

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt



***Funktionelle Charakterisierung neuer Mutationen
des Transkriptionsfaktors STAT5A
in der akuten myeloischen Leukämie***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sven Enrico Cuntz

aus

Waiblingen

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter: PD Dr. Hanna-Mari Baldauf

Prof. Dr. Michael Fiegl

Prof. Dr. Christoph Salat

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Harald Polzer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2023

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	9
2.1 Die akute myeloische Leukämie	9
2.2 Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)	12
2.2.1 Grundlagen	12
2.2.2 Aufbau des STAT5-Proteins	12
2.2.3 Der JAK-STAT-Signalweg.....	14
2.3 Physiologische Funktionen von STAT5	15
2.4 STAT5 in hämatologischen Neoplasien	16
2.4.1 <i>Downstream</i> hyperaktiver Tyrosinkinasen	16
2.4.2 Die Treibermutation STAT5B ^{N642H}	17
3. Fragestellung	19
3.1 Sind STAT5A ^{E637G} und STAT5A ^{T719M} onkogene Varianten?.....	19
4. Methoden	20
4.1 Molekularbiologie	20
4.1.1 Aufbereitung von DNA	20
4.1.2 Restriktion von DNA.....	20
4.1.3 Dephosphorylierung von DNA.....	20
4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	21
4.1.5 In-Fusion® Cloning	21
4.1.6 Ligation von DNA	22
4.1.7 Chemische Transformation	22
4.1.8 Elektroporation	22
4.1.9 Agarose-Gelelektrophorese	23
4.1.10Ortsspezifische Mutagenese.....	23
4.1.11Sequenzierung von DNA.....	23
4.1.12STAT5A-Plasmid.....	23
4.2 Zellbiologie	24
4.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	24
4.2.2 Kultivierung adhärenter Zellen und Zellsuspensionskultur.....	24
4.2.3 Transiente Transfektion adhärenter Zellen	24
4.2.4 Retrovirale Infektion von Suspensionszellen	25
4.2.5 Zellsortierung von Suspensionszellen.....	25
4.2.6 Zellproliferation von Suspensionszellen.....	26
4.2.7 Zellstimulation adhärenter Zellen und Suspensionszellen	26
4.3 Proteinbiochemie	26

4.3.1	Aufbereitung von Proteinen.....	26
4.3.2	Quantifizierung von Proteinen.....	27
4.3.3	SDS-PAGE.....	27
4.3.4	Western-Blot	27
4.3.5	Proteindetektion	28
4.4	Immunzytochemie	28
4.4.1	Fixierung	28
4.4.2	Permeabilisierung und Färbung	28
4.4.3	Fluoreszenz- und Konfokal-Mikroskopie	29
5.	Ergebnisse.....	30
5.1	Klonierung der Konstrukte pcDNA6- und pMIG-STAT5A	30
5.2	Expression der DNA-Konstrukte in Ba/F3-Zellen.....	31
5.2.1	STAT5A-Expression in einfach-transduzierten Ba/F3.....	31
5.2.2	STAT5A- und FLT3-Expression in doppelt-transduzierten Ba/F3.....	32
5.2.3	STAT5A- und EGFR-Expression in doppelt-transduzierten Ba/F3 ...	34
5.3	Keine Transformation durch E637G oder T719M	36
5.3.1	STAT5A ^{E637G} und STAT5A ^{T719M} sind in Ba/F3 nicht pro-proliferativ .	36
5.3.2	FLT3-Stimulation erhöht die Ba/F3-Zellproliferation geringfügig.....	38
5.3.3	EGFR-Stimulation erhöht die Ba/F3-Zellproliferation erheblich	40
5.4	Keine konstitutive Aktivierung durch E637G und T719M.....	42
5.4.1	STAT5A ^{E637G} und STAT5A ^{T719M} sind nicht autophosphoryliert	42
5.4.2	FLT3-Expression erhöht STAT5A-Phosphorylierung geringfügig.....	44
5.4.3	EGFR-Stimulation erhöht die STAT5A-Phosphorylierung erheblich.	47
5.4.4	N642H und EGFR aktivieren STAT5A potenziell synergistisch	50
5.5	Keine Akkumulation von E637G und T719M im Nukleus	52
6.	Diskussion.....	54
6.1	Ergebnisübersicht	54
6.2	Proliferationsverhalten der STAT5A-Mutanten	55
6.3	Keine Autophosphorylierung durch STAT5A-Mutanten	57
6.4	STAT5A-Mutanten akkumulieren nicht im Nukleus.....	60
6.5	Fazit und Ausblick.....	62
7.	Material.....	64
7.1	Geräte, Programme und Verbrauchsmaterial	64
7.2	Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen.....	66
7.3	Plasmide, Enzyme, Bakterien und Kits	69
7.4	Primer für Sequenzierung, In-Fusion® Cloning und Mutagenese.....	70
7.5	Zelllinien, Zellkulturmedien und Zellkulturmaterial	71
7.6	Antikörper für Proteinbiochemie und Immunzytochemie.....	73

Literaturverzeichnis	74
Abkürzungen	87
Danksagung.....	90
Affidavit	91
Publikationsliste	92

1. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie ist eine Neoplasie des blutbildenden Systems. Sie geht von unreifen Blasten aus, die die physiologische Hämatopoese verdrängen und infolgedessen innerhalb weniger Wochen zum Tode führen kann. Besondere therapeutische Herausforderungen stellen dabei die Resistenzentwicklung und Rezidiventstehung dar, weshalb die Erkrankung auch heutzutage mit einer schlechten Prognose einhergeht. Greif et al. haben mittels Exom-Sequenzierung einer CN-AML-Kohorte zwei neue Mutationen des Transkriptionsfaktors STAT5A detektiert. Sie betreffen die SH2- (E637G) sowie die Transaktivierungsdomäne (T719M) und waren ausschließlich zu den Zeitpunkten der Diagnose und des Rezidivs detektierbar. Aufgrund der Schlüsselrollen von *STAT5* als Effektor innerhalb hyperaktiver Signalkaskaden oder als eigenständiges Proto-Onkogen, sollten die Mutationen E637G und T719M hinsichtlich eines onkogenen Phänotyps in dieser Arbeit untersucht werden.

In den hierbei angewandten Zellmodellen und Methoden blieb eine maligne Transformation durch sowohl STAT5A^{E637G} als auch STAT5A^{T719M} aus. Nach erfolgreicher Klonierung in die Plasmide pMIG und pcDNA6, wurden stabil transduzierte Ba/F3-Zellen generiert. Die Mutationen waren nicht imstande die IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen Zytokin-unabhängig zu transformieren. In denselben Zellen konnte die charakteristische Y694-Phosphorylierung konstitutiv-aktiver STAT5-Mutanten nicht nachgewiesen werden. Dies war auch in einer HEK 293T-Zelllinie reproduzierbar. In immunzytochemischen Untersuchungen glichen sich Wildtyp und Mutanten bezüglich der zellulären Verteilung des phosphorylierten Proteins. Ebenfalls blieb eine Interaktion der Mutanten mit den Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 und EGFR aus. Im Gegensatz dazu entfaltete die bekannte, konstitutiv-aktive Mutante STAT5A^{N642H} und EGFR eine potenziell synergistische Wirkung auf den Y694-Phosphorylierungsstatus von STAT5A. Die Charakterisierung neuer, potenziell onkogener Varianten ist insbesondere in Anbetracht der intensiven Forschung an der klonalen Struktur von AML-Erkrankten bedeutsam. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, den biologischen Phänotyp von STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} im Rahmen der Leukämogenese einzuschätzen.

2. Einleitung

2.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine hämatologische Neoplasie, die unbehandelt innerhalb eines Jahres zum Tode führt ¹. Das altersadjustierte, relative 5-Jahres-Gesamtüberleben beträgt in Deutschland 22,8 % ². Mit einer Jahres-Inzidenz von 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner ³ ist die AML die häufigste akute Leukämie und macht 23 % aller leukämischen Neuerkrankungen in Deutschland aus ⁴ mit einem Altersmedian bei 72 Jahren ⁵. Der Erkrankung liegt die pathologische Proliferation unreifer, myeloischer Blasten zugrunde, die im Knochenmark die gesunden, blutbildenden Zellen verdrängen und somit zu hämatopoetischer Insuffizienz führen. Die resultierende Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie gehen mit den typischen Symptomen Müdigkeit und Blässe, Infektions- sowie Blutungsneigung einher. Krankheitsdefinierend ist ein Blastenanteil von $\geq 20\%$ im peripheren Blut oder Knochenmark beziehungsweise der Nachweis einer AML-definierenden genetischen Aberration ³.

Bei der AML handelt es sich um eine biologisch heterogene Erkrankung ⁶. Mit Hilfe moderner Methoden konnten genetische Besonderheiten aufgedeckt und molekulare Subgruppen definiert werden ⁷. Die prognostische Relevanz der Molekulargenetik spiegelt sich auch in der Einteilung verschiedener Risikogruppen wider ⁸. Die Therapie der AML basiert auf einer Polychemotherapie, die hauptsächlich aus Cytarabin und Anthrazyklinen besteht ⁹ und richtet sich zudem nach der entsprechenden Subgruppe. Neue therapeutische Meilensteine konnten durch die Kombination des *B-cell lymphoma 2* (BCL-2)-Inhibitors Venetoclax mit dem hypomethylierendem Agens Azacitidin für Patienten, die sich nicht für eine intensive Systemtherapie eignen ¹⁰ sowie durch die Entwicklung zielgerichteter Therapien wie die *Fms related tyrosine kinase 3* (FLT3)-Inhibitoren Midostaurin ¹¹ und Gilteritinib ¹² oder das *antibody-drug conjugate* Gemtuzumab-Ozogamicin ¹³ erreicht werden. Je nach Risikoprofil und Allgemeinzustand muss anschließend eine konsolidierende, allogene Blutstammzelltransplantation erfolgen. Obwohl die meisten Erkrankten auf die initiale Therapie ansprechen, erleiden viele

innerhalb der ersten zwei Jahre ein Rezidiv und versterben daran³. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei der Ursprungsklon oder dessen Subklone, die die Chemotherapie überleben und zum erneuten Ausbruch der Erkrankung führen^{14,15}.

Im Studienkollektiv von Greif et al. aus unserer Arbeitsgruppe wurden zwei neue, somatische Mutationen des *Signal transducer and activator of transcription 5a* (STAT5A) detektiert¹⁶. Die Kohorte bestand aus Patientinnen und Patienten, die an einer *de novo* AML mit normalen Karyotyp (CN-AML) erkrankt sind, therapiert wurden und anschließend ein Rezidiv entwickelten. Der Patient 003 wies die STAT5A-Mutation E637G auf. Die Varianten-Allelfrequenz (VAF) betrug bei Diagnose 40,2 % und im Rezidiv 41,3 % (**Abb. 1 A**). Es konnte die Treibermutation Nucleophosmin 1 (NPM1⁺), aber keine *internal tandem duplication* (ITD) der Rezeptor-Tyrosinkinase *Fms related tyrosine kinase 3* (FLT3^{ITD}) nachgewiesen werden (**Abb. 1 B**). Die Risikogruppe nach European LeukemiaNet (ELN) war günstig und der Blastenanteil betrug bei Diagnose 70 % und im Rezidiv 65 %. Der Patient 039 wies die Mutation T719M auf. Die VAF betrug bei Diagnose 43,7 % und im Rezidiv 39 %. Es konnten die Treibermutationen NPM1⁺ und FLT3^{ITD} nachgewiesen werden. Die ELN-Risikogruppe war intermediär und der Blastenanteil betrug bei Diagnose 22 % und im Rezidiv 80 %. Bei beiden Patienten waren die jeweiligen Mutationen in der Remission nicht detektierbar.

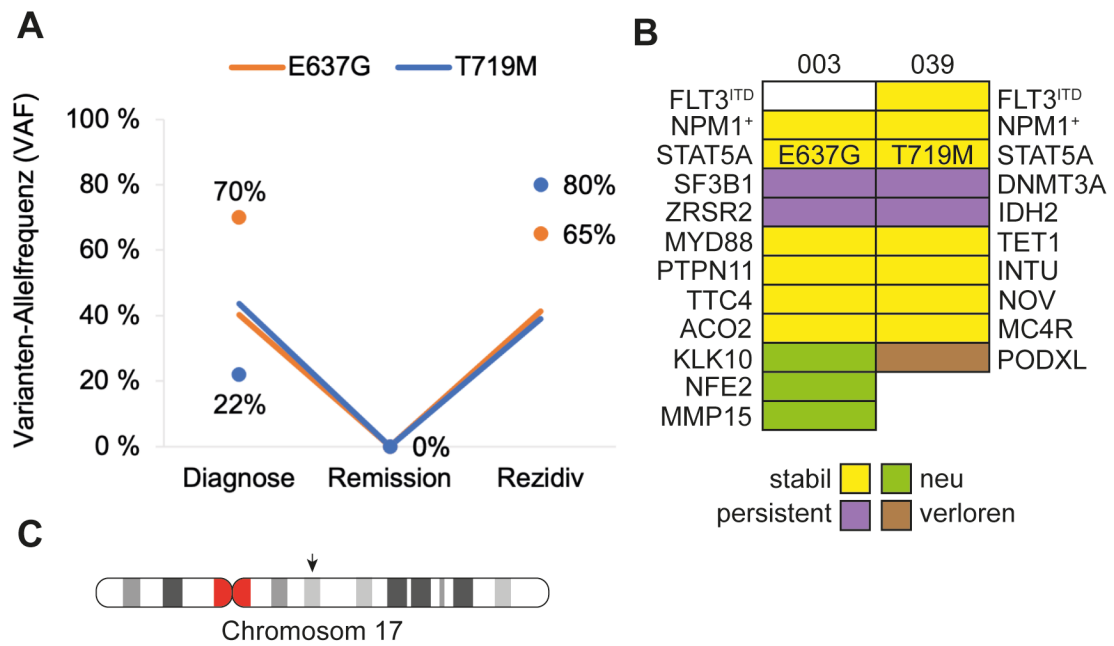


Abb. 1: Detektierte Mutationen im AML-Studienkollektiv von Greif et al.

Die STAT5A-Mutationen E637G und T719M wiesen bei Diagnose und Rezidiv eine hohe VAF auf und waren in der Remission nicht detektierbar (A). Zusätzlich wurden weitere Treibermutationen und Mutationen in Spliceosom- sowie in epigenetischen Regulator-Genen detektiert (B). STAT5A befindet sich auf Chromosom 17 (C). Abbildungen nach Greif, 2018 und Dufva, 2018.

2.2 Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)

2.2.1 Grundlagen

Unter dem Namen *Mammary gland factor* wurde der Transkriptionsfaktor STAT5A erstmals als DNA-Bindeprotein beschrieben, das Prolaktin-abhängig die Transkription von β -Casein induziert¹⁷. Wenige Jahre später gelang die Klonierung der beiden Varianten *STAT5A*¹⁸ und *STAT5B*^{19,20}. Diese befinden sich auf Chromosom 17²¹, existieren ausschließlich in Säugetieren²² und unterscheiden sich hauptsächlich am C-Terminus²⁰ sowie in der DNA-Bindungs-Domäne²³. STAT5 ist wesentlicher Bestandteil Prolaktin-²⁴ und Wachstumsfaktor-²⁵ vermittelter Signalwege²⁶ und kann durch eine Fülle an weiteren Zytokinen wie *Epidermal growth factor* (EGF)²⁷, Erythropoetin (EPO)²⁵, Thrombopoetin²⁸, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Interleukin (IL) -3²⁰ sowie IL-2^{29,30} aktiviert werden. Zu den anti-apoptotischen Zielgenen gehören *B-cell lymphoma 2 (BCL-2)*³¹, *B-cell lymphoma extra-large (BCL-XL)*^{32,33}, *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein (MCL1)*^{34,35}, *Cyclin D1*³⁶ und *Oncostatin M*³⁷. Diese Zielgene supprimieren die Apoptose und können somit die Tumorentstehung fördern.

2.2.2 Aufbau des STAT5-Proteins

STAT5 wird in sechs funktionelle Domänen eingeteilt (**Abb. 2 A**). Der N-Terminus (Aminosäuren (AS) 1 – 144) eines STAT5-Monomers besteht aus vier α -Helices³⁸ und erlaubt die Oligomerisation von mehreren Dimeren³⁹. Dies ermöglicht eine kooperative⁴⁰ und verlängerte DNA-Bindung⁴¹ sowie die selektive Genexpression^{42,43}. Mit Hilfe der *Coiled-Coil*-Domäne (AS 145 – 330) transloziert STAT5 in den Nukleus^{44,45} und stabilisiert gemeinsam mit der DNA-Bindungs-Domäne (AS 331 – 496)^{46,47} STAT5-Dimere im Zytoplasma⁴⁸. Diese erkennen *Gamma interferon activation sites*⁴⁹ mit der palindromischen Sequenz TTCN₃GAA⁵⁰. Die konservierte *Src homology 2* -Domäne (SH2; AS 593 – 686) folgt der Linker-Domäne (AS 497 – 592)⁵¹. Hier befindet sich eine der detektierten STAT5A-Mutationen (E637G). Die SH2-Domäne erkennt phosphorylierte Tyrosine⁵² und ist spezifisch für die umgebende Aminosäuresequenz⁵³. In direkter Nachbarschaft ist das Tyrosin Y694 lokalisiert, dessen Phosphorylierung essenziell für die DNA-Bindung

ist. Die Substitution gegen ein Phenylalanin an dieser Position führt zur *Loss-of-function* (LOF) -Mutation Y694F²⁴. Mittels reziproker SH2-pY694-Interaktion nimmt das Dimer seine aktive Konformation ein⁵⁴, in der es die DNA wie eine Klammer umschließt⁵⁵ (**Abb. 2 B**). In der Transaktivierungs-Domäne (AS 702 – 794)⁵⁶ befindet sich die andere identifizierte STAT5A-Mutation (T719M). Sie interagiert mit Co-Aktivatoren^{57,58} und besitzt Serine, deren Phosphorylierung mit der Leukämogenese assoziiert wird^{59,60}.

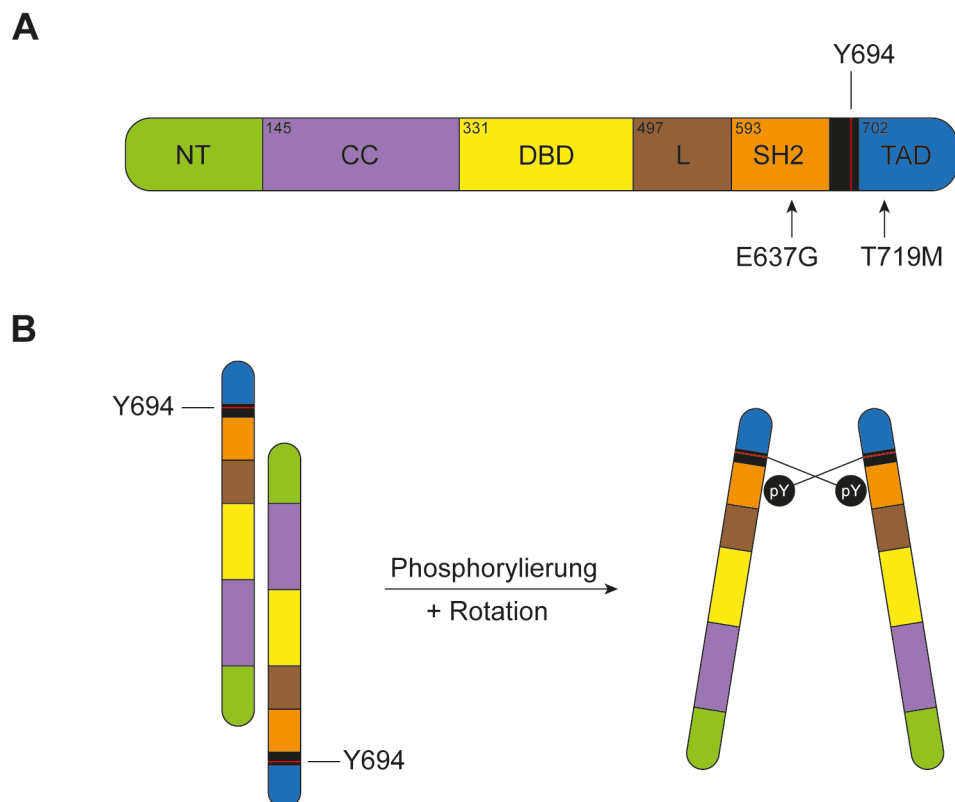


Abb. 2: Domänen und Konformation von STAT5A

Schematische Darstellung des Proteins inklusive Substitutionsmutationen und des funktionell wichtigen Tyrosinrests (**A**). Nach erfolgter Tyrosin-Phosphorylierung nimmt das Dimer über reziproke SH2-pY694-Interaktion seine transkriptionell aktive Form ein (**B**). NT = N-Terminus, CC = *Coiled-Coil*-Domäne, DBD = DNA-Bindungs-Domäne, L = Linker, SH2 = *Src homology 2* -Domäne, TAD = Transaktivierungs-Domäne. Abbildungen nach Maurer, 2019 und Morris, 2018.

2.2.3 Der JAK-STAT-Signalweg

Die Proteine der STAT-Familie vermitteln im Rahmen des JAK-STAT-Signalwegs extrazelluläre Signale über das Zytoplasma in den Nukleus und induzieren dort die Transkription bestimmter Zielgene⁶¹⁻⁶⁴. Der Signalweg beginnt mit der Bindung von Zytokinen an Membranrezeptoren (**Abb. 3**). Diese trans-aktivieren die Rezeptor-assoziierte, intrazelluläre Tyrosinkinase Januskinase (JAK). Die JAK phosphoryliert daraufhin eine juxtapositionierte Rezeptordomäne, die durch die SH2-Domäne der STAT-Proteine erkannt und gebunden wird. Nun wird auch STAT5A durch die JAK an Tyrosin Y694 phosphoryliert und nimmt als Dimer mittels reziproker SH2-pY694-Interaktion seine aktive Form ein. Alternativ können auch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie der *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) STAT5 direkt und indirekt über beispielsweise Src aktivieren. Im Nukleus binden die STAT-Proteine Promotoren und Enhancer und induzieren die Transkription.

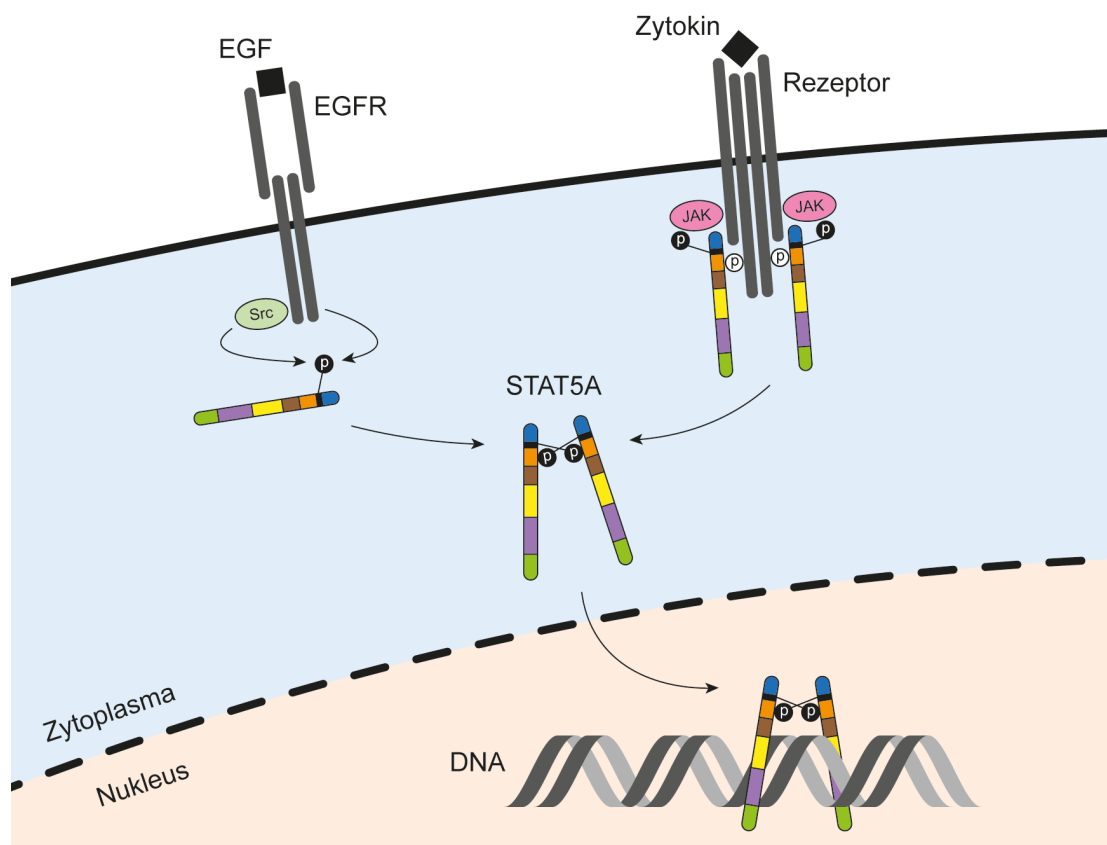


Abb. 3: Der JAK-STAT-Signalweg

Extrazelluläre Signale führen über verschiedene Membranrezeptoren zur Phosphorylierung von STAT5A mit konsekutiver Konformationsänderung und Translokation in den Zellnukleus, wo es die Transkription bestimmter Zielgene induziert. Abbildung nach Mertens, 2007.

2.3 Physiologische Funktionen von STAT5

Frühe Progenitorzellen benötigen den Transkriptionsfaktor, um sich in die erythroiden, lymphatischen und myeloischen Zellreihen zu entwickeln⁶⁵. Zudem trägt STAT5 zum Erhalt der hämatopoetischen Reserve bei, indem es das Wachstum hämatopoetischer Stammzellen (HSC) fördert⁶⁶. Mittels konditionaler STAT5-Deletion konnte gezeigt werden, dass STAT5 für die Dormanz von HSC und das Fortbestehen des Langzeit-HSC-Pools notwendig ist⁶⁷. In diesem Kontext ist *Hypoxia-inducible factor 2 α* (*HIF2 α*) ein wichtiges STAT5-Zielgen für die Erneuerung von HSC⁶⁸. Indem STAT5 die microRNA (miR) -193b hochreguliert, verhindert es die unkontrollierte Expansion von HSC und Progenitorzellen⁶⁹. Dabei ist die Serin-Phosphorylierung von STAT5A essenziell für die Expansion dieser Zellen⁷⁰.

Neben den Rollen des Transkriptionsfaktors in der frühen Hämatopoese basiert die Erythropoese auf einer intakten EPO-JAK2-STAT5-Achse. Vor diesem Hintergrund weisen STAT5-defiziente Mäuse eine schwere mikrozytäre Anämie auf und versterben meist perinatal⁷¹. Dies kann zum einen durch die verringerte Expression von MCL1 und BCL-X_L³³ und zum anderen durch die niedrigen *Iron regulatory protein 2* (IRP-2) und Transferrin-Rezeptor 1 (TfR-1) -Level und dem damit gestörten Eisenstoffwechsel erklärt werden³⁴. Konstitutiv-aktives STAT5 befähigt daher JAK2- und Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) -defiziente Leberzellen zur Erythropoese⁷².

Auch für die B-, T- und Natürliche Killer (NK) -Zell-Entwicklung ist STAT5 unentbehrlich⁷³. Dabei ist das Überleben von Pro-B-Zellen wesentlich von der IL-7R-STAT5-Achse, mit konsekutiver Induktion von *MCL1*, abhängig³⁵. Die Deletion des STAT5-Locus hat demnach den Stillstand der B-Zell-Reifung zur Folge und führt zudem zum Verlust von *Cluster of differentiation* (CD)8⁺- und $\gamma\delta$ -T-Zellen⁷⁴. In peripheren T-Zellen wird STAT5 durch IL-2 induziert und fördert dadurch deren Proliferation^{75,76}. Die Bedeutsamkeit von STAT5 für NK-Zellen konnte mittels STAT5-defizienten Mäusen veranschaulicht werden, in denen die Vorläuferzellen im Knochenmark verharrten, statt in die Peripherie zu migrieren^{76,77}.

Eine Besonderheit des Transkriptionsfaktors STAT5 stellt die Fähigkeit zur Tetramerisierung dar. Diese STAT5-Tetramere sind notwendig für die Differenzierung bis in das frühe Pro-B-Zell-Stadium ⁷⁴. Zudem können Tetramere über *Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit* (EZH2) in die epigenetische Regulation eingreifen ⁷⁸. Wird STAT5 daran gehindert Tetramere zu bilden, führt dies *in vivo* zu erniedrigten CD4⁺-CD25⁻ (T_{reg}), CD8⁺- und NK-Zellzahlen ⁷⁹. Die verbliebenen T_{reg}⁻ und CD8⁺-Zellen sind außer Stande eine adäquate Immunantwort zu leisten. Insbesondere NK-Zellen reifen bei fehlender STAT5-Tetramerisierung aufgrund niedriger BCL-2-Expression nicht aus ⁸⁰.

2.4 STAT5 in hämatologischen Neoplasien

2.4.1 *Downstream* hyperaktiver Tyrosinkinasen

Früh nach der Entdeckung des aktivierten STAT5 in akuten Leukämien ^{81,82} rückte es in den Fokus der akuten myeloischen Leukämie mit nachgewiesener *internal tandem duplication* (ITD) der Rezeptor-Tyrosinkinase *Fms related tyrosine kinase 3* (FLT3^{ITD}). Während der stimulierte FLT3^{WT}-Rezeptor STAT5A nur transient aktiviert ⁸³, liegt STAT5 in FLT3^{ITD}-transformierten Ba/F3-Zellen konstitutiv-aktiv vor ⁸⁴ und ist essenziell für die FLT3^{ITD}-induzierte Leukämogenese ⁸⁵. In primären AML-Blasten ist STAT5 häufig aktiviert ^{86,87} und korreliert mit phosphorylierten FLT3 ⁸⁸. Weder der FLT3-Wildtyp, noch FLT3 mit mutierter Tyrosinkinase-Domäne (FLT3^{TKD}) aktivieren STAT5 und dessen Zielgene im selben Maße wie FLT3^{ITD} ⁸⁹. Zudem unterscheiden sich sowohl die Prognose als auch der klinische Phänotyp zwischen FLT3^{ITD} und FLT3^{TKD} ⁹⁰. Der konditionale STAT5-Knockout konnte die essenzielle Rolle von STAT5 in der FLT3^{ITD}-induzierten Leukämogenese *in vivo* bestätigen ⁹¹.

FLT3^{ITD} aktiviert unabhängig von JAK ⁹² STAT5 *via* Src ^{91,93,94} und Lyn ^{95,96} innerhalb des zytoplasmatischen Kompartiments ^{97,98}. In diesem Kontext induziert STAT5 die Proto-Onkogene *PIM-1* ⁹⁹ und *PIM-2* ¹⁰⁰, *MCL1* ¹⁰¹, *Oncostatin M* sowie *MYC* ⁹¹ und baut mit Hilfe von *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS) 1 ¹⁰² und miR-155 ¹⁰³ ein anti-apoptisches Netzwerk auf. STAT5 fördert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und trägt somit zur genetischen Instabilität und

Aggressivität der FLT3^{ITD}-AML bei ¹⁰⁴. Eine bestehende Tyrosinkinase-Inhibitor-(TKI)-Resistenz fördert STAT-Signalwege durch den hochregulierten FLT3-Liganden (FLT3LG) und die runterregulierten SOCS ¹⁰⁵. Die duale Mutante FLT3^{ITD-TKD} vermittelt ihre TKI-Resistenz über STAT5 und dessen Zielgen *BCL-X_L* ¹⁰⁶.

Neben der zentralen Rolle von STAT5 in der AML, spielt STAT5 sowohl in der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) als auch in der Polycythämia Vera (PV) ebenfalls eine Schlüsselrolle. Der Transkriptionsfaktor ist essenziell für die BCR-Abl-induzierte zelluläre Transformation ¹⁰⁷⁻¹¹⁰ und die Entstehung einer CML ^{74,111}. Ob STAT5 auch für den Erhalt einer CML notwendig ist, wird kontrovers diskutiert ¹¹²⁻¹¹⁴. Die treibende Variante hierbei ist STAT5B ¹¹⁵ und wird unabhängig von JAK2 aktiviert ¹¹⁶. Jedoch kann ein erhöhter JAK2-STAT5-Signalweg eine TKI-Resistenz vermitteln ¹¹⁷. Unter Imatinib-Therapie zeigen CML-Patienten erhöhte STAT5-Level, die in der Akzelerationsphase die notwendige Dosiserhöhung erklären könnten ^{118,119}. Auch für die Entwicklung einer JAK2^{V617F}-induzierten PV ist STAT5 unentbehrlich ^{113,120} und liegt im Knochenmark von PV-Erkrankten aktiviert vor ¹²¹. JAK2^{V617F} aktiviert die STAT5-BCL-X_L-Achse und fördert damit die Bildung endogener erythroider Kolonien ¹²².

2.4.2 Die Treibermutation STAT5B^{N642H}

Die *Gain-of-function* (GOF)-Mutante STAT5B^{N642H} tritt hauptsächlich in peripheren T-Zell Lymphomen (PTCL) auf. Sie betrifft die SH2-Domäne, ermöglicht Autodimerisierung und schützt vor Dephosphorylierung ¹²³. Die Erstbeschreibung gelang in CD56⁺-Leukämiezellen in der Leukämie der groß-granulierten Lymphozyten (LGL) und ist mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert ¹²⁴. In der T-Zell Prolymphozyten Leukämie (T-PLL) stellt sie eine potenzielle Treibermutation dar ^{125,126}. Dies gilt auch für das extranodale NK- / T-Zell Lymphom vom nasalen Typ ^{127,128} und das hepatosplenische T-Zell Lymphom ^{129,130}. In akuten Leukämien ist STAT5B^{N642H} selten vertreten und spielt sowohl in der adulten ¹³¹ als auch in der pädiatrischen T-Zell-ALL eine Rolle ¹³². In der B-Zell-ALL verschiebt STAT5 das transkriptionelle Gleichgewicht, indem es mit NF-κB und IKAROS konkurriert ^{133,134}. Ferner ähnelt die Prognose des Hypereosinophilen Syndroms

mit STAT5B^{N642H} der chronischen Eosinophilenleukämie ¹³⁵ und ist in pädiatrischen Patienten mit Urtikaria, Dermatitis und Diarrhoe verbunden ¹³⁶. Die Mutation ist in der Lage Ba/F3-Zellen Zytokin-unabhängig zu transformieren ¹³⁷ und manifestiert sich im transgenen Mausmodell als organinfiltrierende, reifzellige T-Zell-Neoplasie mit CD56⁺- ¹³⁸, CD8⁺- ^{139,140}, CD4⁺- und $\gamma\delta$ -T-Zellen ¹²³.

3. Fragestellung

3.1 Sind STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} onkogene Varianten?

Um die genetischen Veränderungen, die hinter Therapieresistenz und Krankheitsprogress stehen, auf den Grund zu gehen, haben Greif et al. aus unserer Arbeitsgruppe das Exom von 50 CN-AML-Patienten sequenziert und dabei Substitutionsmutationen in der funktionell essenziellen SH2 (E637G) sowie in der Transaktivierungs-Domäne (T719M) des Transkriptionsfaktors STAT5A identifiziert ¹⁶. Die Mutationen besaßen zu den Zeitpunkten Diagnose und Rezidiv eine stabile Varianten-Allelfrequenz und waren in der Remission der Erkrankung nicht detektierbar. Sie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Leukämie-spezifisch und nicht mit der Chemotherapie assoziiert. Neben der Effektorrolle von STAT5 *downstream* hyperaktiver Tyrosinkinasen ist STAT5 auch als potenzielles Proto-Onkogen bekannt. Aufgrund dessen ist es denkbar, dass die beschriebenen STAT5A-Mutationen frühe Events in der Evolution der leukämischen Stammzelle darstellen und somit zum Ausbruch der Leukämie beigetragen haben (**Abb. 4**). Im Rahmen dieser Arbeit soll der biologische Phänotyp der STAT5A-Mutationen E637G und T719M *in vitro* charakterisiert werden. Hierfür wird sich des murinen Pro-B-Zellmodells Ba/F3 bedient und zellbiologische, proteinbiochemische und immunzytochemische Methoden angewandt. Zudem soll eine mögliche Interaktion der Mutationen mit den Tyrosinkinasen FLT3 und EGFR analysiert werden. Als Kontrollen dienen die GOF-Mutation N642H und die LOF-Mutation Y694F.

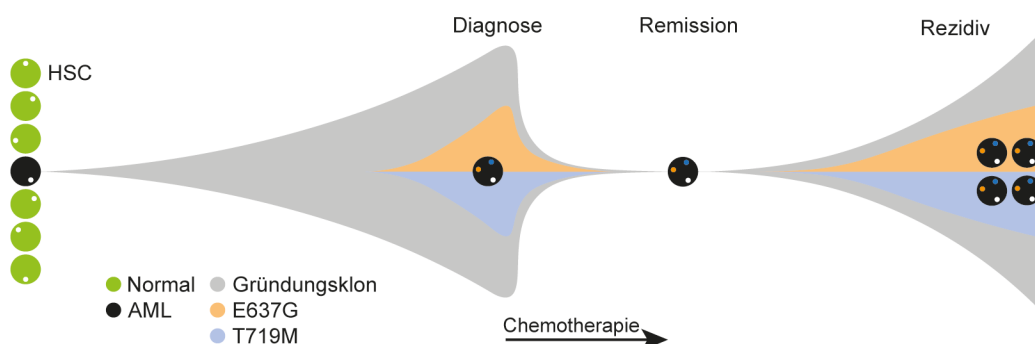


Abb. 4: Klonale Evolution potenziell onkogener STAT5A-Mutationen E637G und T719M

Durch einen frühen Event innerhalb der Population des Gründungsklons tragen die Mutationen E637G und T719M möglicherweise zum Ausbruch der AML und nach Therapie zur Entwicklung des Rezidivs bei. Abbildung nach Ding, 2012.

4. Methoden

4.1 Molekularbiologie

4.1.1 Aufbereitung von DNA

Für die Herstellung identischer DNA-Kopien wurden *DH5α Chemically Competent Cells* verwendet und die anschließende Isolierung, Reinigung und Konzentrierung, je nach benötigter Menge, mit Hilfe des *EndoFree® Plasmid Maxi Kit* oder *QIAprep Spin Miniprep Kit* durchgeführt ¹⁴¹. Dafür wurde LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin hergestellt. Für eine Vorkultur wurden 2 ml Medium mit einer Bakterienkolonie inokuliert und für 6 Stunden bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur auf 100 ml Medium aufgefüllt und für 12 bis 16 Stunden bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels Absorptionsspektrometrie gemessen.

4.1.2 Restriktion von DNA

Nach enzymatischer Spaltung der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, der sogenannten Restriktion, entstehen überhängende oder glatte Enden. Für die Verbindung des linearisierten Plasmids mit einem DNA-Fragment, auch Insert genannt, zu einem neuen DNA-Konstrukt, werden kompatible Enden benötigt. Zu je 1 µg DNA wurden 2,5 bis 5 Enzymeinheiten und der entsprechende Puffer pipettiert. Die Proben wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend die Enzyme für 20 Minuten bei 65 °C hitze-inaktiviert.

4.1.3 Dephosphorylierung von DNA

Die Re-Zirkularisierung des linearisierten Plasmids wurde durch Dephosphorylierung verhindert. Hierfür wurde der Restriktions-Ansatz für 30 s bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und danach das Enzym und der Puffer zu der auf Eis gelagerten Probe pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C, dann für 5 Minuten bei 56 °C. Danach wurde EDTA zur Probe pipettiert und die Probe anschließend für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert.

Tabelle 1: Pipettierschema Dephosphorylierung pMIG

Komponenten	Ansatz
Restriktions-Ansatz	50 µl
CIP	4,65 µl
CIP Puffer	6,2 µl
EDTA	0,62 µl

4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) war Teil der Klonierung von STAT5A in den Ziel-Vektor pcDNA6 und stellt den ersten Schritt des *In-Fusion® Cloning* dar. Dabei wird zunächst das zu klonierende DNA-Fragment durch eine PCR mit Oligonukleotid-Primern, die die geeigneten Restriktionsschnittstellen enthalten, amplifiziert. Hierfür wurde das *In-Fusion HD® Cloning Kit* verwendet. Die Primer wurden mit Hilfe des Hersteller-Programms designt und von der Firma metabion synthetisiert. pcDNA6 weist Schnittstellen für die Enzyme KpnI und XbaI auf, weshalb die *Forward*- und *Reverse*-Primer entsprechend designt wurden. Jeweils 10 ng pCMV6-STAT5A-Template wurden mit 0,3 µM Primer angesetzt. Die Denaturierung erfolgte für 10 s bei 98 °C, die Hybridisierung bei 55 bis 65 °C und die Elongation für 20 s bei 72 °C.

4.1.5 In-Fusion® Cloning

Die Klonierung von STAT5A in pcDNA6 erfolgte mittels *In-Fusion® Cloning*.

Tabelle 2: Pipettierschema In-Fusion Cloning® STAT5A in pcDNA6

Komponenten	5:1	3:1	Negativ	Positiv
STAT5A	6,48 µl	4,86 µl	-	-
PcDNA™6	0,23 µl	0,28 µl	1 µl	-
<i>In-Fusion HD Enzyme Premix (5x)</i>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<i>pUC19 (50 ng/µl)</i>	-	-	-	1 µl
<i>Control Insert (40 ng/µl)</i>	-	-	-	2 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad 10 µl</i>	<i>ad 10 µl</i>	<i>ad 10 µl</i>	<i>ad 10 µl</i>

4.1.6 Ligation von DNA

Die Klonierung von STAT5A in pMIG erfolgte mittels Ligation. Je Probe wurden 20 µl Volumen mit 400 Enzymeinheiten der T4 DNA-Ligase und geeignetem Puffer angesetzt. Es wurden zwei Proben mit den Insert-Vektor-Verhältnissen 5:1 und 3:1 angesetzt. Aufgrund der glatten Enden nach Restriktion, war eine lange Inkubation des Ansatzes für 72 Stunden bei 16 °C notwendig.

4.1.7 Chemische Transformation

Die chemische Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien erfolgte mit Hilfe von KCM-Puffer. Nachdem die Bakterien für 10 Minuten auf Eis auftauten, wurden 25 µl entnommen und 1 µl Plasmid, 10 µl Puffer sowie 14 µl *Aqua dest.* hinzu pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 µl LB-Medium und eine Inkubation für 1 Stunde bei 200 rpm und 37 °C. Danach wurde die Probe für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 100 µl LB-Medium in Suspension gebracht und mit Hilfe eines Drigalskispatels auf vorgewärmte Agarplatten ausgestrichen. Diese enthielten 100 µg/µl Ampicillin, sodass transformierte Bakterien selektioniert wurden. Es folgte eine Inkubation für 16 Stunden bei 37 °C.

4.1.8 Elektroporation

Auch mittels Elektroporation wurde Plasmid-DNA in Bakterien eingeschleust. Hierfür wurden Röhrchen, Küvetten und Bakterien auf Eis gekühlt und LB-Medium auf 37 °C vorgewärmt. Der Elektroporator wurde auf 2.500 V, 200 Ω und 25 µF eingestellt. Der Ligations-Ansatz wurde 1:500 in *Aqua dest.* verdünnt. Davon wurden 4 µl zu den Bakterien pipettiert und für 1 Minute inkubiert. Die Probe wurde danach in die Küvette im Elektroporator überführt, ein Puls initiiert und 1 ml LB-Medium hinzu pipettiert. Nach Inkubation der Probe für 1 Stunde bei 250 rpm und 37 °C in einem 14 ml Röhrchen, wurden davon 60 µl entnommen und mit 40 µl LB-Medium auf eine Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

4.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach Ladung, Masse und Konformation. Das hergestellte Agarosegel wurde in eine Gel-Kammer gegossen und war nach 60 Minuten ausgehärtet. Dann wurde TAE-Puffer hinzugefügt und sowohl die Proben als auch der Größenstandard gemeinsam mit dem Lade-Puffer in die Taschen pipettiert. Es wurde eine Spannung von 80 V für 45 bis 60 Minuten angelegt und das Ergebnis mit Hilfe der *Ebox™ VX2* dokumentiert. Anschließend wurde das DNA-Material aus dem Agarosegel geschnitten mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* extrahiert.

4.1.10 Ortsspezifische Mutagenese

Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurden die zu untersuchenden Punktmutationen in die Konstrukte pcDNA6- und pMIG-STAT5A eingebracht. Sie basiert auf der PCR mit Primern, die die gewünschte Mutation beinhalten. Hierfür wurde das *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* verwendet. Pro Mutation wurden zwei Proben mit jeweils 10 ng und 100 ng DNA angesetzt.

4.1.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der hergestellten DNA-Konstrukte wurde durch die Firma Sequiserve GmbH durchgeführt. Hierfür wurden geeignete Primer designt und von der Firma metabion synthetisiert.

4.1.12 STAT5A-Plasmid

Als ursprünglicher Vektor diente das pCMV6-Entry Plasmid mit STAT5A als Entry und c-terminalem MYC-DDK-Tag, hergestellt von der Firma Origene.

4.2 Zellbiologie

4.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei -80 °C oder in Flüssigstickstoff gelagert. Es wurden 6×10^6 Ba/F3-, 3×10^6 Phoenix-Eco- und 1×10^6 U-2 OS-Zellen in jeweils 1 ml Gefriermedium eingefroren. Die Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und in Vollmedium aufgenommen. Die Proben wurden dann für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet mit dem jeweiligen Medium in Suspension gebracht und in eine Zellkulturflasche überführt.

4.2.2 Kultivierung adhärenter Zellen und Zellsuspensionskultur

Die Kultivierung von adhärenenten und Suspensionszellen fand in einem Inkubator bei 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C statt. Adhärenente Zellen wurden im Verhältnis 1:5 und Suspensionszellen im Verhältnis 1:20 regelmäßig nach 2 bis 3 Tagen passagiert. Adhärenente Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in Trypsin-EDTA für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium verdünnt, für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet mit frischem Medium in Suspension gebracht und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Lebendzellzahl wurde mittels Trypan-Blau-Färbung im Zellzähler *Vi-CELL™ XR* bestimmt.

4.2.3 Transiente Transfektion adhärenter Zellen

Für die Transfektion der Phoenix-Eco-Zellen wurden $6,5 \times 10^6$ Zellen in einer Zellkulturschale ausgesät. Nach 16 Stunden erfolgte an Tag 2 bei einer Konfluenz von circa 75 % ein Medium-Wechsel und nach weiteren 4 Stunden die Transfektion. Je Transfektions-Ansatz wurden 13 μg DNA zu 50 μl CaCl_2 pipettiert und das Gesamtvolumen mit *Aqua dest.* auf 500 μl erhöht. Der Ansatz wurde langsam zu 500 μl HBS-Puffer hinzugefügt, für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. An Tag 3 erfolgte nach 20 Stunden ein Medium-Wechsel. 48 Stunden nach Transfektion wurde an

Tag 4 die Transfektionseffizienz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kontrolliert.

Für die Transfektion der U-2 OS-Zellen wurden Deckgläser in 6-Well-Platten gelegt, in einer UV-Kammer sterilisiert und danach pro Well 3×10^4 Zellen ausgesät. Nach 16 Stunden erfolgte an Tag 2 bei einer Konfluenz von circa 75 % die Transfektion. Je Transfektions-Ansatz wurden 1,5 µg DNA zu 5 µl *PolyFect* und 100 µl *Opti-MEM*® pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 900 µl *Opti-MEM*® hinzugefügt. Das ursprüngliche Medium wurde entfernt, 2 ml frisches Medium hinzugefügt und der Ansatz tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 6 Stunden erfolgte ein Medium-Wechsel. 48 Stunden nach Transfektion wurde an Tag 4 die Transfektionseffizienz kontrolliert und die immunhistochemische Färbung durchgeführt.

4.2.4 Retrovirale Infektion von Suspensionszellen

Für die stabile Transduktion von Ba/F3-Zellen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 3 ml *virus containing medium* (VCM), das von transfizierten Phoenix-Eco-Zellen stammte, aufgenommen. Dann wurden 3 µl Protaminsulfat sowie 30 ng IL-3 hinzu pipettiert und die Zellsuspension in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden für 90 Minuten bei 32 °C und 2.500 rpm zentrifugiert und danach im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden 3 ml Medium zu den Zellen hinzugefügt.

4.2.5 Zellsortierung von Suspensionszellen

Die transduzierten Ba/F3-Zellen konnten anhand des *green fluorescent protein* (GFP) -Signals des retroviralen Expressionsvektors pMSCV-IRES-eGFP (pMIG) mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) sortiert werden. Bei doppelt-transduzierten Zellen zusätzlich anhand des *yellow fluorescent protein* (YFP) -Signals des Vektors pMSCV-IRES-eYFP (pMIY). Die Zellsortierung mit Hilfe des FACSVantage™ SE wurde zweimal im Abstand von einer Woche

durchgeführt, um eine Reinheit von 95 % transduzierter Ba/F3-Zellen zu erreichen.

4.2.6 Zellproliferation von Suspensionszellen

Um die Zellproliferation stabil transduzierter Ba/F3-Zellen zu analysieren, wurden in eine 48-Well-Platte 40×10^3 Zellen pro Well ausgesät. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml RPMI mit 10 % FBS aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte für 72 Stunden im Inkubator unter verschiedenen Bedingungen. Anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

4.2.7 Zellstimulation adhärenter Zellen und Suspensionszellen

24 Stunden vor Stimulation wurde das Vollmedium gegen Medium mit 0,3 % FBS ausgetauscht. Die gehungerten Ba/F3- und Phoenix-Eco-Zellen wurden für 10 Minuten bei 37 °C stimuliert und dann lysiert. Die U-2 OS-Zellen hingegen für 60 Minuten stimuliert und anschließend fixiert.

4.3 Proteinbiochemie

4.3.1 Aufbereitung von Proteinen

Zur Herstellung eines Proteinlysats aus Phoenix-Eco-Zellen wurden $6,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und 48 Stunden nach Transfektion lysiert. Für ein Proteinlysat aus Ba/F3-Zellen wurden 5×10^6 Zellen gezählt und lysiert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen und adhärenente Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale abgelöst. Um den Proteinabbau zu verhindern, wurden zu je 5 ml Lyse-Puffer 50 µl PMSF, 50 µl Natriumorthovanadat und 25 µl Aprotinin pipettiert und anschließend für 30 Minuten bei 9 rpm und 4 °C inkubiert. Danach wurde das Lysat für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen pipettiert und bei -20 °C gelagert. Das FLAG-

STAT5A-Fusionsprotein konnte anschließend mit Hilfe des *ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel* aus den Proteinlysaten immunpräzipitiert (IP) werden.

4.3.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels *Bradford-Test*¹⁴². Hierbei wird die Absorption eines Proteinlysats bei 595 nm nach Zugabe des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250 photometrisch gemessen. Dafür wurden 20 µl eines 1:10 verdünnten Proteinlysats zu 980 µl *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* pipettiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gemessen. Anhand einer Eichgeraden aus gemessenen BSA-Konzentrationen, wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

4.3.3 SDS-PAGE

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) trennt Proteine ihrer Größe nach auf. Hierfür wurden Sammel- und Trenngele hergestellt und der Größenstandard *peqGold Protein Marker VI* verwendet. Je Probe wurden 20 µg Proteinlysats mit *Aqua dest.* auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und 20 µl Lämmli-Puffer¹⁴³ hinzugefügt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und in die Probentaschen im Sammelgel pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel bei 60 V für 1 bis 2 Stunden und im Trenngel bei 80 bis 100 V für weitere 2 bis 3 Stunden.

4.3.4 Western-Blot

Mittels *wet blotting*¹⁴⁴ wurden die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Gel und Membran wurden dazu in direkten Kontakt miteinander gebracht und gemeinsam mit Filterpapier und Schwämmen in einer Transfer-Kammer befestigt. Nachdem diese mit Transfer-Puffer befüllt wurde, erfolgte der Transfer bei 100 mA und 4 °C über Nacht.

4.3.5 Proteindetektion

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde eine Blockierlösung aus 5 % Magermilchpulver in TBS-T hergestellt und in dieser sowohl die Membranen für 1 Stunde inkubiert als auch die Antikörper verdünnt. Die Membranen wurden zuerst für 1 Stunde mit einem Primärantikörper inkubiert und dann dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Detektion des Primärantikörpers durch einen Spezies-spezifischen Sekundärantikörper. Nach 1 Stunde Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für 5 Minuten gewaschen. Die Visualisierung der detektierten Proteine erfolgte im Anschluss im *Fusion SL4 Imaging System* mittels *Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate*. Die Signalintensität wurde mittels graphischer Quantifizierung im Programm *FusionCapt 16.15* aufgezeichnet.

4.4 Immunzytochemie

4.4.1 Fixierung

Unmittelbar vor der Fixierung wurden die Deckgläser in PBS getaucht und dann in einer Lösung aus 2 % Formaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde PBS-T in die Wells pipettiert und die Deckgläser mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf intakte Zellen kontrolliert.

4.4.2 Permeabilisierung und Färbung

Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit 0,5 % TRITON™ X-100 in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden die Zellen in 2 % BSA in PBS-T für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert und Primär- und Sekundärantikörper in derselben Lösung verdünnt. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörperlösungen erfolgte für 1 Stunde in einer feuchten Kammer. Je Deckglas wurden 100 µl Antikörperlösung auf PARAFILM® pipettiert und die Deckgläser auf die Antikörperlösung gelegt. Nach Antikörper-Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und der Zellkern mit 1 µg/µl DAPI für 10 Minuten gefärbt. Im An-

schluss wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen, die Deckgläser mit *Fluorescent Mounting Medium* auf Objektträgern befestigt, die Ränder versiegelt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

4.4.3 Fluoreszenz- und Konfokal-Mikroskopie

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des TCS SP5 II Konfokal-Mikroskops und des Fluoreszenzmikroskops DMI8 angefertigt. Die identischen Aufnahmeeinstellungen wurden für alle Aufnahmen beibehalten. Um das Verhältnis der pSTAT5-Signal-Lokalisation zwischen Nukleus und Zytoplasma zu berechnen, wurde das Programm Fiji von ImageJ verwendet. Zunächst wurde *mean grey value* voreingestellt, eine Aufnahme im DAPI-Kanal geöffnet, der Nukleus händisch als *Region of interest* (ROI) definiert und dann die *integrated density* im RHO-Kanal aufgezeichnet. Dies wurde für die gesamte Zelle wiederholt. Anhand folgender Formel wurde danach der Anteil des nukleären pSTAT5-Signals berechnet ¹⁴⁵:

$$\% \text{ Nuclear} = \frac{\text{Total Nuclear Intensity}}{\text{Total Cytoplasmatic Intensity} + \text{Total Nuclear Intensity}} \times 100$$

5. Ergebnisse

5.1 Klonierung der Konstrukte pcDNA6- und pMIG-STAT5A

Für die funktionellen Analysen der neu beschriebenen Substitutionsmutationen E637G und T719M des Transkriptionsfaktors STAT5A, wurde zunächst die cDNA nach erfolgter Mutagenese in die Plasmide pcDNA6 und pMIG kloniert. Zur Herstellung des Konstruktes pcDNA6-STAT5A wurde das Ziel-Fragment STAT5A mit den KpnI-*forward*- und XbaI-*reverse*-Primer amplifiziert und mittels *In-Fusion*® Cloning mit dem linearisierten pcDNA6 fusioniert. Die Kontroll-Restriktion (**Abb. 5 A**) mit den Enzymen KpnI und XbaI ergaben bei korrekter Fusion ein STAT5A (2517 bp) und ein pcDNA6-Fragment (circa 5000 bp). Für die Klonierung von STAT5A in pMIG wurde das bereits hergestellte Konstrukt pcDNA6-STAT5A mit PmeI geschnitten und pMIG mit HpaI linearisiert. Da die Enzyme nach Restriktion *blunt ends* hinterließen, wurde nach erfolgter Ligation die korrekte Orientierung des Inserts im Plasmid mit Hilfe des Enzyms XhoI kontrolliert (**Abb. 5 B**). Bei korrekter Orientierung entstand ein langes (8841 bp) und ein sehr kurzes DNA-Fragment (84 bp, nicht sichtbar).

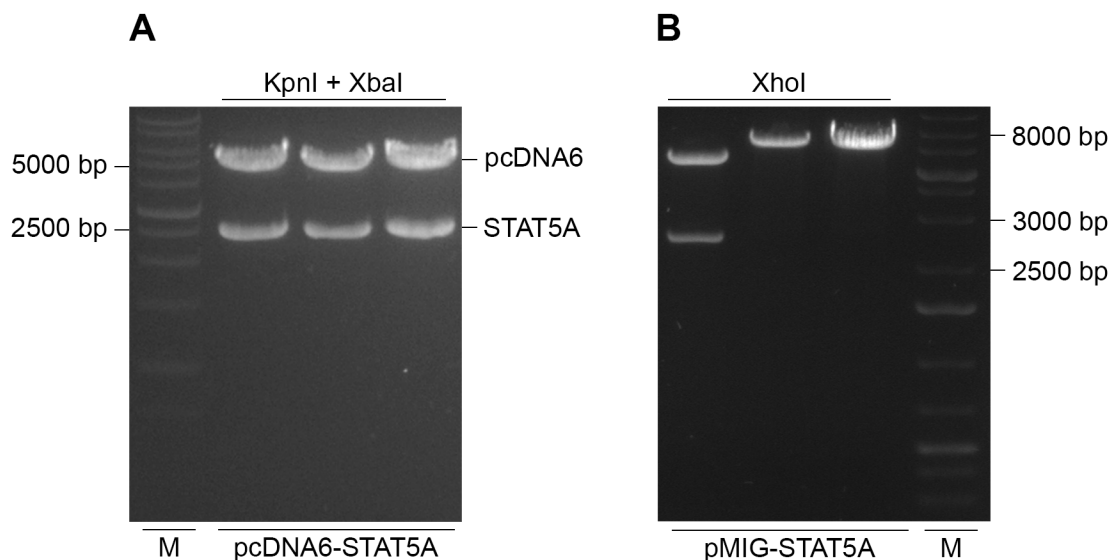


Abb. 5: Kontroll-Restriktion der klonierten DNA-Konstrukte pcDNA6- und pMIG-STAT5A

pcDNA6-STAT5A nach Restriktion mit KpnI und XbaI (**A**) und pMIG-STAT5A nach Restriktion mit XhoI (**B**) auf einem Agarosegel (10 %). M = Größenstandard.

5.2 Expression der DNA-Konstrukte in Ba/F3-Zellen

5.2.1 STAT5A-Expression in einfach-transduzierten Ba/F3

Um den biologischen Phänotyp von STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} zu untersuchen, wurde die murine Pro-B-Zelllinie Ba/F3 mit jeweils einer dieser STAT5A-Mutanten sowie den Kontroll-Mutanten STAT5A^{Y694F} und STAT5A^{N642H} mittels des Expressionsvektors pMIG stabil transduziert und kultiviert. Als Expressionskontrolle dienten Leervektor-transduzierte Ba/F3-Zellen. Im Anschluss wurden die transduzierten Zellpopulationen mittels Zellsortierung anhand des GFP-Signals des Vektors pMIG sortiert.

Anhand des FLAG-Tags in der cDNA von STAT5A konnte die Expression des STAT5A-Wildtyps (STAT5A^{WT}) und der STAT5A-Mutanten mittels FLAG-Antikörper in der Western-Blot-Analyse überprüft werden (**Abb. 6**). Dabei war in den Leervektor-transduzierten Ba/F3-Zellen kein exogenes STAT5A nachweisbar. In fast allen stabil transduzierten Ba/F3-Zellen war eine deutliche STAT5A-Expression detektierbar. Lediglich die STAT5A^{Y694F}-transduzierten Ba/F3-Zellen zeigten ein geringes α -FLAG-Signal bei regelrechter Ladekontrolle mittels GAPDH-Antikörper.

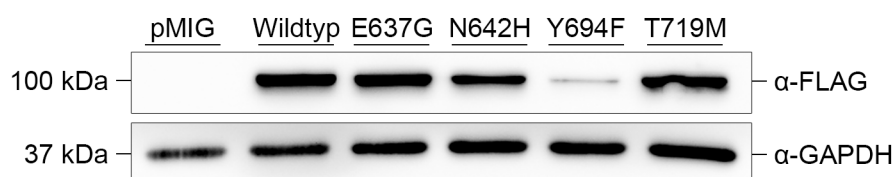


Abb. 6: STAT5A-Expression in einfach-transduzierten Ba/F3-Zellen

Western-Blot-Analyse von Ba/F3-Ganzzell-Lysaten nach stabiler Transduktion mit Leervektor pMIG, STAT5A-Wildtyp oder einer -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M). STAT5A-Detektion mittels α -FLAG, Ladekontrolle mittels α -GAPDH, Proteinmenge 20 μ g.

5.2.2 STAT5A- und FLT3-Expression in doppelt-transduzierten Ba/F3

Um eine mögliche Interaktion zwischen STAT5A und der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 zu untersuchen, wurden STAT5A-Mutanten-transduzierte Ba/F3-Zellen jeweils zusätzlich mit FLT3 doppelt-transduziert. Die generierten Zellpopulationen wurden anschließend anhand des zusätzlichen YFP-Signals des DNA-Konstruktes pMIY-FLT3 sortiert.

Alle doppelt-transduzierten Ba/F3-Zellen zeigten in der Western-Blot-Analyse eine deutliche FLT3-Expression (**Abb. 7 A**). Die Expressionskontrolle von STAT5A mittels FLAG-Antikörper zeigte erneut ein herabgesetztes α -FLAG-Signal in STAT5A^{Y694F}-transduzierten Ba/F3-Zellen im Vergleich zum STAT5A-Wildtyp und den Mutanten. Um negative Effekte der Y694F-Mutation auf die STAT5A-Expression auszuschließen, wurde diese mittels STAT5A-Antikörper validiert (**Abb. 7 B**). Dabei wiesen alle doppelt-transduzierten Ba/F3-Zellen eine deutliche STAT5A-Expression auf. Außerdem war endogenes (91 kDa) sowie exogenes (circa 100 kDa) STAT5A als Doppelbande im Western-Blot nachweisbar.

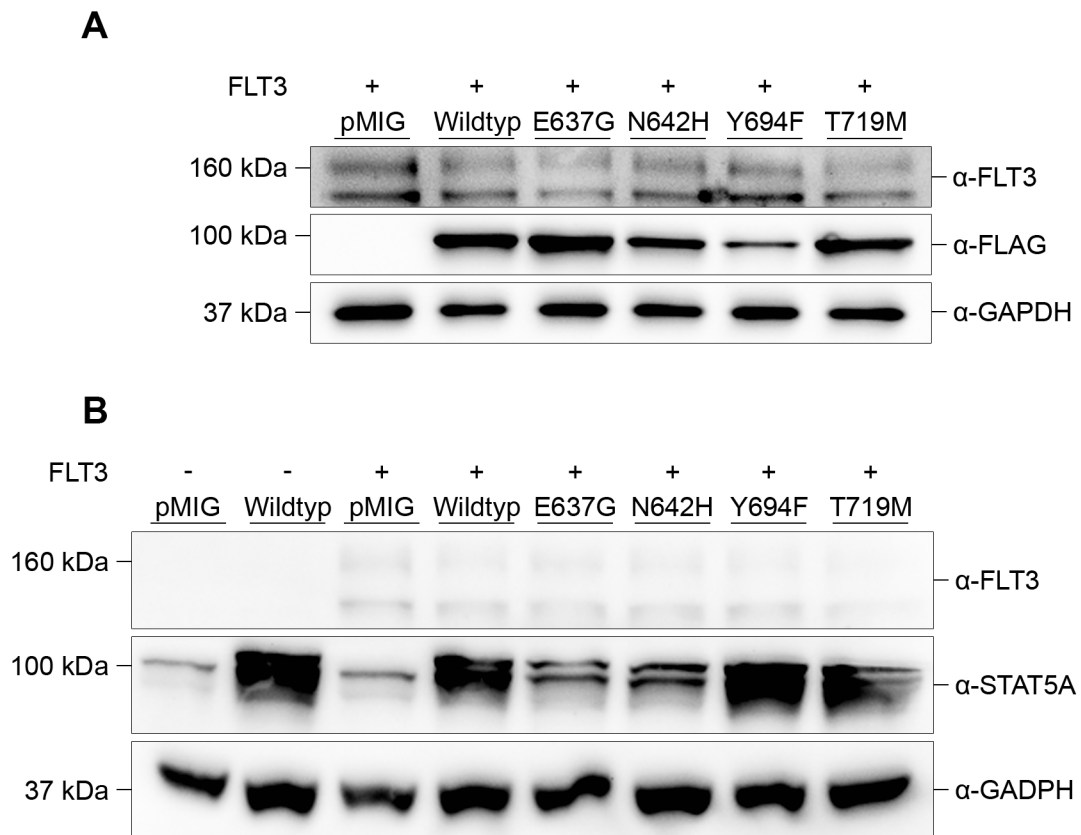


Abb. 7: STAT5A- und FLT3-Expression in doppelt-transduzierten Ba/F3-Zellen

Western-Blot-Analyse von Ba/F3-Ganzzell-Lysaten nach stabiler Doppel-Transduktion mit Leervektor pMIG, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M) sowie mit FLT3. FLT3-Detektion mittels α -FLT3 und Ladekontrolle mittels α -GAPDH. STAT5A-Detektion mittels α -FLAG, Proteinmenge 20 μ g (A). STAT5A-Detektion mittels α -STAT5A, Proteinmenge 30 μ g (B).

5.2.3 STAT5A- und EGFR-Expression in doppelt-transduzierten Ba/F3

Für die Analyse einer potenziellen Interaktion zwischen STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} mit der Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR, wurden die einfach-transduzierten Ba/F3-Zellen zusätzlich mit dem Konstrukt pMIY-EGFR transduziert. Im Anschluss wurden auch diese doppelt-transduzierten Zellpopulationen mit Hilfe des MIY-Signals des Expressionsvektors pMIY sortiert.

In allen doppelt-transduzierten Ba/F3-Zellen war eine deutliche EGFR-Expression in der Western-Blot-Analyse detektierbar (**Abb. 8 A**). Auch in diesen doppelt-transduzierten Zellpopulationen war das α -FLAG-Signal in STAT5A^{Y694F}-transduzierten Zellen im Vergleich zum STAT5A-Wildtyp und den Mutanten verringert, sodass eine regelrechte STAT5A-Expression mittels STAT5A-Antikörper überprüft wurde und in allen Zelllinien eine vergleichbare Expression bestätigt werden konnte (**Abb. 8 B**). Das endogene (91 kDa) sowie exogene (circa 100 kDa) STAT5A bildete sich in der Western-Blot-Analyse als Doppelbande ab.

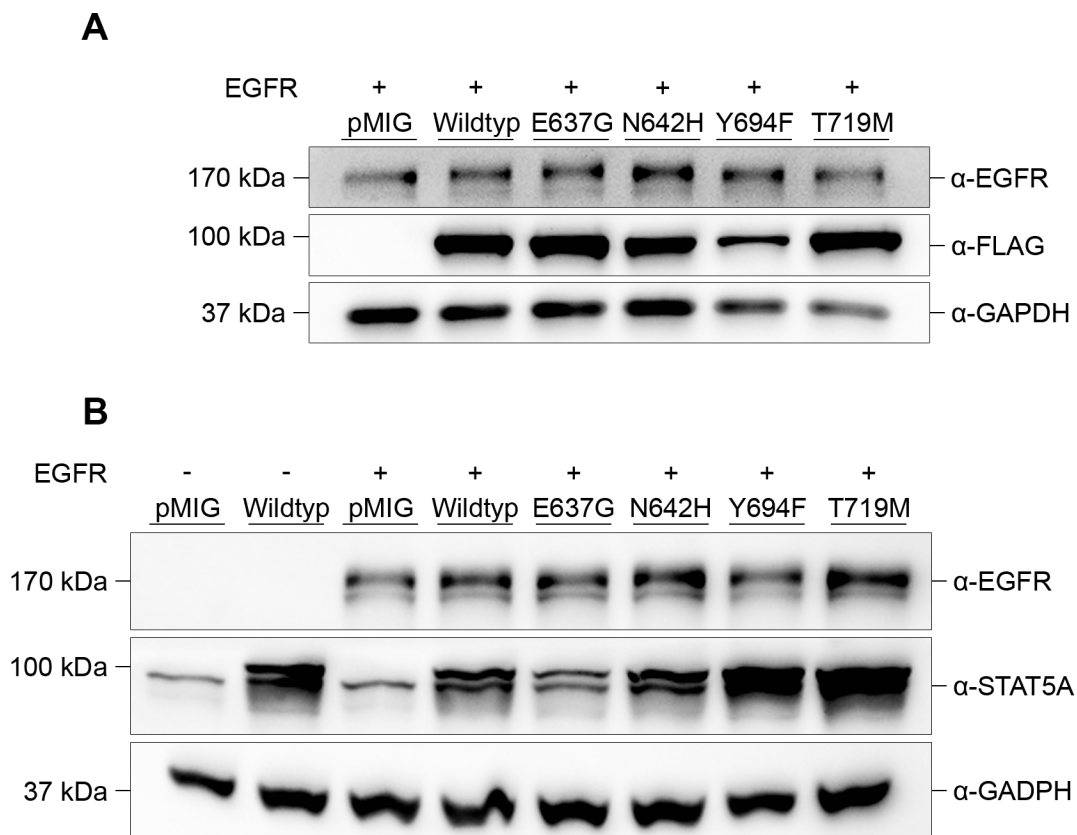


Abb. 8: STAT5A- und EGFR-Expression in doppelt-transduzierten Ba/F3-Zellen

Western-Blot-Analyse von Ba/F3-Ganzzell-Lysaten nach stabiler Doppel-Transduktion mit Leervektor pMIG, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M) sowie mit EGFR. EGFR-Detektion mittels α-EGFR und Ladekontrolle mittels α-GAPDH. STAT5A-Detektion mittels α-FLAG, Proteinmenge 20 µg (A). STAT5A-Detektion mittels α-STAT5A, Proteinmenge 30 µg (B).

5.3 Keine Transformation durch E637G oder T719M

5.3.1 STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} sind in Ba/F3 nicht pro-proliferativ

Aktivierende STAT5A-Mutationen haben die Eigenschaft, die IL-3-abhängige murine Pro-B-Zelllinie Ba/F3 in Zytokin-unabhängige Zellen zu transformieren. Um das transformierende Potential von STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} zu untersuchen, wurden die stabil-transduzierten Ba/F3-Zellen (jeweils 40×10^3 Zellen) für 72 Stunden entweder mit oder ohne IL-3-Zugabe im Zellkulturmedium kultiviert und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt.

Nach 72 Stunden ohne IL-3-Zugabe im Medium proliferierten die STAT5A^{E637G}- und STAT5A^{T719M}-transduzierten Ba/F3-Zellen wie die Wildtyp- und Leervektor-transduzierten Zellen auf einem niedrigen Niveau ($0,1 \times 10^6$ Zellen/ml, **Abb. 9 A**). Unter IL-3-Zugabe war nach 72 Stunden in STAT5A^{T719M}-transduzierten Zellen eine gegenüber dem Wildtyp leicht erhöhte Lebendzellzahl messbar ($2,2 \times 10^6$ Zellen/ml *versus* $1,8 \times 10^6$ Zellen/ml; t-Test mit $p = 0,048$). Wurde die Zellproliferation der einzelnen Zelllinien unter IL-3-Entzug ins Verhältnis zur jeweiligen Proliferation unter IL-3-Zugabe gesetzt, so zeigten alle Zelllinien ein ähnlich niedriges, relatives Zellwachstum von 3 % (**Abb. 9 B**).

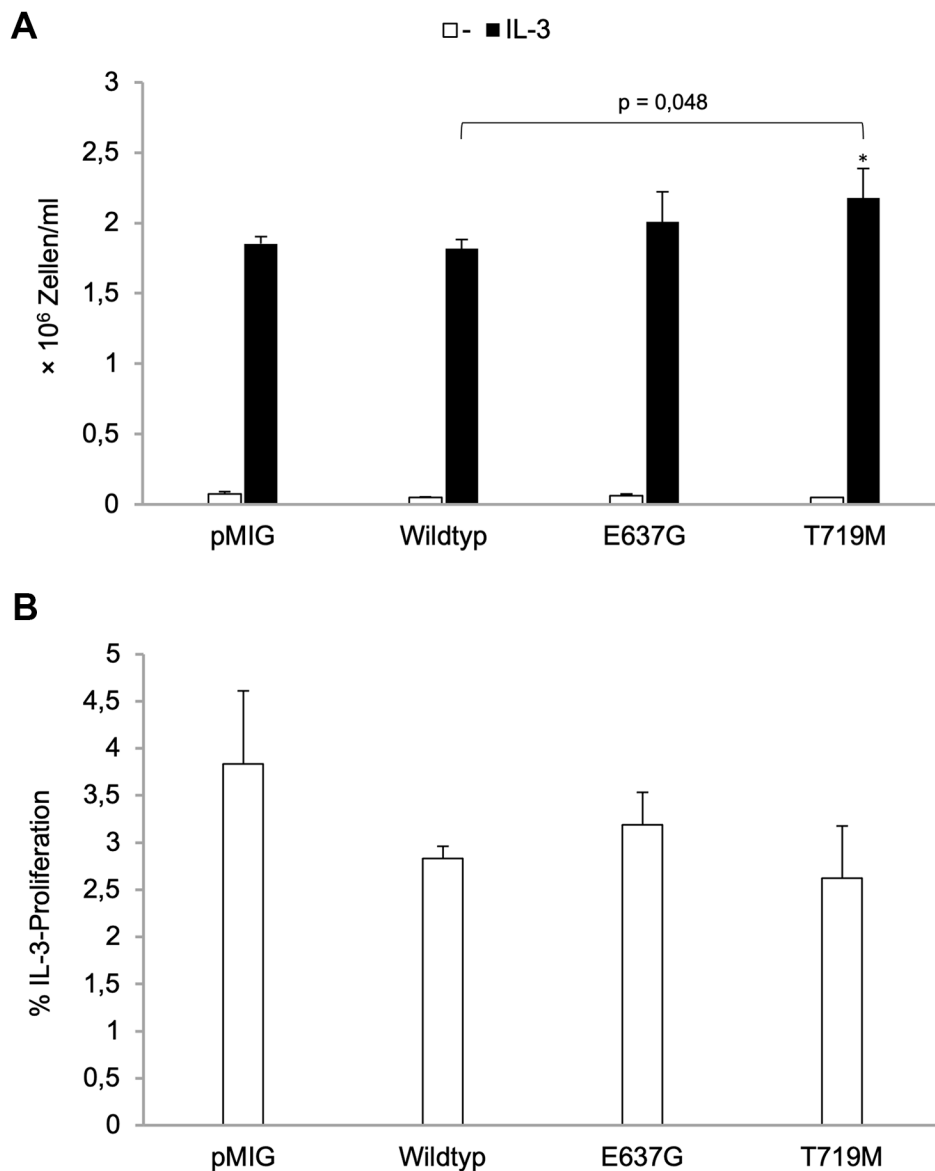


Abb. 9: STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} sind in BA/F3 nicht pro-proliferativ

Ba/F3-Zellen wurden mit Leervektor pMIG, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, T719M) stabil transduziert und jeweils 40×10^3 Zellen für 72 Stunden entweder mit oder ohne IL-3-Zugabe (10 ng/ml) bei 37 °C kultiviert (**A**). Für die jeweiligen Zelllinien wurde das Verhältnis zwischen der Ba/F3-Zellproliferation ohne und mit IL-3-Zugabe berechnet (**B**). Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten, t-Test mit $p = 0,048$.

5.3.2 FLT3-Stimulation erhöht die Ba/F3-Zellproliferation geringfügig

Um eine mögliche Interaktion von STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} mit der Receptor-Tyrosinkinase FLT3 mit Auswirkungen auf die Zellproliferation der IL-3-abhängigen Ba/F3-Zelllinie zu untersuchen, wurden doppelt-transduzierte Zellen für 72 Stunden unter den Bedingungen IL-3-Zugabe, IL-3-Entzug und FLT3LG-Zugabe kultiviert und anschließend die Lebendzellzahl gemessen.

Dabei proliferierten die Leervektor-, STAT5A-Wildtyp- sowie -Mutanten-transduzierten Ba/F3-Zellen bei zusätzlicher FLT3-Expression unter IL-3-Entzug auf einem niedrigen Niveau ($0,1 \times 10^6$ Zellen/ml, **Abb. 10 A**). Somit war das Wachstum bei alleiniger FLT3-Expression ohne stimulierenden FLT3LG vergleichbar zum Wachstum ohne FLT3-Expression (**Abb. 9 A**). Unter Stimulation durch FLT3LG erhöhte sich die Proliferation um den Faktor 3 ($0,3 \times 10^6$ Zellen/ml). Unter beiden genannten Bedingungen gingen STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} nicht mit einer gegenüber dem Wildtyp erhöhten Proliferation einher. Dies galt auch für die Proliferation unter IL-3-Zugabe (2×10^6 Zellen/ml).

Wurden die gemessenen Lebendzellzahlen der einzelnen Zelllinien unter FLT3LG-Stimulation ins Verhältnis zu den Lebendzellzahlen unter IL-3-Zugabe gesetzt, so ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten- und Wildtyp- sowie Leervektor-transduzierten Ba/F3-Zellen (**Abb. 10 B**). Das berechnete relative Zellwachstum betrug hierbei 12 % und lag damit über dem Wachstum der Zellen ohne zusätzliche FLT3-Expression und Stimulation.

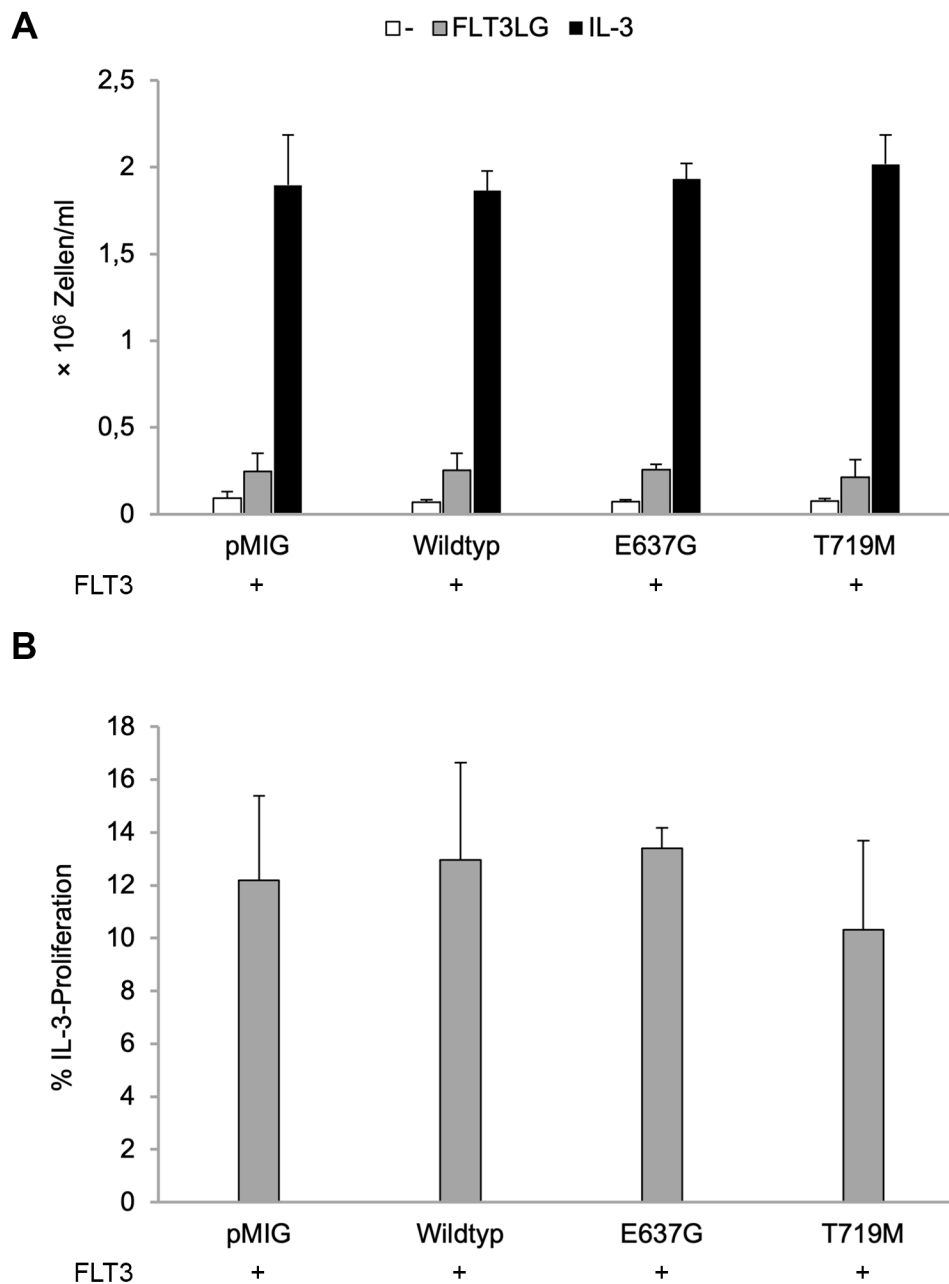


Abb. 10: FLT3-Stimulation erhöht die Ba/F3-Zellproliferation geringfügig

Ba/F3-Zellen wurden mit Leervektor, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, T719M) sowie mit FLT3 doppelt-transduziert und jeweils 40×10^3 Zellen für 72 Stunden unter IL-3-Entzug, FLT3LG-Zugabe (100 ng/ml) oder IL-3-Zugabe (10 ng/ml) bei 37 °C kultiviert (**A**). Für die jeweiligen Zelllinien wurde das Verhältnis zwischen der Ba/F3-Zellproliferation unter FLT3LG- und IL-3-Zugabe berechnet (**B**). Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

5.3.3 EGFR-Stimulation erhöht die Ba/F3-Zellproliferation erheblich

Die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR sollte ebenfalls auf eine mögliche Interaktion mit STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} mit konsekutiver Transformation von Ba/F3-Zellen untersucht werden. Hierfür wurden doppelt-transduzierte Ba/F3-Zellen für 72 Stunden unter den Bedingungen IL-3-Zugabe, IL-3-Entzug und EGF-Zugabe kultiviert und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt.

Unter IL-3-Entzug proliferierten die Leervektor-, Wildtyp- und Mutanten-transduzierten Ba/F3-Zellen bei gleichzeitiger EGFR-Expression auf einem niedrigen Niveau ($0,1 \times 10^6$ Zellen/ml, **Abb. 11 A**). Die Proliferation war hierbei ähnlich niedrig wie in einfach-transduzierten Ba/F3-Zellen ohne zusätzliche EGFR-Expression (**Abb. 9 A**). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Proliferation aller Zellen unter Stimulation mit EGF um den Faktor 12 ($1,2 \times 10^6$ Zellen/ml). Innerhalb beider Bedingungen zeigte sich kein deutlicher Effekt der STAT5A-Mutationen E637G und T719M auf die Ba/F3-Zellproliferation gegenüber dem Wildtyp. Unter IL-3-Zugabe proliferierten alle transduzierten Ba/F3 am höchsten (2×10^6 Zellen/ml).

Der Vergleich der Ba/F3-Zellproliferation der einzelnen Zelllinien unter EGF-Zugabe und unter IL-3-Zugabe ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Mutanten- und Wildtyp- sowie Leervektor-transduzierten Ba/F3-Zellen (**Abb. 11 B**). Das berechnete relative Wachstum betrug 65 % und war hiermit deutlich über dem Wachstum der Ba/F3-Zellen unter FLT3-Expression und FLT3LG-Stimulation.

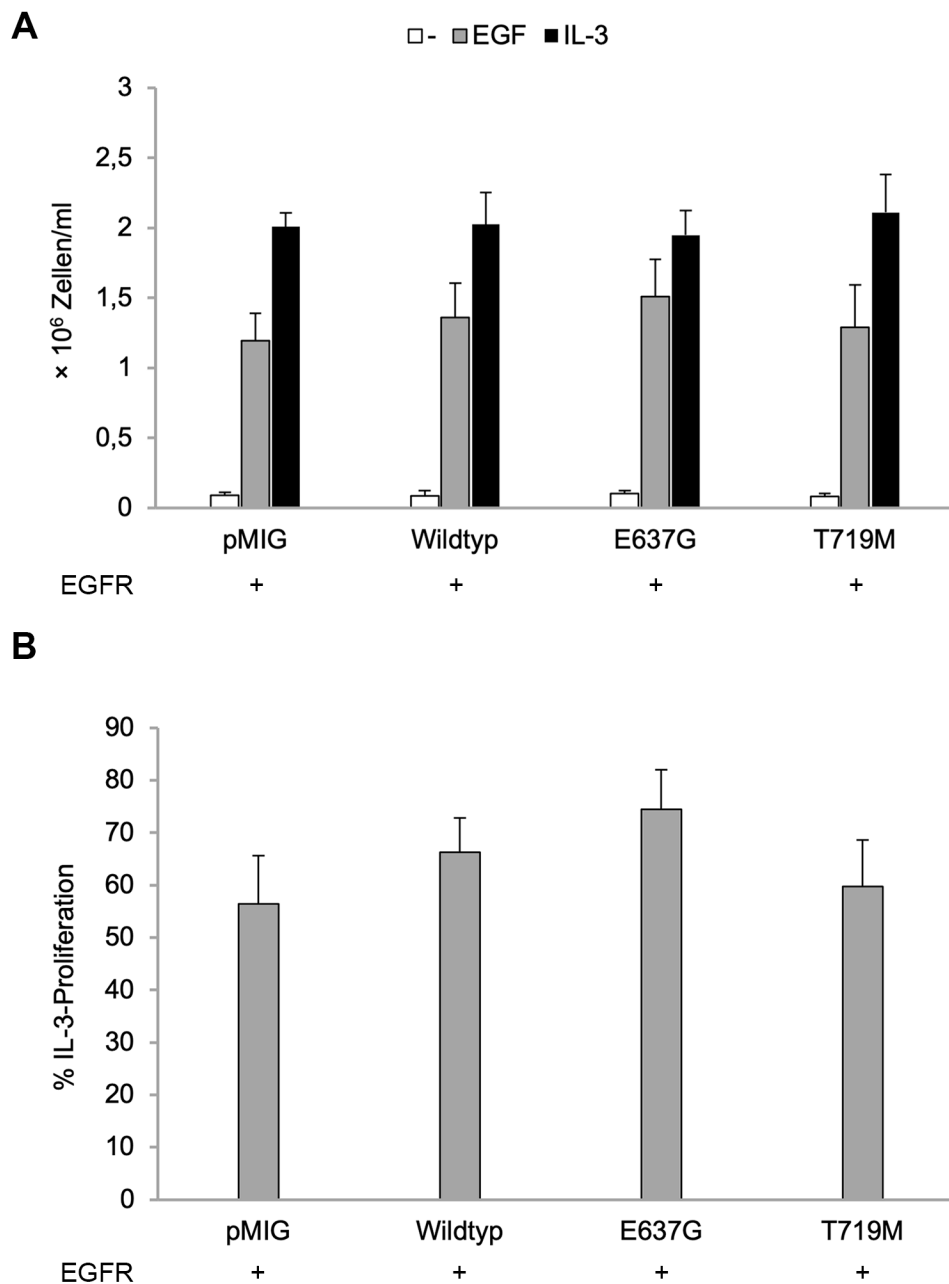


Abb. 11: EGFR-Stimulation erhöht die Ba/F3-Zellproliferation erheblich

Ba/F3-Zellen wurden mit Leervektor, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, T719M) sowie mit EGFR doppelt-transduziert und jeweils 40×10^3 Zellen für 72 Stunden unter IL-3-Entzug, EGF-Zugabe (100 ng/ml) oder IL-3-Zugabe (10 ng/ml) bei 37 °C kultiviert (**A**). Für die jeweiligen Zelllinien wurde das Verhältnis zwischen der Ba/F3-Zellproliferation unter EGF- und IL-3-Zugabe berechnet (**B**). Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

5.4 Keine konstitutive Aktivierung durch E637G und T719M

5.4.1 STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} sind nicht autophosphoryliert

Die Y694-Phosphorylierung ist ein Merkmal konstitutiv-aktiver STAT5A-Mutationen wie beispielsweise der GOF-Mutation N642H. Als Konsequenz ist der Transkriptionsfaktor verlängert transkriptionell aktiv und fördert somit die Proliferation und schützt vor Apoptose. Die LOF-Mutante STAT5A^{Y694F} kann nicht Y694-phosphoryliert werden und dient daher in den Phosphorylierungsstudien als Negativkontrolle.

Nach stabiler Transduktion der Ba/F3-Zellen mit STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} sowie STAT5A^{N642H} als Positiv- oder STAT5A^{Y694F} als Negativkontrolle, wurden die Zellen lysiert und mittels FLAG-Antikörper immunpräzipitiert. In der Western-Blot-Analyse stellte sich bei STAT5A^{WT} sowie STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} ein α -pSTAT5-Signal dar, während dieses bei STAT5A^{Y694F} ausblieb. Aufgrund der unterschiedlichen Mengen an detektierten STAT5A mittels STAT5A-Antikörper, wurden zur vergleichbaren Beurteilung die Signalintensitäten für die jeweiligen Lysate graphisch quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Hierbei war STAT5A^{N642H} in Relation zur nachgewiesenen STAT5A-Menge stärker phosphoryliert als der Wildtyp und die anderen Mutanten (23 % *versus* 7 %). Unter den gleichen Bedingungen war weder STAT5A^{E637G} noch STAT5A^{T719M} autophosphoryliert.

Mit Hilfe des stärkeren Expressionsvektors pcDNA6 und der humanen Nierenepithel-Zelllinie Phoenix-Eco wurde das Experiment wiederholt und die Ergebnisse validiert. Nach transienter Transfektion und anschließender FLAG-Immünpräzipitation (IP) wurde in der Western-Blot-Analyse die Y694-Phosphorylierung der Mutanten untersucht. Erneut zeigte sich lediglich STAT5A^{N642H} als am stärksten phosphoryliert bei geringster nachgewiesener STAT5A-Menge (**Abb. 12**). STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} sowie STAT5A^{WT} waren wiederum nicht autophosphoryliert.

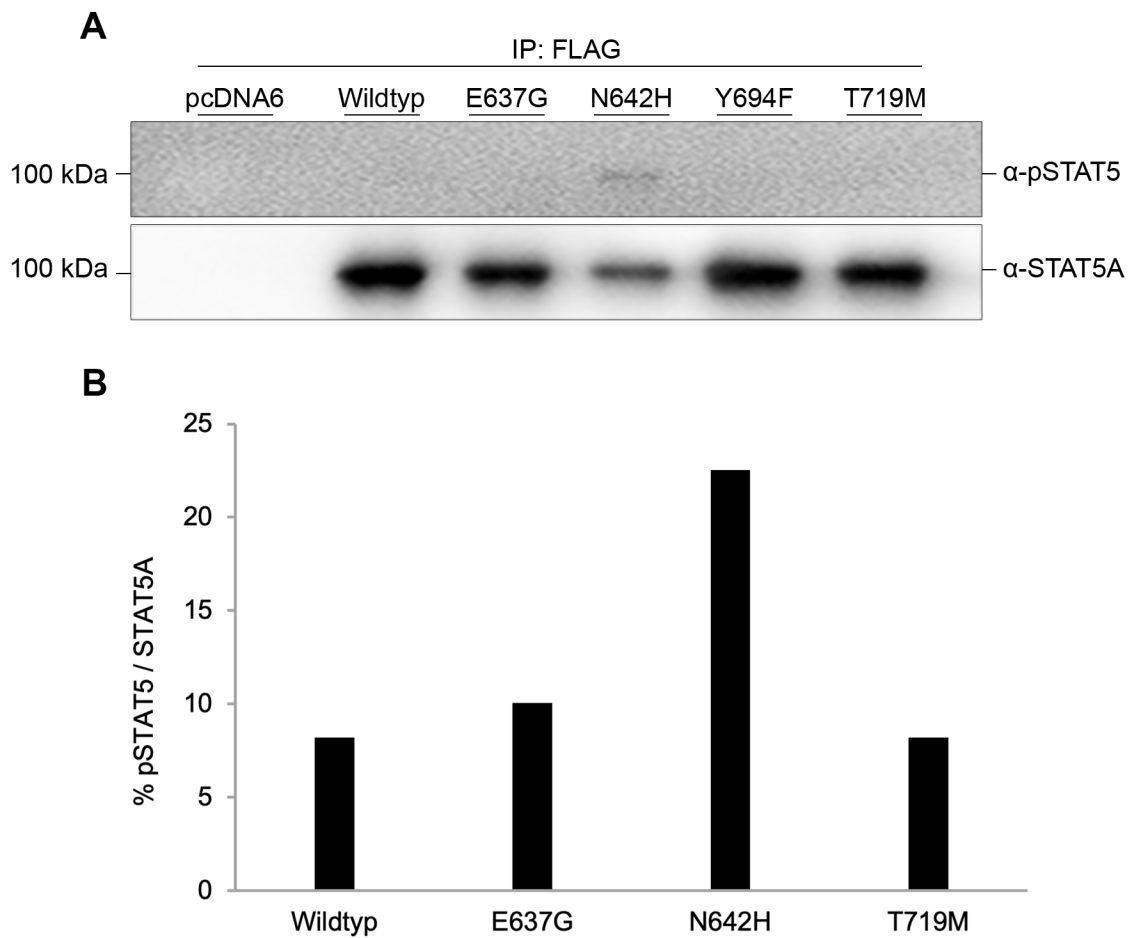


Abb. 12: STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} sind in Phoenix-Eco nicht autophosphoryliert

Western-Blot-Analyse (**A**) von Phoenix-Eco-FLAG-IP-Lysaten nach Transfektion mit Leervektor pcDNA6, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M). pSTAT5A-Detektion mittels α -pSTAT5 und Ladekontrolle mittels α -STAT5A bei 5 μ l IP-Volumen. Graphische Quantifizierung (**B**) mit Hilfe des Programms ImageJ der pSTAT5- und STAT5A-Signalintensität im Western-Blot.

5.4.2 FLT3-Expression erhöht STAT5A-Phosphorylierung geringfügig

Um eine mögliche Interaktion von STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} mit der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 mit Folgen für den Y694-Phosphorylierungsstatus zu untersuchen, wurden mit FLT3 doppelt-transduzierte Ba/F3-Zellen entweder mit oder ohne FLT3LG-Zugabe kultiviert, lysiert und anschließend einer FLAG-IP unterzogen.

Alle transduzierten Zellen mit Ausnahme von STAT5A^{Y694F} wiesen in der Western-Blot-Analyse (**Abb. 13 A**) bei zusätzlicher FLT3-Expression eine Y694-Phosphorylierung auf. Dabei unterschieden sich STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} bezüglich der Signalintensität nicht wesentlich von STAT5A^{WT}. Unter Stimulation mit FLT3LG kam es nicht zu einer erhöhten Y694-Phosphorylierung der transduzierten Ba/F3-Zellen. Nach graphischer Quantifizierung zeigte sich erneut die allgemein erhöhte Y694-Phosphorylierung der N642H-Mutante (**Abb. 13 B**).

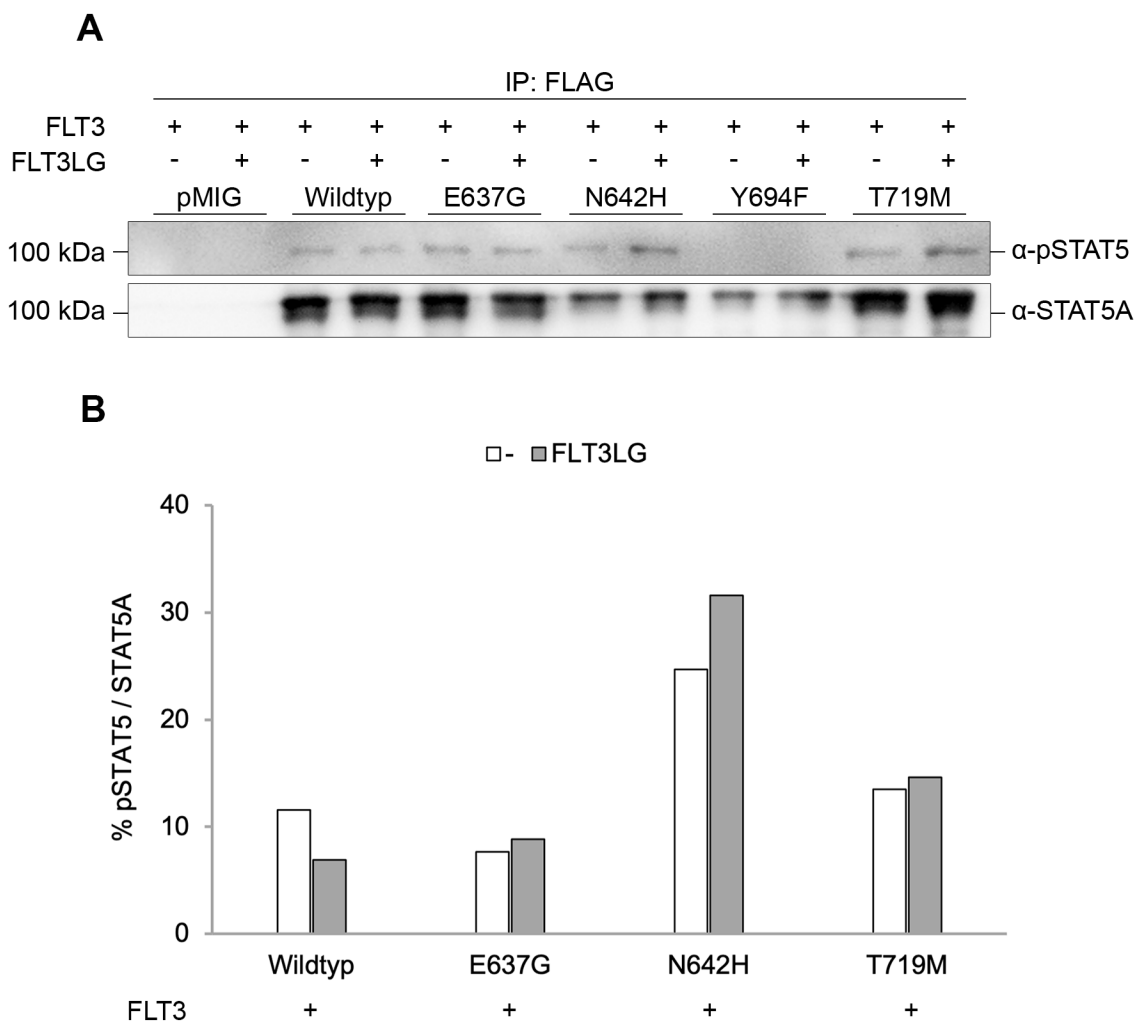


Abb. 13: FLT3-Expression erhöht STAT5A-Phosphorylierung in Ba/F3 geringfügig

Western-Blot-Analyse (A) von Ba/F3-FLAG-IP-Lysaten nach Doppel-Transduktion mit Leervektor pMIG, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M) sowie mit FLT3. Stimulation mit FLT3LG (50 ng/ml) für 10 Minuten. pSTAT5A-Detektion mittels α -pSTAT5 und Ladekontrolle mittels α -STAT5A bei 10 μ l IP-Volumen. Graphische Quantifizierung (B) mit Hilfe des Programms ImageJ der pSTAT5- und STAT5A-Signalintensität im Western-Blot.

Die Wiederholung des Experiments in Phoenix-Eco-Zellen unter Zuhilfenahme des Expressionsvektors pcDNA6 konnte die vorherigen Ergebnisse validieren (**Abb. 14**). Auch hier blieb der Y694-Phosphorylierungsstatus der STAT5A-Mutanten gegenüber dem Wildtyp von zusätzlicher FLT3-Expression unbeeinflusst und die Stimulation mit FLT3LG führte in allen Zellen zu keinem wesentlichen Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung.

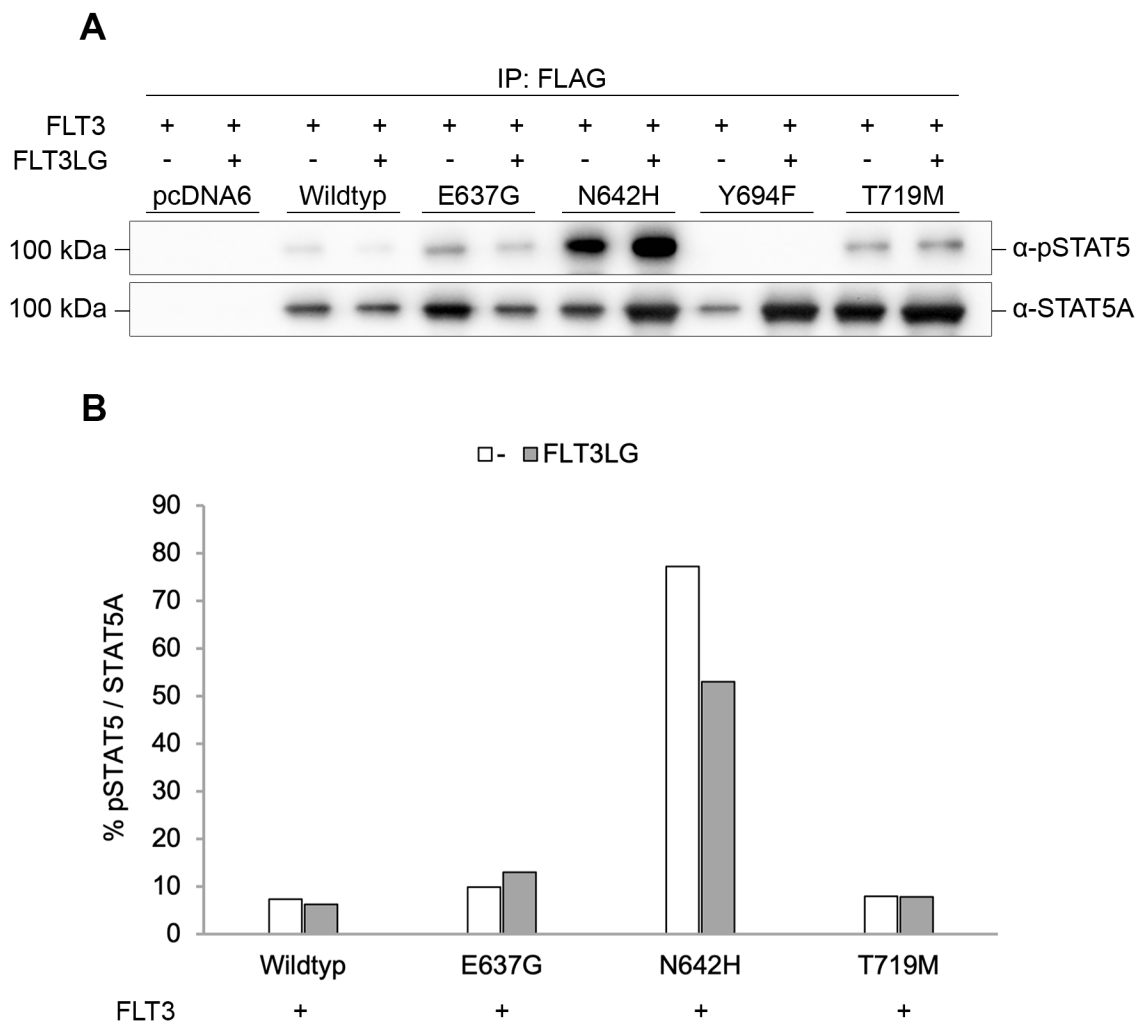


Abb. 14: FLT3-Expression erhöht STAT5A-Phosphorylierung in Phoenix-Eco geringfügig

Western-Blot-Analyse (**A**) mit Phoenix-Eco-FLAG-IP-Lysaten nach Doppel-Transfektion mit Leervektor pcDNA6, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M) sowie mit FLT3. Stimulation mit FLT3LG (50 ng/ml) für 10 Minuten. pSTAT5A-Detektion mittels α -pSTAT5 und Ladekontrolle mittels α -STAT5A bei 5 μ l IP-Volumen. Graphische Quantifizierung (**B**) mit Hilfe des Programms ImageJ der pSTAT5- und STAT5A-Signalintensität im Western-Blot.

5.4.3 EGFR-Stimulation erhöht die STAT5A-Phosphorylierung erheblich

Die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR sollte ebenfalls auf eine mögliche Interaktion mit STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} mit konsekutiver Y694-Phosphorylierung in Ba/F3-Zellen untersucht werden. Hierfür wurden mit EGFR doppelt-transduzierte Ba/F3-Zellen entweder mit oder ohne EGF-Zugabe kultiviert, lysiert und anschließend einer FLAG-IP unterzogen.

Bei zusätzlicher EGFR-Expression ohne EGF-Stimulation zeigte allein STAT5A^{N642H} ein Phosphorylierungs-Signal in der Western-Blot-Analyse (**Abb. 15 A**). Unter Stimulation mit EGF war Y694-phosphoryliertes STAT5A bei den Wildtyp- sowie allen Mutanten-transduzierten Zellen detektierbar. Die Ko-Expression des EGFR erhöhte die Y694-Phosphorylierung von STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} gegenüber STAT5A^{WT} nicht. Die graphische Quantifizierung der Signalintensitäten bestätigte STAT5A^{N642H} mit der höchsten Y694-Phosphorylierung (**Abb. 15 B**).

Das Experiment wurde in Phoenix-Eco-Zellen mit Hilfe des Expressionsvektors pcDNA6 wiederholt, um die vorherigen Ergebnisse zu validieren (**Abb. 16**). Auch hier blieb der Y694-Phosphorylierungsstatus von STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} gegenüber STAT5A^{WT} von zusätzlicher EGFR-Expression unbeeinflusst. Lediglich STAT5A^{N642H} zeigte bereits allein unter EGFR-Expression ohne zusätzliche EGF-Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung. Die Stimulation mit EGF führte, wie bereits in Ba/F3-Zellen veranschaulicht, zu einem deutlichen Anstieg der Y694-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors in allen transduzierten Zellen.

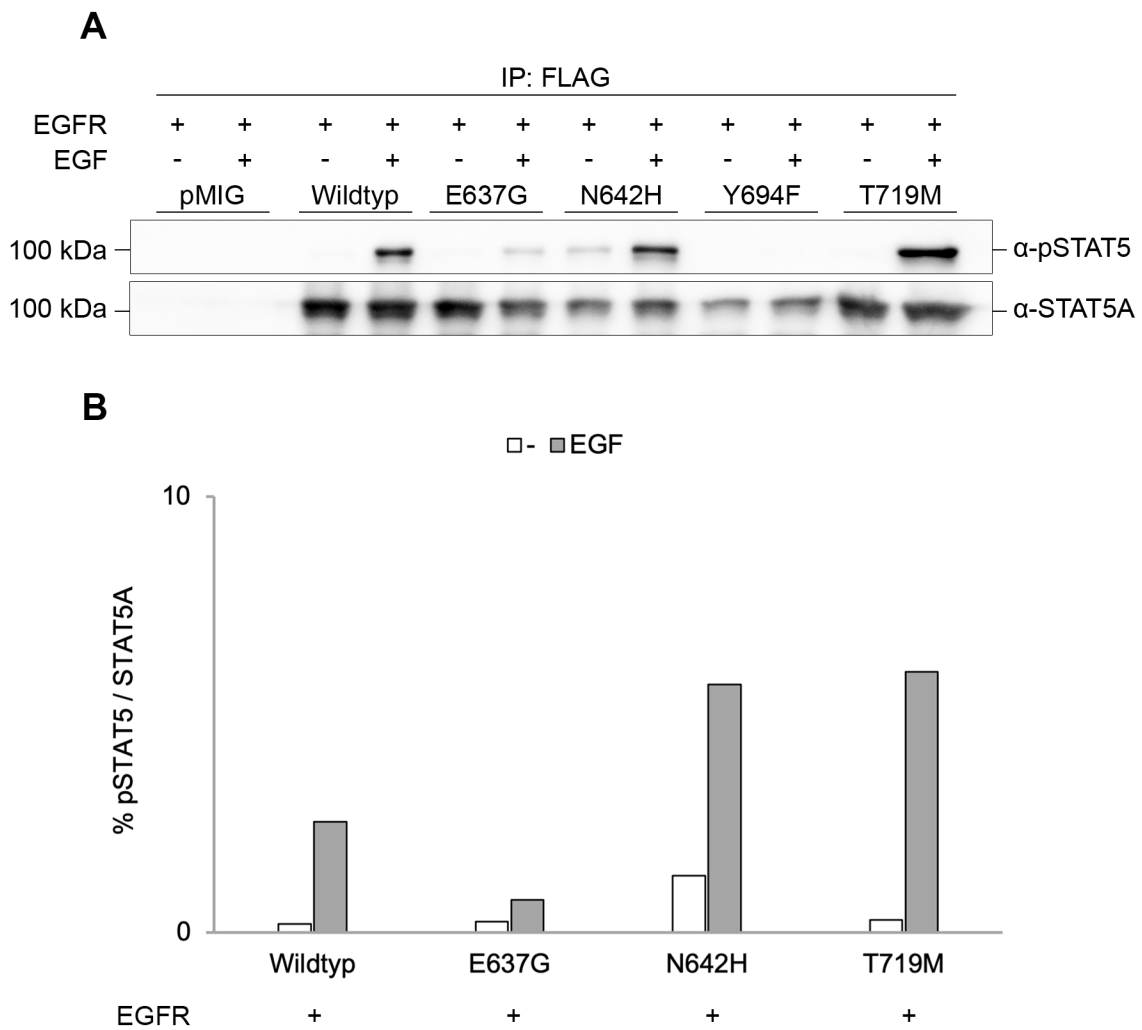


Abb. 15: EGFR-Stimulation erhöht STAT5A-Phosphorylierung in Ba/F3 erheblich

Western-Blot-Analyse (**A**) von Ba/F3-FLAG-IP-Lysaten nach Doppel-Transduktion mit Leervektor pMIG, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M) sowie mit EGFR. Stimulation mit EGF (100 ng/ml) für 10 Minuten. pSTAT5A-Detektion mittels α -pSTAT5 und Ladekontrolle mittels α -STAT5A bei 10 μ l IP-Volumen. Anschließend graphische Quantifizierung (**B**) mit Hilfe des Programms ImageJ der pSTAT5- und STAT5A-Signalintensität im Western-Blot.

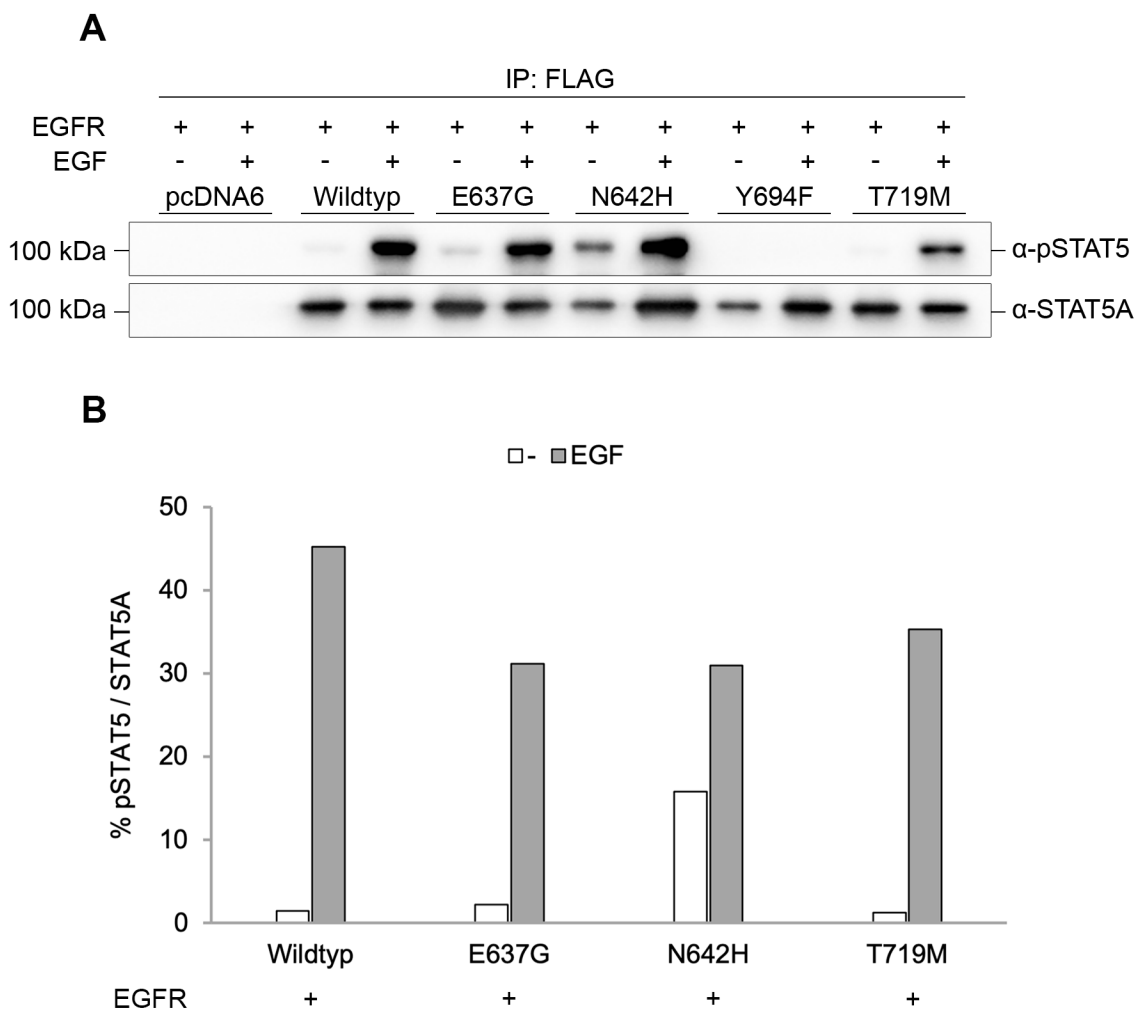


Abb. 16: EGFR-Stimulation erhöht STAT5A-Phosphorylierung in Phoenix-Eco erheblich

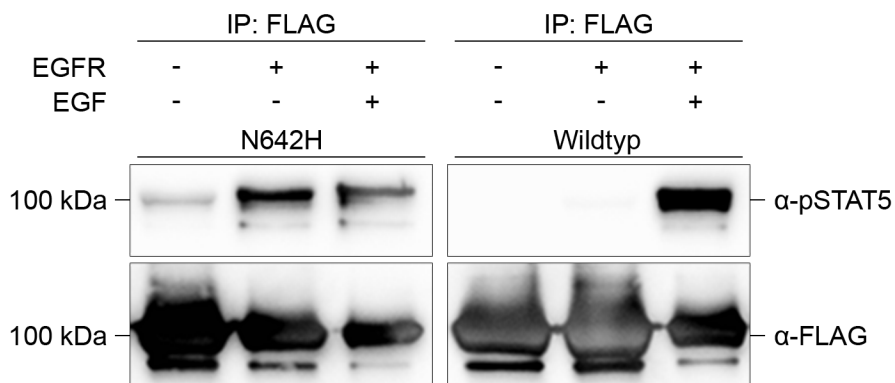
Western-Blot-Analyse (A) von Phoenix-Eco-FLAG-IP-Lysaten nach Doppel-Transfektion mit Leervektor pcDNA6, STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (E637G, N642H, Y694F, T719M) sowie mit EGFR. Stimulation mit EGF (100 ng/ml) für 10 Minuten. pSTAT5A-Detektion mittels α -pSTAT5 und Ladekontrolle mittels α -STAT5A bei 5 μ l IP-Volumen. Anschließend graphische Quantifizierung (B) mit Hilfe des Programms ImageJ der pSTAT5- und STAT5A-Signalintensität im Western-Blot.

5.4.4 N642H und EGFR aktivieren STAT5A potenziell synergistisch

In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass STAT5A^{N642H} als eigenständige, aktivierende Mutante (**Abb. 12**) und die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR (**Abb. 15** und **Abb. 16**) den Y694-Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors erhöhen. Nun sollte untersucht werden, ob diese Effekte eher additiver Art sind oder ob sie möglicherweise synergistisch wirken.

Hierfür wurde die HEK 293T-Zelllinie Phoenix-Eco mit STAT5A^{WT} oder STAT5A^{N642H} transfiziert und jeweils zusätzlich mit EGFR doppelt-transduziert. Anschließend wurden diese Zellen entweder mit oder ohne EGF-Zugabe inkubiert, lysiert, FLAG-immunpräzipitiert und die Y694-Phosphorylierung in der Western-Blot-Analyse dargestellt (**Abb. 17 A**). Dabei wies STAT5A^{N642H} bereits ohne zusätzliche Rezeptor-Expression eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Phosphorylierung auf (4 % *versus* 1 %, **Abb. 17 B**). Bei zusätzlicher EGFR-Expression verstärkte sich die Phosphorylierung des N642H-mutierten Transkriptionsfaktors erheblich, während die Phosphorylierung des Wildtyps nur minimal anstieg (34 % *versus* 2 %). Wurden diese Zellen zusätzlich mit EGF stimuliert, kehrte sich das Verhältnis des Phosphorylierungsstatus um und der Wildtyp wurde stärker aktiviert als STAT5A^{N642H} (63 % *versus* 41 %).

A



B

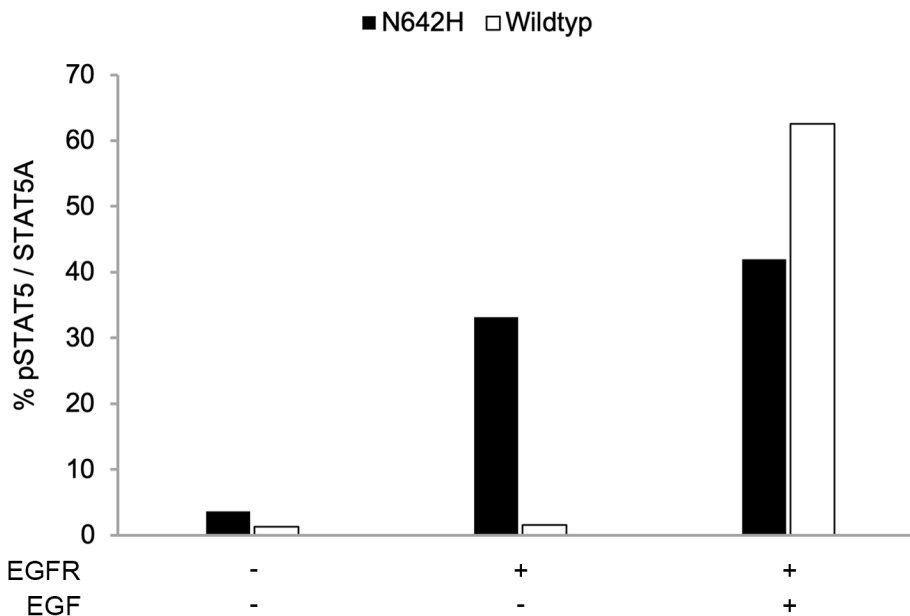


Abb. 17: N642H und EGFR aktivieren STAT5A potenziell synergistisch

Western-Blot-Analyse (A) mit Phoenix-Eco-FLAG-IP-Lysaten nach Doppel-Transfektion mit STAT5A-Wildtyp oder -N642H sowie mit EGFR. Stimulation mit EGF (100 ng/ml) für 10 Minuten. pSTAT5A-Detektion mittels α-pSTAT5 und Ladekontrolle mittels α-FLAG bei 10 µl IP-Volumen. Anschließend graphische Quantifizierung (B) mit Hilfe des Programms ImageJ der pSTAT5- und STAT5A-Signalintensität im Western-Blot.

5.5 Keine Akkumulation von E637G und T719M im Nukleus

Die Lokalisation des phosphorylierten STAT5 lässt Rückschlüsse auf dessen Aktivität zu. Aktivierende STAT5A-Mutationen führen zu einem erhöhten Level an Y694-phosphorylierten STAT5A und zum anderen zu einer nukleären Akkumulation des phosphorylierten Proteins aufgrund der verlängerten transkriptionellen Aktivität. Mittels immunzytochemischer Färbung wurde die Lokalisation des pSTAT5 in U-2 OS-Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit dem STAT5A-Wildtyp oder den Mutanten N642H, Y694F, E637G und T719M transient transfiziert, fixiert und mit einem pSTAT5-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden konfokal-mikroskopische Aufnahmen des häufigsten Phänotyps angefertigt und die zelluläre Verteilung des pSTAT5-Signals im Programm ImageJ analysiert.

Im Vergleich zu STAT5A^{WT} hatten weder STAT5A^{E637G} noch STAT5A^{T719M} Einfluss auf die zelluläre pSTAT5-Verteilung in U-2 OS-Zellen (**Abb. 18 A**). Die Signalverteilung des Wildtyps und der Mutanten glich sich in hohem Maße. In Kontrast dazu reicherte STAT5A^{N642H} hingegen deutlich Y694-phosphoryliertes STAT5 im Nukleus an. STAT5A^{Y694F} als Negativkontrolle stellte sich ohne pSTAT5-Signal dar. Die graphische Auswertung (**Abb. 18 B**) der pSTAT5-Signalverteilung konnte die deutliche nukleäre Anreicherung (67 %) des pSTAT5-Signals in STAT5A^{N642H}-transfizierten Zellen bestätigen. Im Vergleich dazu war das Signal bei STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} hauptsächlich im Zytoplasma detektierbar (90 %) und damit vergleichbar mit dem Wildtyp.

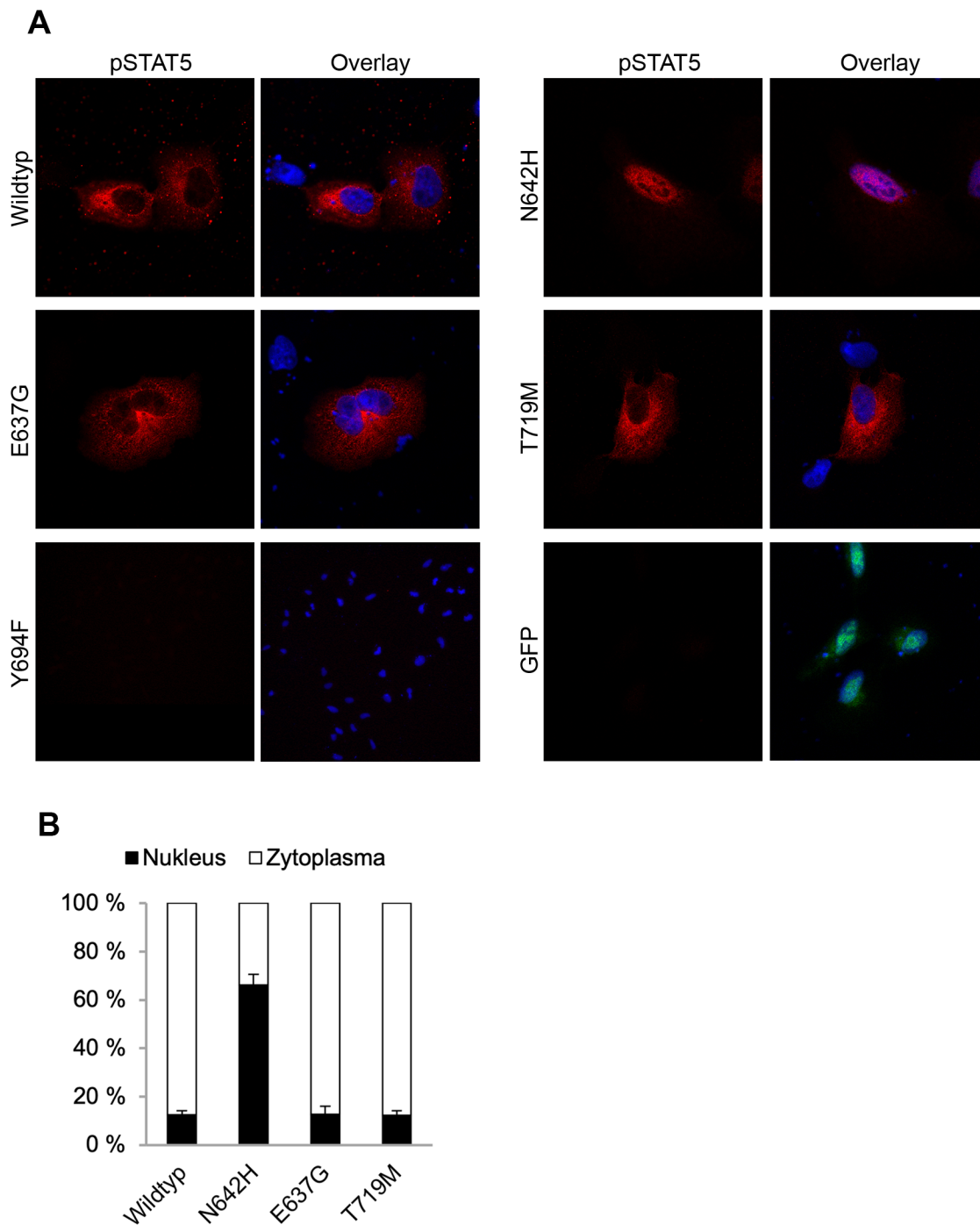


Abb. 18: Keine nukleäre pSTAT5-Anreicherung durch STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M}

Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von U-2 OS-Zellen, die mit STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (N642H, Y694F, E637G, T719M) transfiziert wurden (**A**). pSTAT5-Detektion mittels α -pSTAT5 in Rot, DNA-Färbung mittels DAPI in Blau, Transfektionskontrolle mittels GFP in Grün. Y694F-Mutante in 20 \times Vergrößerung. Zelluläre pSTAT5-Signalverteilung in U-2 OS-Zellen, die mit dem STAT5A-Wildtyp oder -Mutante (N642H, E637G, T719M) transfiziert wurden (**B**). Analyse mit Hilfe des Programms ImageJ von konfokal-mikroskopischen Aufnahmen. Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 Replikaten.

6. Diskussion

6.1 Ergebnisübersicht

In dieser Arbeit konnte mittels *in-vitro*-Experimenten veranschaulicht werden, dass die in AML-Patienten gefundenen STAT5A-Mutationen E637G und T719M in den verwendeten Modellsystemen kein transformierendes Potenzial besitzen. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurde in ersten Schritten die STAT5A-cDNA in Expressionsvektoren kloniert und mit den Mutationen sowie mit der *Gain-of-function*-Mutation N642H und *Loss-of-function*-Mutation Y694F versehen. Durch retrovirale Infektion und wiederholte Zellsortierung wurden als nächstes stabile Ba/F3-Zelllinien generiert, die mit dem STAT5A-Wildtyp oder -Mutanten einzel- oder zusätzlich mit den Rezeptoren FLT3 oder EGFR doppelt-transduziert waren. Nachdem die regelrechte Expression der im Vorfeld sequenzierten DNA-Konstrukten in allen Zelllinien mittels Western-Blot überprüft wurde, ist das Proliferationsverhalten der Mutanten untersucht worden.

Dabei waren die STAT5A-Mutanten nach 72 Stunden nicht imstande die IL-3-abhängigen Ba/F3-Zellen Zytokin-unabhängig zu transformieren und proliferierten unter IL-3-Entzug auf einem zum Wildtyp vergleichbaren niedrigem Niveau. Auch die, für konstitutiv-aktive STAT5-Mutanten typische, Autophosphorylierung des Tyrosins Y694 blieb in denselben Zellen aus. Dieses Resultat ließ sich in der HEK 293T-Zelllinie Phoenix-Eco reproduzieren. Bei Ko-Expression der Rezeptoren FLT3 oder EGFR waren die Zellen durch die jeweiligen Liganden stimulierbar, jedoch blieb eine Interaktion der Mutanten mit den Rezeptoren in Hinblick des Proliferationsverhaltens und Phosphorylierungsstatus aus. Lediglich die Ko-Expression der GOF-Mutante STAT5A^{N642H} mit EGFR entfaltete eine möglicherweise synergistische Wirkung auf die Y694-Phosphorylierung von STAT5A. Um die zelluläre Verteilung des Y694-phosphorylierten STAT5 zu analysieren, wurden U-2 OS-Zellen transfiziert, immunzytochemisch gefärbt und konfokal-mikroskopisch untersucht. In diesen Zellen akkumulierte Y694-phosphoryliertes STAT5 lediglich nach Transfektion mit STAT5A^{N642H} im Nukleus. Zusammenfassend konnte im Rahmen der funktionellen Charakterisierung der STAT5A-Mutationen E637G und T719M kein onkogener Phänotyp beobachtet werden.

6.2 Proliferationsverhalten der STAT5A-Mutanten

Die mittels retroviraler Infektion und anschließender Zellsortierung generierten stabilen Ba/F3-Zelllinien wurden zunächst auf die regelrechte STAT5- und Rezeptor-Expression überprüft. Hierbei fiel eine schwache Detektion durch den FLAG-Antikörper bei der Y694F-Mutante in Ganzzell-Lysaten der sowohl einzeln als auch doppelt-transduzierten Ba/F3-Zellen auf. Um einen möglichen dominant-negativen Effekt auf die STAT5-Expression durch die LOF-Mutante auszuschließen, wurde das Protein mittels eines STAT5A-Antikörpers direkt nachgewiesen. Dabei zeigte sich ein STAT5A-Signal, das mit dem der Wildtyp-transduzierten Ba/F3-Zellen vergleichbar war (**Abb. 7** und **Abb. 8**). In der Erstbeschreibung des STAT5A-Tyrosins Y694 durch Gouilleux et al. konnte über einen Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) ebenfalls eine regelrechte STAT5-Expression nach Transfektion von COS-Zellen mit der STAT5A^{Y694F}-cDNA nachgewiesen werden²⁴. Zudem konnte durch den direkten STAT5A-Nachweis in Ba/F3-Zellen auch das geringfügig kleinere, endogene Protein nachgewiesen werden, wie auch schon durch Spiekermann et al. über eine STAT5-Immunpräzipitation nicht-transfizierter Ba/F3-Zellen gezeigt wurde⁸⁷.

Das Wachstum und Überleben der murinen Pro-B-Zelllinie Ba/F3 ist von Interleukin-3 abhängig¹⁴⁶. Dieser Umstand wird seit 1988 für die Erforschung des onkogenen Potentials neuer, leukämischer Mutationen genutzt¹⁴⁷. Die bekannten, konstitutiv-aktiven STAT5A-Mutanten STAT5A^{N642H}¹³⁷ und STAT5A^{I*6}¹⁴⁸, letztere die wesentliche S711F-Substitution tragend, sind in der Lage, Ba/F3-Zellen IL-3-unabhängig zu transformieren. In den durchgeführten Proliferationsassays waren die STAT5A-Mutanten STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} nicht imstande den stabilen Ba/F3-Zelllinien ein Zellwachstum unter IL-3-Entzug zu ermöglichen. Die Lebendzellzahl beider Mutanten war nach 72 Stunden Inkubation in IL-3-freien Medium vergleichbar mit der Lebendzellzahl der Wildtyp- und Leervektor-transduzierten Ba/F3-Zellen. Die Abhängigkeit der Zellen von Interleukin-3 wird durch das insgesamt niedrige Proliferationsniveau ohne Zytokin verdeutlicht (**Abb. 9**). Im Gegensatz dazu wuchsen die Zellen unter IL-3-Zugabe erwartungsgemäß auf hohem Niveau. Unter dieser Bedingung proliferierte die T719M-Mutante geringfügig höher als der Wildtyp. Dies unterstreicht erneut die IL-3-Abhängigkeit der

Zellen trotz eines möglicherweise dahinterstehenden schwach-transformativen Charakters der T719M-Mutation. Nosaka et al. beobachteten bereits in den ersten 24 Stunden divergierende Wachstumskurven zwischen der Mutante STAT5A^{1*6} und dem Wildtyp ¹⁴⁸.

In den Experimenten von Ariyoshi et al. glichen sich die Wachstumskurven der mit STAT5A^{N642H} und STAT5A^{Y694F}-transfizierten Ba/F3-Zellen bis zum 72-Stunden-Zeitpunkt und trennten sich erst danach, mit einer zunächst stagnierenden und dann nach sechs Tagen steigenden Proliferationskurve für die GOF-Mutante STAT5A^{N642H} ¹³⁷. Daher sollte zur weiterführenden Beantwortung der Fragestellung die Verlängerung der Versuchsdauer auf beispielsweise sieben Tage in Erwägung gezogen werden unter Hinzunahme von STAT5A^{Y694F} als Negativ- sowie der STAT5A^{N642H} als Positivkontrolle. Es ist denkbar, dass sich eine pro-proliferative Aktivität von STAT5A^{E637G} oder STAT5A^{T719M} ebenfalls erst nach 72 Stunden zeigt. Ergänzend zur Lebendzellzahlbestimmung ist auch die Messung der Apoptoserate mittels Annexin V -Färbung und anschließender FACS-Analyse denkbar, um Effekte der Mutanten auf die Apoptoseregulation zu untersuchen ¹⁴⁹.

Als Bestandteil FLT3- und EGFR-vermittelter Signalwege wurde eine potenzielle Interaktion zwischen den Rezeptoren und den STAT5-Mutanten mit Auswirkungen auf die Zellproliferation von Ba/F3-Zellen untersucht. Dabei reagierten die Mutanten auf die Ko-Expression eines Rezeptors verglichen zum Wildtyp nicht mit erhöhter Proliferation (**Abb. 10** und **Abb. 11**). Daher ist eine Mutanten-Rezeptor-Interaktion mit konsekutiver Erhöhung Ba/F3-Zellproliferation unwahrscheinlich. Die Kultivierung in Medium mit den jeweiligen Liganden FLT3LG oder EGF führten nach 72 Stunden zu unterschiedlich hohen Lebendzellzahlen. Dies verdeutlicht die unterschiedlichen Rollen der Rezeptoren in der Zellproliferation. In Kohärenz zu den vorliegenden Resultanten zeigten in den Vorarbeiten von Spiekermann et al. FLT3-transduzierte Ba/F3-Zellen im Vergleich zu Leervektor-transduzierten Zellen eine geringe Proliferationserhöhung ⁸⁶, während die Gruppe um Jiang et al. in den ersten 72 Stunden des IL-3-Entzugs eine zwischen

EGFR-stimulierten und IL-3-stimulierten Zellen ähnliche hohe Proliferation feststellte¹⁵⁰.

Zusammenfassend blieb eine zelluläre Transformation in den durchgeführten Proliferationsassays durch die STAT5A-Mutationen E637G und T719M aus.

6.3 Keine Autophosphorylierung durch STAT5A-Mutanten

Gouilleux et al. konnten früh nach der Erstbeschreibung des Transkriptionsfaktors die Notwendigkeit der Y694-Phosphorylierung für dessen transkriptionelle Aktivität belegen²⁴. Wenig später erwies sich die erhöhte Phosphorylierung des Tyrosins Y694 selbst in nicht-stimulierten Zellen als ein weiteres, klassisches Kennzeichen konstitutiv-aktiver STAT5A-Mutanten wie beispielsweise STAT5A^{N642H}¹³⁷. Entsprechend wurden STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} auf eine mögliche Autophosphorylierung des Proteins untersucht. Aufgrund des zuvor nachgewiesenen, endogenen STAT5-Hintergrunds wurde das transduzierte Protein mittels FLAG-Immunpräzipitation aus Ba/F3-Ganzzell-Lysaten isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurden die hergestellten IP-Lysate mit einem STAT5-Antikörper, der spezifisch für das phosphorylierte Tyrosin Y694 ist, inkubiert. Aufgrund der unterschiedlich großen Mengen an nachgewiesenem IP-Lysat auf den Nitrozellulose-Membranen war eine graphische Quantifizierung der Phospho-Signalintensität in Relation zur FLAG-Signalintensität notwendig. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Gouilleux sowie Ariyoshi et al. stellten sich die *Loss-of-function*-Mutante Y694F und die *Gain-of-function*-Mutante N642H als regelrechte Negativ- und Positivkontrollen dar. Im Gegensatz dazu und in Ähnlichkeit zum Wildtyp wiesen nicht-stimulierte, STAT5A^{E637G}- oder STAT5A^{T719M}-transduzierte Ba/F3-Zellen keine erhöhte Y694-Phosphorylierung auf und der, bei der N642H-Mutante beobachtete, konstitutiv-aktive Phänotyp blieb aus.

Die Klonierungsstrategie unter Verwendung des Expressionsvektors pcDNA6 und das Heranziehen der Phoenix-Eco-Zelllinie zur Herstellung von *Virus containing medium* erlaubte die Validierung der vorangegangenen Ergebnisse in einem

alternativen Zellmodell mit Hilfe eines alternativen Plasmids. In Einklang mit den Resultaten in den generierten Ba/F3-Zelllinien wies auch hier lediglich die GOF-Mutante STAT5A^{N642H} eine Autophosphorylierung des Tyrosins Y694 auf (**Abb. 12**). Vermutlich aufgrund des stärkeren Expressionsvektors pcDNA6 war nach diesem Versuch bereits ohne graphische Quantifizierung eine Interpretation des Phosphorylierungs-Signals möglich. Eine weiteres, alternatives Zellmodell zur Validierung der Resultate könnte die lentivirale Transduktion humaner AML-Zelllinien darstellen. Da die Y694-Phosphorylierung notwendig für die Konformationsänderung und Transaktivierung durch STAT5A ist, wäre auch denkbar, die transkriptionelle Aktivität in einem nächsten Schritt mit Hilfe eines Luciferase-Assays zu erfassen. Nachdem Andersson et al. *via* Exom-Sequenzierung von CD4⁺ T-Zell LGL-Erkrankten die zwei neuen, somatischen STAT5B-Mutationen Q706L und S715F in der Transaktivierungs-Domäne detektierten, konnten sie diesen Assay dazu nutzen, letztere als die aktivierende Mutation zu identifizieren, um als Nächstes mittels Western-Blot die potenzielle Autophosphorylierung erfolgreich nachzuweisen ¹⁵¹.

Um auch in diesem Kontext eine mögliche Interaktion der Mutanten mit den Rezeptoren FLT3 oder EGFR mit Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus zu untersuchen, wurden die doppelt-transduzierten Ba/F3-Zellen lysiert, immunpräzipitiert und mit demselben pY694-Antikörper inkubiert. Dabei konnten die Rezeptoren keine vermehrte Phosphorylierung der Mutanten gegenüber dem Wildtyp in nicht-stimulierten Zellen induzieren (**Abb. 13; Abb. 15**). Auch diese Ergebnisse ließen sich in Phoenix-Eco-Zellen reproduzieren (**Abb. 14; Abb. 16**). Die Stimulation FLT3-exprimierender Zellen mit FLT3LG hatte einen geringfügigen Effekt auf STAT5, wie auch schon Spiekermann et al. für Ba/F3-Zellen ⁸⁶ und Choudhary et al. für 32D-Zellen ⁸⁹ zeigen konnten. Im Kontrast dazu steht die in dieser Arbeit nachgewiesene, weitaus deutlichere Stimulation durch EGF in EGFR-exprimierenden Zellen. Olayioye et al. beleuchteten in ihren Arbeiten die von STAT5 affizierten Signalwege und konnten schon früh eine deutliche Stimulation durch EGF in der humanen A431-Zelllinie nachweisen ¹⁵².

Im Gegensatz zu den Mutanten STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} entfaltete die Ko-Expression der N642H-Mutante mit EGFR in beiden Zelllinien eine möglicherweise synergistische Wirkung auf die Y694-Phosphorylierung von STAT5A (**Abb. 17**). Die einzelnen Effekte auf den Phosphorylierungsstatus gingen dabei über ein rein additives Maß hinaus, sodass eine synergistische Interaktion wahrscheinlich ist. In einer wichtigen Arbeit zur Aufschlüsselung des onkogenen Potentials von STAT5B^{N642H} haben De Araujo et al. die Kristallstruktur des STAT5B-Wildtyps sowie der N642H-Mutante identifiziert und den aggressiven Charakter der Mutation im transgenen Mausmodell, im Sinne einer raschen T-Zell-Infiltration der Haut, Lymphknoten, Leber und Milz, bestätigt¹²³. Die mutierte SH2-Domäne kann demnach in einer Konformation vorliegen, in welcher sich die Peptidbindende Tasche besonders weit öffnet und dadurch eine starke Bindung zwischen Monomeren ermöglicht. Die andere Konformation der Domäne schütze die Mutante vor Dephosphorylierung durch Phosphatasen. Als Konsequenz ergäbe sich eine prolongierte Genregulation durch das Protein sowie eine insgesamt verlängerte Aktivitätsdauer. Die Aktivierung von STAT5 infolge der EGF-Stimulation kann direkt Rezeptor-vermittelt oder indirekt über Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Src erfolgen⁶². Insbesondere vor dem Hintergrund einer FLT3^{ITD} haben verschiedene Forschungsgruppen eine aktivierende Interaktion zwischen Src und STAT5 belegen können^{89,91,92}. Zum einen könnte somit die alleinige Überexpression des Rezeptors mit konsekutiver direkter Aktivierung und zum anderen die nun vermehrte Interaktion mit Src die indirekte Aktivierung von STAT5 zur Folge haben. Das Zusammenspiel der strukturellen Gegebenheiten der N642H-Mutante gemeinsam mit dem aktivierenden Milieu durch EGFR könnte die starke Stimulation des Transkriptionsfaktors und erklären (**Abb. 19**).

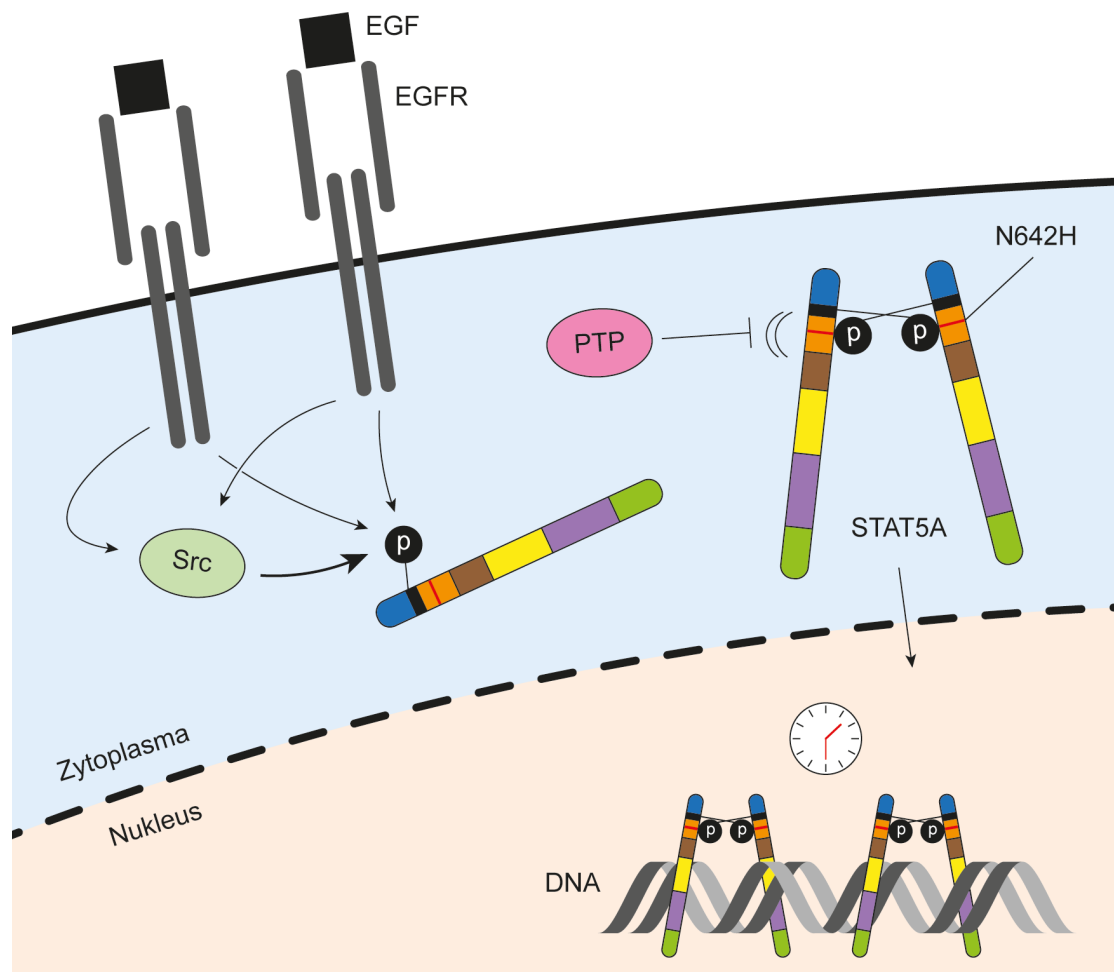


Abb. 19: Synergistische Aktivierung von STAT5A durch EGFR und N642H

Schematische Darstellung des erhöhten Phosphorylierungs-Status von STAT5A durch den Rezeptor EGFR, Src und die GOF-Mutation N642H und die daraus resultierende verlängerte Aktivitätsdauer. PTP = Protein-Tyrosin-Phosphatase.

Zusammenfassend konnte keine STAT5-Autophosphorylierung durch die Mutanten STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M}, jedoch eine gemeinsame Stimulation durch STAT5A^{N642H} und EGFR in Ba/F3- und Phoenix-Eco-Zellen beobachtet werden.

6.4 STAT5A-Mutanten akkumulieren nicht im Nukleus

Transkriptionell aktive STAT5A-Dimere werden im Rahmen aktivierender Signalkaskaden an Y694 phosphoryliert und akkumulieren physiologisch aufgrund ihrer stabilen DNA-Bindung vorübergehend im Zellnukleus⁴⁴. Die funktionelle Charakterisierung der *Gain-of-function*-Mutante STAT5A^{N642H} in 3T3-Zellen durch

Ariyoshi et al. ergab einen ähnlichen Phänotyp auch in nicht-stimulierten Zellen¹³⁷. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf die strukturellen Unterschiede zum Wildtyp, die eine aktive, DNA-bindende Konformation fördern, zurückzuführen¹²³. Da vor diesem Hintergrund Rückschlüsse von der Lokalisierung des Y694-phosphorylierten Transkriptionsfaktors auf dessen transkriptionelle Aktivität gezogen werden können, wurden transfizierte U-2 OS-Zellen immunzytochemisch gefärbt und die Verteilung des pSTAT5-Signals im nukleären und zytoplasmatischen Kompartiment analysiert. Endogener STAT5-Hintergrund ließ sich vermeiden, indem die Aufnahmeeinstellungen auf Leervektor-transfizierte Zellen normiert wurden. Während nicht-stimulierte, Wildtyp-transfizierte Zellen ein überwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes pSTAT5-Signal aufwiesen, war sowohl in den STAT5A^{Y694F}- als auch in den Leervektor-transfizierten Zellen kein Signal nachweisbar. Erwartungsgemäß zeigte die GOF-Mutante STAT5A^{N642H} ein gegenüber dem Wildtyp erhöhtes pSTAT5-Kernsignal, wohingegen weder STAT5A^{E637G} noch STAT5A^{T719M} vermehrt Y694-phosphoryliert im Nukleus nachgewiesen werden konnte (**Abb. 18**). Nichtsdestotrotz sind solche Daten mit Vorsicht zu interpretieren, da immunzytochemische Färbungen von fixierten Zellen in einem transienten System lediglich eine Momentaufnahme widerspiegeln und eine hohe Anzahl an Replikaten zur Validierung des Ergebnisses notwendig ist.

Zeng et al. konnten in Ba/F3-Zellen zeigen, dass auch nicht-phosphoryliertes STAT5B als Monomer einem konstanten Shuttling zwischen Zytoplasma und Nukleus unterliegt und identifizierten hierbei die *Coiled-Coil*-Domäne für den nukleären Import und CRM1 für den Export als essenziell¹⁵³. Ersteres konnten Iyer et al. für STAT5A bestätigen und zeigen, dass die Tyrosin-Phosphorylierung zwar wichtig für die nukleäre Akkumulation, aber nicht notwendig für die Translokation ist⁴⁴. Diese beruht auf einer Interaktion zwischen der *Coiled-Coil*-Domäne und dem Importin- α 3/ β 1-Komplex⁴⁵. Insofern erwies sich ein ursprünglicher Versuchsansatz unter Verwendung eines FLAG-Antikörpers als nicht zielführend, da aufgrund des beschriebenen Umstandes auch Y694F-mutiertes STAT5A im Nukleus detektiert werden konnte. Um Rückschlüsse auf die transkriptionelle Aktivität der untersuchten Mutanten bei regelrechter Negativkontrolle ziehen zu können, ist nunmehr die Untersuchung des phosphorylierten Proteins zur Beantwortung der zu Grunde liegende Fragestellung geeignet.

6.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die STAT5A-Mutationen E637G und T719M in den hier angewandten Zellmodellen und Methoden keinen onkogenen Phänotyp verursachten. Die GOF-Mutation N642H und LOF-Mutation Y694F erwiesen sich als adäquate Kontrollen für Phosphorylierungsstudien, deren Ergebnisse in einem alternativen Zellmodell reproduzierbar waren. Neben den jüngsten Untersuchungen zur GOF-Mutation N642H konnten Schwaller et al. mittels murinen Transplantationsmodells einen myeloproliferativen Phänotyp durch die konstitutiv-aktive Mutante STAT5A^{1*6} provozieren¹⁵⁴ und Moriggl et al. der STAT5A-Mutation S711F (cS5^F) ein leukämisches Potential zuschreiben¹⁵⁵.

Die beiden identifizierten STAT5A-Mutationen E637G und T719M wiesen zur Diagnose und Rezidiv eine hohe VAF auf und konnten in der Remission nicht detektiert werden. Dies spricht dafür, dass STAT5A^{E637G} und STAT5A^{T719M} Leukämie-spezifische, somatische Mutationen sind und es sich um Events in der Evolution der leukämischen Stammzelle handelt, diese jedoch vermutlich nicht zum Ausbruch der AML beigetragen haben und Passenger-Mutationen darstellen könnten¹⁵⁶. Beide Mutationen waren während der Abschlussphase dieser Dissertation weder im *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC), noch in der Datenbank dbSNP des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gelistet. In der Literatur zu malignen Neoplasien durch STAT5 werden selten Unterschiede zwischen den Homologen STAT5A und STAT5B beleuchtet. Im Zusammenhang mit dem Onkogen BCR-Abl nimmt STAT5B die Hauptrolle ein, während STAT5A eher eine untergeordnete Rolle zugeschrieben wird^{115,157}. Für das Onkogen NPM1-ALK wird das Homolog STAT5A sogar als Tumorsuppressor beschrieben, der dessen Expression reziprok inhibiert¹⁵⁸.

Innerhalb hyperaktiver Signalkaskaden^{116,159,160} oder als konstitutiv-aktives Onkoprotein^{123,125,127,128} ist STAT5 eine attraktive, wenn auch pharmakologisch herausfordernde Zielstruktur. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Homologen STAT5A und STAT5B sowie zu weiteren STAT-Proteinen und die fehlende enzymatische Aktivität des Proteins erschweren die selektive und effiziente Inhibi-

tion erheblich ¹⁶¹. Zuletzt erbrachte der SH2-Inhibitor AC-4-130 vielversprechende Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* ¹⁶². Wingelhofer et al. konnten zeigen, dass AC-4-130 effektiv die Zellviabilität und Kolonie-Bildung von FLT3^{ITD}-AML-Zellen hemmt und dabei CD34⁺-Zellen sowie weitere STAT-Proteine weitestgehend verschont. Im AML-Xenograft-Modell war der Inhibitor imstande das Tumorstadium deutlich zu reduzieren und erwies sich in Kombination mit JAK-Inhibitoren als sequenzielle JAK2-STAT5-Blockade als besonders effektiv. Darüber hinaus konnten Wong et al. STAT5 als Katalysator der nicht-enzymatischen Mannich-Reaktion identifizieren und infolgedessen einen potenten STAT5-Inhibitor entwickeln ¹⁶³. Der im Ba/F3-FLT3^{ITD}-Modell getestete Inhibitor war spezifisch für STAT5, verlangsamte das Tumorstadium *in vivo* und entfaltete in Kombination mit FLT3-Inhibition eine synergistische Wirkung.

7. Material

7.1 Geräte, Programme und Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Autoklav VARIOKLAV® Type 500	HP Medizintechnik (Oberschleißheim, DE)
Autoklav Vertical Autoclave VX-150	Systec (Linden, DE)
BioPhotometer®	Eppendorf (Hamburg, DE)
Blockthermostat BT 1302	Haep Labor Consult (Bovenden, DE)
Blockthermostat ThermoMixer® compact	Eppendorf (Hamburg, DE)
Ebox™ VX2	Vilber Lourmat (Eberhardzell, DE)
Eismaschine FM 170-AKE	Hoshizaki (Amsterdam, NL)
Electroporator MicroPulser	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
FACSVantage™ SE	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
FlowSafe® B-[MaxPro]2-130/-190	Berner Group (Künzelsau, DE)
Flüssigstickstoff-Tank	Cryoson (Schökrippen, DE)
Fluoreszenzmikroskop DMi8	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Fusion SL4 Imaging System	Vilber Lourmat (Eberhardzell, DE)
Gefriercontainer Mr. Frosty™	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr (Biberach, DE)
Gefrierschrank -80 °C, TLE Serie	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Inkubationschüttler Multitron	Infors HT (Bottmingen, CH)
Inkubator CB220 CO ₂	Binder (Tuttlingen, DE)
Inkubator Mini	Labnet (Edison, NJ, USA)
Kipp-/Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix instrument (Garbsen, DE)
Konfokal-Mikroskop TCS SP5 II	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Lichtmikroskop ID 03	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments, (Schwabach DE)
Microplate Reader GloMax® Discover	Promega (Madison, WI, USA)
Pipetten (0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand (Wertheim, DE)
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Präzisionswaage PCB 2500-2	Kern & Sohn (Balingen-Frommern, DE)
Q-POD® Unabhängige Reinstwasser- Entnahmeeinheit	Merck Millipore (Darmstadt, DE)

SDS-PAGE Electrophoresis System Xcell SureLock Mini Cell	Invitrogen (Darmstadt, DE)
SDS-PAGE Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
SDS-PAGE Probenkämme	Invitrogen (Darmstadt, DE)
Spectrophotometer NanoDrop™ 1000	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Thermocycler peqSTAR 2X Gradient	VWR (Radnor, PA, USA)
UV Chamber GS Gene Linker	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Vortex-Genie™ 2T	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waage ABJ 220-4NM	Kern & Sohn (Balingen-Frommern, DE)
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q® Reference	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Wasserbad Typ 1003	GFL (Burgwedel, DE)
Zellzähler Vi-CELL™ XR	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X1R	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Zentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 40R	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Zentrifugen 5415 D, 5424 R, 5430	Eppendorf (Hamburg, DE)

Tabelle 4: Programme

Anwendung	Programm	Entwickler
Datenverwaltung	Microsoft® Office	Microsoft® (Redmond, WA, USA)
Literaturverwaltung	EndNote™ 20	Clarivate (Philadelphia, PA, USA)
Statistik	Microsoft® Excel	Microsoft® (Redmond, WA, USA)
Grafikdesign	Adobe Creative Cloud	Adobe (San José, CA, USA)
DNA-Gelelektrophorese	E-Capt 15.06	Vilber Lourmat (Eberhardzell, GER)
Quantifizierung Western-Blot	FusionCapt 16.15	Vilber Lourmat (Eberhardzell, GER)
Quantifizierung Immunhistochemie	Fiji	ImageJ developers, www.imagej.net

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Blotting Paper Whatman®	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
CryoTube Nunc®	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Deckgläser (18x18 mm, 170 +/- 5 µm, 1.5H)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Erlenmeyerkolben DURAN® (25, 50, 250, 500, 1000 ml)	DURAN Group (Mainz, DE)
Fluorescent Mounting Medium	DAKO (Jena, DE)
Handschuhe Vasco® Nitril	B. Braun (Melsungen, DE)
Laborflaschen DURAN® GL 45 (10, 250, 500, 1000 ml)	DURAN Group (Mainz, DE)
MicroPulser Electroporation Cuvettes	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Objektträger Superfrost®	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
PARAFILM® M Verschlussfolie	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Petrischale 10 cm	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Standard	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipettenspitzen Seque/Pro™	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Pipettenspitzen, serologisch, Stripette® (5, 10 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
Pipettenspitzen, serologisch, 25 ml	Greiner Bio One (Frickenhausen, DE)
Röhrchen 0,2 ml PCR	Biozym Scientific (Oldendorf, DE)
Röhrchen 5 ml Falcon®	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Röhrchen 5 ml FACS	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Röhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
SDS-PAGE-Kassetten Novex™	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	VWR (Radnor, PA, USA)
Sterilfilter Steritop-GP 0,22 µm	Merck (Darmstadt, DE)
Vernichtungsbeutel	Brand (Wertheim, DE)
Western blotting membranes Amersham™ Protran®, nitrocellulose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Zellkulturschalen, Suspension (6-, 48-Well)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellkulturschalen, Adhärent (6-Well)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellkulturflaschen, Suspension & Adhärent	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

7.2 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2-Propanol	AppliChem (Darmstadt, DE)
Agarose NEEO ROTI®Garose	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
APS	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
CaCl ₂ (2 M)	AppliChem (Darmstadt, DE)
DAPI	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EGTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Gel Loading Dye (6x)	NEB (Ipswich, MA, USA)
Glycerol	AppliChem (Darmstadt, DE)
Größenstandard 1 kb DNA ladder	Promega (Madison, WI, USA)
HBS (2x)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
HEPES	AppliChem (Darmstadt, DE)
KCl	AppliChem (Darmstadt, DE)
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
MgCl ₂	AppliChem (Darmstadt, DE)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Magermilchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
NaF	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
peqGold Protein Marker VI	VWR (Radnor, PA, USA)
Pierce™ ECL Plus, Western Blotting Substrate	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
PMSF	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
SDS	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer	Apotheke Klinikum der Universität München (München, DE)
SDS-PAGE Gel-Transfer-Puffer	Apotheke Klinikum der Universität München (München, DE)
S. O. C. Medium	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
SYBR™ Safe DNA gel stain	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
TAE-Puffer	Apotheke Klinikum der Universität München (München, DE)
TBS-Puffer	Apotheke Klinikum der Universität München (München, DE)
TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
TRIS (1,5 M; pH 8,8, pH 6,8)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
TRITON™ X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tween 20	Merck (Darmstadt, DE)

Wheat germ agglutinin, Alexa Fluor
488™ Conjugate

Thermo Fisher (Waltham MA, USA)

X-Gal

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Agarosegel (0,5 l, 1 %)	500 ml TAE-Puffer (1x) 5 g Agarose 50 µl SYBR™ Safe
Gefriermedium	90 % FBS 10 % DMSO
KCM (30 ml, 5x)	5 ml KCl (3 M) 4,5 ml CaCl ₂ (1 M) 7,5 ml MgCl ₂ (1 M) <i>ad 30 ml Aqua dest.</i>
Lämmli-Puffer (2x)	20 % Glycerol 10% 2-Mercaptophenol 4 % SDS 0,004 % Bromphenol blau TRIS-HCl (0,125 M, pH 6,8)
LB-Medium (1 l)	20 g LB-Medium <i>ad 1 l Aqua dest.</i>
Lyse-Puffer (500 ml)	100 ml Glycerol (50 %) 25 ml HEPES (1 M, pH 7,5) 15 ml NaCl (5 M) 5 ml TRITON™ X-100 2,5 ml EGTA (200 mM) 2,1 g NaF 2,23 g Na ₄ P ₂ O ₇ ·10 H ₂ O <i>ad 500 ml Aqua dest.</i>
PBS-T	PBS, Tween 20 (0,1 %)
SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer (5 l, 10x)	151,4 g TRIS 720,7 g Glycin 50 g Natriumdodecylsulfat <i>ad 5 l Aqua dest.</i>
SDS-PAGE Gel-Transfer-Puffer (5 l, TRIS 250 mmol/l)	15,0 g TRIS 71,0 g Glycin 790,0 g Methanol <i>ad 5 l Aqua dest.</i>
SDS-PAGE Sammelgel (5 ml, 5 %)	3,4 ml <i>Aqua dest.</i> 830 µl Acrylamid (30 %) / Bis (0,8 %) 630 µl TRIS (1,5 M, pH 6,8) 50 µl SDS (10 %) 50 µl APS (10 %) 5 µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (15 ml, 10 %)	5,9 ml <i>Aqua dest.</i> 5 ml Acrylamid (30 %) / Bis (0,8 %) 3,8 ml TRIS (1,5 M, pH 8,8) 150 µl SDS (10 %)

	150 µl APS (10 %) 6 µl TEMED
TAE-Puffer (5 l, 10x)	242,3 g TRIS 18,61 g Titriplex III (Natriumedetat) 59,85 g Essigsäure (100 %) <i>ad 5 l Aqua dest.</i>
TBS-Puffer (5 l, 10x)	60,57 g TRIS 483,3 g NaCl <i>ad 5 l Aqua dest.</i>
TBS-T	TBS, Tween 20 (0,1 %)

7.3 Plasmide, Enzyme, Bakterien und Kits

Tabelle 8: Plasmide

Plasmid	Antibiotikum	Hersteller
pCMV6-STAT5A-Myc-DDK-tagged	Kanamycin/Neomycin	Origene (Rockville, MD, USA)
PcDNA™6/V5-His A (Expressionsvektor)	Ampicillin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
pcDNA6-STAT5A	Ampicillin	Diese Arbeit
pcDNA6-STAT5A Y694F (a2081t)	Ampicillin	Diese Arbeit
pcDNA6-STAT5A N642H (a1924c)	Ampicillin	Diese Arbeit
pcDNA6-STAT5A E637G (a1910g)	Ampicillin	Diese Arbeit
pcDNA6-STAT5A T719M (c2156t)	Ampicillin	Diese Arbeit
pMSCV-IRES-eGFP (retroviraler Expressionsvektor)	Ampicillin	R. K. Humphries (Vancouver, CAN)
pMIG-STAT5A	Ampicillin	Diese Arbeit
pMIG-STAT5A Y694F (a2081t)	Ampicillin	Diese Arbeit
pMIG-STAT5A N642H (a1924c)	Ampicillin	Diese Arbeit
pMIG-STAT5A E637G (a1910g)	Ampicillin	Diese Arbeit
pMIG-STAT5A T719M (c2156t)	Ampicillin	Diese Arbeit
pMIY-EGFR	Ampicillin	AG Spiekermann
pMIY-FLT3	Ampicillin	AG Spiekermann

Tabelle 9: Enzyme

Enzym	Puffer	Hersteller
KpnI	NEBuffer 2.1 (10x)	NEB (Ipswich, MA, USA)
XbaI	NEBuffer 2.1 (10x)	NEB (Ipswich, MA, USA)
PmeI	NEBuffer 2.1 (10x)	NEB (Ipswich, MA, USA)

HpaI	NEBuffer 2.1 (10x)	NEB (Ipswich, MA, USA)
XhoI	NEBuffer 2.1 (10x)	NEB (Ipswich, MA, USA)
CIP	CIP Buffer (10x)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
T4 DNA-Ligase	T4 DNA-Ligase Buffer	NEB (Ipswich, MA, USA)

Tabelle 10: Bakterien

Bakterien	Hersteller
<i>DH5α Chemically Competent Cells</i>	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
<i>XL-1 Blue Competent Cells</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
<i>Stellar™ Competent Cells</i>	Clontech® Laboratories (Mountain View, CA, USA)
<i>XL10-Gold Ultracompetent Cells</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Tabelle 11: Kits

Kit	Hersteller
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, DE)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, DE)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, DE)
In-Fusion HD® Cloning Kit	Clontech® Laboratories (Mountain View, CA, USA)
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

7.4 Primer für Sequenzierung, In-Fusion® Cloning und Mutagenese

Tabelle 12: Primer Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Tm	Orientierung
STAT5A 647for	AGCGTGAGGCACAGACACT	59,0 °C	<i>forward</i>
STAT5A 1352for	GCAGCAATGAGCTTGTGTTC	58,0 °C	<i>forward</i>
STAT5A 2060for	TGGCTAAAGCTGTTGATGGA	56,0 °C	<i>forward</i>
STAT5A 743rev	AGGATGATGGTCTGCTGCTT	58,0 °C	<i>reverse</i>

Tabelle 13: Primer In-Fusion® Cloning

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Tm	Orientierung
STAT5A KpnI	TTAAACTTAAGCTTGGATCCGG TACCGAGGAGAT	73,0 °C	forward
STAT5A XbaI	CGAAGGGCCCTCTAGAC CGGCCGTTTAAACCTTATCG	80,0 °C	reverse

Tabelle 14: Primer ortsspezifische Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Tm	Länge
a1910g_ mutSTAT5A E637Gfor	GTTTGACTCCCCGGGACGCAA CCTGTGGA	76 °C	29 bp
mutSTAT5A E637Grev	TCCACAGGTTGCGTCCCGGGG AGTCAAAC	76 °C	29 bp
c2156t_ mutSTAT5A T719Mfor	GGCAGCAGCGCCATGTACATG GACCAG	74 °C	27 bp
mutSTAT5A T719Mrev	CTGGTCCATGTACATGGCGCT GCTGCC	74 °C	27 bp
a2081t_ mutSTAT5A Y694Ffor	GGCTAAAGCTGTTGATGGATT TGTGAAACCACAGATC	74 °C	37 bp
mutSTAT5A Y694Frev	GATCTGTGGTTTCACAAATCC ATCAACAGCTTTAGCC	74 °C	37 bp
a1924c_ mutSTAT5A N642Hfor	GGAACGCAACCTGTGGCACCT GAAACCATTAC	76 °C	33 bp
mutSTAT5A N642Hrev	GTGAATGGTTTCAGGTGCCAC AGGTTGCGTTCC	76 °C	33 bp

7.5 Zelllinien, Zellkulturmedien und Zellkulturmaterial

Tabelle 15: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Ba/F3 (ACC 300)	Murine, IL-3-abhängige, Pro-B-Zelllinie in Suspension	DSMZ (Braunschweig, DE)
Phoenix™-Eco	Humane, embryonale und adhärenente Nierenepithel-Zelllinie	Orbigen (San Diego, CA, USA)
U-2 OS (ATCC® HTB-96™)	Humane, adhärenente Osteosarkom-Zelllinie	ATCC® (Manassas, VA, USA)

Tabelle 16: Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium
Phoenix™-Eco	DMEM 10 % FBS 0,5 % Penicillin 10000 U/ml 0,5 % Streptomycin 10 mg/ml
U-2 OS (ATCC® HTB-96™)	Opti-MEM® 10 % FBS 0,5 % Penicillin 10000 U/ml 0,5 % Streptomycin 10 mg/ml
Ba/F3	RPMI 10 % FBS 10 % WEHI-3B-Überstand 1 % Penicillin 10000 U/ml 1 % Streptomycin 10 mg/ml

Tabelle 17: Zellkulturmaterial

Material	Hersteller
DMEM (1x) + GlutaMAX™-I, Pyruvat, Gibco™	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
EGF	ImmunoTools (Friesoythe, DE)
FBS	PAN-Biotech (Aidenbach, DE)
FLT3LG	ImmunoTools (Friesoythe, DE)
IL-3	ImmunoTools (Friesoythe, DE)
Opti-MEM® I (1x)	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
PenStrep Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Polybrene Infection Reagent	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen (Hilden, DE)
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
Trypan Blau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin-EDTA (0,05 %), phenolrot, Gibco™	Thermo Fisher (Waltham MA, USA)
WEHI-3B-Überstand	AG Spiekermann
Zellschaber, Falcon®	Corning (Corning, NY, USA)

7.6 Antikörper für Proteinbiochemie und Immunzytochemie

Tabelle 18: Antikörper Proteinbiochemie und Immunhistochemie

Bezeichnung	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
ANTI-FLAG® M2	Maus, monoklonal, IgG1-Isotyp	1:40000	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	Maus, monoklonal, IgG1-Isotyp		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Stat5a (L-20): sc-1081	Hase, polyklonal	1:6000	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Phospho-Stat5 (Tyr694) Antibody, #9351	Hase, polyklonal	1:1000 1:50	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
EGFR (1005)-G	Ziege, polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Flt-3/Flk-2 (S-18): sc-480	Hase, polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
GAPDH (6C5): sc-32233	Maus, monoklonal, IgG1-Isotyp	1:6000	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	Ziege, polyklonal, Sekundärantikörper	1:10000	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase	Ziege, polyklonal, Sekundärantikörper	1:10000	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 594 Conjugate)	Ziege, Sekundärantikörper	1:500	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)

Literaturverzeichnis

1. Southam CM, Craver LF, Dargeon HW, Burchenal JH. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer* 1951;4(1):39-59. DOI: 10.1002/1097-0142(195101)4:1<39::aid-cnrcr2820040105>3.0.co;2-g.
2. Pulte D, Jansen L, Castro FA, et al. Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int J Cancer* 2016;139(6):1289-96. DOI: 10.1002/ijc.30186.
3. DGHO. Leitlinie Akute Myeloische Leukämie (AML). (<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@guideline/html/index.html>).
4. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015/2016. (https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf;jsessionid=167E8A81835C5899EE92051984DC635D.1_cid363?blob=publicationFile).
5. Juliusson G, Lazarevic V, Horstedt AS, Hagberg O, Hoglund M, Swedish Acute Leukemia Registry G. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood* 2012;119(17):3890-9. DOI: 10.1182/blood-2011-12-379008.
6. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015;373(12):1136-52. DOI: 10.1056/NEJMra1406184.
7. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016;374(23):2209-2221. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192.
8. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424-447. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
9. Crowther D, Bateman CJ, Vartan CP, et al. Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J* 1970;4(5734):513-7. DOI: 10.1136/bmj.4.5734.513.
10. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2020;383(7):617-629. DOI: 10.1056/NEJMoa2012971.
11. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med* 2017;377(5):454-464. DOI: 10.1056/NEJMoa1614359.
12. Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med* 2019;381(18):1728-1740. DOI: 10.1056/NEJMoa1902688.
13. Castaigne S, Pautas C, Terré C, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-

- 0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* 2012;379(9825):1508-1516. DOI: 10.1016/s0140-6736(12)60485-1.
14. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012;481(7382):506-10. DOI: 10.1038/nature10738.
 15. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* 2017;547(7661):104-108. DOI: 10.1038/nature22993.
 16. Greif PA, Hartmann L, Vosberg S, et al. Evolution of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia During Therapy and Relapse: An Exome Sequencing Study of 50 Patients. *Clin Cancer Res* 2018;24(7):1716-1726. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2344.
 17. Schmitt-Ney M, Doppler W, Ball RK, Groner B. Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol Cell Biol* 1991;11(7):3745-55. DOI: 10.1128/mcb.11.7.3745.
 18. Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 1994;13(9):2182-91. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514531>).
 19. Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(19):8831-5. DOI: 10.1073/pnas.92.19.8831.
 20. Mui AL, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J* 1995;14(6):1166-75. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7720707>).
 21. Lin JX, Mietz J, Modi WS, John S, Leonard WJ. Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells. *J Biol Chem* 1996;271(18):10738-44. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631883>).
 22. Wang Y, Levy DE. Comparative evolutionary genomics of the STAT family of transcription factors. *JAKSTAT* 2012;1(1):23-33. DOI: 10.4161/jkst.19418.
 23. Boucheron C, Dumon S, Santos SC, et al. A single amino acid in the DNA binding regions of STAT5A and STAT5B confers distinct DNA binding specificities. *J Biol Chem* 1998;273(51):33936-41. DOI: 10.1074/jbc.273.51.33936.
 24. Gouilleux F, Wakao H, Mundt M, Groner B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J* 1994;13(18):4361-9. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925280>).
 25. Gouilleux F, Pallard C, Dusanter-Fourt I, et al. Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor

- induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *EMBO J* 1995;14(9):2005-13. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744007>).
26. Teglund S, McKay C, Schuetz E, et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998;93(5):841-50. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81444-0.
 27. Ruff-Jamison S, Chen K, Cohen S. Epidermal growth factor induces the tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of Stat 5 in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(10):4215-8. DOI: 10.1073/pnas.92.10.4215.
 28. Pallard C, Gouilleux F, Benit L, et al. Thrombopoietin activates a STAT5-like factor in hematopoietic cells. *EMBO J* 1995;14(12):2847-56. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796811>).
 29. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Wong SC, McKnight SL. Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity* 1995;2(4):321-9. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90140-x.
 30. Wakao H, Harada N, Kitamura T, Mui AL, Miyajima A. Interleukin 2 and erythropoietin activate STAT5/MGF via distinct pathways. *EMBO J* 1995;14(11):2527-35. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7781605>).
 31. Li G, Miskimen KL, Wang Z, et al. STAT5 requires the N-domain for suppression of miR15/16, induction of bcl-2, and survival signaling in myeloproliferative disease. *Blood* 2010;115(7):1416-24. DOI: 10.1182/blood-2009-07-234963.
 32. Dumon S, Santos SC, Debierre-Grockiego F, et al. IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 1999;18(29):4191-9. DOI: 10.1038/sj.onc.1202796.
 33. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999;98(2):181-91. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81013-2.
 34. Kerenyi MA, Grebien F, Gehart H, et al. Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood* 2008;112(9):3878-88. DOI: 10.1182/blood-2008-02-138339.
 35. Malin S, McManus S, Cobaleda C, et al. Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat Immunol* 2010;11(2):171-9. DOI: 10.1038/ni.1827.
 36. Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, et al. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J* 1999;18(5):1367-77. DOI: 10.1093/emboj/18.5.1367.
 37. Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, et al. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 1996;15(5):1055-63. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8605875>).
 38. Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Jr., Kuriyan J. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 1998;279(5353):1048-52. DOI: 10.1126/science.279.5353.1048.

39. Meyer WK, Reichenbach P, Schindler U, Soldaini E, Nabholz M. Interaction of STAT5 dimers on two low affinity binding sites mediates interleukin 2 (IL-2) stimulation of IL-2 receptor alpha gene transcription. *J Biol Chem* 1997;272(50):31821-8. DOI: 10.1074/jbc.272.50.31821.
40. Xu X, Sun YL, Hoey T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 1996;273(5276):794-7. DOI: 10.1126/science.273.5276.794.
41. Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE, Jr. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 1996;15(20):5616-26. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896455>).
42. John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell JE, Jr., Leonard WJ. The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1910-8. DOI: 10.1128/mcb.19.3.1910.
43. Soldaini E, John S, Moro S, Bollenbacher J, Schindler U, Leonard WJ. DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol Cell Biol* 2000;20(1):389-401. DOI: 10.1128/mcb.20.1.389-401.2000.
44. Iyer J, Reich NC. Constitutive nuclear import of latent and activated STAT5a by its coiled coil domain. *FASEB J* 2008;22(2):391-400. DOI: 10.1096/fj.07-8965com.
45. Shin HY, Reich NC. Dynamic trafficking of STAT5 depends on an unconventional nuclear localization signal. *J Cell Sci* 2013;126(Pt 15):3333-43. DOI: 10.1242/jcs.123042.
46. Horvath CM, Wen Z, Darnell JE, Jr. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 1995;9(8):984-94. DOI: 10.1101/gad.9.8.984.
47. Schindler U, Wu P, Rothe M, Brasseur M, McKnight SL. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity* 1995;2(6):689-97. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90013-6.
48. Neculai D, Neculai AM, Verrier S, et al. Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer. *J Biol Chem* 2005;280(49):40782-7. DOI: 10.1074/jbc.M507682200.
49. Decker T, Kovarik P, Meinke A. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17(3):121-34. DOI: 10.1089/jir.1997.17.121.
50. Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, et al. DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem* 2001;276(9):6675-88. DOI: 10.1074/jbc.M001748200.
51. Kuriyan J, Darnell JE, Jr. An SH2 domain in disguise. *Nature* 1999;398(6722):22-3, 25. DOI: 10.1038/17916.
52. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994;265(5179):1701-6. DOI: 10.1126/science.8085155.

53. Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE, Jr. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 1995;267(5202):1347-9. DOI: 10.1126/science.7871432.
54. Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE, Jr. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 1994;76(5):821-8. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90357-3.
55. 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;93(5):827-39. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81443-9.
56. Moriggl R, Gouilleux-Gruart V, Jahne R, et al. Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol Cell Biol* 1996;16(10):5691-700. DOI: 10.1128/mcb.16.10.5691.
57. Litterst CM, Kliem S, Marilley D, Pfitzner E. NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain. *J Biol Chem* 2003;278(46):45340-51. DOI: 10.1074/jbc.M303644200.
58. Pfitzner E, Jahne R, Wissler M, Stoecklin E, Groner B. p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* 1998;12(10):1582-93. DOI: 10.1210/mend.12.10.0180.
59. Berger A, Hoelbl-Kovacic A, Bourgeais J, et al. PAK-dependent STAT5 serine phosphorylation is required for BCR-ABL-induced leukemogenesis. *Leukemia* 2014;28(3):629-41. DOI: 10.1038/leu.2013.351.
60. Friedbichler K, Kerenyi MA, Kovacic B, et al. Stat5a serine 725 and 779 phosphorylation is a prerequisite for hematopoietic transformation. *Blood* 2010;116(9):1548-58. DOI: 10.1182/blood-2009-12-258913.
61. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264(5164):1415-21. DOI: 10.1126/science.8197455.
62. Mertens C, Darnell JE, Jr. SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell* 2007;131(3):612. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.033.
63. Stark GR, Darnell JE, Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 2012;36(4):503-14. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.013.
64. Villarino AV, Gadina M, O'Shea JJ, Kanno Y. SnapShot: Jak-STAT Signaling II. *Cell* 2020;181(7):1696-1696 e1. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.052.
65. Snow JW, Abraham N, Ma MC, Abbey NW, Herndier B, Goldsmith MA. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2002;99(1):95-101. DOI: 10.1182/blood.v99.1.95.
66. Schepers H, van Gosliga D, Wierenga AT, Eggen BJ, Schuringa JJ, Vellenga E. STAT5 is required for long-term maintenance of normal and

- leukemic human stem/progenitor cells. *Blood* 2007;110(8):2880-8. DOI: 10.1182/blood-2006-08-039073.
67. Wang Z, Li G, Tse W, Bunting KD. Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement. *Blood* 2009;113(20):4856-65. DOI: 10.1182/blood-2008-09-181107.
68. Fatrai S, Wierenga AT, Daenen SM, Vellenga E, Schuringa JJ. Identification of HIF2alpha as an important STAT5 target gene in human hematopoietic stem cells. *Blood* 2011;117(12):3320-30. DOI: 10.1182/blood-2010-08-303669.
69. Haetscher N, Feuermann Y, Wingert S, et al. STAT5-regulated microRNA-193b controls haematopoietic stem and progenitor cell expansion by modulating cytokine receptor signalling. *Nat Commun* 2015;6:8928. DOI: 10.1038/ncomms9928.
70. Ghanem S, Friedbichler K, Boudot C, et al. STAT5A/5B-specific expansion and transformation of hematopoietic stem cells. *Blood Cancer J* 2017;7(1):e514. DOI: 10.1038/bcj.2016.124.
71. Cui Y, Riedlinger G, Miyoshi K, et al. Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *Mol Cell Biol* 2004;24(18):8037-47. DOI: 10.1128/MCB.24.18.8037-8047.2004.
72. Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, et al. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* 2008;111(9):4511-22. DOI: 10.1182/blood-2007-07-102848.
73. Ilaria RL, Jr., Hawley RG, Van Etten RA. Dominant negative mutants implicate STAT5 in myeloid cell proliferation and neutrophil differentiation. *Blood* 1999;93(12):4154-66. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361113>).
74. Hoelbl A, Kovacic B, Kerenyi MA, et al. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood* 2006;107(12):4898-906. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3596.
75. Moriggl R, Sexl V, Piekorz R, Topham D, Ihle JN. Stat5 activation is uniquely associated with cytokine signaling in peripheral T cells. *Immunity* 1999;11(2):225-30. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80097-7.
76. Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, et al. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 1999;10(2):249-59. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80025-4.
77. Eckelhart E, Warsch W, Zebedin E, et al. A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development. *Blood* 2011;117(5):1565-73. DOI: 10.1182/blood-2010-06-291633.
78. Mandal M, Powers SE, Maienschein-Cline M, et al. Epigenetic repression of the Igk locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nat Immunol* 2011;12(12):1212-20. DOI: 10.1038/ni.2136.

79. Lin JX, Li P, Liu D, et al. Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity* 2012;36(4):586-99. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.02.017.
80. Lin JX, Du N, Li P, et al. Critical functions for STAT5 tetramers in the maturation and survival of natural killer cells. *Nat Commun* 2017;8(1):1320. DOI: 10.1038/s41467-017-01477-5.
81. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, et al. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 1996;87(5):1692-7. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8634413>).
82. Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, et al. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* 1996;88(3):809-16. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8704235>).
83. Zhang S, Fukuda S, Lee Y, et al. Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med* 2000;192(5):719-28. DOI: 10.1084/jem.192.5.719.
84. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000;19(5):624-31. DOI: 10.1038/sj.onc.1203354.
85. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000;96(12):3907-14. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090077>).
86. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W. Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clin Cancer Res* 2003;9(6):2140-50. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796379>).
87. Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 2002;30(3):262-71. DOI: 10.1016/s0301-472x(01)00787-1.
88. Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, Kruijer W, Vellenga E. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 2001;15(12):1923-31. DOI: 10.1038/sj.leu.2402317.
89. Choudhary C, Schwable J, Brandts C, et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 2005;106(1):265-73. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2942.
90. Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005;105(12):4792-9. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4430.

91. Muller TA, Grundler R, Istvanffy R, et al. Lineage-specific STAT5 target gene activation in hematopoietic progenitor cells predicts the FLT3(+)-mediated leukemic phenotype. *Leukemia* 2016;30(8):1725-33. DOI: 10.1038/leu.2016.72.
92. Choudhary C, Brandts C, Schwable J, et al. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 2007;110(1):370-4. DOI: 10.1182/blood-2006-05-024018.
93. Leischner H, Albers C, Grundler R, et al. SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML. *Blood* 2012;119(17):4026-33. DOI: 10.1182/blood-2011-07-365726.
94. Rocnik JL, Okabe R, Yu JC, et al. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 2006;108(4):1339-45. DOI: 10.1182/blood-2005-11-011429.
95. Dos Santos C, Demur C, Bardet V, Prade-Houdellier N, Payrastre B, Recher C. A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111(4):2269-79. DOI: 10.1182/blood-2007-04-082099.
96. Okamoto M, Hayakawa F, Miyata Y, et al. Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD. *Leukemia* 2007;21(3):403-10. DOI: 10.1038/sj.leu.2404547.
97. Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell* 2009;36(2):326-39. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.019.
98. Schmidt-Arras D, Bohmer SA, Koch S, et al. Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood* 2009;113(15):3568-76. DOI: 10.1182/blood-2007-10-121426.
99. Kim KT, Baird K, Ahn JY, et al. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 2005;105(4):1759-67. DOI: 10.1182/blood-2004-05-2006.
100. Mizuki M, Schwable J, Steur C, et al. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood* 2003;101(8):3164-73. DOI: 10.1182/blood-2002-06-1677.
101. Yoshimoto G, Miyamoto T, Jabbarzadeh-Tabrizi S, et al. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood* 2009;114(24):5034-43. DOI: 10.1182/blood-2008-12-196055.
102. Reddy PN, Sargin B, Choudhary C, et al. SOCS1 cooperates with FLT3-ITD in the development of myeloproliferative disease by promoting the escape from external cytokine control. *Blood* 2012;120(8):1691-702. DOI: 10.1182/blood-2010-08-301416.
103. Gerloff D, Grundler R, Wurm AA, et al. NF-kappaB/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29(3):535-47. DOI: 10.1038/leu.2014.231.
104. Sallmyr A, Fan J, Datta K, et al. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and

- misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* 2008;111(6):3173-82. DOI: 10.1182/blood-2007-05-092510.
105. Zhou J, Bi C, Janakakumara JV, et al. Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood* 2009;113(17):4052-62. DOI: 10.1182/blood-2008-05-156422.
 106. Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, et al. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* 2005;105(9):3679-85. DOI: 10.1182/blood-2004-06-2459.
 107. de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Jove R, Koenderman L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 1999;94(3):1108-12. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419904>).
 108. Scherr M, Chaturvedi A, Battmer K, et al. Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* 2006;107(8):3279-87. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3087.
 109. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 1996;13(2):247-54. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710363>).
 110. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000;95(6):2118-25. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706883>).
 111. Ye D, Wolff N, Li L, Zhang S, Ilaria RL, Jr. STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice. *Blood* 2006;107(12):4917-25. DOI: 10.1182/blood-2005-10-4110.
 112. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, et al. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* 2010;2(3):98-110. DOI: 10.1002/emmm.201000062.
 113. Walz C, Ahmed W, Lazarides K, et al. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood* 2012;119(15):3550-60. DOI: 10.1182/blood-2011-12-397554.
 114. Warsch W, Walz C, Sexl V. JAK of all trades: JAK2-STAT5 as novel therapeutic targets in BCR-ABL1+ chronic myeloid leukemia. *Blood* 2013;122(13):2167-75. DOI: 10.1182/blood-2013-02-485573.
 115. Kollmann S, Grundschober E, Maurer B, et al. Twins with different personalities: STAT5B-but not STAT5A-has a key role in BCR/ABL-induced leukemia. *Leukemia* 2019;33(7):1583-1597. DOI: 10.1038/s41375-018-0369-5.
 116. Hantschel O, Warsch W, Eckelhart E, et al. BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nat Chem Biol* 2012;8(3):285-93. DOI: 10.1038/nchembio.775.
 117. Wang Y, Cai D, Brendel C, et al. Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway

- activation. *Blood* 2007;109(5):2147-55. DOI: 10.1182/blood-2006-08-040022.
118. Warsch W, Grundschober E, Berger A, et al. STAT5 triggers BCR-ABL1 mutation by mediating ROS production in chronic myeloid leukaemia. *Oncotarget* 2012;3(12):1669-87. DOI: 10.18632/oncotarget.806.
 119. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011;117(12):3409-20. DOI: 10.1182/blood-2009-10-248211.
 120. Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. *Blood* 2012;119(15):3539-49. DOI: 10.1182/blood-2011-03-345215.
 121. Teofili L, Martini M, Cenci T, et al. Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood* 2007;110(1):354-9. DOI: 10.1182/blood-2007-01-069237.
 122. Garçon L, Rivat C, James C, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006;108(5):1551-4. DOI: 10.1182/blood-2005-10-009514.
 123. de Araujo ED, Erdogan F, Neubauer HA, et al. Structural and functional consequences of the STAT5B(N642H) driver mutation. *Nat Commun* 2019;10(1):2517. DOI: 10.1038/s41467-019-10422-7.
 124. Rajala HL, Eldfors S, Kuusanmaki H, et al. Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121(22):4541-50. DOI: 10.1182/blood-2012-12-474577.
 125. Kiel MJ, Velusamy T, Rolland D, et al. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 2014;124(9):1460-72. DOI: 10.1182/blood-2014-03-559542.
 126. Schrader A, Crispatzu G, Oberbeck S, et al. Actionable perturbations of damage responses by TCL1/ATM and epigenetic lesions form the basis of T-PLL. *Nat Commun* 2018;9(1):697. DOI: 10.1038/s41467-017-02688-6.
 127. Dufva O, Kankainen M, Kelkka T, et al. Aggressive natural killer-cell leukemia mutational landscape and drug profiling highlight JAK-STAT signaling as therapeutic target. *Nat Commun* 2018;9(1):1567. DOI: 10.1038/s41467-018-03987-2.
 128. Kucuk C, Jiang B, Hu X, et al. Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from gammadelta-T or NK cells. *Nat Commun* 2015;6:6025. DOI: 10.1038/ncomms7025.
 129. McKinney M, Moffitt AB, Gaulard P, et al. The Genetic Basis of Hepatosplenic T-cell Lymphoma. *Cancer Discov* 2017;7(4):369-379. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0330.
 130. Nicolae A, Xi L, Pittaluga S, et al. Frequent STAT5B mutations in gammadelta hepatosplenic T-cell lymphomas. *Leukemia* 2014;28(11):2244-8. DOI: 10.1038/leu.2014.200.

131. Kontro M, Kuusanmaki H, Eldfors S, et al. Novel activating STAT5B mutations as putative drivers of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2014;28(8):1738-42. DOI: 10.1038/leu.2014.89.
132. Bandapalli OR, Schuessle S, Kunz JB, et al. The activating STAT5B N642H mutation is a common abnormality in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia and confers a higher risk of relapse. *Haematologica* 2014;99(10):e188-92. DOI: 10.3324/haematol.2014.104992.
133. Dovat S, Payne KJ. STAT5 alters the state of transcriptional networks, driving aggressive leukemia. *Nat Immunol* 2017;18(6):597-598. DOI: 10.1038/ni.3747.
134. Katerndahl CDS, Heltemes-Harris LM, Willette MJL, et al. Antagonism of B cell enhancer networks by STAT5 drives leukemia and poor patient survival. *Nat Immunol* 2017;18(6):694-704. DOI: 10.1038/ni.3716.
135. Cross NCP, Hoade Y, Tapper WJ, et al. Recurrent activating STAT5B N642H mutation in myeloid neoplasms with eosinophilia. *Leukemia* 2019;33(2):415-425. DOI: 10.1038/s41375-018-0342-3.
136. Ma CA, Xi L, Cauff B, et al. Somatic STAT5b gain-of-function mutations in early onset nonclonal eosinophilia, urticaria, dermatitis, and diarrhea. *Blood* 2017;129(5):650-653. DOI: 10.1182/blood-2016-09-737817.
137. Ariyoshi K, Nosaka T, Yamada K, et al. Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain. *J Biol Chem* 2000;275(32):24407-13. DOI: 10.1074/jbc.M909771199.
138. Klein K, Witalisz-Siepracka A, Maurer B, et al. STAT5B(N642H) drives transformation of NKT cells: a novel mouse model for CD56(+) T-LGL leukemia. *Leukemia* 2019;33(9):2336-2340. DOI: 10.1038/s41375-019-0471-3.
139. Maurer B, Nivarthi H, Wingelhofer B, et al. High activation of STAT5A drives peripheral T-cell lymphoma and leukemia. *Haematologica* 2020;105(2):435-447. DOI: 10.3324/haematol.2019.216986.
140. Pham HTT, Maurer B, Prchal-Murphy M, et al. STAT5BN642H is a driver mutation for T cell neoplasia. *J Clin Invest* 2018;128(1):387-401. DOI: 10.1172/JCI94509.
141. Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 1983;100:243-55. DOI: 10.1016/0076-6879(83)00059-2.
142. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
143. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5. DOI: 10.1038/227680a0.
144. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):4350-4. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

145. Kelley JB, Paschal BM. Fluorescence-based quantification of nucleocytoplasmic transport. *Methods* 2019;157:106-114. DOI: 10.1016/j.ymeth.2018.11.002.
146. Palacios R, Henson G, Steinmetz M, McKearn JP. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature* 1984;309(5964):126-31. DOI: 10.1038/309126a0.
147. Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(23):9312-6. DOI: 10.1073/pnas.85.23.9312.
148. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J* 1999;18(17):4754-65. DOI: 10.1093/emboj/18.17.4754.
149. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84(5):1415-20. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068938>).
150. Jiang J, Greulich H, Janne PA, Sellers WR, Meyerson M, Griffin JD. Epidermal growth factor-independent transformation of Ba/F3 cells with cancer-derived epidermal growth factor receptor mutants induces gefitinib-sensitive cell cycle progression. *Cancer Res* 2005;65(19):8968-74. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1829.
151. Andersson EI, Tanahashi T, Sekiguchi N, et al. High incidence of activating STAT5B mutations in CD4-positive T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2016;128(20):2465-2468. DOI: 10.1182/blood-2016-06-724856.
152. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1999;274(24):17209-18. DOI: 10.1074/jbc.274.24.17209.
153. Zeng R, Aoki Y, Yoshida M, Arai K, Watanabe S. Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol* 2002;168(9):4567-75. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4567.
154. Schwaller J, Parganas E, Wang D, et al. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell* 2000;6(3):693-704. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)00067-8.
155. Moriggl R, Sexl V, Kenner L, et al. Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell* 2005;7(1):87-99. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.12.010.
156. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;458(7239):719-24. DOI: 10.1038/nature07943.
157. Schaller-Schonitz M, Barzan D, Williamson AJ, et al. BCR-ABL affects STAT5A and STAT5B differentially. *PLoS One* 2014;9(5):e97243. DOI: 10.1371/journal.pone.0097243.

158. Zhang Q, Wang HY, Liu X, Wasik MA. STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nat Med* 2007;13(11):1341-8. DOI: 10.1038/nm1659.
159. Minieri V, De Dominici M, Porazzi P, et al. Targeting STAT5 or STAT5-Regulated Pathways Suppresses Leukemogenesis of Ph+ Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res* 2018;78(20):5793-5807. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0195.
160. Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, et al. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood* 2011;117(12):3421-9. DOI: 10.1182/blood-2009-11-255232.
161. Maurer B, Kollmann S, Pickem J, Hoelbl-Kovacic A, Sexl V. STAT5A and STAT5B-Twins with Different Personalities in Hematopoiesis and Leukemia. *Cancers (Basel)* 2019;11(11). DOI: 10.3390/cancers11111726.
162. Wingelhofer B, Maurer B, Heyes EC, et al. Pharmacologic inhibition of STAT5 in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2018;32(5):1135-1146. DOI: 10.1038/s41375-017-0005-9.
163. Wong EL, Nawrotzky E, Arkona C, et al. The transcription factor STAT5 catalyzes Mannich ligation reactions yielding inhibitors of leukemic cell proliferation. *Nat Commun* 2019;10(1):66. DOI: 10.1038/s41467-018-07923-2.

Abkürzungen

Tabelle 19: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
<i>ad</i>	Auffüllen auf
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-X _L	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CN-AML	<i>Cytogenetically normal acute myeloid leukemia</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT3A	DNA-Methyltransferase 3 α
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELN	European LeukemiaNet
EPO	Erythropoetin
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
FLT3	<i>Fms related tyrosine kinase 3</i>
FLT3LG	<i>Fms related tyrosine kinase 3 ligand</i>
g	Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GOF	<i>Gain-of-function</i>
h	Stunde
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i>

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF2 α	<i>Hypoxia-inducible factor 2α</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase (NADP ⁺)
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitat
IRP-2	<i>Iron regulatory protein 2</i>
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LOF	<i>Loss-of-function</i>
M	Molar
MCL1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miR	microRNA
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NPM1	Nucleophosmin 1
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pMIG	pMSCV-IRES-eGFP
pMIY	pMSCV-IRES-eYFP
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PV	Polycythämia vera
ROI	<i>Region of interest</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT5A	<i>Signal transducer and activator of transcription 5a</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TfR-1	Transferrin-Rezeptor 1
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
Tm	<i>Primer melting temperature</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
V	Volt
VAF	Varianten-Allelfrequenz
VCM	<i>Virus containing medium</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Karsten Spiekermann für die Möglichkeit Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden und dieses Forschungsprojekt untersuchen zu dürfen. Seine Betreuung schuf ein kollegiales und konstruktives Arbeitsumfeld und sein wertvoller Rat half mir bei der Realisierung dieser Doktorarbeit.

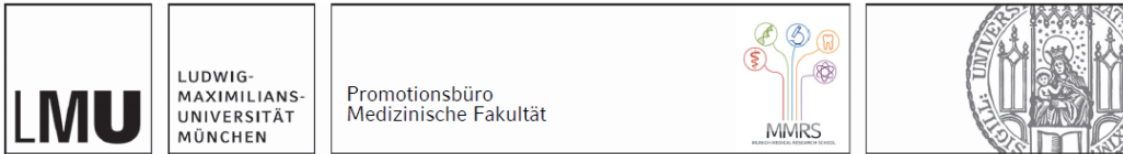
Herr Dr. Harald Polzer unterrichtete mich im Rahmen meines Projekts in der Praxis des wissenschaftlichen Arbeitens und begleitete mich kompromisslos und freundschaftlich durch die Höhen und Tiefen der experimentellen Forschung. Dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Danken möchte ich auch Herrn Belay Tizazu für die kontinuierliche, technische Unterstützung und das stets freundliche Verhältnis.

Diese Arbeit ist meinen Eltern Lucy und Dieter, meiner Schwester Chiara und meinen Großeltern Ruth und Edgar sowie Nelly und Santiago gewidmet, die mich während des Medizinstudiums unterstützten und mir ständigen Rückhalt gaben.

Lea, meiner Partnerin, danke ich von ganzem Herzen für den geschenkten Mut und die Zuversicht, dies und alles Folgende erreichen zu können.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Cuntz, Sven Enrico

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Funktionelle Charakterisierung neuer Mutationen des Transkriptionsfaktors STAT5A in der akuten myeloischen Leukämie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Heidelberg, 03.07.2023

Cuntz, Sven Enrico

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Publikationsliste