Pellet gewaschen und mit 2x Probenpuffer mit ß-Mercaptoethanol für drei Minuten bei 95 ^oC inkubiert.

4.3.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Nach Isolierung von Proteinen durch Immunpräzipitation wurde das Protein-Probenpuffergemisch mit Hilfe eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (Bio Rad) verwendet. Die Zusammensetzungen des Gels und des Puffers sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt.

SDS-Polyacrylamidgele:

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
40% Acrylamid	8,25 ml	1 ml
Trenn - bzw. Sammelgelpufer	8,25 ml	2 ml
Ammoniumpersulfat 10%	200 µl	29,2 µl
TEMED	17 µl	8,35 µl
H_2O	16,3 ml	5,08 ml

Tabelle 5. Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

Puffer:

	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
Tris	1,5 M	0,5 M
SDS	13,9 mM	13,9 mM
pH	8,8	6,8

Tabelle 6. Zusammensetzung der verwendeten Puffer

4.3.2.3 Blotting

Die mittels Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im nächsten Schritt auf eine PVDF-Membran (Poly Screen; Perker Elmer Life Science) übertragen. Die Aktivierung der Membran erfolgte für eine Minute mit Methanol und anschließender 5minütiger Rehydrierung in *Aqua dest*. Anschließend wurde der relevante Abschnitt des Gels ausgeschnitten und so in einer Semidry-Blotting-Apparatur positioniert, dass bei Durchfluss des Stromes die Proteine

des Gels auf die Membran übertragen wurden. Bei einer Stromstärke von 400 mA, wurde für 4 h bei 4 ^{o}C der Transfer durchgeführt bzw. alternativ bei 200 mA über Nacht.

4.3.2.4 Immunoreaktionen

Nach erfolgter Übertragung auf die PVDF-Membran wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen mittels einer Blocklösung (PBS; 1%, BSA 5%, Tween 20) abgesättigt. Dafür wurde die Membran 45 min bei Raumtemperatur in der Blocklösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Primärantikörper in Blocklösung verdünnt und zusammen mit der Membran über Nacht bei 4 ^{o}C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:1000 angesetzt. Die Wahl des jeweiligen Primärantikörpers wird im Ergebnisteil erläutert.

Am Folgetag wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit Waschlösung (PBS 0,1 %, Tween 20) gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper Anti-Rabbit/Goat IgG, Horseradish Perixodase linked (GE Healthcare) inkubiert. In einer Verdünnung von 1:5000 wurde für 45 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min bei Raumtemperatur in Waschlösung gewaschen.

4.3.2.5 Detektion mittels ECL

Durch den Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper lassen sich die auf der Membran spezifisch gebundenen Primärantikörper nachweisen, indem man die Membran für eine Minute mit etwa 125 µl/cm^2 ECL-Lösung (GE Healthcare) inkubiert. Eine spezifische Peroxidase oxidiert dabei das Substrat Luminol und erzeugt eine Chemilumineszenz. Diese wurde mittels eines Röntgenfilms (Agfa) detektiert.

4.3.3 Untersuchung der Induktion der Transkription durch Dual-Luciferase Reportergen Assays

Die Methode wird eingesetzt, um die Wirkung regulatorischer DNA-Sequenzen auf die Transkription zu untersuchen. Dazu werden Zellen mit einem Vektor transfiziert, der einerseits das Leuchtkäfer-Luciferase-Gen und andererseits 5'-seitig die zu untersuchende DNA-Sequenz trägt. Die zytokinabhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt durch Bindung an die regulatorische Sequenz (Enhancer) zu einer Erhöhung der

Luciferasetranskription. Die exprimierte Luciferasemenge wird dann in Zell-Lysaten luminometrisch in relativen Lichteinheiten bestimmt.

4.3.3.1 Versuchsbeschreibung

$2x10^6$ bis $8x10^6$ Ba/F3-Zellen in exponentieller Wachstumsphase wurden abzentrifugiert und durch mehrfaches Waschen in RPMI 1640 das IL-3 entfernt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von etwa $5x10^5$/ml in RPMI 1640, inkl. 10 % (v/v) FKS aufgenommen und unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach 5 h wurden die Zellen pelletiert, einmal mit RPMI 1640 gewaschen, in 700 µl RPMI 1640 resuspendiert und mit 100 µl der jeweiligen DNA-Lösungen vermischt (siehe Tabelle **7**).

DNA-Lösung zur Transfektion für den Dual- Luciferase -Reportergen-Assay		
Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
15 µg pcDNA3.1 150 ng pRL-TK*)	15 µg pcDNA-STAT5a-wt 150 ng pRL-TK*)	15 µg pcDNA-STAT5a K123R 150 ng pRL-TK*)
*) Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega		

Tabelle 7. DNA-Lösungen des Dual-Luciferase-Reportergen-Assays

Nach 10minütiger Inkubation bei RT und Überführung der Suspension in Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand, Fa. BioRad) erfolgte die Elektroporation bei 350 V und 960 µF, sowie eine weitere Inkubation für 10 min bei RT. Danach wurden die Zellen in Stimulationsmedium (0,8 ml RPMI 1640, inkl. 10 % (v/v) FKS, gewünschtes Zytokin) bei einer Zelldichte von $1x10^6$/ml in den Vertiefungen einer 24er Mikrotiterplatte für 4 h unter Kulturbedingungen kultiviert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen pelletiert und einmal in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen für 10 min bei RT nach Resuspension in 40 µl Passive Lysis Buffer (bei Dual-Luciferase Reportergen Assays) bzw. 40 µl Cell Culture Lysis Reagent (bei Luciferase-Reportergen Assays). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Untersuchung der Lysate erfolgte nach Anweisungen des Herstellers für den Dual-Luciferase Reportergen Assay bzw. den Luciferase Reportergen Assay (beide Promega). Die Lysepuffer waren Bestandteile dieses Systems. Die Messung der Lumineszenz wurde mit einem Luminometer MiniLumat LB9506 (EG&G Berthold) durchgeführt.

4.3.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay / EMSA

Dieses Verfahren dient der *in-vitro*-Untersuchung der Bindung von aktivierten Transkriptionsfaktoren an spezifische Sequenzmotive doppelsträngiger DNA, wie sie im Zellkern stattfindet. Entsprechende DNA-Fragmente werden radioaktiv markiert und danach mit Kernextrakten inkubiert. Anschließend wird in einer nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese das Protein-DNA-Gemisch aufgetrennt. Dabei migrieren die freien, nicht gebundenen Oligonukleotide wesentlich schneller durch das Gel als die DNA-Protein-Komplexe. Bei der anschließenden Detektion mittels Autoradiografie stören sie daher nicht.

4.3.4.1 Puffer und Reagenzien

Pufferbestandteil:	Puffer A:	Puffer B:
HEPES (pH 7,9)	10 mM	20 mM
MgCl2	1,5 mM	1,5 mM
KCl	10 mM	10 mM
NaCl	-	420 mM
Glycerol	-	25%
EDTA (pH 8,0)	-	0,2 mM
DTT	0,5 mM	0,5 mM
Pepstatin (Roche)	0,7 µg/ml	0,7 µg/ml
Complete ™ (Boehringer, Mannheim)	4%	4%
1 Tabl. in 2 ml H_2O (reinst) lösen		
Vanadat	1 mM	1 mM

1x TE-Puffer:, pH 7,8 — 1 mM EDTA
10 mM Tris (Roth)

Shiftpufferstock (5x): 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerol, 0,1% (v/v) Nonidet P40 (Boehringer, Mannheim), 1 mM Pefa Bloc (Boehringer, Mannheim); (pH 7,5), die Verdünnung zu 1x Puffer erfolgt mit Aqua bidest

0,5x TBE-Puffer, pH 8,0: 90 mM Tris
90 mM Borsäure
2mM EDTA

4.3.4.2 Gewinnung von Kernextrakten

Verwendet wurden jeweils 1x 10^6 Zellen. Nach Zentrifugation [5 min; 1000 U/min (GS-6R Centrifuge; Beckman)] und Verwerfung des Überstandes, wurde das Pellet mit PBS (GibcoBRL) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet mit 400 µl Puffer A versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. In dieser Phase erfolgt die Zell-Lyse. Danach wurde die Probe für 10 Sekunden bei 14000 U/min (Mikro 22R; Hettich Zentrifugen) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Im verbleibenden Pellet befinden sich die Zellkerne. Diese wurden mit 75 µl Puffer B resuspendiert und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach der in diesem Schritt erfolgten Lyse der Zellkerne wurde die Probe 3 min bei 14000 U/min (Mikro 22R; Hettich Zentrifugen) und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befindet sich nun der Kernextrakt, der in ein neues Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde.

4.3.4.3 Vorbereitung der Oligonukleotide ,Markierung der Sonde und Shift-Assay

Nach dem Herstellerprotokoll wurden die Oligonukleotide entsprechend einer Endkonzentration von 50 pmol/µl aufgelöst. Danach erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide, bei der je 10 µl Oligonukleotidlösung mit 80 µl Wasser für 10 min auf 80 °C erhitzt wurden. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 300 µl Wasser verdünnt (Endkonzentration 2.5 pM). Anschließend wurde die nun doppelsträngige DNA-Sonde, die durch Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Stränge entstand, am 5´-Ende enzymatisch durch den Austausch von Phosphatgruppen radioaktiv markiert (Polynukleotidkinase-Reaktion). Dafür wurde der Reaktionsansatz (s.u.) 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend direkt auf Eis überführt. Danach wurden die markierten Oligonukleotide vom freien ^{32}P-γ-ATP getrennt. Dazu wurden Sephadex G 50-Säulen (Nick Columns™, Amersham) verwendet. Die Säulen wurden mit 3 ml 1x TE-Puffer äquilibriert und im Anschluss mit dem Reaktionsansatz und weiteren 800 µl 1x TE-Puffer beladen, wovon die letzten 400 µl aufgefangen wurden, da sie das markierte Oligonukleotid enthielten. Die markierte DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

<u>Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide:</u>

CAS	(boviner β-Casein Promoter, enthält STAT5a-Bindungsstelle)	5´- AGA TTT CTA GGA ATT CAA ATC- 3´
AP-1	(Bindungsstelle für AP1; Jun-Homo- o. Jun/Fos-Heterodimer	5´- CGC TTG ATG ACT CAG CCG ATC- 3´

Reaktionsansatz, Markierung:

Materialien:	Menge:
doppelsträngiges Oligonukleotid	1 µl (2,5 pmol)
10x Reaktionspuffer (Roche)	2 µl
Aqua ad iniektabilia Ph. Eur. (Serum-Werk Bernburg AG)	13 µl
^{32}P-γ-ATP	3 µl (30 µCi)
T4-Polynukleotidkinase (Roche bzw. GibcoBRL)	1 µl

Reaktionsansatz, Shift Assay:

1x Shiftpuffer	(2 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl; 0,02 mM EDTA; 0,2 mM DTT; 1 % Glycerin 0,02 % NP 40 (Roche); 0,02 mM Pefa Bloc)	4 µl
BSA	(10 mg/ml)	2 µl
Poly dI/dC	(1 mg/ml; Roche)	2 µl
Kernextrakt		3-6 µl
Oligo		3-6 µl
Wasser, reinst		auf 20 µl auffüllen

Der Reaktionsansatz für den Shift Assay wurde für 30 Minuten bei 27 °C inkubiert und konnte im Anschluss auf das 6 %-ige Acrylamidgel aufgetragen werden. Elektrophoresebedingungen: Stromstärke: 100 mA, Spannung: 300 V, Puffer: 0,5x TBE (pH 8,4), Dauer: ca. 1,5 h. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgte die Detektion durch Autoradiographie.

Ansatz für Polyacrylamidgel (6 %):

40 % (v/v) Acrylamid/ Mis – 29:1	6 ml
10x TBE-Puffer pH 8,4 (Gibco BRL)	1 ml
Ammoniumpersulfat (10 % Stock)	240 µl
TEMED (Invitrogen)	40 µl
mit H_2O auf 40 µl auffüllen	

5. Ergebnisse

5.1 SUMOlierung von STAT5a in hämatopoetischen Zellen

5.1.1 Expression von STAT5a in Ba/F3 Zellen

Für die hier dargestellten Experimente wurde die murine, IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie Ba/F3 verwendet. Zunächst wurde die Expression von STAT5a in Abhängigkeit von der Gegenwart des Wachstumsfaktors IL-3 untersucht. Dafür wurden Zellen wie unter 4.1 beschrieben kultiviert und jeweils Aliquots mit oder ohne IL-3 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen isoliert und eine Immunpräzipitation ausgehend von je 10^7 Zellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen STAT5a (L-20, Santa Cruz Biotechnology) durchgeführt. Beim anschließenden Western Blot wurde der gleiche Antikörper als Primärantikörper verwendet und die Bindung durch ECL nachgewiesen (Abb.4). Es zeigte sich, dass STAT5a in Ba/F3-Zellen konstitutiv exprimiert wird. Die detektierten Banden entsprechen einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa. Die Expression des Proteins erfolgt unabhängig von der Präsenz des Wachstumsfaktors IL-3. Nach jeweils einstündiger Entfernung des Faktors und anschließender Reinkubation der Zellen mit IL-3 für eine Stunde ist nur eine geringfügige Zunahme des Signals sichtbar

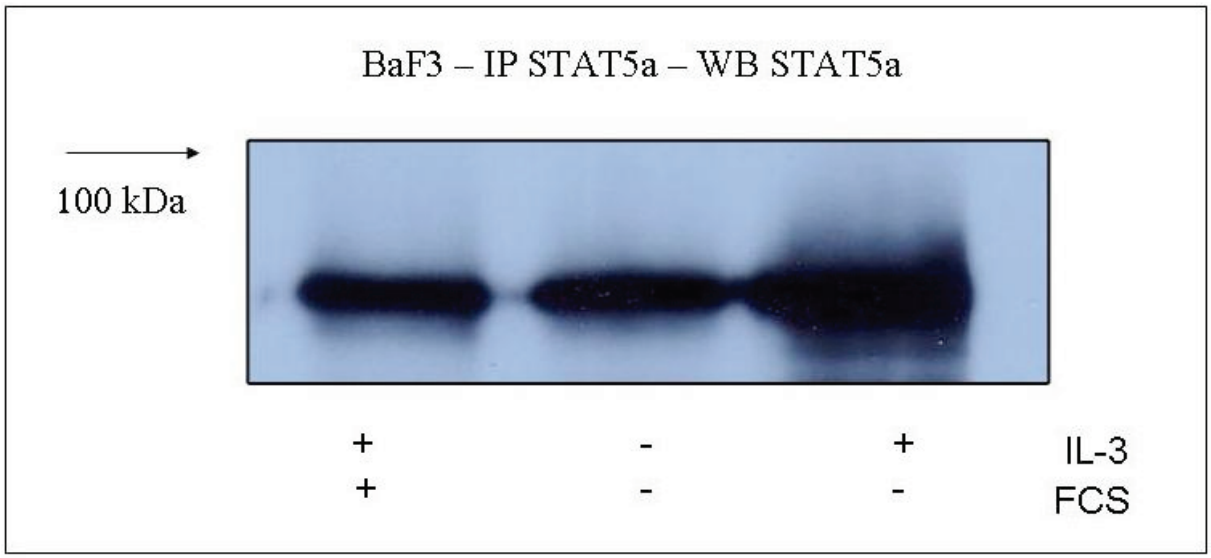

Abb. 4. Ba/F3. IP–STAT5a, WB –STAT5a, Banden bei Molekulargewicht 90 kDa

5.1.2 Modifizierung von STAT5a in Ba/F3-Zellen durch SUMOlierung.

Nachdem die Expression von STAT5a in Ba/F3-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt der STAT5-Antikörper von der Membran entfernt und die Membran mit einem SUMO1-spezifischen Primärantikörper (FL-101, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert.

Dadurch sollte zum einen geklärt werden, ob STAT5a SUMOliert wird, aber darüber hinaus auch eine Aussage getroffen werden, inwieweit die SUMOlierung auch von der Stimulation mit IL-3 abhängig ist. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis eines Experiments, in dem wie oben beschrieben STAT5a-spezifische Immunpräzipitate aus Ba/F3-Zellen hergestellt wurden und im anschließenden Immunoblot ein SUMO1-spezifischer Antikörper zum Einsatz kam. Zunächst wird deutlich, dass STAT5a einer SUMOlierung unterliegt. Darüberhinaus wird die Annahme bestätigt, dass die SUMOlierung unter IL-3-Stimulierung zunimmt.

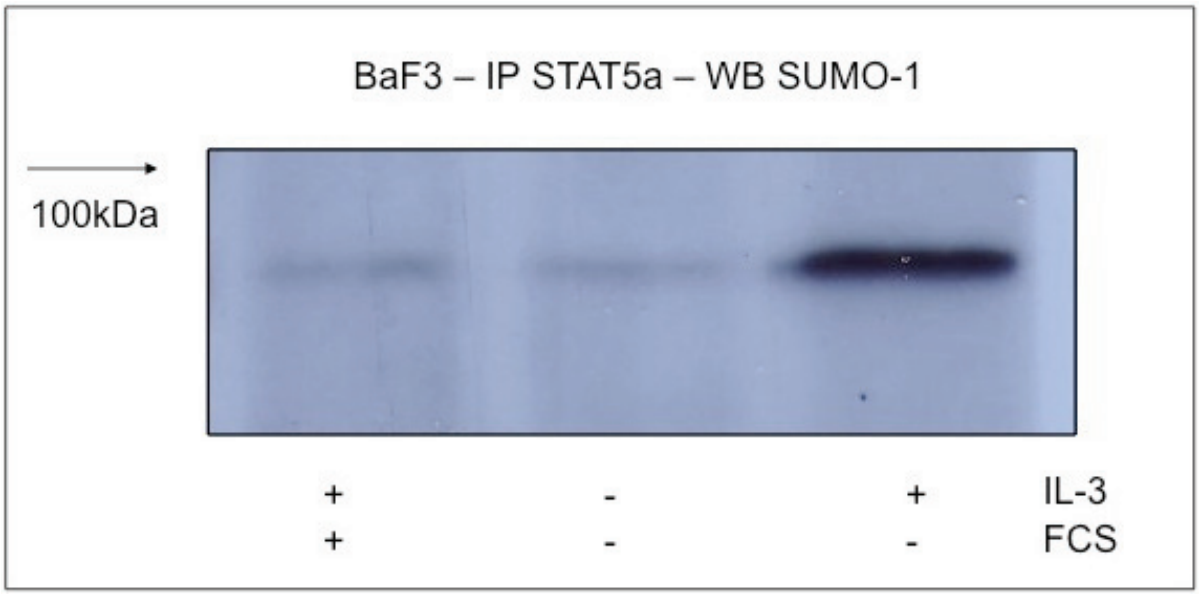

Abb. 5. Nachweis SUMO1-spezifischer Modifikation an immunpräzipitiertem STAT5a aus Ba/F3-Zellen. Banden bei Molekulargewicht 90 kDa

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in der verwendeten Zelllinie das konstitutiv exprimierte Protein STAT5a einer IL-3-abhängigen Modifikation durch SUMO-1 unterliegt.

5.2. Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen bei der SUMOlierung von STAT5a

5.2.1 Identifizierung von SUMOlierungs-Orten

Nach erfolgtem Nachweis der SUMOlierung von STAT5a wurde als nächster Schritt die Identifizierung der entsprechenden Loci im STAT5a-Protein angestrebt.

Die typische Konsensus-Sequenz für SUMOlierungen besteht in der Aminosäuresequenz **Φ**KxE/D. Dabei stellt **Φ** einen aliphatischen Rest dar, K ist die Aminosäure Lysin, x ist eine beliebige Aminosäure und E/D eine saure Aminosäure. Ausgehend davon wurde mit Hilfe des Programms SUMOplot™ analysis (Abgent, San Diego, CA, USA) die Suche nach wahrscheinlichen Konsensus-Sequenzen im Protein STAT5a durchgeführt. Die Analyse ergab, dass in der Sequenz von STAT5a drei Loci existieren, für die eine hohe Wahrscheinlichkeit einer SUMOlierung postuliert werden kann. Die betreffenden Sequenzen sind in Abbildung 6 entsprechend hervorgehoben.

Aminosäuresequenz des murinen STAT5a
(rot: vorhergesagte SUMOlierungsloci)

```
  1  MAGWIQAQQL QGDALRQMQV LYGQHFPIEV RHYLAQWIES QPWDAIDLDN
 51  PQDRGQATQL LEGLVQELQK KAEHQVGEDG FLLKIKLGHY ATQLQNTYDR
101  CPMELVRCIR HILYNEQRLV REANNCSSPA GVLVDAMSQK HLQINQRFEE
151  LRLITQDTEN ELKKLQQTQE YFIIQYQESL RIQAQFAQLG QLNPQERMSR
201  ETALQQKQVS LETWLQREAQ TLQQYRVELA EKHQKTLQLL RKQQTIILDD
251  ELIQWKRRQQ LAGNGGPPEG SLDVLQSWCE KLAEIIWQNR QQIRRAEHLC
301  QQLPIPGPVE EMLAEVNATI TDIISALVTS TFIIEKQPPQ VLKTQTKFAA
351  TVRLLVGGKL NVHMNPPQVK ATIISEQQAK SLLKNENTRN ECSGEILNNC
401  CVMEYHQATG TLSAHFRNMS LKRIKRADRR GAESVTEEKF TVLFESQFSV
451  GSNELVFQVK TLSLPVVVIV HGSQDHNATA TVLWDNAFAE PGRVPFAVPD
501  KVLWPQLCEA LNMKFKAEVQ SNRGLTKENL VFLAQKLFNI SSNHLEDYNS
551  MSVSWSQFNR ENLPGWNYTF WQWFDGVMEV LKKHHKPHWN DGAILGFVNK
601  QQAHDLLINK PDGTFLLRFS DSEIGGITIA WKFDSPDRNL WNLKPFTTRD
651  FSIRSLADRL GDLNYLIYVF PDRPKDEVFA KYYTPVLAKA VDGYVKPQIK
701  QVVPEFVNAS TDAGASATYM DQAPSPVVCP QPHYNMYPPN PDPVLDQDGE
751  FDLDESMDVA RHVEELLRRP MDSLDARLSP PAGLFTSARS SLS
```

Abb. 6. Vorhergesagte SUMO-Modifizierungsloci in der Aminosäuresequenz des murinen Proteins STAT5a. 3 Abschnitte mit einer hohen angenommenen Wahrscheinlichkeit (p=0,7-0,9)
einer SUMOlierung (K86, K384, K516). Berechnung durch SUMOplot™.

5.2.2 Herstellung von SUMOlierungs-negativen Mutanten von STAT5a

Nach Identifizierung von drei potenziellen SUMOlierungsorten innerhalb des murinen Proteins STAT5a sollten diese im nächsten Schritt mutiert werden, um eine SUMOlierung dieser Proteinabschnitte gezielt abzuklären und entsprechende funktionelle Untersuchungen durchzuführen.

Zu diesem Zweck wurde das Kodon für Lysin (AAG) so verändert, das nachfolgend AGG Arginin (AGG) kodiert wird. Dafür wurden die unter 4.2.3 beschriebenen Primer eingesetzt. Ausgehend von der Wildtyp-STAT5a-cDNA wurden insgesamt vier verschiedene Varianten hergestellt. Dabei wurde jedes Lysin (K86, K384, K516) einzeln in Arginin mutiert bzw. zusätzlich eine Variante produziert, der alle potenziellen SUMOlierungsmotive fehlen (siehe Abb. 7). Die kombinierte Variante K1,2,3R sollte Aussagen zum möglicherweise vollständigen Ausfall der Modifikation liefern

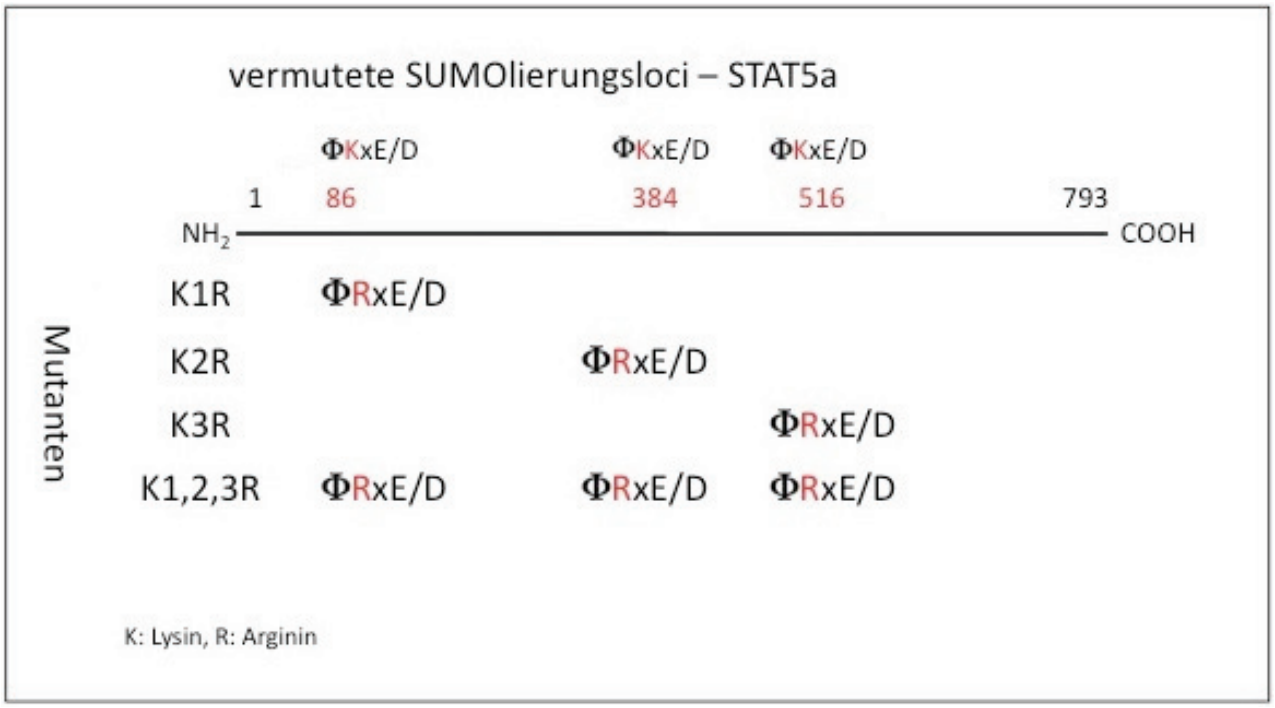

Abb. 7. Mutation der SUMOlierungs-Stellen in der Wildtyp-STAT5a-cDNA durch gerichtete Mutagenese.

Nach der *in-vitro*-Mutagenese wurden alle Konstrukte durch Sequenzierung analysiert und die vollständige und exakte Veränderung der Konsensus-Sequenz bestätigt.

5.2.3 Transiente Expression der mutierten STAT5a-Varianten in Ba/F3-Zellen

Die unter 5.2.2 hergestellten Mutanten von STAT5a sollten nachfolgend hinsichtlich ihrer SUMOlierbarkeit überprüft werden. Dafür musste die mutierte cDNA in Zellen transfiziert werden, um nach transienter Expression analysierbare Genprodukte zu liefern. Wie unter 4.1.5 beschrieben, wurden Ba/F3-Zellen elektroporiert und die in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen) klonierten Mutanten eingeschleust. Zur besseren Unterscheidung des ektop exprimierten STAT5a von dem endogenen Protein wurde Myc-markiertes STAT5a verwendet.

Nach Isolierung entsprechender Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit anti-mSTAT5a und anschließendem Westernblot unter Verwendung eines gegen murines SUMO1 gerichteten Primärantikörpers durchgeführt. Zu Kontrollzwecken wurde nachfolgend die Membran mit einem STAT5a-spezifischen Antikörper inkubiert. In Abbildung 8 sind Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes gezeigt. Die Daten demonstrieren eine gleichmäßige transiente Expression aller STAT5a-Varianten bis auf die mit dem leeren Vektor (mock) transfizierten Zellen (Abb 8b). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl das aufgrund seines geringeren Molekulargewichts eine höhere Mobilität aufweisende endogene STAT5 als auch das nach Transfektion exprimierte Protein durch SUMOlierung modifiziert werden (Abb. 8a). Während bei den Mutanten mit fehlendem Lysin 86 und 384 kein Unterschied in der SUMOlierung zum Wildtyp feststellbar ist, lässt sich beim Lysin 516 ein deutlicher Abfall und in der Variante mit drei mutierten SUMOlierungsorten ein vollständiges Fehlen der Modifikation konstatieren. Obwohl hier keine klare Quantifizierung der SUMOlierung möglich ist, zeigen diese Ergebnisse, dass die untersuchten Aminosäuresequenzen für die Modifikation des STAT5a von großer Bedeutung sind.

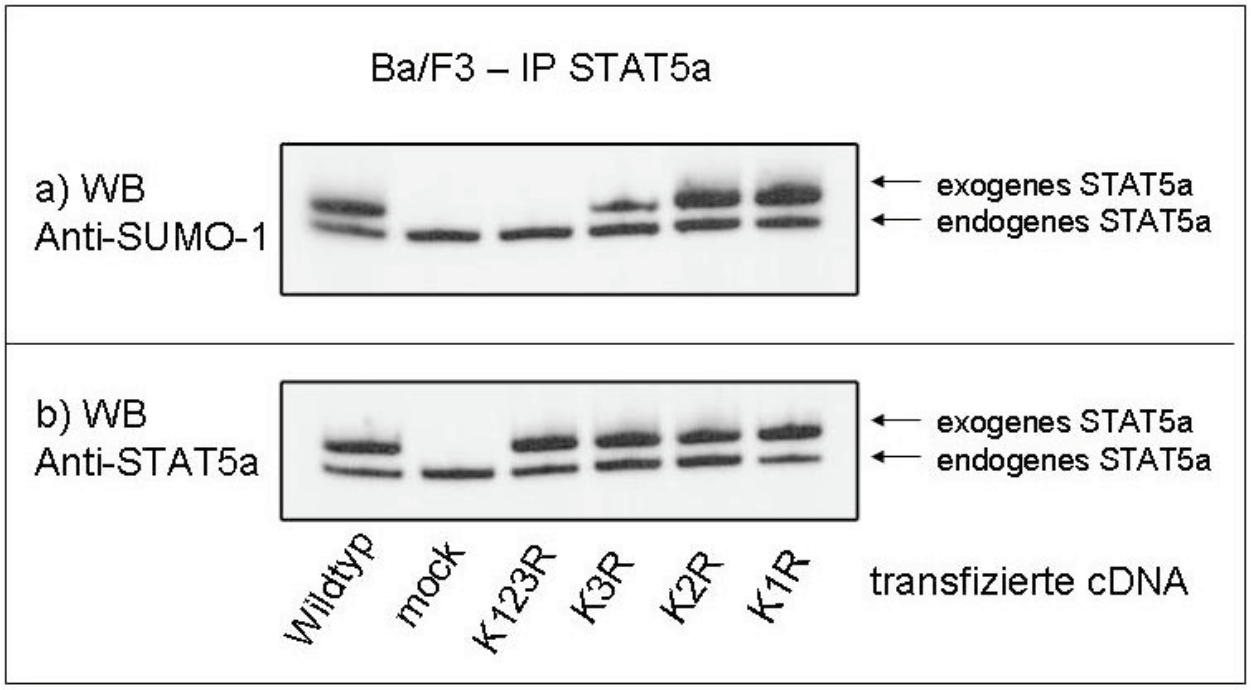

Abb. 8. Immunoblot nach Transfektion von Ba/F3-Zellen mit cDNA-Varianten des murinen STAT5a und anschließender Immunopräzipitation (8a: IP mit anti-mSTAT5a und WB unter Verwendung von anti-mSUMO-1.; 8b: WB mit anti-mSTAT5a)

5.3 Funktionelle Untersuchungen an Varianten des murinen STAT5a

5.3.1 DNA-Bindung von mutiertem mSTAT5a

Nachdem in den oben beschriebenen Untersuchungen die transiente Expression mutierter mSTAT5a-Spezies (Siehe 5.2.3) und Veränderungen im Ausmaß der posttranslationalen SUMOlierung gezeigt wurden, stellte sich die Frage, welche Folgen dies für die biologischen Funktionen von STAT5a hat. Als Transkriptionsfaktor bindet STAT5a an regulatorische DNA-Sequenzen und fördert so die Expression bestimmter Zielgene. Aus diesem Grund war es sinnvoll, die DNA-Bindungskapazität der verschiedenen STAT5a-Spezies diesbezüglich zu evaluieren. Um die DNA-Bindung zu erfassen wurden Electrophoretic Mobility Shift Assays (siehe 4.3.4) durchgeführt. Nach transienter Transfektion der cDNAs wurden Kernextrakte von IL-3-stimulierten Zellen präpariert und anschließend mit radioaktiven, transkriptionsfaktorspezifischen DNA-Fragmenten inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden gebildete Komplexe autoradiographisch sichtbar gemacht (Abb. 9).

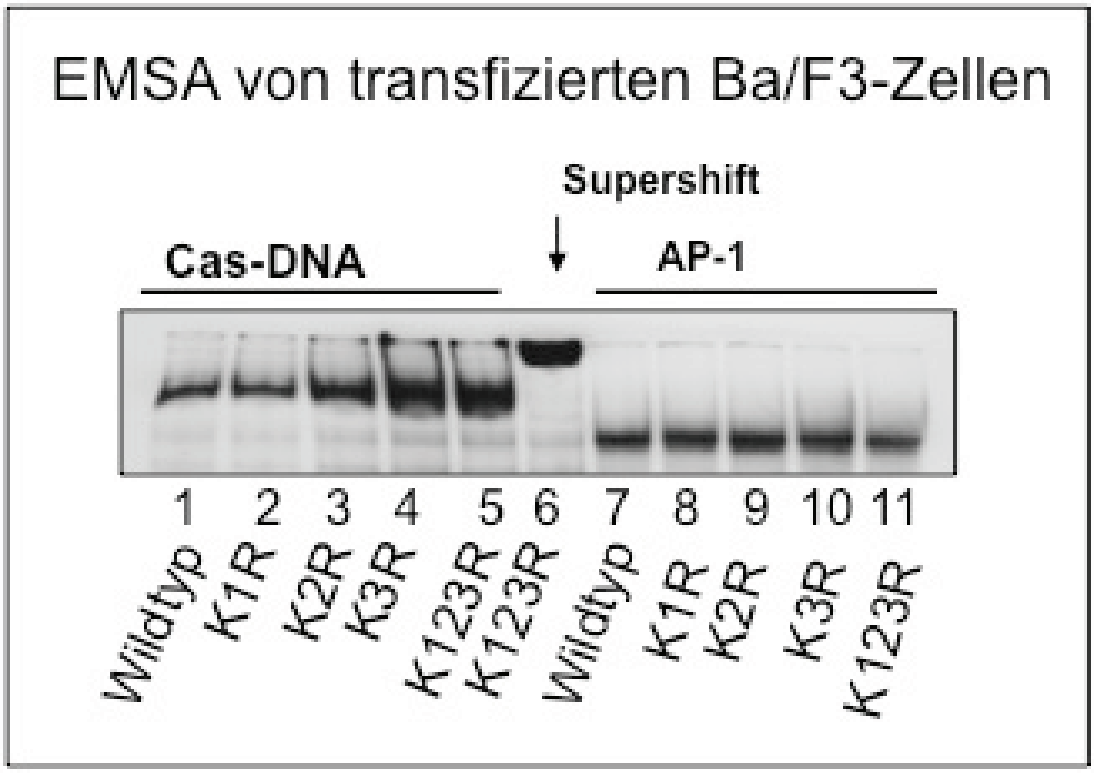

Abb. 9. Die DNA-Bindung von mSTAT5a ist von der SUMOlierung abhängig. Durch Verwendung eines für STAT5a spezifischen Oligonukleotids wurde die DNA-Bindung mittels EMSA nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden dieselben Kernextrakte mit einem für den Transkriptionsfaktor AP-1 spezifischen Oligonukleotid untersucht (Einzelheiten siehe Text)

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass unter Verwendung des für STAT5a spezifischen Oligonukleotids CAS (Spuren 1-6) eine Bindung von mSTAT5a nachweisbar ist. Diese nimmt an Intensität bei SUMOlierungsdefekten Mutanten – insbesondere bei Ausschaltung aller drei Lysylreste - deutlich zu. Da in vorhergehenden Versuchen (5.2.3) festgestellt wurde, dass die dreifach mutierte Variante von mSTAT5a nicht durch SUMOlierung modifiziert wird (siehe Abb.8) wird postuliert, dass die SUMOlierung von mSTAT5a die DNA-Bindung reduziert. Die Identität des DNA/Protein-Komplexes wurde durch Supershiftanalyse mit einem STAT5-spezifischen Antikörper bestätigt (Abbildung 9, Bahn 6). Die mit gleichen Kernextraktmengen durchgeführten Bindungsassays mit einem AP1-spezifischen Oligonukleotid zeigen keinerlei Veränderung und bestätigen die mit dem STAT5-spezifischen Oligonukleotid gefundenen quantitativen Unterschiede (Bahn 7-11).
Zusammenfassend sprechen die gezeigten Daten dafür, dass Veränderungen in der SUMO-spezifischen posttranslationalen Regulation zu funktionellen Veränderungen bei dem Transkriptionsfaktor STAT5a führen. Es kann postuliert werden, dass die SUMOlierung von

STAT5a die DNA-Bindung und damit die Funktion als Transkriptionsfaktor negativ beeinflusst.

5.3.2 Analyse der Transaktivierungs-Eigenschaften von mutiertem STAT5a

Die im Folgenden beschriebenen Experimente hatten die Beantwortung der Frage zum Ziel, ob die transaktivierende Funktion von STAT5a durch die SUMOlierung moduliert wird. Dazu wurden Ba/F3-Zellen mit einem Reportervektor (GAS-Luc) transient transfiziert. In diesem Vektorkonstrukt steht das Luciferasegen unter Kontrolle STAT5-spezifischer enhancer-Sequenzen (γ-*Interferon-activated-sequence*, GAS). Gleichzeitig wurden die unter 5.2.3 beschriebenen, in Expressionsvektoren klonierten cDNAs für STAT5a-Varianten kotransfiziert (Elektroporation) und die Zellen nach 4 h mit dem Zytokin EGF stimuliert oder ohne Zytokin für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und in einem Reportergenassay die Luciferaseaktivität als Maß für die STAT5a-abhängige Transaktivierung bestimmt. Die in Abb. 10 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Expression der SUMOlierungsdefekten STAT5a-Mutante in den Zellen zu einer deutlich höheren Aktivierung des Luciferasevektors führt als in mock-transfizierten (leerer Vektor) oder mit der Wildtyp-cDNA transfizierten Zellen.

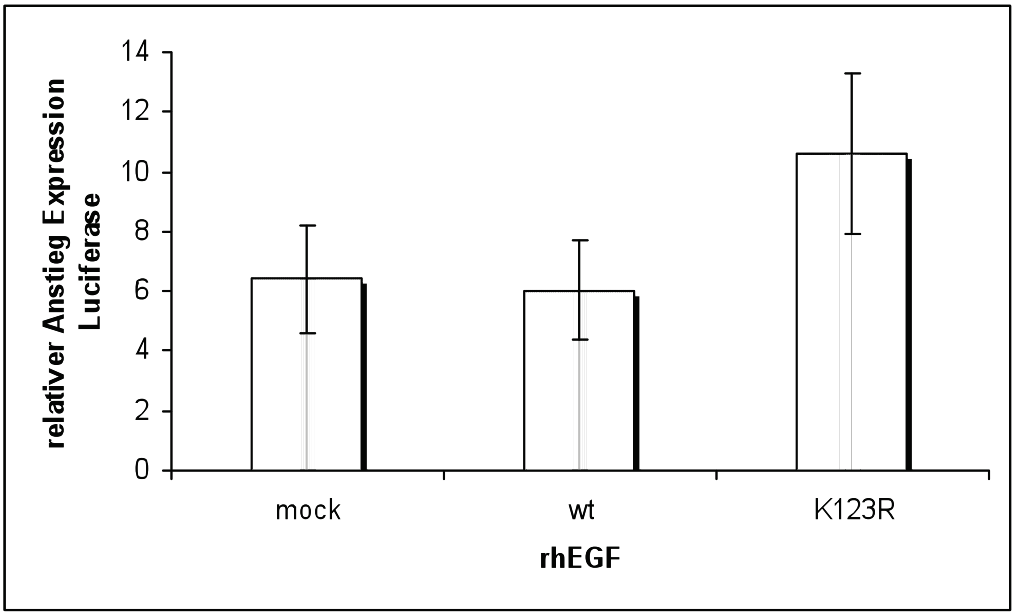

Abb. 10. Reportergen–Assay: Relativer Anstieg der Luciferaseexpression nach Stimulation mit EGF im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die transaktivierenden Eigenschaften des STAT5a-Moleküls durch SUMOlierung offensichtlich gehemmt werden. Dies bestätigt die Daten zur DNA-Bindung aus dem Abschnitt 5.3.1.

5.4 Analyse von Genexpressionsveränderungen im enzymatischen System der SUMOlierung

5.4.1 Real-Time-PCR

Um Erkenntnisse über Zytokin-abhängige Veränderungen in der Expression von an der SUMOlierung beteiligten Enzymen zu gewinnen, wurden entsprechende Transkripte quantifiziert. Ba/F3-Zellen wurden für unterschiedlich lange Zeit (5 min. bis 24h) einer Stimulation mit IL-3 ausgesetzt und im Anschluss die Gesamt-RNA isoliert (4.3.1.1). Durch RTQ-PCR sollte anhand der Quantifizierung eine Aussage über Veränderungen der Expression der jeweiligen Proteinspezies ermöglicht werden. Gewählt wurden folgende Proteine, deren Beteiligung am Prozess der SUMOlierung und De-SUMOlierung (siehe Abb. 1 und Abschnitt 2.2.2) aus der Literatur bekannt ist:

-SUMO-1/-3

-Uble1a	E1-Enzym
-Ubc9	E2-Enzym
-PIAS-1/-2/-4	E3-Ligasen,
-SENP-1/-2	Isopeptidasen
-ZFP36	Kontrolle

Die RTQ-PCR lieferte die im Folgenden dargestellten Ergebnisse.

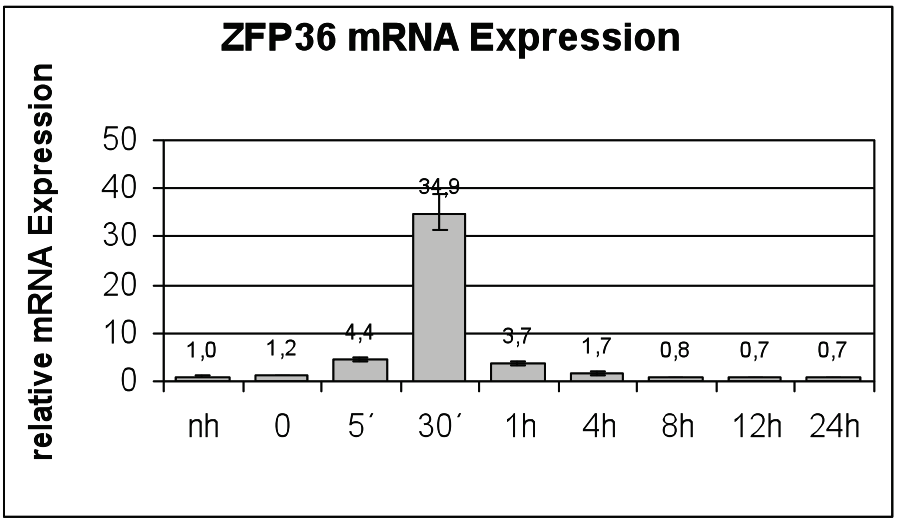

Abb. 11. Expressionsanalyse der zfp-36-mRNA

Abb. 11 zeigt das Ergebnis der RTQ-PCR des Kontroll-Gens zfp36. Das Zink-Finger-Protein 36 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, dessen mRNA-Induktion in hämatopoetischen Zellen nach IL-3-Stimulation nachgewiesen wurde (Büchse et al. 2006). Zfp36 wird zytokinabhängig sehr schnell induziert und erreicht nach 30minütiger Stimulation schon das Maximum der Synthese. Das Ergebnis dieser Positivkontrolle beweist, dass die Stimulation der Zellen erfolgreich war und intakte cDNAs präpariert wurden.

Die Quantifizierung der mRNA von SUMO-1 und SUMO-3 ist in der Abb. 12 dargestellt. Die Daten zeigen, dass nach Stimulation mit IL-3 keine nennenswerte Neu-Synthese der Proteine stattfindet. Gleiches gilt für die ebenfalls in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der E1-Ligase Uble1a und des E2-Enzyms Ubc9. Diese Proteine werden somit konstitutiv exprimiert und liegen in ausreichender Menge vor, um Veränderungen der SUMOlierung zu realisieren.

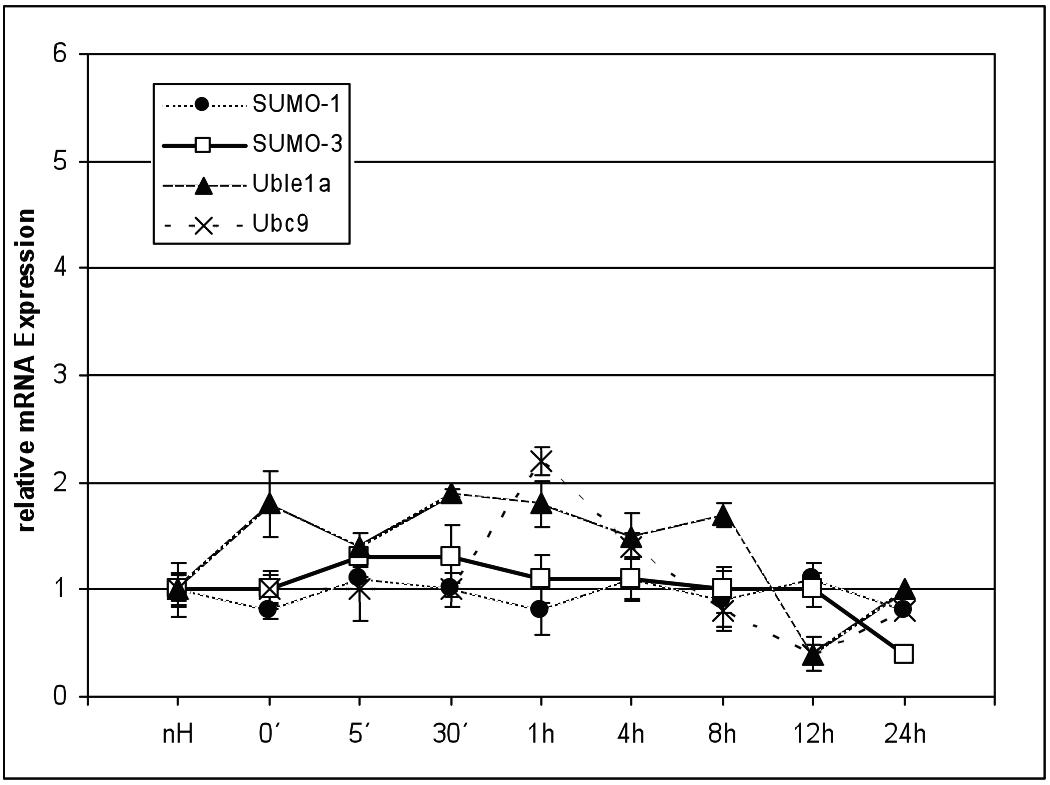

Abb. 12. RTQ-PCR. Relative mRNA-Expression von SUMO-1/-3, Uble1a und Ubc9.

Im Gegensatz dazu konnte für die als E3-Ligasen aktiven PIAS-Enzyme ein Anstieg innerhalb der ersten Stunden nachgewiesen werden, der später wieder auf ursprüngliche Werte fällt (Abb. 13).

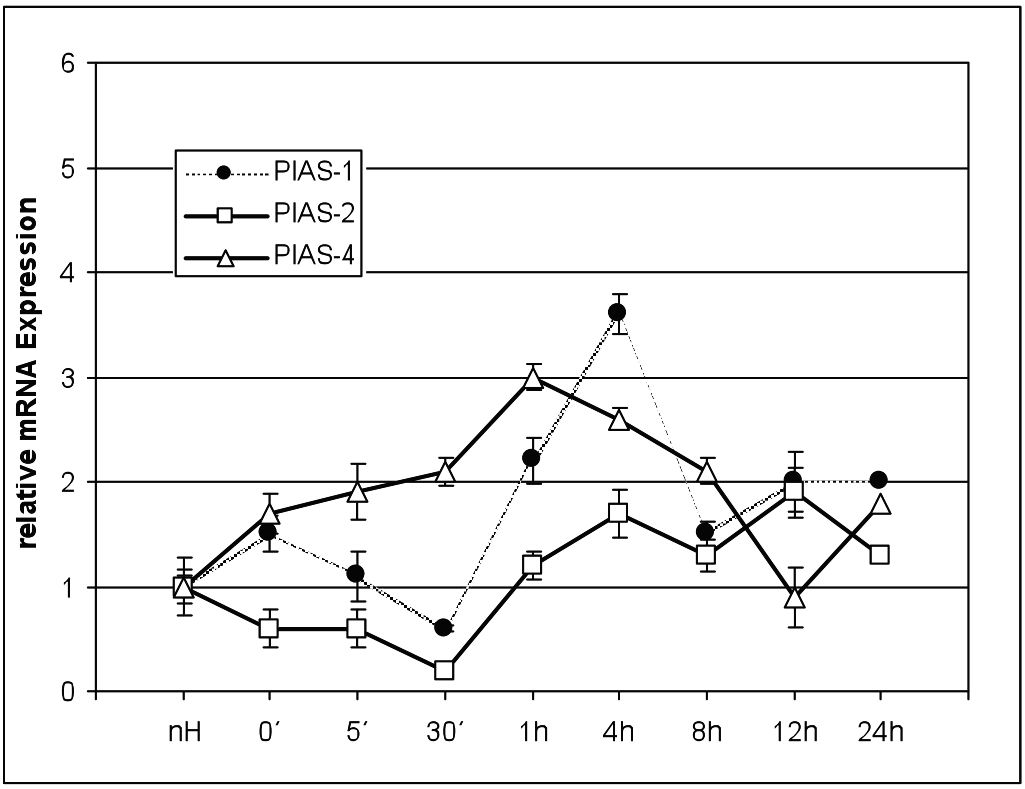

Abb. 13. RTQ-PCR. Relative mRNA-Expression von 3 Isoproteinen der PIAS-Familie.

Die Quantifizierung der mRNA der Isopeptidasen SENP-1/-2unterscheidet sich deutlich. Die Isopeptidasen sind für die Spaltung der kovalenten Bindung zwischen SUMO und Substrat verantwortlich (siehe 2.2.3). Innerhalb der ersten Stunde ist kein Anstieg der mRNA-Menge festzustellen, weder von SENP-1 noch von SENP-2 (Abb. 14). Nach ca. 4stündiger Stimulation mit IL-3 ist jedoch ein markanter Anstieg der Synthese von SENP-1 nachweisbar. Möglicherweise wird SENP-1 zu diesem Zeitpunkt vermehrt für die Beendigung des SUMO-Signals benötigt und seine Expression entsprechend verstärkt.

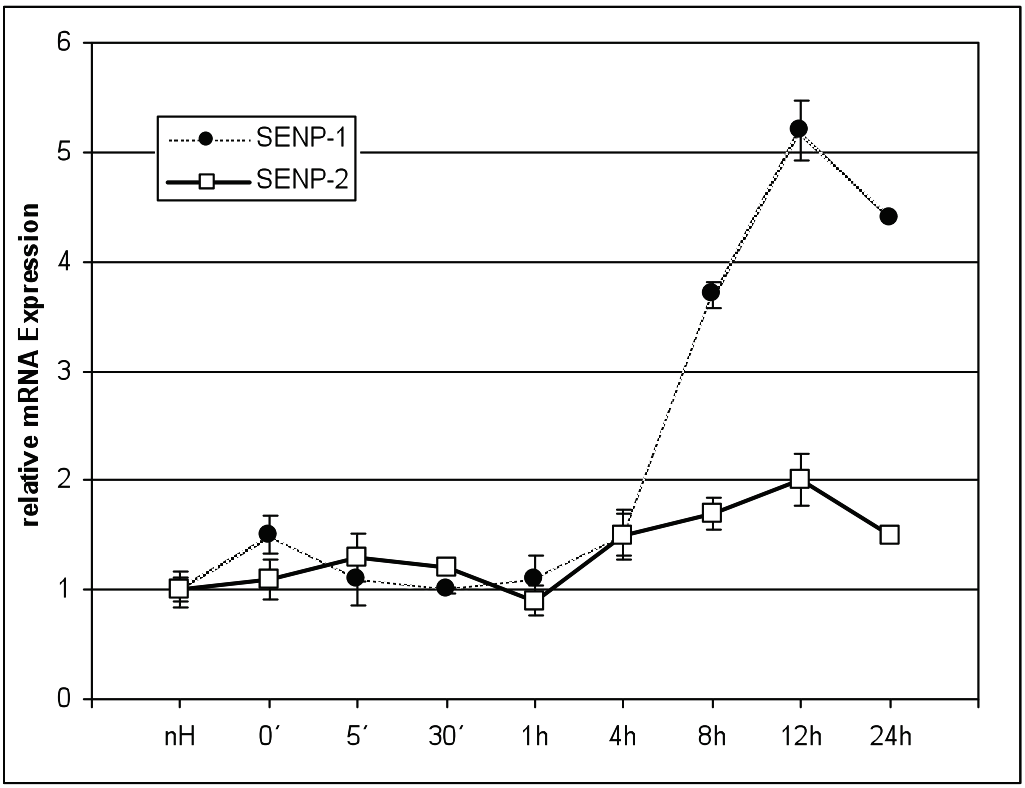

Abb. 14. RTQ-PCR. Relative mRNA-Expression der Isopeptidasen SENP-1/-2.

6. Diskussion

Die Regulation von intrazellulären Signalwegen ist gegenwärtig ein zentraler Gegenstand der medizinischen Forschung. Die Fortschritte auf diesem Gebiet machen zunehmend deutlich, dass Veränderungen der Signaltransduktion ursächlich an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind. Der Jak-STAT-Signalweg ist insbesondere in die Regulation des hämatopoetischen Systems sowie immunologischer Prozesse involviert. Es ist vielfach nachgewiesen, dass Mutationen und Dysregulation in diesem Signalweg zu Erkrankungen wie Immunschwäche, Asthma und Krebs führen können (Schindler, 2002). Die weitere Forschung auf diesem Gebiet liefert die Grundlage zur Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen, welche das Potenzial besitzen, in dieses Signalsystem spezifisch einzugreifen.

SUMOlierung von STAT5a

Die bisher bekannten Daten zur posttranslationalen Modifikation der STATs machen deutlich, dass Proteine der STAT-Familie Substrate der SUMOlierung sind. Am besten untersucht ist diese Beziehung am STAT-1 (Rogers et al., 2003; Ungureanu et al., 2003). Innerhalb der Struktur von STAT-1 wurde dabei ein Lysylrest (Lys703) identifiziert und seine Bedeutung für die SUMOlierung charakterisiert (Ungureanu et al., 2005).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Protein STAT5a, von welchem in der Literatur ähnliche Untersuchungen bisher nicht beschrieben sind. Zunächst wurde die Expression von STAT5a in Ba/F3-Zellen gezeigt und festgestellt, dass die Stimulation mit IL-3 nur eine geringfügige Zunahme hervorruft (Abb. 4). Die Expression von STAT5a ist demnach als weitgehend konstitutiv anzusehen.

Für STAT-1 und STAT-3 konnte demonstriert werden, dass sie nach zytokinvermittelter Aktivierung auch ihre eigene Expression induzieren (Yang et al., 2008). Im Fall von STAT-5a scheint jedoch die primäre Folge einer IL-3-Stimulation nicht die vermehrte Expression des Proteins, sondern die IL-3-abhängige Aktivierung durch Phosphorylierung zu sein (Reddy EP et al., 2000). In weiteren Versuchen konnte bewiesen werden, dass STAT5a posttranslational SUMOliert wird und diese Modifikation unter der Stimulation von IL-3 zunimmt. Ähnliches wurde bereits für

STAT-1 nachgewiesen (Rogers et al., 2003; Ungureanu et al., 2003). Daher kann festgestellt werden, dass die SUMOlierung von STAT-Proteinen ein Vorgang ist, der im Rahmen der Signaltransduktion zum Repertoire zytokinabhängiger Prozesse zählt.

Enzyme der SUMOlierung

Über die Regulation der an der SUMOlierung beteiligten Enzyme ist bisher nur relativ wenig bekannt. In den hier durchgeführten Experimenten konnte festgestellt werden, dass die Stimulation von Ba/F3-Zellen mit IL-3 für die meisten der beteiligten Enzyme keine Veränderung in deren Expression hervorruft. Auch die relativen mRNA-Spiegel von SUMO-1 und SUMO-3 unterlagen keiner Veränderung über die Zeit (Abb. 12). Diese Tatsache spricht dafür, dass SUMO-1 konstitutiv produziert wird und ein „steady-state“ durch Konjugation und Dekonjugation vorliegt. Für SUMO-3 liegen Daten vor, die zeigen, dass das Protein in einem freien Pool vorliegt und keine zeitabhängige Veränderung der relativen mRNA-Expression nachweisbar ist (Johnson, 2004). Vermutlich wird in den Zellen eine relativ konstante Menge von SUMO-Proteinen vorgehalten, um entsprechende Modifikationen abzusichern. Dies gilt im Übrigen auch für die E1 und E2-Enzyme, da weder für Uble1a, noch für Ubc9 eine Veränderung der Expression nachzuweisen war.

Die als E3-Ligasen aktiven PIAS-Proteine zeigen eine leichte Steigerung über die Zeit, mit einer maximalen Expression nach ca. 4 h für PIAS-1 (Abb. 13). Dies könnte ein Ausdruck zunehmender E3-Ligase-Aktivität von PIAS-1 und nachfolgender SUMOlierung sein.

Die markanteste Veränderung über die Zeit weist das Protein SENP-1 auf (Abb. 14). Beginnend nach einer 4-stündigen Stimulation mit IL-3 erfolgt ein deutlicher Anstieg der Synthese, der bis zum Ende der Versuchszeit anhält. SENP-1 ist als Isopeptidase für die Beendigung der SUMO-Bindung verantwortlich. In der Literatur sind IL-6 und Androgene als Induktoren der Transkription von SENP-1 beschrieben (Yeh, 2009). Eine Erklärung für den Anstieg könnte die Dynamik der SUMOlierung liefern. Wenn PIAS als E3-Ligase nach ca. 4h vermehrt synthetisiert wird, um die SUMOlierung zu verstärken, steigt dementsprechend auch der Bedarf an erhöhter Aktivität der Isopeptidasen, die die SUMO-Bindung terminieren. Dies ist sicher auch für die Erhaltung eines zellulären Gleichgewichts der SUMO-Proteine notwendig.

Im Ergebnis dieser Versuche kann somit der Schluss gezogen werden, dass das Enzymsystem der SUMOlierung eher konstitutiv exprimiert wird und die beteiligten und vorliegenden Enzyme einer katalytischen Leistungssteigerung nachkommen können, ohne eine markante Neusynthese von z.B. Ubc9 bewerkstelligen zu müssen. Allein die E3-Ligase PIAS-1 und die Isopeptidase SENP-1 zeigten eine gesteigerte Synthese im Verlauf der Stimulation mit IL-3. Hier sind weitere Versuche notwendig, um die Zytokinabhängigkeit des Systems besser zu verstehen.

Reduzierte SUMOlierung nach Mutation von Lysylresten

Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der SUMOlierungsloci war eine Überprüfung der STAT5a-Sequenz mit dem Programm SUMOplot™ analysis (Abgent, San Diego, CA, USA). Drei Lysylreste (K86, K384, K516) wurden dabei identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Modifikation durch SUMOlierung unterliegen (siehe Text und Tabelle unter 4.2.2). Die höchste Wahrscheinlichkeit einer SUMOlierung wurde für Lys384 angegeben. Untersuchungen an STAT-1 haben gezeigt, dass dort der Lysylrest 703 für die gefundene SUMOlierung verantwortlich ist (Ungureanu et al., 2005; Song et al., 2006). Lys703 ist innerhalb der STAT-Familie nur in STAT-1 vorhanden (Lim et al., 2006).

Die Analyse von *in vitro*-mutierten STAT5a-Varianten lieferte Daten, die für die Modifikation von drei Lysylresten durch SUMOlierung sprechen. In Analogie zum STAT-1 scheint jedoch auch hier einem Lysylrest eine größere Bedeutung zuzukommen. Während für STAT5a-Varianten mit mutierten Lysylresten (Positionen 86, 384) praktisch keine Abschwächung der SUMOlierung feststellbar war, erfolgt nach Mutation des Rests 516 eine deutliche Reduktion. Die Mutation aller Loci (K123R) hat einen kompletten Ausfall der SUMOlierung zur Folge. Wider erwarten scheint deshalb nicht der Lysylrest 384, sondern das Lysin in Position 516 bei STAT5a die entscheidende Rolle für die Modifikation zu spielen. Beim Ausfall dieses Aminosäurerestes ist die SUMOlierung signifikant reduziert. Die Lysylreste K86 und K384 werden ebenfalls SUMOliert, allerdings in erheblich geringerem Ausmaß.

SUMO hemmt die DNA-Bindung von STAT5a

Die Untersuchungen zum Zusammenhang struktureller Veränderungen im STAT5a-Molekül mit funktionellen Konsequenzen erbrachten klare Aussagen zur Rolle der SUMOlierung. Die Analyse der DNA-Bindungsaktivitäten von STAT5a-Varianten (Abb. 9) zeigt eine deutlich höhere DNA-Bindung der Mutanten K3R und K123R. Eine geringfügig höhere Bindung kann auch für K2R angenommen werden. In den vorangehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass Mutationen der SUMOlierungsstellenvon STAT5a zu einer geringeren SUMOlierung des Gesamtmoleküls führten. Da die STAT5a-Mutanten (K3R, K123R) mit der geringsten SUMO-Bindung die stärkste DNA-Bindung aufweisen, muss davon ausgegangen werden, dass die SUMOlierung von STAT5a zu einer Hemmung der DNA-Bindung und somit der STAT5a-vermittelten Genexpression führt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten aus der Literatur. Die Mehrzahl der bisher untersuchten Transkriptionsfaktoren wird durch posttranslationale SUMOlierung gehemmt und zeigt eine geringere DNA-Bindung und Transaktivierung (Gill, 2005; Palvimo, 2007). Als Ausnahmen sind z.B. der Hitze-Schock-Transkriptions-Faktor 2 oder ROR-alpha bekannt, welche beide nach SUMO-Modifizierung aktiviert werden und die Transkription fördern (Goodson et al., 2001; Hwang et al., 2009). Aus der Familie der STAT-Proteine ist bisher nur STAT-1 untersucht. SUMO-Modifikation führt hier zu einer Hemmung der Genexpression. So zeigen Arbeiten an STAT-1 (K703R), dass die Mutation von Lys703 zu einer erhöhten DNA-Bindung führt, die SUMOlierung also eine stark negative regulatorische Auswirkung auf STAT-1 besitzt (Ungureanu et al., 2005). Song et al. (2006) kamen zu dem gleichen Ergebnis, waren jedoch der Auffassung, dass eine durch die Mutation herbeigeführte Konformationsänderung, und nicht die fehlende SUMOlierung, für die stärkere DNA-Bindung verantwortlich sei. Als Grund dafür wurde angeführt, dass nur eine geringe Fraktion des nachgewiesenen STAT-1 SUMOliert wird und somit nicht das alleinige Fehlen von SUMO durch Mutation für die erhöhte DNA-Bindung verantwortlich ist.

Die Tatsache, das SUMO eine große Wirkung auf die Proteinfunktion hat, aber die betroffenen Proteine nur zum Teil SUMOliert sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wird angenommen, dass durch unzureichende Protease-Inhibition bei der Lyse der verwendeten Zellen ein Teil der SUMO-Proteine von Proteasen abgelöst wird und deshalb nicht an den Zielproteinen nachweisbar ist (Ross et al., 2002).

Des Weiteren bestehen Theorien, nach welchen SUMOlierte Proteine in sogenannte „nuclear bodies“ translozieren. Diese sollen als Speicher für deaktivierte Proteine dienen. Die SUMO-Bindung würde nach Translokation beendet werden und wäre somit nicht an den Zielproteinen nachweisbar (Hay, 2005).

Die Veränderung der DNA-Bindung von STAT5a, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, könnte im Hinblick auf die unterschiedlichen Domänen der STATs (unter 2.4 beschrieben) auch durch die Lokalisation der Mutationsstellen erklärbar sein. Während die Mutation K86R aminoterminal in der ND-Domäne lokalisiert ist, befinden sich die Mutationen K384 und K516 in der DNA-Bindungsdomäne. Eine Konformationsänderung dieser Domäne und mögliche Veränderung der DNA-Affinität wäre somit naheliegend.

SUMO-1 hemmt die Transaktivierung von STAT5a

Die Untersuchung der Transaktivierungsaktivität von STAT5a (Abb. 10) durch Reportergenassays stärkte die Annahme, dass SUMO an der Inhibition von STAT5a beteiligt ist. Nach Transfektion der STAT5a-Wildtyp-cDNA war im Vergleich zur transfizierten Dreifachmutante K123R eine geringere Expression der Luciferase messbar, etwa vergleichbar mit der Situation bei Transfektion des leeren Vektors. SUMOlierung scheint somit nicht nur die direkte DNA-Bindung von STAT5a zu hemmen, sondern in der Folge auch die transaktivierenden Eigenschaften zu reprimieren.

Hemmung der SUMOlierung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse weisen auf Mechanismen hin, die über die SUMOlierung von STAT5a die DNA-Bindung und die Genexpression negativ beeinflussen. Daraus erwächst natürlich auch die Frage nach Mechanismen, die entgegengesetzt wirken, also die SUMOlierung hemmen und somit in die Regulation der STAT-Aktivität eingreifen. Bei der Untersuchung eines Komplexes von Prolactin/CyclophilinB hat sich herausgestellt, dass dieser Komplex die Bindung zwischen STAT5 und PIAS-3 durch eine direkte Interaktion mit STAT5 beendet und dadurch zu einer Aktivierung und Verstärkung der Genexpression führt (Rycyzin et

al., 2002). Man kann derzeit davon ausgehen, dass es mehrere Substrate gibt, die ähnlich wirken. Demzufolge scheint die PIAS/SUMO-Achse ein konstitutiv negativer Mechanismus zur Hemmung der Genexpression zu sein. Partielle De-SUMOlierung und gesenkte PIAS-Aktivität würden dementsprechend eine gesteigerte Genexpression bewirken. Die Untersuchung des Transkriptionsfaktors Sp3 zeigt bei Mutation des SUMO-Akzeptor-Lysins die Konvertierung von Sp3 zu einem starken Aktivator der Genexpression mit diffuser nukleärer Lokalisation (Ross et al., 2002). Ähnliches trifft auch auf N-CoR, einen nukleären Corepressor der durch SUMO-1 modifiziert wird, zu. Die Mutation von drei identifizierten Lysylresten führt zu einer kompletten Blockierung der SUMOlierung (Tiefenbach et al., 2006). Die Funktionsuntersuchung zeigte im Verlauf eine verminderte Repression der Genexpression bei der Mutante, welche nicht SUMOliert werden konnte. Mit anderen Worten bewirkt die SUMOlierung von N-CoR eine Aktivierung der Repression. Obwohl N-CoR im Gegensatz zu STATs durch SUMOlierung aktiviert wird, entfaltet dieses Protein seine Wirkung durch Repression der Genexpression.

Trotz der unterschiedlichen Erklärungen für ähnliche Ergebnisse in der Literatur weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die SUMOlierung von STAT5a die DNA-Bindung und Transaktivierung inhibitorisch beeinflusst. Von den drei identifizierten SUMOlierungs-Loci scheint K516 funktionell im Vordergrund zu stehen. Die Mutation dieses Aminosäurerestes führt zu eindeutigen funktionellen Veränderungen, welche mit fehlender SUMOlierung in Zusammenhang gebracht werden können.

Zur Pathophysiologischen Bedeutung der SUMO-Modifikation im Jak/STAT-Signalweg

Die bisher nachgewiesene Modifikation durch SUMO betrifft auch Proteine, deren Dysregulation nachweislich mit der Entstehung von Krankheiten verbunden ist. Bei der Erforschung der Ursachen neurodegenerativer Krankheiten wie z.B. Chorea Huntington, Morbus Parkinson und -Alzheimer wurden damit in Verbindung gebrachte Proteine als Substrate von SUMO identifiziert (Sarge et al., 2009). Allerdings bleibt weiter offen, ob eine Dysregulation der SUMOlierung ursächlich für die Pathogenese dieser Erkrankungen verantwortlich ist.

Künstlich induzierte zerebrale Ischämien zeigen bei Mäusen eine massiv erhöhte SUMOlierung von Proteinen der betroffenen neuronalen Zellen. Es wird daher spekuliert, ob der SUMOlierung bei Neuronen, die einer transienten Ischämie ausgesetzt waren, eine protektive Bedeutung zukommt, (Yang W et al., 2008).
Eine Rolle von SUMOlierungsereignissen bei der Krebsentstehung kann als relativ sicher angenommen werden. Aufgrund der Mitwirkung an der Regulation von Transkription und DNA-Reparatur häufen sich die Hinweise, dass dysregulierte SUMOlierung an Onkogenese und Metastasierung beteiligt ist (Kim et al., 2009). In der Brustkrebsforschung wird die Interaktion zwischen SUMO und Östrogenrezeptoren in der Hoffnung untersucht, neue Ansätze der Chemo- und Hormontherapie zu finden (Karamouzis et al., 2008).

Die Rolle des Transkriptionsfaktors STAT5 bei der Entwicklung und Funktion der weiblichen Brustdrüse ist schon sehr lang bekannt und gut untersucht (siehe 2.4). Von der oben bereits erwähnten positiven Regulation der Genexpression durch den Prolaktin/Cyclophilin-B-Komplex wird in diesem Zusammenhang eine Beteiligung an der Entstehung von Brustkrebs vermutet (Clevenger, 2009).

Für STAT-3 wurde eine Mitwirkung bei der Induktion von Hautkrebs bei Mäusen (Kataoka et al., 2008) festgestellt. Gegenwärtig werden spezifische Inhibitoren entwickelt, die bei der Tumortherapie einen Fortschritt erwarten lassen (Aggarwal et al., 2009).

Der Jak-STAT-Signalweg wird auch mit myeloproliferativen Krankheiten und hämatologischen Malignomen in Verbindung gebracht. Die Mehrzahl der an Polyzythämia vera leidenden Patienten weist eine Mutation von Jak2 (V617F) auf. Die gleiche Mutation ist bei Patienten mit essentieller Thrombozytämie und primärer Myelofibrose nachweisbar und führt zu Liganden-unabhängiger Aktivierung der STATs durch konstitutive Phosphorylierung (Constantinescu et al., 2007, Nagata et al., 2009).

Leukämische Tumorzellen exprimieren konstitutiv STAT5. Durch die anti-apoptotische Wirkung des STAT5 besitzen diese Zellen einen Überlebensvorteil (Moucadel et al., 2005, Ferrajoli A). Die Inibition der konstitutiven Aktivierung von STAT5 wird als wichtiger Meilenstein in der Tumorbehandlung betrachtet. *In-vitro*-Untersuchungen von thyreoidalen Tumorzellen haben gezeigt, dass eine Hemmung

des STAT5-Signals durch exogene Expression von SOCS (siehe 2.4) die Überexpression und dadurch resultierende anti-apoptotische Wirkung reduziert (Francipane et al., 2009). Dadurch erhofft man sich *in-vivo* eine gesteigerte Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika. Die anti-apoptotische Wirkung von STAT5a in Tumorzellen lies sich auch am Malignen Melanom nachweisen. Die Resistenz gegenüber Interferon (IFN) bei der Chemotherapie des malignen Melanoms ließ sich durch IFNα-bedingte Überexpression von STAT5 erklären. STAT5 wird hier eine anti-apoptotische Rolle zugeschrieben (Wellbrock et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu dem noch sehr unvollständigen Bild von der Regulation der STATs durch SUMOlierung bei. Wachsende Erkenntnisse in diesem Bereich zeigen, dass mehr fundamentale zelluläre Mechanismen durch SUMO beeinflusst werden, als nach der Entdeckung des Systems 1996 vermutet wurde. Viele Mechanismen der Regulation sind noch ungeklärt und ständig werden weitere Proteine als Substrate der SUMOlierung definiert. Es ist zu erwarten, dass die Forschung zur Modifikation und Regulation von Transkriptionsfaktoren die Basis zum Verständnis und zur Therapie von Tumorerkrankungen deutlich verbessern wird.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die posttranslationale Modifikation durch SUMO am Transkriptionsfaktors STAT5a in der Pro-B-Zelllinie Ba/F3 analysiert. Zunächst wurde die konstitutive Expression von STAT5a in der verwendeten Zelllinie durch Immunoblotting nachgewiesen. Danach konnte gezeigt werden, dass STAT5a ein Substrat der SUMOlierung ist und diese Modifikation nach Stimulierung der Zellen mit IL-3 zunimmt.

Im Ergebnis einer Analyse der STAT5a-Proteinsequenz konnten drei potenzielle SUMOlierungs-Stellen postuliert werden. Durch zielgerichtete *in-vitro*-Mutation wurden insgesamt vier STAT5a-Mutanten hergestellt, deren Akzeptor-Lysin durch die ebenfalls basische Aminosäure Arginin ersetzt wurde. Konkret wurden die Lysylreste K86, K384 und K516 mutiert, sowie eine STAT5-cDNA hergestellt in der gleichzeitig alle drei Lysylreste verändert wurden (siehe Tabelle).

Lysylrest	K 86	K 384	K 516	K 86, 384, 516
Mutiertes STAT5-Konstrukt	K1R	K2R	K3R	K123R

Die in einen Expressionsvektor klonierten Mutanten sowie der Wildtyp wurden durch Elektroporation in Ba/F3-Zellen transfiziert. Der SUMO-Nachweis mittels Western-Blot zeigte eine Abschwächung der SUMOlierung einzelner Mutanten, insbesondere von K3R. Bei der Mutante K123R ließ sich keine SUMOlierung mehr nachweisen. Die Daten zeigen erstens, dass STAT5a an mehreren Loci SUMOliert werden kann und dass zweitens der Lysylrest 516 dabei die entscheidende Rolle spielt.

In anschließenden funktionellen Analysen der STAT5a-Varianten konnten Zusammenhänge zwischen der SUMOlierung und der DNA-Bindungsfähigkeit bzw. dem Transaktivierungspotenzial aufgezeigt werden. Die Tatsache, dass die Mutanten K3R und K123R, also Proteinvarianten die geringer oder gar nicht SUMOliert

werden, eine deutlich höhere DNA-Bindungsaktivität aufweisen, spricht für die Vorstellung, dass SUMO die Interaktion von STAT5a mit DNA-Elementen hemmt.

Diese Daten werden durch die Untersuchung der transaktivierenden Eigenschaften von STAT5a in Reportergenassays bestätigt. Für K123R wurde eine deutlich höhere Reportergen-Aktivierung gemessen. Somit hat die Modifikation durch SUMO offensichtlich auch eine negative Wirkung auf die transaktivierenden Eigenschaften von STAT5a.

Die Untersuchung des Enzymsystems um SUMO zeigte, dass beteiligte Enzyme überwiegend konstitutiv exprimiert werden. Bei Stimulation mit IL-3 stieg allein die Isopeptidase SENP-1 nach 4-stündiger Zytokinstimulation auf höhere Werte an.

Es ist bekannt, dass SUMO die DNA-Bindung der Mehrzahl der bisher untersuchten Transkriptionsfaktoren negativ beeinflusst. In dieser Arbeit konnten für STAT5a drei SUMOlierungs-Stellen nachgewiesen werden deren Mutation eine fördernde Wirkung auf DNA-Bindung und Transaktivierung zeigten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die posttranslationale Modifikation von STAT5a durch SUMO die DNA-Bindung und Transaktivierung inhibiert.

8. Literaturverzeichnis

Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C Dey S, Sung B
Signal transducer and activator of transcription-3, Inflammation and cancer
Annals of the New York Academy of Science (2009) 1171;59-76

Bawa-Khalfe T, Cheng J, Wang Z, Yeh ETH
Induction of the SUMO-specific protease 1 transcription by the androgen receptor in prostate cancer cells
The Journal of Biological Chemistry (2007) Vol. 282, Number 52; 37341-37349

Bernier-Villamor V, Sampsom DA, Matunis MJ, Lima CD
Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between Ubiquitin.conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1
Cell (2002) Vol. 108; 345-356

Bittorf T, Seiler J, Lüdtke B, Büchse T, Jaster R, Brock J
Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis
Cellular Signaling (2000) 12;23-30

Boddy N, Howe K, Etkin LD, Solomon E, Freemont PS
PIC 1, a novel ubiquitin-like Protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelotic leukaemia
Oncogene (1996) 13:971-982

Bromberg J, Darnell JE Jr.
The role of STATs in transciptional control and their impact on cellular function
Oncogene (2000) 19;2468-2473

Büchse T, Prietzsch H, Sasse T, Körbel S, Stigge G, Bogdanow S, Brock J, Bittorf T
Profiling of early gene expression induced by Erythropoietin receptor structural variants
Journal of Biological Chemistry (2006) 281;7697-7707

Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S
Stalla GK, Holsboer F, Arzt E
RSUME, a samll RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1α during hypoxia

Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr., Kuriyan J
Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA
Cell (1998) Vol. 93;827-839

Cheung JY, Miller BA
Molecular mechanisms of Erythropoietin signaling
Nephron (2001) 87;215-222

Clevenger CV
Role of Prolaction/Prolactin receptor signaling i human breast cancer
Breast disease (2009) 18;75-86

Constantinescu SN, Girardot M, Pecquet C
Mining for Jak-STAT mutations in cancer
Trends in Biochemical Science (2007) Vol. 33, Number 3;122-130

Darnell JE Jr., Kerr IM, Stark GR
Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins
Science (1994) Vol. 264;1415-1421

Desterro JMP, Rodriguez MS, Hay RT
SUMO-1 Modification of IκBα inhibits NF-κB activation
Molecular Cell (1998) Vol. 2;233-239

Ferrajoli A, Faderl S, Ravandi F, Estrov Z
The Jak-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies
Current Cancer Drug Targets (2006) 6(8);671-679

Francipane MG, Eterno V, Spina V, Bini M, Scerrino G, Buscemi G, Gulotta G
Todaro M, Dieli F, De Maria R, Stassi G
Supressor of cytokine signaling 3 sensitizes anaplastiv thyroid cancer to standard chemotherapy
Cancer Research (2009) 69(15);6141-6148

Fu XY, Schindler C, Improta T, Aebersold R, Darnell JE Jr.
The proteins of ISGF-3, the interferon α-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction
Biochemistry (1992) Vol. 89;7840-7843

Geoffroy MC, Hay RT
An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis
Nature (2009) 10;564-568

Gill G
SUMO changes Sox for developmental diversity
Molecular Cell (2005) Vol. 20; 495-496

Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Kroiewski J, Schreiber RD
STAT recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process
Immunity (1995) Vol. 2;677-687

Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schär P
Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover
The EMBO Journal (2002) Vol. 21, Number 6; 1456-1464

Hay RT
SUMO: a history of modification
Molecular Cell (2005) Vol. 18;1-12

Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I
Specification of SUMO-1 and SUMO-2-interacting Motifs
Journal of Biological Chemistry (2006) Vol. 23, Number 23;16117-16127

Hochstrasser M
Ubiquitin-dependent protein degradation
Annu. Rev. Genet. (1996) 30:405-439

Hwang EJ, Lee JM, Jeong J, Park JH, Yang Y, Lim JS, Kim JH, Baek SH, Kim KI
SUMOylation of RORalpha potentiates transcriptional activation function
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2009) 378(3);513-517

Ihle JN, Pepersack L, Rebar L
Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine
Journal of Immunology (1981) 126(6);2184-2189

Johnson ES
Protein modification by SUMO
Annu. Rev. Biochem. (2004) 73:355-382

Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, Papavassiliou AG
SUMO and estrogen receptors in breast cancer
Breast Cancer Res. Treat. (2008) 107(2);195-210

Kataoka K, Kim DJ, Carbajal S, Clifford JL, DiGiovanni J
Stage-specific disruption of STAT-3 demonstrates a direct requirement during both the initiation and promotion stages of mouse skin tumorigenesis
Carcinogenesis (2008) Vol. 29, Number 6;1108-1114

Kim KI, Baek SH
Small ubiquitin-like modifiers in cellular malignancy and metastasis
Cellular Molecular Biology (2009) 273;265-311

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW
Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges
Gene (2002) 285;1-24

Knipscheer P, Flotho A, Klug H, Olsen JV, van Dijk WJ, Fish A, Johnson ES, Mann M, Sixma TK, Pichler A
Ubc9 SUMOylation regulates SUMO target discrimination
Molecular Cell (2008) 31;371-382

Levy DE, Darnell JE Jr.
STATs: transcriptional control and biological impact
Nature (2002) Vol. 3;651-662

Li SJ, Hochstrasser M
A new protease required for cell-cycle progression in yeast
Nature (1999) Vol. 398;246-251

Lim CP, Cao X
Structure, function and regulation of STAT proteins
Molecular BioSystems (2006) 2;536-550

Liu B, Shuai K
Regulation of the SUMOylation system in gene expression
Curr Opin Cell Biol. (2008) 20;288-293

Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Henninghausen L
Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis
Genes Dev. (1997) 15;11(2):179-186

Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G
A novel Ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and nuclear pore complex
The Journal of Cell Biology (1996) Vol. 135, Number 6, Part 1;1457-1470

Melchior F, Schergaut M, Pichler A
SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores
Trends in Biochemical Sciences (2003) Vol. 28, Number 11;612-618

Melcalf D
Hematopoietic cytokines
Blood (2008) Vol. 111, Number 2;485-491

Meulmeester E, Melchior F
SUMO
Nature (2008) Vol. 452;709-711

Moucadel V, Constantinescu SN
Differental STAT5 signaling by ligand-dependent and constitutively active cytokine receptors
Journal of Biological Chemistry (2005) 280(14);13364-13373

Müller S, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, Dejean A
c-Jun and p53 actitivy is modulated by SUMO-1 modification
The Journal of Biological Chemistry (2000) Vol. 275, Number 18;13321-13329

Müller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S
SUMO, Ubiquitins mysterious cousin
Nature (2001) Vol. 2;202-210

Müller S, Ledl A, Schmidt D
SUMO: a regulator of gene epression and genome integrity
Oncogene (2004) 23;1998-2008

Nagata K, Shimoda K
Myeloproliferative diseases caused by Jak2 mutation
Rinsho Byori (2009) 57(4);357-364

Noguchi CT, Wang L, Rogers HM, Teng R, Jia Y
Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage
Expert Rev Mol Med. (2008) 1;10:e36

Palvimo JJ
PIAS proteins as regulators of small ubitquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription
Biochemical Society Transactions (2007) Vol. 35, part 6;1405-1408

Pellegrini S, Dusanter-Fourt I
The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs)
Eur. Journal of Biochem. (1997) 284;615-633

Pichler A, Melchior F
Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmatic transport
Traffic (2002) 3;381-387

Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S
IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled
Oncogene (2000) 19(21);2532-2547

Remy I, Wilson IA, Michnick SW
Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced comformation change
Science (1999) Vol. 283;990-993

Rogers RS, Horveth CM, Matunis MJ
SUMO modification of STAT-1 and ist role in PIAS-mediated inhibition of gene activation
Journal of Biological Chemistry (2003) Vol. 278, Number 32;30091-30097

Ross S, Best JL, Zon LI, Gill G
SUMO-1 modification represses Sp3 trancriptional activation and modulates ist subnuclear localization
Molecular Cell (2002) Vol. 10;831-842

Rycyzyn MA, Clevenger CV
The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer
PNAS (2002) Vol. 99, Number 10;6790-6795

Rytiniki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jääskeläinen T, Palvimo JJ
PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO
Cell. Mol. Life Science (2009) E-Publikation, nicht gedruckt

Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R
PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3-ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies
Genes Dev. (2001) 15(23);3088-3103

Sarge KD,Park-Sarge O
SUMOylation and human disease pathogenesis
Trends in Biochemical Sciences (2009) Vol. 34, Number 4;200-205

Sehgal PB
Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling
Semin Cell Dev Biol. (2008) 19(4);329-340

Schindler C, Darnell JE Jr.
Transcriptional responses to polypeptide ligands: The Jak-STAT
Annu. Rev. Biochem. (1995) 64;621-651

Schindler CW
Jak-STAT signaling in human disease
Journal of Clinical Investigation (2002) 109;1133-1137

Schmidt D, Müller S
Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity
PNAS (2002) Vol. 99, Number 5; 2872-2877

Schuster SJ, Badiavas EV, Costa-Giomi P, Weinmann R, Erslev AJ, Caro J
Stimulation of Erythropoietin gene transcription during hypoxia and Cobalt exposure
Blood (1989) Vol. 73, Number 1;13-16

Song L, Bhattacharya S, Yunus AA, Lima CD, Schindler C
STAT1 and SUMO modification
Blood (2006) Vol. 108, Number 10;3237-3243

Tiefenbach J, Novac N, Ducasse M, Eck M, Melchior F, Heinzel T
SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates ist capacity to repress transcription
Molecular Biology of the Cell (2006) Vol. 17;1643-1651

Ungureanu D, Vanhatupa S, Kotaja N, Aittomaki S, Jänne OA, Palvimo JJ
Silvenoinen O
PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation in STAT-1
Blood (2003) 102(9);3311-3313

Ungureanu D, Vanhatupa S, Grönholm J, Palvimo JJ, Silvennoinen O
SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses
Blood (2005) Vol. 106, Number 1;224-226

Van Etten RA
Aberrant cytokine signaling in leukemia
Oncogene (2007) 26;6738-6749

Wellbrock C, Weisser C, Hassel JC, Fischer P, Becker J, Vetter CS, Behrmann I
Kortylewski M, Heinrich PC, Schartl M
STAT5 contributes to Interferon resistance of melanoma cells
Current Biology (2005) Vol. 15;1629-1639

Yang J, Stark GR
Roles of unphosphorylated STATs in signaling
Cell Research (2008) 18;443-451

Yang SH, Jaffray E, Senthinathan B, Hay RT, Sharrocks AD
SUMO and transcriptional repression
Cell Cycle (2003) Vol. 2, Number 6;528-530

Yang W, Sheng H, Warner DS, Paschen W
Transient global cerebral ischemia induces a massive increase in protein SUMOylation
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2008) 28;269-279

Yeh ET
SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with life´s processes
Journal of biological Chemistry (2009) 284(13)8223-8227

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
Epo	Erythropoetin
EpoR	Eryhropoetin-Rezeptor
F	Phenylalanin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
K	Lysin
MG	Molekulargewicht
mSTAT	murine signal transducer and activator of transcription
PIAS	proteine inhibitor of activated STAT
R	Arginin
RT	Raumtemperatur
RTQ-PCR	Real-time quantitative polymerase Kettenreaktion
SAE	SUMO activating Enzyme
SCE	SUMO conjugating Enzyme
SENP	sentrin protease
SH-2-Domäne	src homology domain
SOCS	suppressor of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TAD	Transaktivierende Domäne
TF	Transkriptionsfaktor
UBC	Ubiquitin conjugating Enzyme
ULP	Ubiquitin-like Protease
V	Valin
WB	Western Blot
ZFP	Zink-finger-protein

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 1.2.2010 Marcus Weimer

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Marcus Carl Georg Weimer
Geboren am 6. Oktober 1980, Landau in der Pfalz
Staatsangehörigkeit: Deutsch / Schwedisch

Schulausbildung

1987-1989	Finkenburgschule, Wittmund, Deutschland
1989-1993	Norra skolan, Sveg, Schweden
1993-1996	Södra skolan, Sveg, Schweden
1996-1999	Härjulfskolans Gymnasium, Sveg, Schweden
1999	Abitur, Note: 1,4

Universitätsausbildung

1999-2000	Studium der Geschichte, Uppsala Universitet, Schweden
2000-2001	Studium der französischen Sprache, Université de la Sorbonne, Frankreich
2001-2002	Studium der Naturwissenschaften, Uppsala Universitet, Schweden
2002-2004	Studium der Humanmedizin, Präklinischer Teil, Universität Rostock
2004	Physikum, Note: 1,33
2004-2007	Studium der Humanmedizin, Klinischer Teil, Universität Rostock
2007-2008	Praktisches Jahr
2008	Staatsexamen, Note: 2

Thesen

1. Zelluläre Protein werden nach ihrer Umschreibung/Translation intrazellulär verändert. Eine dieser Vielzahl von Modifikationen ist die Anheftung sog. SUMO-Proteine (*s*mall *u*biquitin-like *mo*difier). Durch SUMOlierung werden vor allem Aktivität und Lokalisation eines Proteins verändert.

2. In dieser wird die SUMOlierung von STAT5a in Ba/F3-Zellen untersucht. Die hauptsächlichen Fragestellungen sind in wie fern die Modifizierung durch SUMO die Expression und Transaktivierungseigenschaft von STAT5a verändert. Des Weiteren werden die an der SUMOlierung beteiligten Enzyme untersucht.

3. STAT (*s*ignal *t*ransducer and *a*ctivator of *t*ranscription) sind latent zytosolische Transkriptionsfaktoren. STATs spielen im Rahmen der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle, indem sie durch Translokalisation in den Nucleus, eine direkte Verbindung zwischen Rezeptor und Zellkern herstellen. STAT5a ist ein Isoprotein der STAT-Familie und wird durch SUMO modifiziert.

4. Ba/F3-Zellen sind murine B-Zellen. Sie sind in ihrem Wachstum abhängig von Interleukin-3. STAT5a wird in Ba/F3-Zellen exprimiert.

5. STAT5a wird in Ba/F3-Zellen exprimiert. Durch Stimulation mit IL-3 kann eine leichte Steigerung der Expression von STAT5a erreicht werden. Die Expression ist jedoch als konstitutiv zu betrachten. Die SUMOlierung zeigt sich jedoch stärker Abhängig von der Stimulation mit IL-3 und nimmt dadurch zu.

6. SUMO wird durch enzymatische Schritte an Lysinreste des Akzeptorproteins gebunden. Für STAT5a werden mehrere Lysinreste mit der passenden Konfiguration nachgewiesen. Drei Lysylreste (K86, K384, K516) werden dabei identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Modifikation durch SUMOlierung unterliegen. *In-vitro*-Mutation von Lysin in Arginin ermöglicht Versuche den Ausfall der SUMOlierung zu untersuchen.

7. Mutierte STAT5a-Varianten zeigen eine geringere SUMOlierung. Vor allem die Mutation von Lysin-516 in Arginin verhindert die SUMOlierung von STAT5a. Die SUMOlierbaren Lysinreste haben eine unterschiedliche Bedeutung.

8. Die SUMOlierung von STAT5a verhindert die Bindung an spezifische DNA-Abschnitte. Untersuchungen zeigen eine erhöhte Bindung des STAT5a wenn oben genannte Lysinreste durch Mutation eine Modifizierung von SUMO unmöglich machen. Somit wird nachgewiesen, dass SUMO die Regulation der Genexpression von STAT5a negativ beeinflusst.

9. Die transaktivierenden Eigenschaften von STAT5a werden ebenfalls durch SUMO gehemmt. Untersuchungen ergeben eine erhöhte Aktivität von mutiertem STAT5a verglichen mit dem Wildtyp.

10. Von den drei mutiereten Lysinresten (K86, K384, K516) des STAT5a kann dem Akzeptorlysin K516 die bedeutendste Rolle zugeschrieben werden. Seine Mutation führt zur stärksten Aktivitätsveränderung.

11. Trotz der unterschiedlichen Erklärungen für ähnliche Ergebnisse in der Literatur weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die SUMOlierung von STAT5a die DNA-Bindung und Transaktivierung inhibitorisch beeinflusst.

12. Weitere Forschung auf dem Gebiet der Signaltransduktion sollte das Verständnis der komplex erscheinenden Folgen der SUMOlierung erweitern. Medizinisch könnten dadurch Pathomechanismen der Karzinogenese verstanden werden und therapeutische Ansätze aufgedeckt werden.

Danksagung

Ein unschätzbarer Dank gebührt PD Dr. rer. nat. Thomas Bittorf und Dr. rer. nat. Tilo Sasse. Ihre Hilfe und Anregungen im Laufe der Erstellung der Arbeit waren entscheidend für die Fertigstellung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei dem Leiter Prof. Dr. med. Markus Tiedge und allen Mitarbeitern des Instituts für medizinische Biochemie und Molekularbiologie für die kollegiale Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft. Allen voran weiß ich die Hilfe von Dr. rer. nat. Tom Büchse zu schätzen, welcher für alle Fragen ein offenes Ohr hatte.

Ein Dank gebührt auch meinen Studienkollegen, die mir über die Studienjahre eine starke Stütze waren und immer noch sind. Zu erwähnen sind vor allem Peder Bjorland, Axel Widigs, Benedikt Hasemann und Michael Klyszcz.

Die Hilfe meiner Eltern und Schwester Maria kann nicht überschätzt werden. Sie haben mich in allen Lebensabschnitten unterstützt und mir den Rücken freigehalten.

Abschließend richtet sich mein Dank an meine Freundin Ellen, ihren Sohn William und unsere gemeinsame Tochter Selma. Durch ihre Liebe gewinnt man das nötige Selbstvertrauen im Weg durch das Leben.