

Aus dem

Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
und Pharmakogenomik der Universität Tübingen

Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie
und Toxikologie

**Molekulare Analyse möglicher Interaktionspartner
von SLy1**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kraft, Mareen Monique**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer
2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Knipper-Breer

Tag der Disputation: 16.02.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Thymozyten und Thymozytenentwicklung	1
1.2 IL-7 Rezeptorsignalweg in Thymozyten	4
1.3 STAT5-p53 Crosstalk	7
1.4 Aufbau und Funktion von SLy1	9
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Puffer	15
2.1.3 Plasmide	17
2.1.4 Primäre Antikörper	18
2.1.5 Sekundäre Antikörper	19
2.1.6 Kits	19
2.1.7 Zelllinien	20
2.1.8 Geräte	20
2.1.9 Software	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellkultur	21
2.2.2 Vervielfältigung der Plasmide mittels Nucleo Bond Maxi Prep	21
2.2.3 Transfektion der HEK 293T Zellen mittels HP Reagent Xtreme Gene	22
2.2.4 Transduktion der Jurkat Zellen	23
2.2.5 Durchflusszytometrie zur Überprüfung der Transfektions- und Transduktionsrate	23
2.2.6 Generierung der Jurkat SLy1 Knockout Zellen	24
2.2.7 Zelllyse	24

2.2.8	Lowry Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung	24
2.2.9	Immunopräzipitation	25
2.2.10	Western Blot	26
2.2.11	On bead digest für Massenspektrometrie	27
2.2.12	Statistische Analyse und Darstellung	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Analyse des p53-Signalwegs	29
3.1.1	Interaktionen im p53-Signalweg in HEK 293T Zellen	29
3.1.2	Interaktionen im p53-Signalweg in Loucy Zellen	31
3.1.3	Analyse möglicher Interaktionspartner im p53-Signalweg mittels Immunopräzipitation aus Loucy Zellen	32
3.2	Analyse des STAT5-NPM1-Signalweges	35
3.2.1	Interaktionen im STAT5-NPM1-Signalweg in HEK 293T Zellen	35
3.2.2	Interaktionen im STAT5-NPM1-Signalweg in Loucy Zellen	37
3.2.3	Analyse möglicher Interaktionspartner im STAT5-NPM1-Signalweg mittels Immunopräzipitation aus Loucy Zellen	38
3.2.4	Erweiterte Analyse möglicher Interaktionspartner im STAT5-NPM1 Signalweg	42
3.3	Analyse des FOXO1 Signalweges	50
3.3.1	Interaktionen im FOXO1 Signalweg in HEK 293T Zellen	50
3.3.2	Erweiterte Analyse möglicher Interaktionspartner im FOXO1 Signalweg	52
3.3.3	Interaktionen im FOXO1 Signalweg in Loucy Zellen	55
3.4	Analyse der Immunopräzipitation aus Loucy Zellen mittels Massenspektrometrie	56
3.5	Untersuchung des IL-7R Signalwegs in An- und Abwesenheit von SLy1 in Jurkat Zellen	63
3.5.1	Verifizierung des Knockdowns von SLy1	63
3.5.2	Expressionsmuster auf Proteinebene in SLy1-KD Jurkat Zelllinien	66
3.5.3	Interaktionen in An- und Abwesenheit von SLy1 in Jurkat Zelllinien	70
4	Diskussion	74

4.1	Analyse möglicher Interaktionspartner	74
4.1.1	Interaktion SLy1-NPM1	75
4.1.2	Interaktion STAT5-SLy1	78
4.1.3	Interaktion FOXO1- SLy1	80
4.2	Interaktionen im STAT5-p53 Crosstalk	82
4.3	Protein Level in den Jurkat SLy1 Knockdown Zelllinien	83
4.4	Massenspektrometrische Analyse	84
4.5	Klinischer Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	92
7	Erklärung zum Eigenanteil	102
8	Veröffentlichungen	103
9	Danksagung	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Interaktionsanalyse von Mdm2, p53 und HERC2 in HEK 293T Zellen	30
Abbildung 2 Interaktionsanalyse von Mdm2 und p53 in Loucy Zellen	32
Abbildung 3 Interaktionsanalyse von p53 und SLy1	33
Abbildung 4 Interaktionsanalyse von Mdm2 und SLy1	34
Abbildung 5 Interaktionsanalyse von Bard1-HA, BRCA1 und NPM1 in HEK 293T Zellen	36
Abbildung 6 Interaktionsanalyse von Bard1 und NPM1 in Loucy Zellen	38
Abbildung 7 Interaktionsanalyse von STAT5 und SLy1	39
Abbildung 8 Interaktionsanalyse von Bard1 und SLy1	40
Abbildung 9 Interaktionsanalyse von NPM1 und SLy1	41
Abbildung 10 Interaktionsanalyse SLy1-STAT5 mittels Raptor X	43
Abbildung 11 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und STAT5	44
Abbildung 12 Interaktionsanalyse von STAT5 und SLy1 in Jurkat Zellen	45
Abbildung 13 Interaktionsanalyse von SLy1-myc und NPM1	46
Abbildung 14 Interaktionsanalyse von SLy1-HA und NPM1	47
Abbildung 15 Interaktionsanalyse SLy1-NPM1 mittels Raptor X	48
Abbildung 16 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und NPM1	49
Abbildung 17 Interaktionsanalyse von FOXO1-myc und SLy1-flag	51
Abbildung 18 Interaktionsanalyse SLy1-FOXO1 mittels Raptor X	52
Abbildung 19 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und FOXO1-myc mittels IP myc	53
Abbildung 20 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und FOXO1-myc mittels IP flag	54
Abbildung 21 Interaktionsanalyse von FOXO1 und SLy1	55
Abbildung 22 Boxplot Massenspektrometrie pSLy1/ IgG rabbit	56
Abbildung 23 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Jurkatvarianten anhand von FSC und PE	64
Abbildung 24 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Jurkatvarianten anhand von FSC und FITC	65
Abbildung 25 Western Blot Analyse SLy1 Knockdown in Jurkat Zellen	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26 Analyse der STAT5 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien	67
Abbildung 27 Analyse der Bard1 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien	68
Abbildung 28 Analyse der NPM1 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien	68
Abbildung 29 Analyse der Mdm2 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien	69
Abbildung 30 Analyse der FOXO1 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien	70
Abbildung 31 Interaktionsanalyse von Bard1 und NPM1 in Jurkat Zelllinien	71
Abbildung 32 Interaktionsanalyse von STAT5 und NPM1 in Jurkat Zelllinien ..	72
Abbildung 33 Interaktionsanalyse von p53 und Mdm2 in Jurkat Zelllinien	73
Abbildung 34 IL-7R/ p53 Crosstalk in An- und Abwesenheit von SLy1	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ergebnisse der BLAST Analyse Erkennungssequenz pSLy-AK vs. in der Massenspektrometrie detektierte Proteine	57
Tabelle 2 Massenspektrometrisch detektierte Riboproteine in der pSLy1-IP ...	58
Tabelle 3 Massenspektrometrisch detektierte Splicing Faktoren in der pSLy1-IP	58
Tabelle 4 Massenspektrometrisch detektierte Kinasen in der pSLy1-IP.....	60
Tabelle 5 Massenspektrometrisch detektierte Cycline in der pSLy1-IP.....	61
Tabelle 6 Massenspektrometrisch detektierte 14-3-3 Proteine in der pSLy1-IP62	

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
Bard1	<i>BRCA1 Associated RING Domain 1</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
DN	Doppelt negative (Thymozyten)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Doppelt positive (Thymozyten)
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
FSC	<i>Forward scatter scale</i> (Vorwärtstreulicht in Durchflusszytometrie)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor
IP	Immunopräzipitation
Jak	Januskinase
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
Mdm2	<i>Murine double minute 2 homolog Ligase</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NK	Natürliche Killer (Zellen)
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPM1	Nucleophosmin 1
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> Lösung
PDB	<i>proximity-dependent biotinylation</i>
PDK-1	Phosphatidyl-Inositol-Kinase 1

Abkürzungsverzeichnis

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
SAM	Steriles α Motiv
SH3	Src-homology 3
SLy1	<i>SH3 containing protein expressed in lymphocytes</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SP	<i>Single positive</i> (Thymozyten)
SSC	<i>Side scatter scale</i> (Seitwärtsstreulicht in Durchflusszytometrie)
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
TBS	<i>TRIS buffered saline</i> Lösung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helfer (Zellen)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Thymozyten und Thymozytenentwicklung

Der menschliche Organismus ist ständig Millionen von Mikroorganismen und Viren von außen und der Gefahr der Entartung und unkontrollierten Proliferation körpereigener Zellen ausgesetzt. Ein gut austariertes Immunsystem ist unerlässlich, um pathogene Keime abzuwehren und gleichzeitig die Schäden an eigenen Zellen in Grenzen zu halten. Das menschliche Immunsystem ist ein komplex reguliertes Zusammenspiel aus Zellen, Enzymen und Zytokinen.

Das angeborene Immunsystem kann unspezifische Antworten auf das Eindringen von Pathogenen initiieren. Zum angeborenen Immunsystem zählen Zellen wie Makrophagen, Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) und Mastzellen. Sie können Pathogene phagozytieren oder lysieren und anschließend über die Präsentation der Bruchstücke die spezifische Immunantwort aktivieren.

Eine weitere Stufe der Immunabwehr bilden T-Lymphozyten zusammen mit den B-Lymphozyten als adaptive erworbene Immunantwort des Körpers. B-Lymphozyten besitzen B-Zell-Rezeptoren, die durch spezifische Antigene aktiviert werden können. Die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors führt zur Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen und zur Produktion von Antikörpern gegen ein spezifisches Epitop.

T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Hilfe ihrer T-Zell-Rezeptoren (TCR) Antigene von Tumoren und Pathogenen zu erkennen und durch die Ausschüttung von Zytokinen eine Immunantwort einzuleiten. Andererseits müssen T-Lymphozyten auch körpereigene Zellen als solche erkennen können und eine Immunantwort auf den eigenen Körper verhindern. Ist diese Selbsttoleranz gestört, kann es zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen kommen (Lüllmann-Rauch 2015).

Auf Grund der Expression von verschiedenen TCR Ketten lassen sich die T-Zellen in $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen einteilen. Etwa 5 % der T-Zellen tragen den $\gamma\delta$ Rezeptor (Casorati, De Libero et al. 1989). Die Funktion dieser Zellen wird zurzeit intensiv erforscht.

Die $\alpha\beta$ T-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene wiederum in $CD4^+$ T-Helferzellen (TH-Zellen) und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen einteilen. Die $CD8^+$ T-

Einleitung

Zellen sind für das Erkennen und Abtöten von virusinfizierten Körperzellen verantwortlich. CD4⁺ TH-Zellen führen regulatorische Funktionen aus, indem sie durch die Produktion von Zytokinen andere Immunzellen aktivieren. Die TH1 Zellen produzieren hauptsächlich Interferon γ und Interleukin-2 (IL-2) und sorgen so für die Aktivierung von Makrophagen in der zellvermittelten Immunantwort. TH2 Zellen hingegen sind verantwortlich für die Regulation der antikörpervermittelten Immunreaktion über die Sezernierung von IL-4, IL-5 und IL-10 (Peter Heinrich 2014).

Im Rahmen der Immunantwort werden native T-Zellen über ihren TCR aktiviert und differenzieren sich zu aktiven Effektorzellen. Ein Teil der T-Zellen kehrt nach klonaler Expansion in die G0 Phase zurück und differenziert zu Gedächtniszellen aus. Diese können sich bei erneutem Kontakt mit dem Antigen schnell zu Effektorzellen umwandeln und somit für eine effektive und schnelle Immunantwort sorgen.

Bevor T-Zellen als native T-Zellen in den Blutkreislauf gelangen, absolvieren sie einen komplex regulierten Entwicklungsprozess. Die Vorläufer der T-Zellen stammen aus dem Knochenmark und migrieren im Laufe ihrer Entwicklung hämatogen in den Thymus (Donskoy and Goldschneider 1992). Dort durchlaufen sie verschiedene Reifungsstadien und Selektionspunkte bevor sie den Thymus verlassen, um in der Peripherie ihre Aufgaben wahrzunehmen.

Die frühen Thymozyten, die im Thymus zu finden sind, besitzen weder CD4 noch CD8. Sie werden doppelt negative Thymozyten (DN) genannt (Fowlkes, Edison et al. 1985). Die DN Thymozyten sind keine homogene Gruppe, sondern können anhand der Expression von CD25 (IL-2 α -Kette) und CD44 in vier Untergruppen eingeteilt werden. DN1 Thymozyten exprimieren ausschließlich CD44. Die Expression von zusätzlichem CD25 markiert die DN2 Phase. In der DN3 Phase exprimieren die Thymozyten nur noch CD25. Das Fehlen von sowohl CD25 als auch CD44 charakterisiert die DN4 Phase (Ceredig, Lynch et al. 1987, Ewing, Egerton et al. 1988, Nikolić-Žugić 1991, Godfrey, Kennedy et al. 1993).

In der DN3 Phase findet die sogenannte β -Selektion statt. Dabei werden die Zellen ausgewählt, die den TCR β -Ketten Locus erfolgreich rearrangiert haben (Crispe, Husmann et al. 1986, Hoffman, Passoni et al. 1996).

Einleitung

Durch Paarung der β -Kette mit der prä-T- α Kette entsteht der prä-TCR. Dieser bildet mit CD3 einen Komplex, welcher in der DN4 Phase für das Überleben der β -selektierten Zellen sorgt.

In der Folge kommt es zur Expression von CD4 und CD8, wodurch sich die DN Thymozyten zu doppelt positiven Thymozyten (DP) weiterentwickeln. Thymozyten, die nicht in der Lage sind den β -Ketten Locus zu rearrangieren, werden apoptotisch (Saint-Ruf, Ungewiss et al. 1994, Falk, Nerz et al. 2001).

In der DP Phase findet das Rearrangement des α -Ketten Locus statt. Ist dies erfolgreich, so entsteht über Zusammenlagerung der α - und β - Kette der $\alpha\beta$ -TCR. In enger zeitlicher Koordination dazu wird die prä-T- α Kette herunterreguliert (Koyasu, Clayton et al. 1997, Trop, Rhodes et al. 2000, Lacorazza, Porritt et al. 2001).

DP Zellen mit erfolgreicher Produktion des $\alpha\beta$ -TCR werden im Cortex des Thymus positiv selektiert. Dabei werden den DP Zellen körpereigene Antigene auf Major Histocompatibility Complex (MHC) I bzw. MHC II präsentiert. Nur die Zellen, welche eine ausreichende Bindungsaffinität zu den Antigen-MHC Komplexen aufweisen, werden positiv selektiert. Im Rahmen der negativen Selektion präsentieren Antigen Presenting Cells (APC) den selektierten Thymozyten erneut körpereigene Antigene. Im Gegensatz zur positiven Selektion führt eine starke Interaktion der Thymozyten mit den Antigenen hier zur Induktion von Apoptose (Saito and Watanabe 1998, Klein, Kyewski et al. 2014).

Im Anschluss an die erfolgreiche Selektion wird entweder der CD4 oder CD8 Rezeptor herunterreguliert. Die nativen einfach positiven Zellen wandern in die Medulla, wo sie sich für weitere 4-5 Tage aufhalten, bevor sie in die Peripherie migrieren. In der Medulla treffen sie auf medullary thymic epithelial cells (mTECs). Diese sind spezialisiert, Selbstantigene verschiedener Gewebe zu produzieren und können über eine erneute negative Selektion die Selbsttoleranz der T-Zellen verfeinern. Nur ein Bruchteil der ursprünglich im Thymus ankommenden T-Zell Vorläufer überlebt den Selektionsprozess und verlässt als CD4⁺ oder CD8⁺ native T-Zelle die Medulla (Kyewski and Klein 2006, Singer, Adoro et al. 2008, Klein 2009, Sawicka, Stritesky et al. 2014).

1.2 IL-7 Rezeptorsignalweg in Thymozyten

Der IL-7 Rezeptorsignalweg ist ein immens wichtiger und sehr komplex regulierter Signalweg in der Entwicklung der Thymozyten. Das Zytokin IL-7 wird hauptsächlich im Thymus von CD45 negativen Epithelzellen gebildet (Alves, Richard-Le Goff et al. 2009, Mazzucchelli, Warming et al. 2009, Repass, Laurent et al. 2009). Die Regulation der Aktivität des Signalweges erfolgt entscheidend durch die Kontrolle der Expression des IL-7 Rezeptors (Mazzucchelli and Durum 2007).

Der IL-7 Rezeptor (IL-7R) besteht aus der α -Kette und der γ c-Kette. Die IL-7R α Kette bindet spezifisch an IL-7. Die γ c Kette zeigt allein keine Affinität zu IL-7 und ist auch Bestandteil der IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 und IL-21 Rezeptoren (Jiang, Li et al. 2005). Erst die Heterodimerisierung der α - und γ c-Kette ist in der Lage, die assoziierten Januskinase 1 (Jak1) und Januskinase 3 (Jak3) in unmittelbare räumliche Nachbarschaft zu bringen. Dadurch erfolgt eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der Jak Kinasen, die wiederum das Tyrosin 449 der intrazellulären Domäne der α -Kette phosphorylieren. Die Domäne mit dem phosphorylierten Tyr 449 ist in der Lage, den Transkriptionsfaktor Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zu rekrutieren und anschließend durch Phosphorylierung mit Hilfe der Jak Kinasen zu aktivieren (Venkitaraman and Cowling 1994, Lin, Migone et al. 1995, Jiang, Li et al. 2004, Jiang, Huang et al. 2007, Osborne, Dhanji et al. 2007).

STAT5 kommt in zwei Isoformen vor: STAT5 A und STAT5 B. Sie sind zu 95 % homolog und üben größtenteils die gleichen Funktionen aus (Heltemes-Harris and Farrar 2012, Able, Burrell et al. 2017). Phosphoryliertes STAT5 migriert in den Nukleus und kann dort die Transkription seiner Zielgene aktivieren. Dies ist unter anderem das anti-apoptotische Gen B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)(von Freedon-Jeffry, Solvason et al. 1997).

Außerdem führt das IL-7R-Signal mit der STAT5 Aktivierung zur Umverteilung der pro-apoptotischen Proteine Bad und Bax in das Zytosol und somit zur Hemmung der Apoptose (Khaled, Kim et al. 1999, Khaled, Li et al. 2002, Jiang, Li et al. 2004, Mackall, Fry et al. 2011).

Einleitung

Die von den Jak Kinasen aktivierte PI3K phosphoryliert Akt. Dieses sorgt für eine Hochregulation des Zellmetabolismus über eine vermehrte Expression von Glut1 (Wofford, Wieman et al. 2008).

Durch Aktivierung des IL-7R Signalwegs wird zudem das Zellzyklus-regulierende Protein p27 herunterreguliert. P27 hemmt die Cyclin-dependent-Kinasen (Cdk) und kann so die Progression im Zellzyklus aufhalten (Li, Jiang et al. 2006). Insgesamt übt IL-7 über die Aktivierung seiner Zielgene eine anti-apoptotische und pro-trophische Funktion aus.

In der Thymozytenentwicklung spielt der IL-7R eine wichtige Rolle als Überlebenssignal, wird aber auf der anderen Seite in einigen Phasen der Entwicklung gezielt herunterreguliert. Der erste Nachweis von IL-7 Rezeptor Expression kann in der DN2 Phase gefunden werden (Peschon, Morrissey et al. 1994, von Freeden-Jeffry, Vieira et al. 1995). Ab der DN3 Phase scheinen die Thymozyten für das weitere Überleben auf den IL-7R angewiesen zu sein. Die in dieser Phase stattfindende TCR- β -Selektion kann ohne das Überlebenssignal des IL-7R nicht erfolgen. Zellen ohne IL-7R verbleiben in der DN3 Phase (von Freeden-Jeffry, Solvason et al. 1997). In der DN4 Phase wird daraufhin der IL-7R stark herunterreguliert (Van De Wiele, Marino et al. 2004).

In den folgenden Schritten der Entwicklung werden CD4 und CD8 exprimiert und die Expression des IL-7 Rezeptors pausiert. Der Progress der Zellen vom DN4 zum DP Stadium scheint an die Deaktivierung des IL-7R Signalweges und damit einhergehend die aufgehobene Inhibierung der TCF-1 und LEF1 Expression gebunden zu sein (Yu, Erman et al. 2004). Es folgt die positive Selektion der erfolgreich MHC erkennenden, aber nicht autoreaktiven TCR exprimierenden Zellen. Diese positive Selektion wird über die erfolgreiche Aktivierung des TCR Signalweges mit konsekutiv folgender IL-7R Expression reguliert (Hong, Luckey et al. 2012). Die erneute Aktivierung des IL-7R Signalwegs führt zur Expression anti-apoptotischer Signale und somit zum Überleben der selektierten Zellen.

Die Differenzierung zu single positive (SP) Zellen scheint wiederum auch von IL-7 beeinflusst zu werden. So wird in CD4⁺ T-Helfer Zellen das IL-7R Signal unterdrückt, wohingegen die zytotoxischen Zellen nur mit IL-7R Signal

Einleitung

ausdifferenzieren können. Reife T-Zellen sind lebenslang auf IL-7 angewiesen (Fry and Mackall 2005).

Da die T-Zellen in den verschiedenen Entwicklungsphasen unterschiedlich stark vom IL-7R Signal abhängig sind, muss die Intensität des Signals variabel angepasst und kontrolliert sein. Das IL-7 Signal ist über die Expression des IL-7R sowie über fördernde und hemmende Proteine streng reguliert. Zum einen wird in einem negativen Feedbackloop mit Hilfe der Expression von Suppressor of cytokine signaling (SOCS) Proteinen nach erfolgreichem IL-7R Signal die Expression des Rezeptors herunterreguliert. Dies hat möglicherweise altruistische Gründe, da IL-7 eine begrenzte Ressource ist und deshalb an möglichst viele Zellen gelangen sollte (Munitic, Williams et al. 2004, Park, Yu et al. 2004, Mazzucchelli and Durum 2007, Ghazawi, Faller et al. 2016). Zum anderen wird die IL-7R Expression von vielen Proteinen beeinflusst. Dazu zählen u.a. FOXO1, Gfi-1, GABP und Runx1,2.

Forkhead box protein O1 (FOXO1) ist ein Protein der FOXO Gruppe, welches eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellantworten spielt (Ouyang, Beckett et al. 2009). FOXO1 ist in ruhenden T- Zellen aktiv im Nukleus. Erst der Export und damit die Inaktivierung von FOXO1 nach TCR Signalaktivierung macht den Weg frei für die Proliferation der T-Zellen (Peng 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass FOXO1 die Transkription der IL-7R α -Kette durch Aktivierung des Enhancers erhöht (Kerdiles, Beisner et al. 2009, Ouyang, Beckett et al. 2009). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde beschrieben, dass FOXO1-defiziente reife T-Zellen nicht in der Lage sind, die IL-7R Expression hoch zu regulieren. In SP Thymozyten hingegen scheint FOXO1 für die IL-7R α Expression nicht notwendig zu sein, denn auch in FOXO1-defizienten SP Thymozyten konnte eine IL-7R α Expression detektiert werden (Hong, Luckey et al. 2012).

In der Hochregulation des IL-7R α in DN Thymozyten scheint das GA-binding protein (GABP) eine Rolle zu spielen (Xue, Bollenbacher et al. 2004).

Growth factor independent 1 transcriptional repressor (Gfi-1) hingegen ist möglicherweise für die Herunterregulation des IL-7R α in reifen CD8 T-Zellen mitverantwortlich (Yücel, Karsunky et al. 2003).

Einleitung

Die Runt Familie mit den Transkriptionsfaktoren Runx1 und Runx2 sind ebenso Kandidaten der IL-7R α Expressionsaktivierung, v.a. in reifen T-Zellen (Egawa, Tillman et al. 2007).

In SLy1 Knockout Zellen konnte gezeigt werden, dass der IL-7 Signalweg durch SLy1 beeinflusst ist. Ähnlich wie bei IL-7R negativen Thymozyten ist in SLy1-defizienten Thymozyten die Entwicklung von DN3 zu DN4 eingeschränkt (Reis, Pfeffer et al. 2009).

1.3 STAT5-p53 Crosstalk

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass in SLy1-defizienten Thymozyten sowohl der IL-7R Signalweg mit STAT5 als auch der p53 Signalweg verändert sind (Gruber 2021, Kloos 2021, Schneider 2021). Dabei stellt sich die Frage, ob dies auf verschiedenen Interaktionspartnern und Mechanismen beruht oder ob SLy1 an einer Schnittstelle der beiden Signalwege eine Rolle spielt.

Ein Crosstalk von STAT5 und p53 über den BRCA1/ Bard1-NPM1 Komplex wurde von Ren, Aerts et al. (2016) beschrieben.

P53 hat eine starke apoptotische Wirkung. In vitalen Zellen muss demnach die p53 Konzentration strikt reguliert werden (Levine 1997). Ein wichtiger Regulator der p53 Level ist Mdm2. Es ist in der Lage, p53 in einer direkten Interaktion zu binden (Momand, Zambetti et al. 1992). Dabei blockiert es die transkriptionsfaktoraktive Domäne von p53 und inhibiert somit die regulierende Funktion von p53 auf dessen downstream Gene. Des Weiteren sorgt Mdm2 über eine Monoubiquitinierung von p53 für eine verkürzte Halbwertszeit und somit für einen verstärkten Abbau des Proteins (Haupt, Maya et al. 1997, Maki 1999).

P53 wiederum aktiviert die Mdm2 Expression im Sinne eines negativen Feedbackloops. Somit wird sichergestellt, dass unter Abwesenheit von Stresssignalen die p53 Level auf einem niedrigen Niveau bleiben (Barak, Juven et al. 1993).

Neben Mdm2 spielt auch Nucleophosmin 1 (NPM1 oder auch B23) eine Rolle in der Stabilisierung und Aktivierung von p53. NPM1 ist ein in allen Geweben exprimiertes nukleoläres Protein. NPM1 wird eine wichtige Rolle in der Ribosomen Biogenese, dem Chromatin Remodelling, der mRNA Prozession und der Embryogenese zugeschrieben. Außerdem scheint es in DNA

Einleitung

Reparaturmechanismen und die Apoptosekontrolle eingebunden zu sein (Box, Paquet et al. 2016). Mutationen und Expressionsveränderungen von NPM1 sind mit verschiedenen Krebsarten assoziiert. So zeigen beispielsweise 35 % aller AML-Patienten NPM1 Rearrangements oder Mutationen (Falini, Mecucci et al. 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass NPM1 den Mdm2 mediierten Abbau von p53 durch eine direkte Bindung an p53 inhibiert. Zudem konnte als Reaktion auf eine Proteasomeninhibition eine Bindung von NPM1 an Mdm2 detektiert werden. Diese Bindung wurde durch hohe p53 Level verringert, was für eine Konkurrenz von p53 und NPM1 um die Bindungsstellen von Mdm2 spricht. Zusätzlich scheint NPM1 die Expression von Mdm2 zu inhibieren. Hohe Konzentrationen an NPM1, z.B. im Rahmen einer Antwort auf UV Stress, führen demnach über eine direkte Bindung von p53 und Inhibition der Bindung von Mdm2 an p53 zu erhöhten p53 Levels und somit zu einer verstärkten Apoptose (Colombo, Marine et al. 2002, Kurki, Peltonen et al. 2004, Hamilton, Abraham et al. 2014).

Die Phosphorylierung von STAT5 führt zu einem verringerten NPM1 Level. Zwar scheint die Phosphorylierung von STAT5 die Expression von NPM1 hoch zu regulieren, zusätzlich wird jedoch die Proteasomen-medierte Degradation ebenfalls verstärkt (Ren, Aerts et al. 2016). NPM1 wird durch den BRCA1/BARD1 Komplex ubiquitiniert. Gegensätzlich zur generellen Wirkung von Ubiquitinierungen scheint dies bei NPM1 zu einer Proteinstabilisierung zu führen (Okuwaki 2008). Die Phosphorylierung von STAT5 bewirkt eine verminderte Expression sowohl von Bard1 als auch von BRCA1. Somit wird der stabilisierende Einfluss der BRCA1/Bard1 E3 Ubiquitin Ligase auf NPM1 reduziert und daraus resultiert ein verstärkter Abbau.

Die Wirkung von NPM1 auf STAT5 besteht zum einen in der Aktivierung der Expression von STAT5, was zu einer erhöhten STAT5 Konzentration führt. Zum anderen wird jedoch die Phosphorylierung von STAT5 inhibiert, womit die Aktivität von STAT5 verringert wird. Es konnte zudem eine direkte Interaktion von STAT5 mit NPM1 nachgewiesen werden. Diese scheint unabhängig von der Phosphorylierung von STAT5 an Y694 zu sein (Ren, Aerts et al. 2016).

In Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von STAT5 zu einer verminderten Expression von p53 führte (Joliot, Cormier et al. 2006, Casetti, Martin-Lannerée et al. 2013). Die Herunterregulation von p53 ist auch in mit STAT5 A Vektor transfizierten HEK293T Zellen nachweisbar. Gleichzeitig können in diesen transfizierten Zellen stark verringerte NPM1 Level detektiert werden. Daraus lässt sich die Möglichkeit ableiten, dass die durch erhöhte STAT5 Expression verursachte p53 Depletion NPM1 mediiert ist (Ren, Aerts et al. 2016).

In SLy1-defizienten Thymozyten konnte auf der einen Seite eine verstärkte Aktivierung des pro-trophischen IL-7 Rezeptorsignalweges festgestellt werden. Dabei wurden erhöhte Level von IL-7R, Jak1, phosphoryliertem STAT5, sowie Bcl-2 detektiert (Schäll 2015, Kloos 2021, Schneider 2021). Andererseits waren in SLy1-defizienten Thymozyten erhöhte mRNA und Protein Level von pro-apoptotischem p53 vorhanden (Gruber 2021, Kloos 2021). Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse könnten sich über einen durch die SLy1-Defizienz gestörten Crosstalk zwischen STAT5 und p53 erklären lassen.

1.4 Aufbau und Funktion von SLy1

SLy1 ist ein Adaptorprotein, welches ausschließlich in Lymphozyten exprimiert wird (Beer, Simins et al. 2001).

Das Gen Sash3, welches für SLy1 kodiert, befindet sich beim Menschen auf dem X Chromosom (Beer, Simins et al. 2001). In räumlicher Nähe zum Genlokus Sash3 befinden sich im Rahmen der Immunentwicklung relevante Gene wie CD40L und SH2D1A. Bei Mutation dieser Gene kommt es zum sogenannten Hyper-IgM-Syndrom bzw. zur X-chromosomalen lymphoproliferativen Krankheit (Ramesh, Morio et al. 1995, Coffey, Brooksbank et al. 1998).

SLy1 setzt sich zusammen aus 381 Aminosäuren und erreicht damit ein Gewicht von 55 kDa (Beer, Simins et al. 2001). Das SLy1 Protein besitzt verschiedene Domänen. So befindet sich von AS 176-233 eine Src homology 3 (SH3) Domäne. SH3 Domänen sind bekannt als Protein-Protein Interaktionsdomänen (Buday 1999). SLy1 weist im C-terminalen Ende von Aminosäure 249 bis 316 zudem eine sterile α motif (SAM) Domäne auf (Beer, Simins et al. 2001). SAM Domänen können ebenfalls Protein-Protein Interaktionen ermöglichen, sind aber auch in

Einleitung

der Lage zu homodimerisieren (Qiao and Bowie 2005). Für SLy1 konnte rechnerisch gezeigt werden, dass eine Homodimerisierung mit Hilfe der SAM Domäne möglich ist. Die berechneten Homodimere sind relativ stabil, weshalb eine funktionelle Relevanz dieser Reaktion wahrscheinlich scheint (Kukuk, Dingley et al. 2019). SLy1 besitzt des Weiteren eine zweigeteilte Kern Lokalisationssequenz (NLS, nucleolar localisation signal) im N Terminus des Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass nach Deletion eines Teils der NLS SLy1 nicht mehr in den Kern gelangen kann (Beer, Scheikl et al. 2005). SLy1 kann nach B- oder T-Zellrezeptor Aktivierung vermutlich durch Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) bzw. Protein Kinase C (PKC) am Serin 27 Rest phosphoryliert werden (Astoul, Laurence et al. 2003, Beer, Scheikl et al. 2005). Der Phosphorylierungsstatus von SLy1 ist relevant für die Lokalisation von SLy1 im Zytoplasma oder Zellkern (Beer, Scheikl et al. 2005). So wird in murinen T-Zellen SLy1 nach Phosphorylierung am Ser27 mit Hilfe von 14-3-3 Proteinen aus dem Zellkern ins Zytoplasma geschuttelt (Schäll, Schmitt et al. 2015).

SLy1 konnte sowohl im menschlichen, als auch im murinen Genom identifiziert werden. Die Sequenzen verfügen über eine 89%ige Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz und eine 94%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (Beer, Simins et al. 2001).

SLy1 mRNA konnte in lymphoiden Geweben wie Milz, Thymus, Knochenmark, Lymphknoten und Peyer'schen Plaques nachgewiesen werden (Beer, Simins et al. 2001). In Mäusen mit einer SLy1 Deletionsvariante und in SLy1 Knockout (KO) Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl der lymphoiden Organe reduziert ist. In Abwesenheit von SLy1 scheint die B- und T-Zell Proliferation vermindert abzulaufen (Beer, Scheikl et al. 2005, Reis, Pfeffer et al. 2009).

In Mäusen mit verkürztem SLy1 ist die Anzahl der marginalen B-Zellen ebenso wie deren Proliferation nach IgM und anti-CD40 Stimulation verringert (Scheikl, Reis et al. 2009). Die Zellzahl der B-Zell-Vorläufer im Knochenmark, der B-Zellen im Peritoneum und der folliculären B-Zellen in der Milz ist durch die Abwesenheit von funktionstüchtigem SLy1 nicht beeinflusst. Untersuchungen in Mäusen mit verkürzten SLy1 zeigten jedoch eine verminderte basale Antikörperproduktion der IgM und IgG1 Subtypen. Ebenso konnte eine verminderte Steigerung der

Einleitung

Antikörperproduktion nach thymusunabhängiger und thymusabhängiger Aktivierung festgestellt werden (Beer, Scheikl et al. 2005).

Darüber hinaus ist SLy1 für eine adäquate Natürliche-Killer-Zell (NK-Zell) Funktion und Proliferation notwendig. In SLy1-KO Mäusen konnten erniedrigte NK-Zell Zahlen festgestellt werden (Arefanian, Schäll et al. 2016). Die Entwicklung der NK-Zellen im Knochenmark scheint durch die Abwesenheit von SLy1 nicht beeinflusst zu werden. Aus der Milz gewonnene SLy1-defiziente NK-Zellen weisen aber Unterschiede im Aktivierungsmuster und Expressionsmuster von Oberflächenrezeptoren auf. Im Gegensatz zur Funktion und Lokalisation in B- und T-Zellen befindet sich SLy1 in NK-Zellen ausschließlich im Zytoplasma und spielt dort eine Rolle bei der Stabilisierung von Ribosomen. In SLy1-defizienten NK-Zellen ist die Virusabwehr unverändert im Vergleich zum Wildtyp (WT), es kann jedoch eine vermehrte Tumoranfälligkeit festgestellt werden. Im Einklang damit steht die Beobachtung, dass in Mausstämmen mit vermehrter Tumoranfälligkeit die SLy1 Expression in den NK-Zellen reduziert ist (Arefanian, Schäll et al. 2016).

Die Thymozytenproliferation ist in SLy1-defizienten Mäusen erheblich eingeschränkt. Die Anzahl der T-Zellen im Thymus der SLy1 KO Mäuse ist signifikant reduziert auf 54% der Zellzahl von WT Mäusen (Reis, Pfeffer et al. 2009). Die Analyse der Subpopulationen der Thymozyten konnte erstaunlicherweise eine signifikante Verminderung der DP und SP Thymozytenzahl zeigen, wohingegen sich der prozentuale Anteil der DN Thymozyten verdoppelte. Daraus lässt sich eine verminderte Progression der SLy1^{-/-} DN Thymozyten zum DP Stadium ableiten (Reis, Pfeffer et al. 2009).

In der Entwicklung von DN Thymozyten spielt der Notch Signalweg eine wichtige Rolle. Die Aktivierung des Notch Signalweges zusammen mit dem Prä-TCR führt zur Aktivierung von mTOR und im Verlauf zur vermehrten Expression der stoffwechselfördernden Rezeptoren CD71 und CD98. Durch die Zunahme der Aktivierung von Phosphatidyl-Inositol-Kinase 1 (PDK-1) und AGC-Serin-Kinasen wird die Stoffwechselaktivität der Thymozyten gesteigert und sie können proliferieren (Ciofani and Zúñiga-Pflücker 2005, Kelly, Finlay et al. 2007). In SLy1-defizienten Thymozyten zeigt sich eine verringerte Notch-

Einleitung

Signalwegaktivierung mit verringerter Phosphorylierung von Ribosomenprotein S6 und einer verringerten Expression von CD71 und CD98. Die Stimulation mit Notch Ligand von DN SLy1-defizienten Thymozyten führt zu einer verringerten Hochregulation von CD4 und CD8 sowie einer verminderten Proliferation im Vergleich zu WT DN Thymozyten. Die Stimulation von DN3 Prä-TCR⁺ Thymozyten führt in Abwesenheit von funktionalem SLy1 sogar zu einer vermehrten Apoptoserate (Reis, Pfeffer et al. 2009). In SLy1-defizienten DN Thymozyten kann im Gegensatz zu SLy1-defizienten Gesamt-Thymozyten jedoch keine erhöhte Expression von p53 einhergehend mit der erhöhten Apoptoserate festgestellt werden (Schneider 2021).

In SLy1-defizienten Thymozyten konnte des Weiteren eine verstärkte Aktivität des IL-7R Signalweges detektiert werden (Schäll 2015, Kloos 2021).

SLy1 besitzt neben der Rolle in der Thymozytenentwicklung auch eine Funktion in der Aktivierung und Proliferation von ausgereiften T-Zellen. So ist in SLy1-defizienten Mäusen *in vitro* nach Stimulation mit CD3 die T-Zell Proliferation und die Produktion von Zytokinen wie IL-2, IL-4, TNF α und IFN γ vermindert. Ein spezifischer Defekt der T-Zell abhängigen Immunantwort konnte über das verlängerte Überleben von kardialen Allograft Transplantaten in SLy1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Beer, Scheikl et al. 2005). Eine funktionale T-Zell Antwort ist ebenso notwendig für die Abwehr von Bakterien wie *Listeria monocytogenes*. SLy1-KO Mäusen zeigten ein verringertes Überleben nach Listerieninfektion, aufgrund einer insuffizienten T-Zell Proliferation und Differenzierung (Schäll, Schmitt et al. 2015). In SLy1-defizienten T-Zellen wurde ein unveränderter Transport von FOXO1 aus dem Zellkern nach TCR Aktivierung und somit Phosphorylierung von FOXO1 festgestellt. Die Abwesenheit von SLy1 führte jedoch zu einem schnelleren Re-import von FOXO1 und somit zur Aktivierung der Transkription der Zellzyklusarretierenden Proteine p27 und p130. SLy1 scheint dementsprechend relevant zu sein bei der Aufrechterhaltung des korrekten Transports von FOXO1 und im Zuge dessen eine proproliferative Rolle in ausgereiften T-Zellen zu spielen (Eijkelenboom and Burgering 2013, Schäll, Schmitt et al. 2015).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass SLy1 eine entscheidende Rolle in der Thymozytenentwicklung spielt. Die Abwesenheit von SLy1 hat vielfältige Auswirkungen auf den Notch- und den IL-7 Rezeptorsignalweg in den Thymozyten. Dabei ist noch nicht geklärt, an welcher Stelle und über welchen Mechanismus SLy1 in die Signalwege eingreift.

Ziel dieser Arbeit ist es, direkte Interaktionspartner von SLy1 im IL-7 Rezeptorsignalweg und im Crosstalk mit p53 ausfindig zu machen und somit die Position von SLy1 in den Signalwegen einzuordnen.

Dazu sollen als Thymozyten-Modell die humanen T-ALL Zelllinien Loucy und Jurkat verwendet werden. Vorarbeiten wurden zum größten Teil im Mausmodell durchgeführt. Obwohl es Unterschiede in der humanen und murinen Thymozytenentwicklung gibt, sprechen die gute Kultivierbarkeit der humanen T-ALL Zelllinien und die Ähnlichkeit der Jurkat und Loucy Zellen zu frühen T-Zellen für die Verwendung dieser Zelllinien.

Zunächst sollen die bereits beschriebenen Interaktionen des IL-7R Signalwegs und des STAT5-p53 Crosstalks in HEK 293T Zellen nachgewiesen werden. Anschließend soll die Existenz der zuvor untersuchten Interaktionen in Loucy Zellen analysiert werden. Daraufhin soll durch Immunopräzipitation von SLy1 aus Zelllysaten der Loucy Zellen nach direkten Interaktionspartnern von SLy1 im IL-7R-Signalweg und STAT5-p53-Crosstalk gesucht werden. Identifizierte Interaktionen sollen anschließend mittels Transfektion von trunkierten SLy1 Varianten in HEK 293T Zellen auf die Position der Interaktionsstelle im SLy1 Protein hin untersucht werden. Nachfolgend soll mittels Massenspektrometrie das SLy1-Immunopräzipitat aus Loucy Zellen analysiert werden, um mögliche Interaktionspartner in anderen Signalwegen zu finden.

Zuletzt sollen Jurkat SLy1-Knockout Zellen mittels CRISPR/Cas generiert werden. In diesen sollen Veränderungen der Proteinlevel im IL-7R Signalweg verglichen mit Jurkat-Wildtyp-Zellen untersucht werden sowie mögliche Interaktionen des IL-7R und STAT5-p53 Crosstalks in An- und Abwesenheit von SLy1 eruiert werden, um Auswirkungen der SLy1 Defizienz in humanen Leukämiezellen genauer beleuchten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Sigma
Acrylamid	Carl Roth
APS	Sigma Aldrich
β -Mercaptoethanol	Carl Roth
BSA	Sigma Aldrich
CHAPS	Carl Roth
Coomassie Blue R	Sigma Aldrich
DMEM	Sigma Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Pan reac Appli Chem
Fetal Bovine Serum	gibco
Glutamin	Sigma Aldrich
Glycin	Carl Roth
HCl	Carl Roth
Iodacetamide	Merck
Isopropanol	AnalaR Normapur
Lämmli 4x- Roti Load	Carl Roth
LB	Carl Roth
Methanol	Honeywell Riedel de Haen
Milchpulver	Carl Roth
NaCl	AnalaR Normapur
NaN ₃	Carl Roth
Nitrocellulosemembran 0,45 μ m Protran	GE Healthcare
PBS	Sigma Aldrich
Penicillin/ Streptomycin	Sigma Aldrich
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma Aldrich

Material und Methoden

Ponceau S	Sigma Aldrich
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Roche
Protease Inhibitor cOmplete	Roche
Protein A Sepharose beads CL-4B	GE Healthcare
Protein G Agarose beads	Roche
RPMI 1640	Sigma Aldrich
SDS	Carl Roth
TEMED	Sigma Aldrich
Trifluoroacetic Acid (TFA)	Fluka
TRIS/HCl	Carl Roth
Tween	Sigma Aldrich
Westar Supernova Luminol Enhancer	Cyanagen
Westar Supernova Peroxide Solution	Cyanagen
X-treme Gene HP reagent	Roche

2.1.2 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
CHAPS Lysepuffer	0,3 % CHAPS 100 mM NaCl 10 mM TRIS/HCl Eingestellt auf pH 7,5
Coomassie Färbelösung	0,25 % Coomassie Blue R 10 % (v/v) Essigsäure 45 % (v/v) Ethanol
Coomassie Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 20 % (v/v) Methanol
DMEM Medium	DMEM 10 % Fetal Bovine Serum 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

Material und Methoden

FACS Puffer	PBS 0,2 % (w/v) BSA 0,089 % NaN ₃
IAA	2-Iodacetamid 5 mg/ml
LB Medium	20 g/l LB Pulver
On Bead Digest Puffer 1	2 M Urea 50 mM Tris pH 7,5 5 µg/ml Trypsin
Om Bead Digest Puffer 2	2 M Urea 50 mM Tris pH 7,5 1 mM DTT
Ponceau-S	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure
RPMI Medium	RPMI 1640 10 % Fetal Bovine Serum 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Running Puffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Sammelgel 4 %	30 % Acrylamid 0,5 ml Sammelgelpuffer 1,67 ml ddH ₂ O 1,1 ml 20 % SDS 33,3 µl TEMED 6 µl 12,5 % APS 26,7 µl
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
TBS-T	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % Tween

Material und Methoden

Transferpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Trenngel 10 %	30 % Acrylamid 2,22 ml Trenngelpuffer 1,67 ml ddH ₂ O 2,68 ml 20 % SDS 33,3 µl TEMED 3,33 µl 12,5 % APS 53,3 µl
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0/5 Lösung	5 % (v/v) TFA
50/5 Lösung	5 % (v/v) TFA 50 % (v/v) Acetonitril
80/5 Lösung	5 % (v/v) TFA 80 % (v/v) Acetonitril

2.1.3 Plasmide

Plasmid	Vektorplasmid	Quelle
Mdm2-flag	pcDNA3	Jose Luis Rosa
HERC2-F3 fragment-myc		Jose Luis Rosa
P53 CT	CT	Jose Luis Rosa
BRCA1- fragment		Tomohiko Ohta
BARD1-HA		Tomohiko Ohta
SLy1- HA	pWPI	Simone Brandt
SLy1- myc	pSecTagB	Simone Brandt
SLy1-flag	pFlag-CMV TM -2	Simone Brandt
SLy1 Δ SH3-flag	pFlag-CMV TM -2	Simone Brandt
SLy1 Δ SAM-flag	pFlag-CMV TM -2	Simone Brandt
SLy1 Δ NLS-flag	pFlag-CMV TM -2	Simone Brandt
FOXO1-myc		Daniel Schäll

psPAX2	Lentiviraler Verpackungsvektor (Zufferey, Dull et al. 1998)	Simone Brandt
VSV-G		Simone Brandt
Cas9 RFP		SIGMA ALDRICH
gRNA LV03 432		SIGMA ALDRICH
gRNA LVO3 434		SIGMA ALDRICH
gRNA negative control LV03		SIGMA ALDRICH

2.1.4 Primäre Antikörper

Zielstruktur	Verdünnung WB	Verdünnung IP	Firma	Katalog- nummer
BARD1	1:1000	1:100	Thermofisher	A300-263A
BRCA1	1:1000	1:100	Abcam	ab245330
β-Aktin	1:10000		Abcam	ab8227
flag	1:1000	1:100	Sigma Aldrich	F 1804
FOXO1	1:1000	1:100	Cellsignaling	2880S
GAPDH	1:5000		HyTest	Cat564
HA (C29F4)	1:1000	1:100	Cellsignaling	3724S
IgGXP rabbit Isotype Control		1:100	Cellsignaling	3900S
IgG mouse IgG1 Isotype		1:100	Cellsignaling	5415S
Lamin	1:1000		Cellsignaling	2032S
Mdm2 (SMP 14)	1:500	1:100	Santa Cruz	sc-965
myc (9B11)	1:1000	1:1000	Cellsignaling	2276S

Material und Methoden

NPM1	1:5000	1:100	Thermofisher	32-5200
p-SLy1	1:1000	1:100	Charles River	customized
p53 (1C12)	1:1000	1:100	Cellsignaling	2524S
SLy1	1:2000	1:100	Charles River	customized
STAT5 D206Y	1:1000		Cellsignaling	94205S
STAT5B		1:100	Invitrogen	13-5300

2.1.5 Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Anti Rabbit HRP	1:5000	Cellsignaling	7074S
Anti Mouse HRP	1:2000	Santa Cruz	Sc-2055
Clean Blot HRP	1:1000	ThermoScientific	21230

2.1.6 Kits

Beschreibung	Name	Hersteller
Plasmid Vervielfältigung	XL 10 Gold	Agilent Technologies
Plasmid Aufreinigung	Nucleo Bond Maxi Prep	Macherey-Nagel
Proteinkonzentrationsbestimmung	Protein Assay DC	Biorad

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Adhärenz/ Suspension
Loucy	Humane T-ALL	RPMI mit Zusätzen	Suspension
Jurkat	Humane T-ALL	RPMI mit Zusätzen	Suspension
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzelle	DMEM mit Zusätzen	Adhärenz

2.1.8 Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACS Canto™ II	BD Biosciences
GloMax	Promega
Light Cycler 480 II	Roche
Nano Photometer	Implem
Thermal Cycler C1000 Touch	BioRad
VersaDoc	Bio-Rad Laboratories
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge 200R	Hettich Zentrifugen

2.1.9 Software

Software	Hersteller
Epson Scan	Epson
FlowJo	FlowJo, LLC
GraphPad Prism	GraphPad Software
Image Lab	Bio-Rad Laboratories

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei 37° Celsius und 5 % CO₂ im Brutschrank angereichert mit Wasserdampf kultiviert.

Loucy & Jurkat Zellen

Die Zellen wurden in RPMI Medium supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen in 50 ml Röhrchen überführt. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau gemischt und die so angefärbten Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 min bei 5°C und 500 g zentrifugiert. Es folgte das Absaugen des Überstandes und die Resuspension des Pellets in frischem Medium. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 0,5 Millionen Zellen pro ml Medium in 200 ml Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden zweimal die Woche passagiert.

HEK 293T Zellen

Die HEK 293T Zellen wurden in DMEM Medium supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren wurden die HEK Zellen mit Hilfe einer 1 ml Pipette im Medium von der Platte abgespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen überführt und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend erfolgte die 5-minütige Zentrifugation bei 500 g und 5°C. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte das Ausplattieren von 2 Millionen Zellen auf 10 cm Petrischalen in 10 ml Medium. Die HEK Zellen wurden zweimal pro Woche umgesetzt.

2.2.2 Vervielfältigung der Plasmide mittels Nucleo Bond Maxi Prep

Die Vervielfältigung der Plasmide wurde mittels Transformation von kompetenten Bakterien und der anschließenden Plasmidisolation durchgeführt.

Zunächst wurden 45 µl XL10 Gold *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 2 µl β-Mercaptoethanol vermischt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis mit regelmäßigem Schwenken. Es folgte die Zugabe von 4 µl Plasmid

DNA und eine erneute Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Sekunden im Wärmeblock bei 42°C hitzegeschockt. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden die *E.coli* Bakterien in 1 ml LB Medium für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien in 200 ml LB Medium transferiert. Das Medium wurde mit 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin, abhängig von der auf dem Plasmid codierten Resistenz, versetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht schüttelnd bei 130 rpm und 37°C. Die Plasmidisolation wurde mit Hilfe des NucleoBond®Xtra Maxi EF Kits nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Restitution der Plasmid DNA erfolgte in 300 µl Endotoxin freiem Wasser. Die Konzentration der DNA wurde anschließend mit Hilfe des Nanodrop elite bestimmt.

2.2.3 Transfektion der HEK 293T Zellen mittels HP Reagent Xtreme Gene

Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent von der Firma Roche. Dazu wurden 2 Millionen HEK 293T Zellen 24 h vor der Inkubation mit Plasmid DNA in 10 cm Petrischalen mit 10 ml DMEM Medium ausgesät. Am Tag der Transfektion betrug die Konfluenz der Zellen ca. 30 %. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch 9 ml frisches Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde aus 10 µg Plasmid DNA gelöst in 1 ml serumfreiem DMEM Medium und 20 µl Xtreme Transfection Reagent zubereitet. Der Ansatz wurde zunächst durch Pipettieren gut durchmischt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde 1 ml des Transfektionsansatzes tropfenweise auf die Platte mit den ausgesäten HEK 293T Zellen gegeben. Die Platte wurde dabei leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen 72 h bei 5 % CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation betrug die Konfluenz der Zellen über 90 %. Die HEK 293T Zellen wurden mit Hilfe einer 1 ml Pipette im Medium abgespült und in 50 ml Röhrchen überführt. Daraufhin wurden sie über eine Zentrifugation bei 4°C und 500 g über 5 min pelletiert und anschließend zweifach in 10 ml PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die HEK 293T Zellen für eine FACS und Western Blot Analyse weiterverwendet.

2.2.4 Transduktion der Jurkat Zellen

Lentivirenproduktion

Für die Produktion der Lentiviren wurden HEK 293T Zellen mit Pax2, VSV6 und dem jeweilig erwünschten Vektor transfiziert. 24 h vor Transfektion wurden 4 Millionen HEK 293T Zellen ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium mit 9 ml frischem supplementiertem DMEM ersetzt. Für die Transfektion wurden 15 µg Pax2, 5 µg VSV-G und 20 µg Vektor in 1 ml DMEM ohne Zusätze gelöst. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 80 µl HP Transfection Reagent. Der Transfektionsansatz wurde 15 min inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 48 h wurden die Zellen im Medium abgelöst und in 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm. Der Überstand mit den Viren wurde durch ein 0,2 µm Filter steril filtriert um Zellüberreste zu entfernen. Der Lentivirusüberstand wurde in 2 ml Kryoröhrchen überführt und nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Transduktion

Für die Transduktion wurden 0,5 Millionen Jurkat Zellen in 100 µl RPMI in einer 24 Well Platte ausgesät. Dazu wurde 1 ml Lentivirusüberstand pipettiert und 8 µg Polybrene dazugegeben. Nach 30-minütigem Equilibrieren im Brutschrank erfolgte eine zweistündige Zentrifugation bei 1200 rpm bei 32°C. Anschließend wurde der Ansatz für weitere drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Überführen des Ansatzes in 15 ml Röhrchen und 5-minütige Zentrifugation bei 500 g wurde der Virusüberstand abgesaugt und durch 1 ml RPMI Medium ersetzt. Im Verlauf wurden alle 2 Tage das Medium gegen das doppelte Volumen frisches Medium ausgetauscht. Nach dreimaligem Mediumwechsel wurden die Zellen mittels FACS oder Western Blot analysiert.

2.2.5 Durchflusszytometrie zur Überprüfung der Transfektions- und Transduktionsrate

Nach der Ernte der transduzierten bzw. transfizierten Zellen und deren zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 Million Zellen pro ml in FACS Puffer resuspendiert und in FACS Röhrchen überführt. Anschließend wurden sie bei 500 g für 5 min bei 5°C zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 250 µl FACS Puffer pro 1 Million Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden gekühlt direkt zur Analyse im Durchflusszytometer verwendet. Da die verwendeten Leervektoren für GFP, RFP bzw. Cherry kodieren, konnte das Leuchtsignal ohne vorherige Anfärbung detektiert werden. Für GFP erfolgte die Analyse im FITC Kanal und für Cherry und RFP im PE Kanal. Zur Leerkontrolle wurden Zellen mit Vektoren ohne Fluoreszenzproteine transfiziert und verwendet. Die Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe der FlowJo Software ermittelt.

2.2.6 Generierung der Jurkat SLy1 Knockout Zellen

SLy1 Knockout Zellen wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas Systems generiert. Dafür wurden zunächst Lentiviren mit den Vektoren Cas9-RFP bzw. der gRNA 432, gRNA 434 und gRNA negative control nach Prozedere in 2.2.4 hergestellt.

Anschließend erfolgte die Transduktion der Jurkat Zellen mit dem Cas9 Plasmid wie in 2.2.4 beschrieben. Die Transduktionsrate wurde mittels FACS Analyse überprüft. Die Transduktion wurde noch einmal wiederholt. Der Anteil der PE positiven Zellen lag dann bei 80 %. Anschließend wurden die mit Cas9 transduzierten Zellen mit jeweils einer gRNA transduziert. Die Transduktion mit der gRNA wurde ebenfalls zweimalig durchgeführt. Zuletzt erfolgte erneut die Transduktion mit Cas9. Zur Überprüfung des Knockouts wurden die Zellen wie in 2.2.7 beschrieben lysiert und anschließend mittels Western Blot analysiert.

2.2.7 Zellyse

Zur Herstellung der Zelllysate wurden in 10 ml PBS gewaschene Zellpellets in CHAPS Lysepuffer inklusive Phosphatase und Protease Inhibitor (10 µl/1 Million Jurkat/ Loucy bzw. 40 µl/1 Million HEK Zellen) durch regelmäßiges Vortexen 30 min auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 15.000 g. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und bis zur Weiternutzung bei -80°C gelagert.

2.2.8 Lowry Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Kit Protein Assay DC von Biorad verwendet. Das Kit beinhaltet Reagenz A-alkalische Kupfertartrat Lösung,

Reagenz B- verdünntes Folin Reagenz und Reagenz S. Zunächst wurde ein Mix aus Reagenz S und Reagenz A mit dem Verhältnis 20 μl S:1 ml A hergestellt. In einer Mikrotiterplatte wurden pro Well 25 μl Mix vorgelegt. Anschließend wurden 5 μl Zelllysate Probe bzw. Standard hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Als Standard fungierte dabei BSA in einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bzw. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in dem jeweils genutzten Lysepuffer gelöst. Auch eine Probe des Lysepuffers ohne BSA wurde als Leerwert genutzt. Alle Proben und Standards wurden als Triplikate pipettiert. In jedes Well wurden anschließend 200 μl Reagenz B hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Mikrotiterplatte wurde dann 15 min lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption getrennt für jedes Well im GloMAX bei 600 nm gemessen. Aus der Absorption der Triplikate wurde ein Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der Standards inklusive des Leerwerts wurden genutzt, um eine lineare Standardkurve abzuleiten. Durch Einsetzen der gemittelten Absorption der gesuchten Probe in die Standardgleichung konnte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

2.2.9 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde mit Zelllysaten von Loucy, Jurkat bzw. HEK 293T Zellen durchgeführt. Für die Immunopräzipitation wurde das Zelllysate auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. 800 μl der Lösung wurden in ein separates Gefäß überführt und mit der unter 2.1.5. verzeichneten Menge des entsprechenden Antikörpers versetzt. Daraufhin erfolgte eine zweistündige Inkubation unter Bewegung bei 4°C. Im Anschluss wurde die Antikörper/Proteinlösung mit 50 μl Protein A bzw. G gekoppelten Beads versetzt. Diese Beads wurden davor zweifach in 1 ml CHAPS Puffer gewaschen und mittels 10-sekündiger Zentrifugation bei 8000 g wieder pelletiert. Die mit den Beads versetzte Lösung wurde eine weitere Stunde auf dem Rollenmischer bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 800 g für 2 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml CHAPS Puffer resuspendiert. Insgesamt wurden die Beads sechs Mal gewaschen. Nach dem finalen Waschschrift wurde der Überstand verworfen und die pelletierten Beads mit

Material und Methoden

50 µl 2x Lämmli Ladepuffer versetzt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C bis zur Analyse mittels Western Blot.

2.2.10 Western Blot

Western Blots wurden nach dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll durchgeführt. Dafür wurden zunächst 10%ige 1 mm dicke Trenngele hergestellt, indem die in 2.1.2 beschriebenen Reagenzien gut vermischt und zwischen zwei in einer Haltapparatur befestigten Gläsern gegossen wurden. Dabei füllte das Trenngel ca. 2/3 der gesamten Fläche aus. Um eine glatte Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngel vor dem Auspolymerisieren mit Ethanol überschichtet. Nach 30-minütiger Auspolymerisation wurden der Ethanol restlos entfernt. Die Reagenzien für die Sammelgele wurden wie in 2.1.2 beschrieben vermischt und der Raum zwischen den Glasplatten damit vollständig ausgefüllt. Anschließend wurden Käbme mit 10 bzw. 15 Taschen möglichst blasenfrei eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten Auspolymerisation wurden die Gele direkt weiterverwendet oder in feuchte Tücher gehüllt bei 4°C zur späteren Nutzung gelagert.

Die Proben für den Western Blot wurden vor der Benutzung mit 4x Lämmli im Verhältnis 3:1 gemischt und anschließend 5 min bei 95°C unter konstanter Bewegung gekocht. Die Elektrophoresekammern mit eingespannten Gelen wurden mit 1 l Running Puffer gefüllt. Die Beladung der Gele erfolgte mit 20 µl Probe bzw. 5 µl Marker pro Tasche. Die Gelelektrophorese wurde mit 90 V durchgeführt bis die Lauffront das Ende des Sammelgels erreichte. Anschließend wurde die Spannung auf 140 V erhöht. Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront nach ca. 90 Minuten das Ende des Trenngels erreichte. Vor dem Transfer wurden die Gele zur Equilibrierung 20 Minuten in Transferpuffer bei 4°C gelegt. Für den Transfer wurden 10,5*8,5 cm große Nitrocellulosemembranen verwendet, welche zuvor 10 Minuten in Transferpuffer aktiviert wurden. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 100 V für 90 Minuten im Eisbad bei 4°C. Nach dem Transfer wurden die Gele 20 Minuten in Coomassie Blue gefärbt und anschließend über Nacht in Coomassie Destainer entfärbt. Am nächsten Tag erfolgte dann eine Fotografie der Gele im Versa Doc.

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Transfer zunächst in ddH₂O für eine Minute equilibriert und anschließend 5 Minuten in Ponceau S gefärbt. Zum Entfernen der unspezifischen Bindungen wurde sie für 30 Sekunden in ddH₂O gewaschen. Von den gefärbten Membranen wurde mit Hilfe des Epson scans ein Bild gemacht. Falls nötig wurden die gefärbten Membranen geschnitten. Anschließend wurde die Färbung durch 5-minütiges Waschen in TBS entfernt. Es folgte das Blocken der Membran in Milch für eine Stunde auf dem Rollenschüttler. Anschließend wurden die Membranen in 50 ml Röhrchen mit 10 ml des entsprechenden primären Antikörpers überführt und über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges achtminütiges Waschen in TBST. Daraufhin erfolgte die Inkubation in 5 ml sekundärer Antikörperlösung über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer. Nach neuerlichem Waschprozess für drei mal acht Minuten in TBST wurden die Membranen analysiert. Dazu wurden die Westar Supernova Substanzen im Verhältnis 1:1 gemischt und 700 µl des Reagenzes auf einer Membran verteilt. Anschließend wurde die Membran im VERSA Doc analysiert.

2.2.11 On bead digest für Massenspektrometrie

Immunopräzipitationen mittels pSLy1 bzw. IgG rabbit wurden zunächst wie in 2.2.9 beschrieben durchgeführt. Der On Bead Digest erfolgte nach einem Protokoll von Katrin Junger (Arbeitsgruppe Karsten Boldt, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, UKT). Das Waschen der beads wurde 3-malig mit 1ml CHAPS Puffer, einmalig mit 1ml TBS mit 0,01% NP40 und anschließend zweimalig mit TBS durchgeführt. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 60 µl von On Bead Digest Puffer 1 zu den beads gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 27°C für 30 min bei 1200 rpm. Im Anschluss wurde die Suspension für 30 s bei 7000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 0,5 ml Gefäß überführt. Die Beads wurden anschließend zweimalig in 50 µl On Bead Digest Puffer 2 gewaschen. Die Überstände wurden in einem Gefäß zusammengeführt und mit 20 µl IAA versetzt. Die Lösung wurde über Nacht im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde der enzymatische Abbau zunächst durch Zugabe von 1 µl TFA gestoppt. Anschließend wurden die Proben mittels Stage Tips aufkonzentriert. Dafür wurden die Stage Tips zunächst mit 20 µl 80/5 Lösung

equilibriert. Anschließend wurde die Matrix der Stage Tips mit 20 µl 0/5 Lösung gewaschen. Daraufhin wurde die Probe auf die Matrix appliziert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 20 µl 0/5 Lösung wurden die Peptide gelöst und in ein neues Gefäß überführt durch das Eluieren mit 20 µl 50/5 Lösung. Die Elution wurde mit 20 µl 80/5 Lösung wiederholt. Über eine SpeedVac wurde das Volumen anschließend auf 5 µl reduziert. Die Probe wurde zur Analyse mittels Massenspektrometrie in der Arbeitsgruppe Boldt genutzt.

2.2.12 Statistische Analyse und Darstellung

Die quantitative Auswertung der Western Blot Daten erfolgte mit ImageLab. Zur Darstellung der gewonnenen Daten, sowie Ermittlung von Mittelwerten und Standardabweichung wurde GraphPad Prism genutzt. Die Darstellung und Auswertung Durchflusszytometrischer Daten erfolgte mittels FlowJo Software. Zur Erstellung von weiteren Abbildungen wurde zudem PowerPoint verwendet. Die Auswertung der Massenspektrometrischen Daten erfolgte durch die Arbeitsgruppe Boldt. Dabei wurde ein rechtsseitiger Student t-Test genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p=0,01$ festgelegt. Zudem wurde als Cut-off für eine signifikante Anreicherung in der pSLy1-IP ein Verhältnis von pSLy1/ IgG von > 5 definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des p53-Signalwegs

Der p53-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Thymozytenentwicklung. Hohe p53 Level führen zu einer verstärkten Apoptose (Levine 1997). Mdm2 kann an p53 binden und sorgt durch eine Monoubiquitinierung des Proteins für eine kürzere Halbwertszeit und somit für niedrigere Proteinlevel (Haupt, Maya et al. 1997, Moll and Petrenko 2003). HERC2 bindet gleichzeitig mit Mdm2 an p53 und kann somit ebenfalls die p53 Level beeinflussen (García-Cano, Sánchez-Tena et al. 2020).

In SLy1-KO Thymozyten wurde eine Hochregulation von p53 auf mRNA und Proteinebene im Vergleich zu WT Thymozyten gezeigt (Gruber 2021, Kloos 2021). Deshalb wird die Hypothese aufgestellt, dass SLy1 über direkte Interaktionen im p53-Signalweg interagiert.

Zur Analyse des Signalweges wurden die Interaktionen zunächst in Mdm2 und HERC2 überexprimierenden HEK 293T Zellen betrachtet. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Interaktionen des p53-Signalweges in der T-ALL Zelllinie Loucy. Zur Charakterisierung der Rolle von SLy1 wurde daraufhin in Loucy Zellen mittels Immunopräzipitationen nach direkten Interaktionspartnern von SLy1 im p53-Signalweg gesucht.

3.1.1 Interaktionen im p53-Signalweg in HEK 293T Zellen

Die Interaktion von Mdm2-p53 und HERC2 wurde in Mdm2 und HERC2 überexprimierenden HEK 293T untersucht. Die Plasmide Mdm2-flag, p53 und HERC2-myc zur Transfektion der HEK 293T Zellen wurden freundlicherweise von Jose Luis Rosa zur Verfügung gestellt. HERC2 scheint gleichzeitig mit Mdm2 an p53 zu binden (García-Cano, Sánchez-Tena et al. 2020). Deshalb sollte es möglich sein, durch die Immunopräzipitation von Mdm2 auch HERC2 nachzuweisen. Ebenso sollte in der IP von HERC2 auch Mdm2 nachweisbar sein. Zunächst wurden HEK 293T Zellen mit Mdm2-flag, p53 und dem F3 Fragment von HERC2-myc transfiziert. Die Überprüfung der Transfektion erfolgte mittels Western Blot. Anschließend wurden aus dem Proteinlysate der transfizierten Zellen Immunopräzipitationen mittels myc- bzw. flag-Antikörper

Ergebnisse

(AK) durchgeführt. Als Leerkontrolle diente die IP der Zelllysate von mit pcDNA3 Leervektor transfizierten HEK 293T Zellen. Die Immunopräzipitation wurde im Anschluss durch Western Blots analysiert (Abbildung 1).

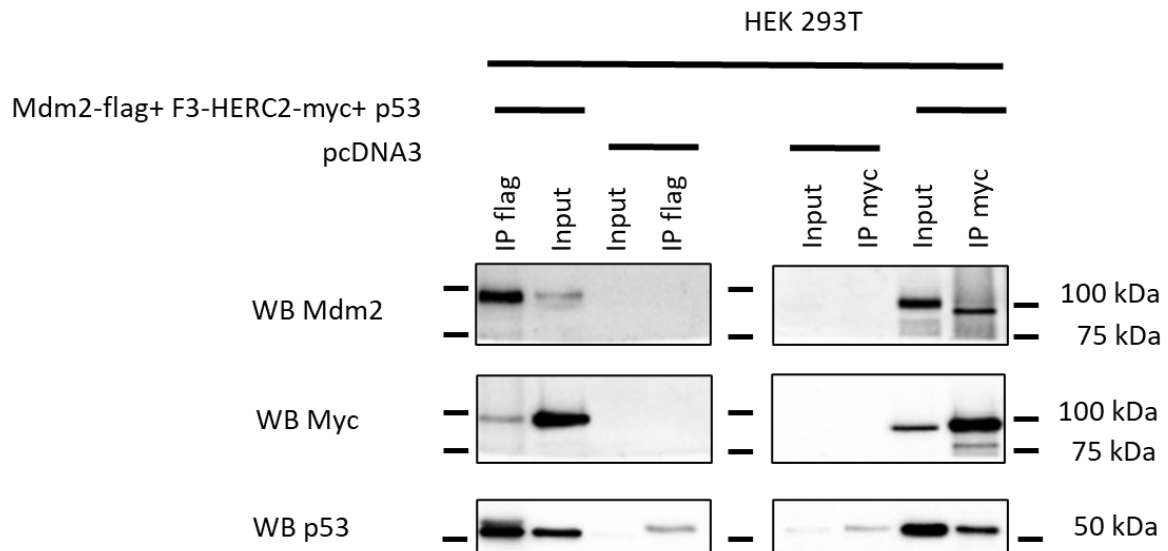


Abbildung 1 Interaktionsanalyse von Mdm2, p53 und HERC2 in HEK 293T Zellen

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von HERC2-myc und Mdm2-flag aus HEK 293T Zelllysaten (n=3). HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder Mdm2-flag, HERC2-myc und p53 Plasmid transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels flag und myc Antikörper und anschließender Western Blot Analyse untersucht. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (Mdm2, obere Reihe, myc mittlere Reihe, p53 untere Reihe) und sekundärer anti-mouse HRP-gekoppelten AK. Input: 2,5 µg. Belichtungszeiten: myc: 20 s (links)/ 5 s (rechts); p53: 1 s; Mdm2: 60 s.

Im Zelllysate der dreifach transfizierten Zellen können Mdm2, HERC2 mittels myc-AK und p53 detektiert werden. Im Input der Leerkontrolle hingegen ist kein Mdm2 und HERC2 nachweisbar. Zudem wird eine nur sehr schwache p53 Bande im Input der Leerkontrolle gefunden. In der IP mittels flag-AK zeigt sich bei den dreifach transfizierten Zellen eine kräftige Mdm2 Bande und eine im Vergleich zum Input etwas schwächere HERC2-myc Bande. Auf Höhe von p53 werden zwei ineinander übergehende Banden detektiert. Dabei stellt die obere p53 dar, die untere repräsentiert die schwere IgG Kette bei 50 kDa, welche durch den sekundären anti-mouse-AK erkannt wird. Die IgG Bande bei 50 kDa ist auch in der flag-IP der Leerkontrolle zu erkennen. Ansonsten bleibt die Leerkontrolle erwartungsgemäß leer. In der IP mittels myc zeigt sich eine starke HERC2 Bande

Ergebnisse

und eine, im Vergleich zum Input, schwächere Mdm2 Bande. In der p53 Reihe wird eine kräftige p53 Bande im Vergleich zu der deutlich schwächeren Bande auf der gleichen Höhe in der myc-IP der Leerkontrolle gefunden. Dabei scheint die IgG Bande des myc-AK auf der gleichen Höhe wie p53 zu liegen. Es ist demnach nicht möglich, die Menge des mit HERC2-myc coimmunpräzipitierten p53 zu bestimmen. Da jedoch Mdm2 eindeutig nachgewiesen wird, ist davon auszugehen, dass auch p53 in der IP zu finden ist.

Insgesamt kann die gleichzeitige Bindung von HERC2 und Mdm2 an p53 im überexprimierten Zustand in HEK 293T Zellen bestätigt werden.

3.1.2 Interaktionen im p53-Signalweg in Loucy Zellen

Als nächstes wurde die Interaktion zwischen Mdm2-p53 und HERC2 in Loucy Zellen untersucht. HERC2 mit einer Größe von 530 kDa lässt sich im Loucy Zelllysate nicht detektieren. Deshalb wurde nur die Interaktion zwischen p53 und Mdm2 betrachtet (Abbildung 2).

In der Western Blot Analyse zeigt sich im Input der Loucy Zelllysate jeweils eine dünne Bande von Mdm2 und p53. Der Nachweis von p53 in den IPs gestaltete sich schwierig, da die IgG Bande auf 50 kDa ebenfalls durch den sekundären anti-mouse-AK erkannt wird und die p53 Bande überstrahlt. Damit ist es nicht möglich zu sagen, ob p53 in der p53-IP und der Mdm2-IP nachweisbar ist, oder ob die gesamte Stärke der Bande auf der Menge des für die IP genutzten AK beruht. Bei Mdm2 sind jeweils drei Banden durch den Mdm2-AK nachweisbar. Eine auf Höhe von 75 kDa und eine bei 110 kDa in den IPs, welche unspezifische IgG Banden darstellen. Zudem zeigte sich eine Bande, die der Mdm2 Bande entspricht, bei 90 kDa. Die 90 kDa Bande kann sowohl bei der IP mittels Mdm2-AK als auch bei der IP mittels p53-AK detektiert werden. Das spricht für eine Interaktion zwischen p53 und Mdm2 in Loucy Zellen.

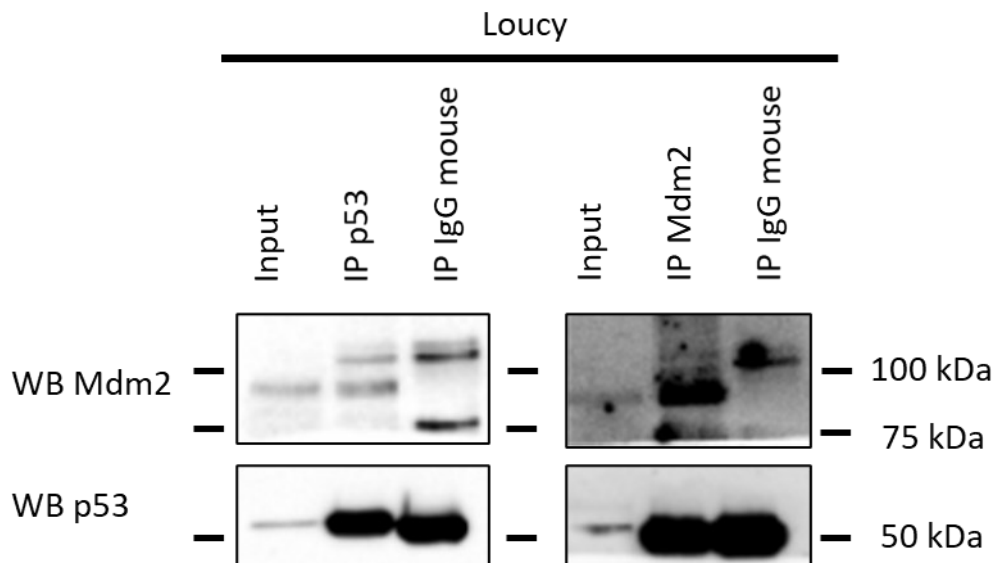


Abbildung 2 Interaktionsanalyse von Mdm2 und p53 in Loucy Zellen

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von Mdm2 und p53 aus Loucy Proteinlysate (n=3). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG mouse. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (Mdm2, obere Reihe und p53, untere Reihe) und sekundärer Clean Blot HRP-gekoppelter AK. Input: 10 µg (links), 2,5 µg (rechts) Loucy Proteinlysate. Belichtungszeiten: Mdm2: 30 s (links)/ 120 s (rechts); p53: 1 s (links)/ 120 s (rechts).

3.1.3 Analyse möglicher Interaktionspartner im p53-Signalweg mittels Immunopräzipitation aus Loucy Zellen

Zur Analyse möglicher Interaktionspartner von SLy1 im p53-Signalweg, wurde eine Immunopräzipitation von SLy1 aus Loucy Zellen durchgeführt und anschließend das Präzipitat mittels Western Blot auf coimmunopräzipitierte Proteine untersucht.

In SLy1-KO Thymozyten ist p53 auf mRNA und Protein Ebene im Vergleich zu WT Thymozyten hochreguliert (Gruber 2021, Kloos 2021). Daher sollte untersucht werden, ob SLy1 durch eine direkte Bindung an p53 dessen Abbau unterstützt. Dafür wurde das Proteinlysate von Loucy Zellen mittels spezifischer SLy1- und p53-AK immunopräzipitiert. Als Leerkontrolle wurde eine Immunopräzipitation mit rabbit bzw. mouse IgG Antikörpern durchgeführt (Abbildung 3).

Ergebnisse

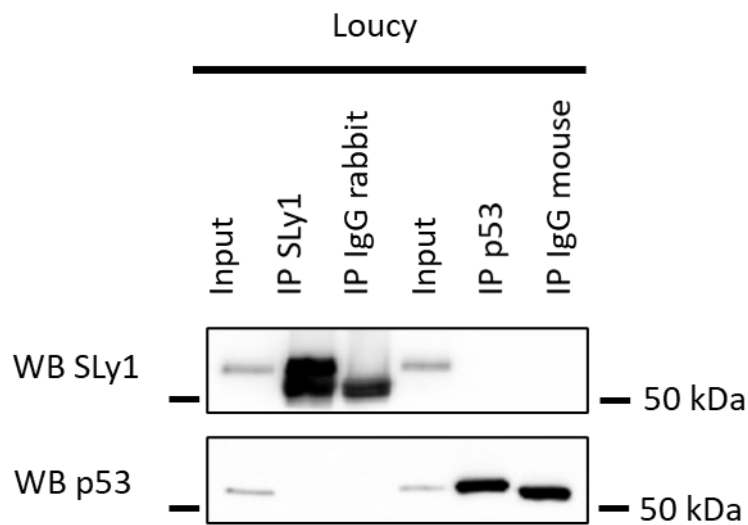


Abbildung 3 Interaktionsanalyse von p53 und SLy1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von SLy1 und p53 aus Loucy Proteinlysate (n=3). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG (IP IgG rabbit bzw. IP IgG mouse). Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (SLy1 obere Reihe, p53 untere Reihe) und sekundärer anti-mouse bzw. anti-rabbit-HRP-gekoppelter Antikörper. Input: 10 µg Loucy Proteinlysate. Belichtungszeiten SLy1: 1 s; p53: 1 s.

In der Western Blot Analyse zeigen sich bei der Detektion mittels SLy1-AK schmale Banden auf Höhe von 55 kDa im Loucy Proteinlysate (Input). Auf der gleichen Höhe zeigt sich eine kräftige Bande in der Immunopräzipitation mittels SLy1-AK. Direkt darunter, auf Höhe von 50 kDa, ist eine kräftige Bande, sowohl bei der IP mittels SLy1-AK, als auch bei der IP mittels IgG rabbit sichtbar. Diese repräsentieren die 50 kDa schwere Kette des IgG, der für die IP genutzten AK. Diese werden durch den genutzten sekundären anti-rabbit-AK ebenfalls erkannt. In der Immunopräzipitation von p53 mittels spezifischem AK und der Negativkontrolle der IP mittels unspezifischen IgG mouse-AK werden keine Banden vom SLy1-AK detektiert. In der Analyse der Immunopräzipitationen mittels p53-AK können schwache Banden auf Höhe von 53 kDa im Input beobachtet werden. Zudem zeigt sich eine starke Bande auf Höhe von p53 in der p53-IP. Die Bande der Negativkontrolle (IP IgG mouse) zeigt die schwere Bande des zur IP genutzten AKs bei ca. 50 kDa. In der SLy1-IP und der korrespondierenden Negativkontrolle können keine Banden mittels p53-AK detektiert werden. Insgesamt finden sich keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen p53 und SLy1.

Ergebnisse

Mdm2 kann als Gegenspieler von p53 an das Protein binden und durch dessen Monoubiquitinierung für einen stärkeren Abbau und somit für niedrigere Proteinlevel sorgen (Haupt, Maya et al. 1997, Moll and Petrenko 2003). Erhöhte p53-Level in SLy1-KO Thymozyten könnten dementsprechend auch durch die Hemmung der Funktion von Mdm2 in SLy1-KO Thymozyten bedingt sein.

Die Analyse der Immunopräzipitation aus Loucy Proteinlysaten mittels spezifischer Mdm2- bzw. SLy1-AK kann allerdings keine Interaktion aufzeigen (Abbildung 4). An den kräftigen Banden der IP von Mdm2 und von SLy1, detektiert durch den jeweils spezifischen AK, ist ersichtlich, dass die Immunopräzipitationen erfolgreich waren. Die Negativkontrollen mittels IgG mouse bzw. IgG rabbit bleiben auf Höhe der spezifischen Banden leer. In der Analyse der Immunopräzipitation durch den jeweils anderen Antikörper können ebenfalls keine Banden detektiert werden, weshalb eine Bindung von Mdm2 an SLy1 unwahrscheinlich erscheint.

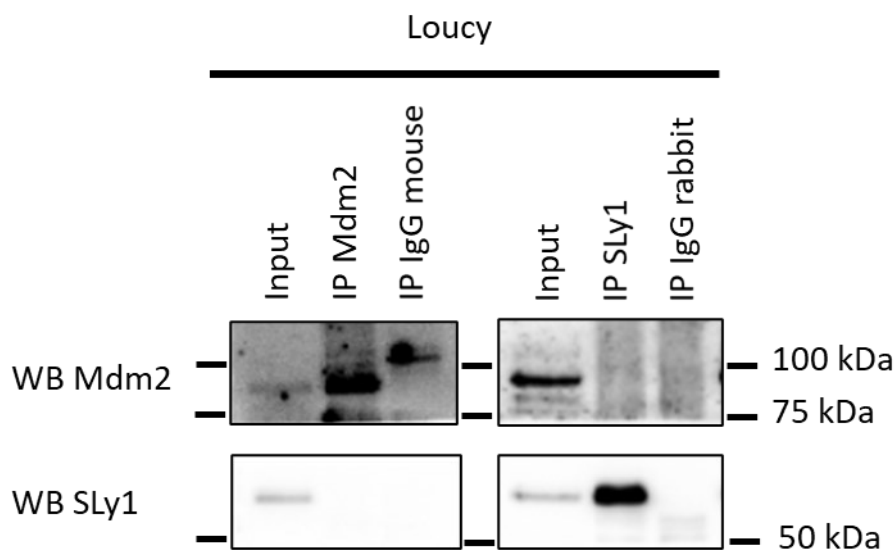


Abbildung 4 Interaktionsanalyse von Mdm2 und SLy1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von SLy1 und Mdm2 aus Loucy Proteinlysate (n=3). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG (IP IgG mouse bzw. IP IgG rabbit). Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (Mdm2 obere Reihe, SLy1 untere Reihe) und sekundärer anti-mouse bzw. Clean Blot HRP-gekoppelter Antikörper. Input: 2,5 µg (links) bzw. 5 µg (rechts) Loucy Proteinlysate. Belichtungszeiten: Mdm2: 120 s (links)/ 200 s (rechts); SLy1: 5 s (links)/10 s (rechts).

Die Hypothese, dass SLy1 über direkte Interaktionen in den p53-Signalweg eingebunden ist, kann auf Basis der erfolgten Untersuchungen nicht belegt werden.

3.2 Analyse des STAT5-NPM1-Signalweges

Die Aktivierung des pro-proliferativen IL-7R Signalweges führt zur Hochregulation von phosphoryliertem STAT5 (Chetoui, Boisvert et al. 2010). Im Crosstalk des STAT5 und p53-Signalweges sind BRCA1/ Bard1 und NPM1 eingebunden. Dabei ist STAT5 in der Lage, über Hemmung des BRCA1/Bard1 Komplexes einen vermehrten Abbau von NPM1 herbeizuführen. Im Sinne eines Feedbackmechanismus führt NPM1 wiederum zu einer Erniedrigung von phosphoryliertem STAT5 (Ren, Aerts et al. 2016). NPM1 ist zudem in der Lage, p53 über eine direkte Bindung vor dem Mdm2 medierten Abbau zu schützen (Colombo, Marine et al. 2002, Kurki, Peltonen et al. 2004).

In SLy1-KO Thymozyten wurden erhöhte Level von STAT5 festgestellt, die jedoch nicht, aus dem Crosstalk ableitbare, niedrige p53 Level zur Folge haben. Dabei ergibt sich die Hypothese, dass SLy1 über eine direkte Interaktion in den STAT5-NPM1-Signalweg eingebunden ist.

Zur Untersuchung des STAT5-NPM1-Signalweges wurden die Interaktionen zunächst in Bard1/ BRCA1 überexprimierenden HEK 293T Zellen untersucht. Im Anschluss soll analysiert werden, ob die Interaktionen auch in den T-ALL Loucy Zellen nachweisbar sind. Zur genaueren Analyse der Rolle von SLy1 im Crosstalk folgt dann die Interaktionsanalyse mittels Immunopräzipitationen aus Loucy Zellen. Beobachtete Interaktionen werden in einem letzten Schritt in HEK 293T Zellen mit Hilfe von verschiedenen SLy1 Konstrukten tiefergehend untersucht.

3.2.1 Interaktionen im STAT5-NPM1-Signalweg in HEK 293T Zellen

Es wird berichtet, dass NPM1 an den BRCA1-BARD1 Komplex bindet (Sato, Hayami et al. 2004, Ren, Aerts et al. 2016). Diese Bindung sollte mit Hilfe der Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Zunächst wurden HEK 293T Zellen mit BARD1-HA und BRCA1-Plasmid transfiziert. Das BRCA1 Plasmid enthielt dabei nur die N-terminale RING Domäne, weshalb das Proteinprodukt eine Größe von 100 kDa aufwies. Die Plasmide Bard1-HA und BRCA1 wurden

Ergebnisse

freundlicherweise von Tomohiko Ohta (Japan) zur Verfügung gestellt (Ren, Aerts et al. 2016). Die erfolgreiche Transfektion wurde mittels Western Blot überprüft. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation aus dem Proteinlysat der transfizierten Zellen mit HA, BRCA1 oder NPM1 Antikörper durchgeführt. Als Leerkontrolle wurden Proteinlysate von mit Leervektor transfizierten Zellen verwendet. Die Immunopräzipitation wurde mittels Western Blot analysiert (Abbildung 5).

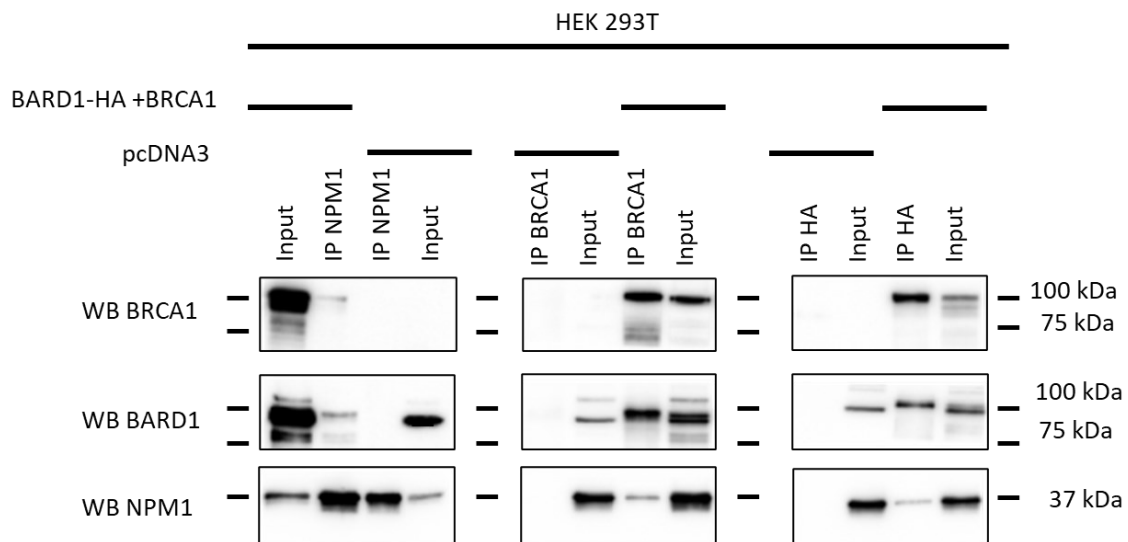


Abbildung 5 Interaktionsanalyse von Bard1-HA, BRCA1 und NPM1 in HEK 293T Zellen

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von Bard1, BRCA1 und NPM1 aus HEK 293T Zelllysaten (n=3). HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder BRCA1 und Bard1-HA Plasmid transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels HA, NPM1 und BRCA1 Antikörper und anschließender Western Blot Analyse untersucht. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (BRCA1, obere Reihe, Bard1 mittlere Reihe, NPM1 untere Reihe) und sekundärer anti-rabbit bzw. anti-mouse HRP-gekoppelter AK. Input: 2,5 µg (links); 5 µg (Mitte und rechts). Belichtungszeiten: BRCA1:10 s (links)/ 20 s (Mitte)/ 2 s (rechts); Bard1: 10 s (links)/ 5 s (Mitte)/ 1 s (rechts); NPM1: 1 s.

Dabei sind sowohl im Input der doppelt transfizierten Zellen also auch in der zum jeweiligen Protein spezifischen IP deutliche Banden der Proteine erkennbar. Bei allen drei IPs aus den mit BRCA1 und Bard1 transfizierten Zellen finden sich in der Western Blot Analyse auch bei den co-immunopräzipitierten Proteinen Banden. Diese sind bei Bard1-HA und BRCA1 untereinander kräftiger als bei NPM1 in Verbindung mit Bard1 bzw. BRCA1. Im Input der mit Leervektor transfizierten Zellen wird jeweils NPM1 und eine, im Vergleich zu den transfizierten Zellen, schwache Bande von Bard1 detektiert. BRCA1 kann in der

Leerkontrolle weder auf Höhe des Fragments bei 100 kDa, noch auf Höhe der ungekürzten Form bei 210 kDa detektiert werden. In der IP der Leerkontrolle mittels HA und BRCA1 wird für keines der Proteine eine Bande nachgewiesen. In der IP mittels NPM1 wird erwartungsgemäß eine kräftige NPM1 Bande detektiert. Im Gegensatz zu der NPM1-IP der doppelt transfizierten Zellen zeigt sich hier jedoch keine Bard1 oder BRCA1 Bande. Insbesondere die Abwesenheit der Bande bei Bard1 zeigt, dass die Überexprimierung der beiden Proteine ein relevanter Faktor für die Nachweisbarkeit der Interaktion ist.

Zusammenfassend kann eine Bindung von Bard1 an BRCA1 im überexprimierten Zustand in HEK 293T Zellen nachgewiesen werden. Die Interaktion der beiden Proteine mit NPM1 ist schwächer, aber ebenfalls detektierbar.

3.2.2 Interaktionen im STAT5-NPM1-Signalweg in Loucy Zellen

Im Anschluss an die Bestätigung der Interaktionen im überexprimierten Zustand in HEK 293T Zellen stellte sich die Frage, ob diese Interaktionen auch in Loucy Zellen als Modell für Thymozyten darstellbar sind.

Zunächst wurde die Interaktion zwischen Bard1-BRCA1 und NPM1 betrachtet. BRCA1 kann in der Western Blot Analyse der Loucy Zelllysate nicht nachgewiesen werden. Deshalb beschränkte sich die Interaktionsanalyse auf die Interaktion zwischen Bard1 und NPM1 (Abbildung 6).

In der Western Blot Analyse zeigt sich bei Bard1 im Input und in der IP mittels Bard1-AK eine deutliche Bande. Die Leerkontrollen IP mittels IgG rabbit bzw. IgG mouse bleiben leer. In der IP mittels NPM1-AK kann kein Bard1 nachgewiesen werden. In der Detektion mittels NPM1 zeigt sich im Input und in der IP mittels NPM1-AK jeweils eine Bande. In der Leerkontrolle zeigt sich auf Höhe von 37 kDa keine Bande, jedoch auf Höhe von 25 kDa ist sowohl in der NPM1-IP, als auch in der IgG mouse IP eine Bande nachweisbar. Diese repräsentiert die leichte IgG Kette der zur IP genutzten AK. In der IP mittels Bard1-AK zeigt sich eine leichte NPM1 Bande. Insgesamt kann also eine Ko-Immunopräzipitation von NPM1 mittels Bard1-AK detektiert werden. Bard1 ist jedoch nicht in der IP mittels NPM1-AK nachweisbar.

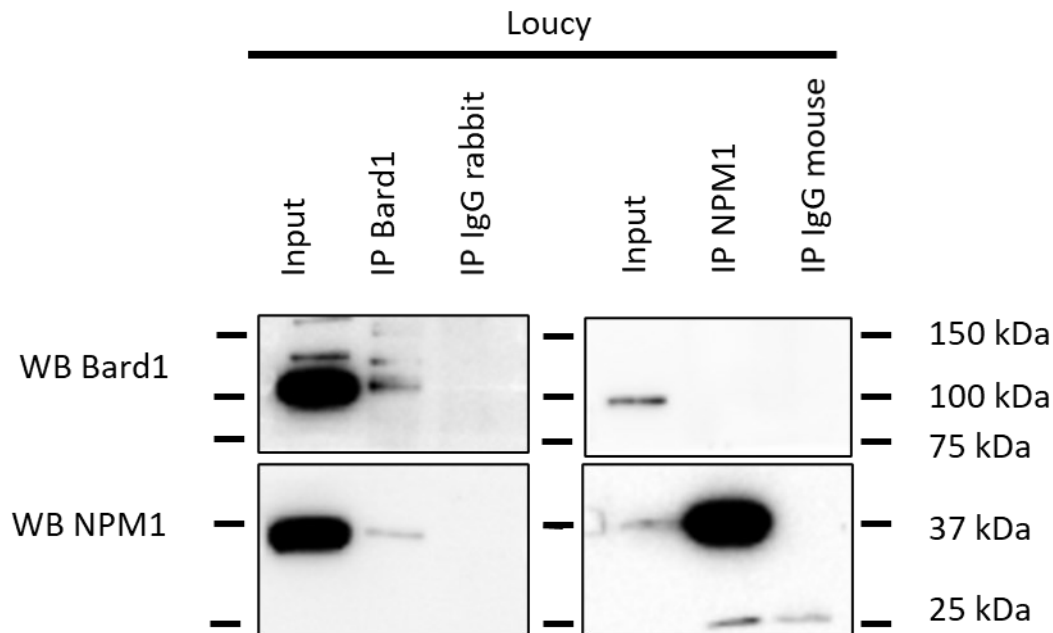


Abbildung 6 Interaktionsanalyse von Bard1 und NPM1 in Loucy Zellen

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von Bard1 und NPM1 aus Loucy Proteinlysate (n=3). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG (IP IgG mouse bzw. IP IgG rabbit). Die Detektion erfolgte mittels angegebenen primären AK (Bard1, obere Reihe und NPM1, untere Reihe) und sekundärem anti-mouse bzw. Clean Blot HRP-gekoppeltem AK Input: links: 2,5 µg, rechts: 0,5 µg Loucy Proteinlysate. Belichtungszeit: Bard1: 20 s (links)/ 60 s (rechts); NPM1: 1 s.

3.2.3 Analyse möglicher Interaktionspartner im STAT5-NPM1-Signalweg mittels Immunopräzipitation aus Loucy Zellen

Die erhöhte Aktivierung des IL-7-Rezeptorsignalweges führt in SLy1-KO DN Thymozyten zu erhöhten STAT5-Leveln (Schäll 2015, Kloos 2021). Im Zuge des p53-STAT5 Crosstalks müsste dadurch weniger p53 detektierbar sein (Ren, Aerts et al. 2016). In SLy1-KO Thymozyten können jedoch erhöhte p53-Level festgestellt werden (Gruber 2021, Kloos 2021). Daher stellt sich die Frage, ob SLy1 direkt mit STAT5 interagieren kann und so die Signalkaskade unterbricht, was in SLy1-KO Thymozyten zu einer erhöhten Expression führen könnte. Mittels Western Blot wurden Immunopräzipitationen mit STAT5- und SLy1-AK durchgeführt, um eine Interaktion zu untersuchen (Abbildung 7).

In der Analyse der Immunopräzipitation der Loucy Proteinlysate mit SLy1 kann STAT5 in geringen Mengen detektiert werden. Die Immunopräzipitation mittels

Ergebnisse

STAT5B weist ebenfalls geringe Mengen an SLy1 auf. In der Immunopräzipitation mittels unspezifischem IgG mouse bzw. IgG rabbit werden durch den STAT5-AK keine Banden detektiert. In der Immunopräzipitation mittels IgG rabbit können durch den SLy1-AK zwei Banden auf Höhe von 50 und ca. 52 kDa detektiert werden. Diese sind ebenfalls in der IP mittels SLy1-AK sichtbar und entsprechen den schweren IgG Banden der genutzten AK. Auf der mit der SLy1 Bande übereinstimmenden Höhe von 55kDa werden keine Banden durch den SLy1-AK in der IgG rabbit Negativkontrolle detektiert. Die Western Blot Analyse der Immunopräzipitationen mittels SLy1-AK und STAT5B-AK liefert Anhaltspunkte für eine mögliche Interaktion der beiden Proteine.

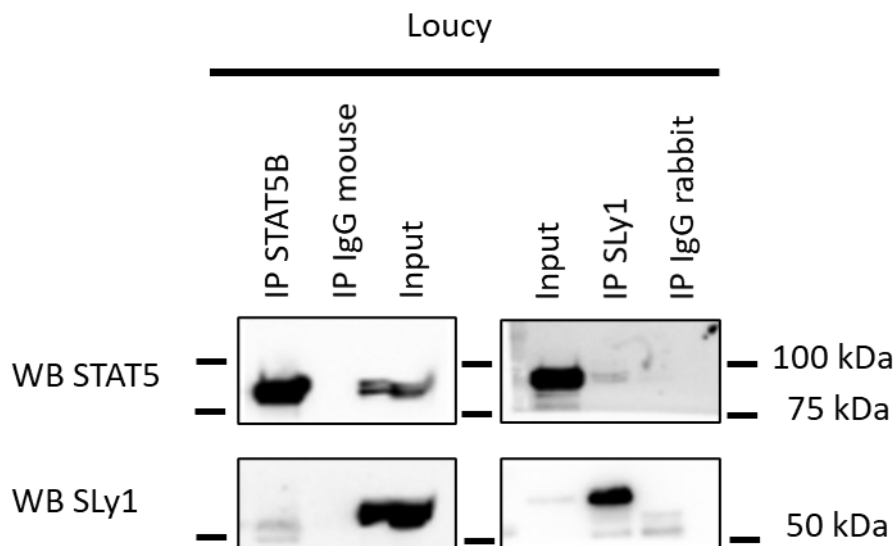


Abbildung 7 Interaktionsanalyse von STAT5 und SLy1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von SLy1 und STAT5 aus Loucy Proteinlysate (n=2). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG (IgG rabbit bzw. IgG mouse). Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (STAT5, obere Reihe und SLy1, untere Reihe) und sekundärer Clean Blot HRP-gekoppelter Antikörper. Input: 5 µg (links) bzw. 2,5 µg (rechts) Loucy Proteinlysate. Belichtungszeiten: STAT5: 30 s (links)/ 120 s (rechts); SLy1: 60 s (links) /10 s (rechts).

Phosphoryliertes STAT5 vermindert über Hemmung der Expression von Bard1 und BRCA1 die Bildung des Bard1/BRCA1 Komplexes. Der Bard1/BRCA1 Komplex ist in der Lage, über Ubiquitinierung von NPM1, dieses vor der Degradation zu schützen. Erniedrigte Level des Komplexes führen demzufolge zu niedrigeren NPM1-Leveln (Ren, Aerts et al. 2016). Eine Interaktion von SLy1 mit dem Bard1/BRCA1 Komplex könnte ein Teil der Signalkaskade des STAT5-

Ergebnisse

p53 Crosstalks sein. Die Abwesenheit von SLy1 könnte somit die erhöhten p53-Level bei erhöhter STAT5 Expression erklären. BRCA1 konnte mit den verwendeten Antikörpern im Proteinlysate der Loucy Zellen nicht zuverlässig detektiert werden. Deshalb wurde nur die Interaktion zwischen Bard1 und SLy1 untersucht (Abbildung 8).

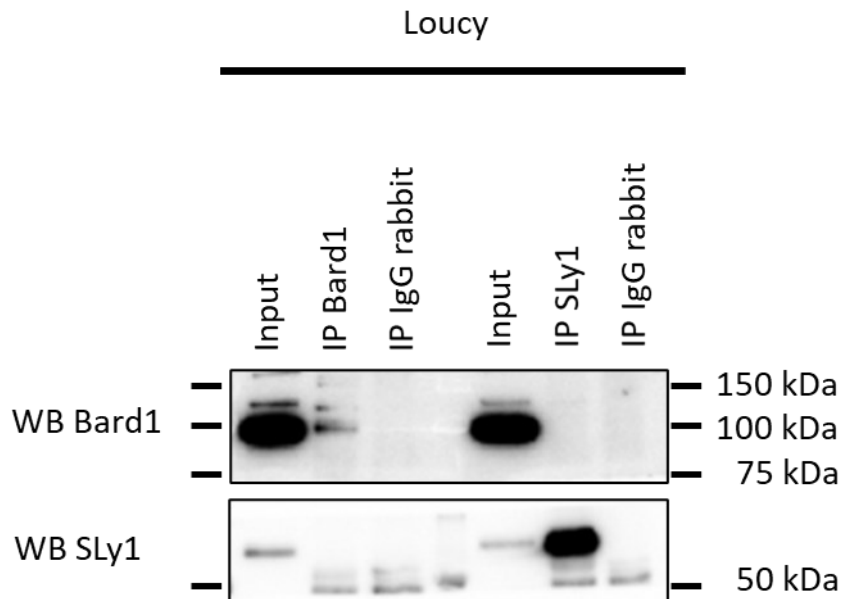


Abbildung 8 Interaktionsanalyse von Bard1 und SLy1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von SLy1 und Bard1 aus Loucy Proteinlysate (n=3). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG rabbit. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (Bard1, obere Reihe und SLy1, untere Reihe) und sekundärer Clean Blot HRP-gekoppelter AK. Input: 2,5 µg Loucy Proteinlysate. Belichtungszeiten: Bard1: 20 s; SLy1: 10 s.

Die Analyse der Immunopräzipitation mittels Bard1-AK weist eine durch den spezifischen Bard1-AK detektierte schwache Bande im Vergleich zur starken Bande im Loucy Proteinlysate (Input) auf. Dies deutet auf eine geringe Effektivität der Immunopräzipitation hin. Die Analyse der Bard1-IP mit dem SLy1-AK zeigt keine Bande auf Höhe der SLy1 Input Bande. Die Immunopräzipitation von SLy1 weist eine kräftige SLy1 Bande, jedoch keine durch Bard1 detektierte Bande auf. Die Negativkontrollen durch IP IgG rabbit zeigen jeweils auf Höhe von 50 kDa eine Bande, die die schwere IgG Kette repräsentiert. Auf Höhe der spezifischen Banden von SLy1 und Bard1 bleiben die Negativkontrollen leer. Insgesamt liefert

Ergebnisse

die Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von SLy1 und Bard1 keinen Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine.

NPM1 nimmt eine zentrale Rolle im Crosstalk zwischen dem p53- und dem STAT5 Signalweg ein. So führt NPM1 zu einer erhöhten STAT5 Expression und gleichzeitig zu einer verminderten Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT5 (Ren, Aerts et al. 2016). Auf der anderen Seite bindet NPM1 direkt an p53 und schützt es vor dem durch Mdm2 initiierten Abbau. Zusätzlich bindet es an Mdm2 und verhindert somit die Bindung von Mdm2 an p53 (Colombo, Marine et al. 2002, Kurki, Peltonen et al. 2004). Die Analyse der Immunopräzipitationen mittels SLy1 und NPM1 Antikörpern liefert Hinweise auf eine mögliche Interaktion (Abbildung 9).

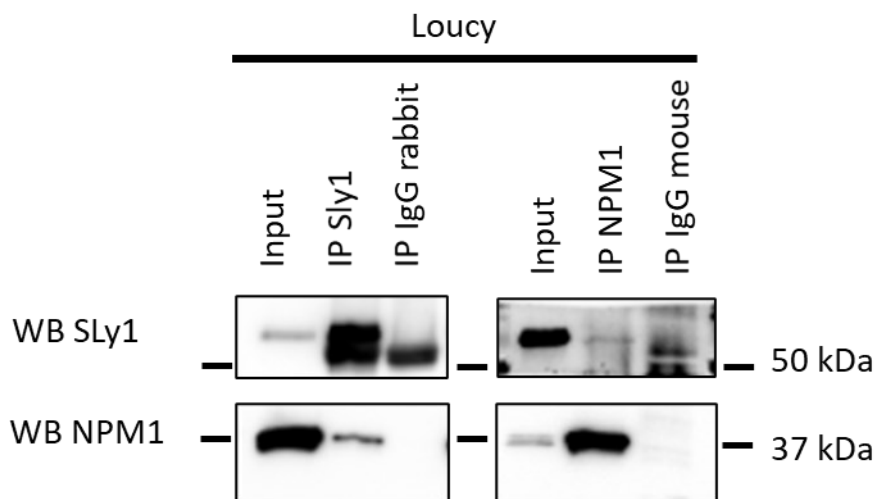


Abbildung 9 Interaktionsanalyse von NPM1 und SLy1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von SLy1 und NPM1 aus Loucy Proteinlysate (n=3). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG (IP IgG mouse bzw. IP IgG rabbit). Die Detektion erfolgte mittels angegebenen primären AK (SLy1, obere Reihe und NPM1, untere Reihe) und sekundären anti mouse bzw. anti rabbit gekoppelten-HRP Antikörpern. Input: 10 μ g (links) bzw. 1 μ g (rechts) Loucy Proteinlysate. Belichtungszeiten: SLy1 1 s (links)/ 120 s (rechts); NPM1: 20 s (links)/ 1 s (rechts).

In der Analyse der SLy1-IP ist eine deutliche durch den NPM1-AK detektierte Bande sichtbar, während in der Negativkontrolle (IP mittels IgG rabbit) keine Bande detektiert wird. In der Analyse der Immunopräzipitation mittels NPM1-AK ist eine schwache, durch den SLy1-AK detektierte Bande auf Höhe der SLy1 Input Bande erkennbar. Allerdings ist die Negativkontrolle (IP mittels IgG mouse)

Ergebnisse

nicht vollständig leer, sondern es finden sich hier auf Höhe von ca. 50 kDa verwaschene Banden. Diese repräsentieren vermutlich unspezifisch erkannte IgG schwere Ketten, die durch den sekundären anti-rabbit-HRP gekoppelten Antikörper erkannt werden.

Die Hypothese, dass SLy1 in den STAT5-NPM1 Signalweg über direkte Interaktionen eingebunden ist, kann bestätigt werden. Die erhobenen Daten belegen eine Interaktion zwischen SLy1-NPM1 und SLy1-STAT5.

3.2.4 Erweiterte Analyse möglicher Interaktionspartner im STAT5-NPM1 Signalweg

3.2.4.1 Interaktion STAT5-SLy1

STAT5 wurde als möglicher Bindungspartner von SLy1 in der Interaktionsanalyse in Loucy Zellen identifiziert.

Zur Untersuchung möglicher Bindungsstellen von STAT5 am SLy1 Protein wurde zudem eine Interaktionsanalyse mittels Raptor X Complex Contact durchgeführt (Wang, Sun et al. 2017, Zhou, Wang et al. 2017, Wang, Sun et al. 2018, Zeng, Wang et al. 2018). Dieses deep-learning Programm ist in der Lage vorauszusagen, in welchen Bereichen zweier Proteine die Wahrscheinlichkeit der Interaktion der Aminosäurereste, aufgrund des geringen Abstands der Nicht-Wasserstoffatome des Rückgrats, am größten ist. Wahrscheinliche Interaktionsdomänen liegen demnach zwischen AS 225-232 des SLy1 Proteins (Abbildung 10). Diese Aminosäuren befinden sich in der SH3 Domäne (Beer, Scheikl et al. 2005). Die Interaktionsstelle im STAT5 Protein liegt zwischen AS 439 und 448. Diese AS sind Teil der DNA Binding Domäne (Able, Burrell et al. 2017).

Ergebnisse

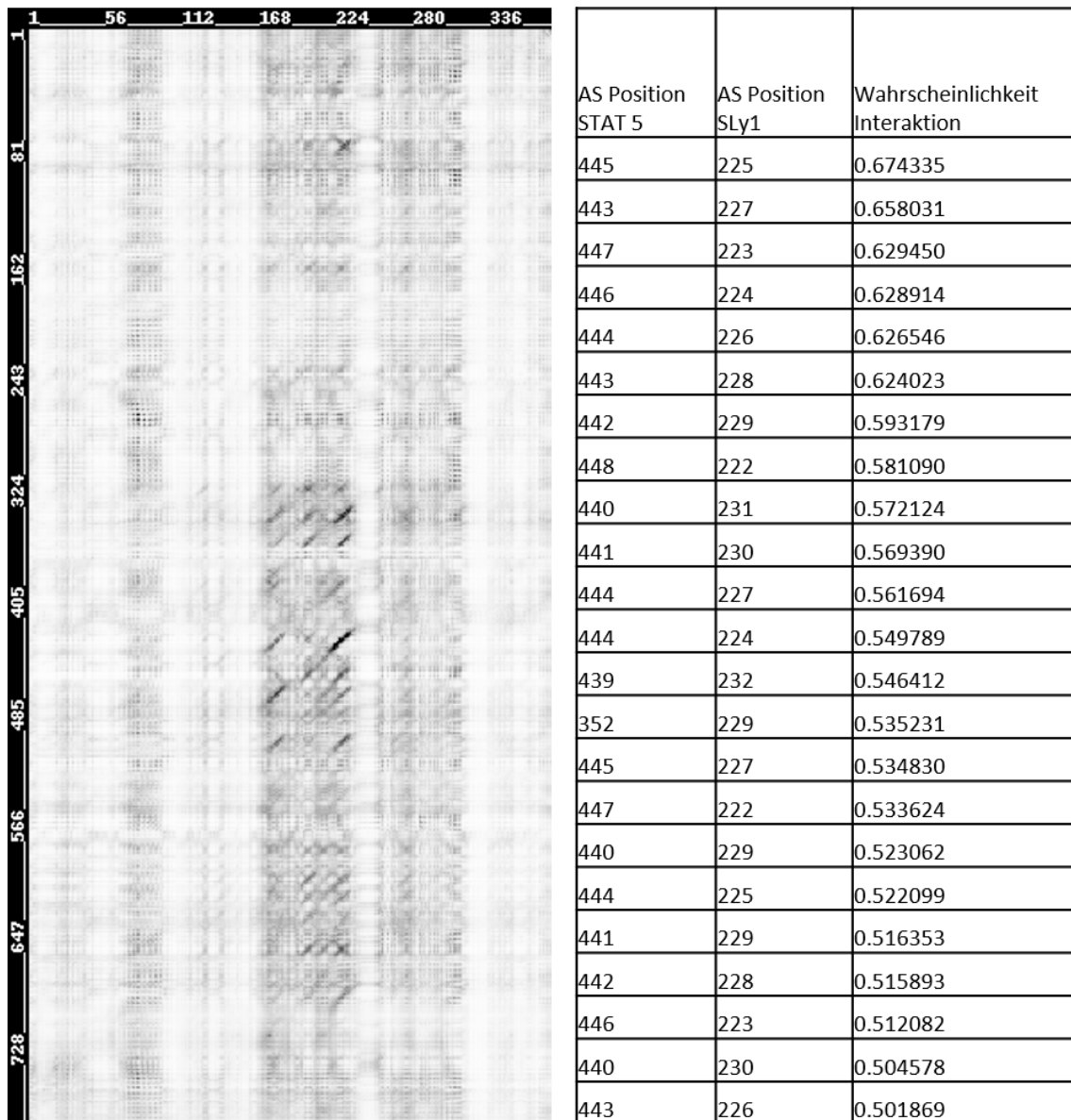


Abbildung 10 Interaktionsanalyse SLy1-STAT5 mittels Raptor X

links: Contact map mit SLy1 auf der x-Achse und STAT5 auf der y-Achse, Farbintensität repräsentiert die Interaktionswahrscheinlichkeit, rechts: AS Paare mit der höchsten Wahrscheinlichkeit der Interaktion.

Zur weiteren Untersuchung der Bindungsstelle wurden HEK 293T Zellen mit SLy1-flag Konstrukten transfiziert und anschließend Immunopräzipitationen mit flag-AK durchgeführt. Mittels Western Blot wurden die IPs auf eine Bindung von STAT5 an SLy1 analysiert (Abbildung 11).

Ergebnisse

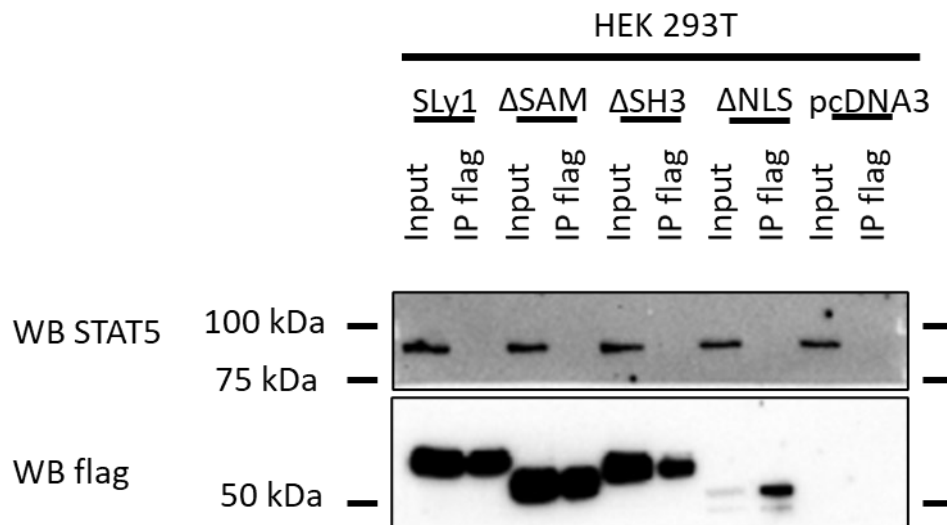


Abbildung 11 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und STAT5

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation mittels flag-AK aus HEK 293T Zelllysaten (n=3). HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder SLy1-flag Deletionskonstrukten transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels flag-Antikörper und anschließender Western Blot Analyse analysiert. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (STAT5, obere Reihe und flag, untere Reihe) und sekundärer Clean-Blot HRP-gekoppelter AK. Input: 1 µg Proteinlysate der transfizierten HEK 293T Zellen. Belichtungszeiten: STAT5: 300 s, flag: 120 s.

In der Western Blot Analyse mittels flag zeigen sich Banden in allen mit SLy1 flag-Konstrukten transfizierten Zelllysaten und den dazugehörigen Immunopräzipitationen mittels flag-AK. In der Leerkontrolle und der dazugehörigen IP sind keine Banden nachweisbar. Mittels STAT5-AK können Banden in allen HEK 293T Zelllysaten nachgewiesen werden. Es sind jedoch keine Banden in den dazugehörigen Immunopräzipitationen zu sehen. Die Analyse kann eine Interaktion zwischen SLy1 und STAT5 weder bei SLy1-flag noch bei den SLy1-flag Deletionskonstrukten nachweisen.

Da die Analyse in HEK 293T Zellen keine Belege für die Interaktion liefern konnte, wurde eine weitere Zelllinie zur Untersuchung herangezogen. Dabei wurde auf T-ALL Jurkat WT und Jurkat SLy1 Knockdown (KD) Zelllinien zurückgegriffen, welche in 3.5. detailliert beschrieben werden (Abbildung 12).

In der Immunopräzipitation mittels STAT5 in Jurkat neg. ctrl Zellen fällt auf, dass auf Höhe von SLy1 zwei Banden erkannt werden. Die Obere stimmt in der Höhe exakt mit der Input SLy1 Bande überein. In den Jurkat SLy1 KD Zellen, welche nur geringe Mengen SLy1 exprimieren, ist hingegen die obere Bande nicht

Ergebnisse

erkennbar. Die Untere ist ähnlich ausgeprägt wie bei der IP aus den Jurkat neg. ctrl Zellen. Dies zeigt an, dass die untere Bande eine IgG Bande darstellt, die obere Bande entspricht dem ko-immunopräzipitierten SLy1. In der Immunopräzipitation mittels SLy1-AK aus Jurkat WT Zellen sind auf Höhe von SLy1 kräftige Banden in der IP SLy1 sichtbar. In dem Jurkat WT Zelllysate ist eine schwache SLy1 Bande erkennbar. In den IPs mittels SLy1-AK und IgG rabbit sind zudem Banden auf Höhe von 50 kDa erkennbar, diese entsprechen den unspezifisch detektierten IgG Banden. In der Analyse mittels STAT5-AK zeigt sich in dem Jurkat WT Zelllysate eine kräftige Bande und in den SLy1-IP etwas schwächere aber gut erkennbare Banden. Die Negativkontrolle (IgG rabbit-IP) bleibt erwartungsgemäß leer.

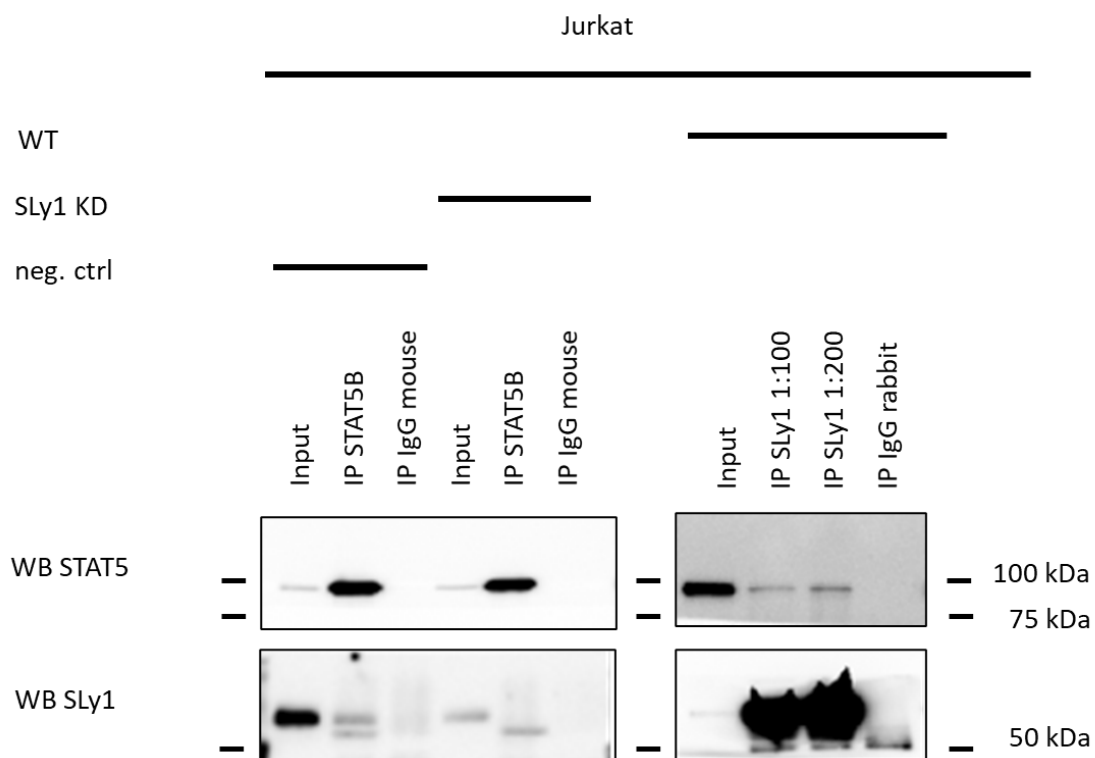


Abbildung 12 Interaktionsanalyse von STAT5 und SLy1 in Jurkat Zellen

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von STAT5B und SLy1 aus Jurkat WT sowie Jurkat Zellen transduziert mit Cas9 und zwei verschiedenen gRNAs. Eine gRNA ist spezifisch für das SLy1 Gen und führt zum SLy1 Knockdown (KD), die andere gRNA diente als Negativkontrolle für die Transduktion (neg. ctrl). n=2. Als Negativkontrolle für die IP diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG (IP IgG mouse bzw. IP IgG rabbit). Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (STAT5, obere Reihe und SLy1, untere Reihe) und sekundärer Clean Blot HRP-gekoppelter AK. Input: 1 µg Jurkat Proteinlysate. Belichtungszeit: STAT5: 30 s (links); 120 s (rechts); SLy1: 60 s.

Ergebnisse

Die Untersuchungen konnten somit Hinweise auf eine Interaktion zwischen SLy1 und STAT5 in Jurkat Zellen bestätigen.

3.2.4.2 Interaktion NPM1-SLy1

In der Analyse möglicher Bindungspartner von SLy1 in Loucy Zellen finden sich Hinweise auf eine Interaktion zwischen NPM1 und SLy1. Zur weiteren Validierung dieser Interaktion wurden HEK 293T Zellen mit SLy1 Konstrukten mit HA-Tag, flag -Tag bzw. myc-Tag transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion wurde zunächst mittels Western Blot bestätigt. Anschließend wurde aus dem Proteinlysate die Immunopräzipitation von den getaggten Konstrukten mittels der entsprechenden Tag-Antikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde die Immunopräzipitation aus Proteinlysaten von, mit pcDNA3 Leervektor transfizierten, HEK 293T Zellen verwendet. Die Analyse der Immunopräzipitation mittels Western Blot kann die Interaktion in den transfizierten HEK 293T Zellen bestätigen (Abbildung 13).

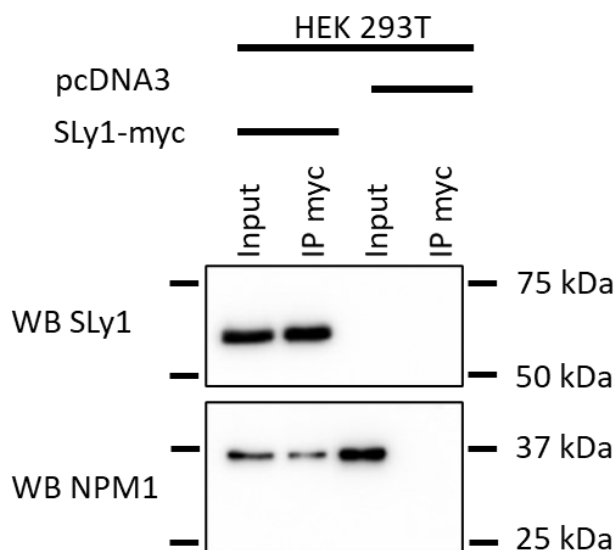


Abbildung 13 Interaktionsanalyse von SLy1-myc und NPM1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von myc-getaggttem SLy1 aus HEK 293T Zelllysaten (n=3). HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder SLy1-myc Konstrukten transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels myc-Antikörper und anschließender Western Blot Analyse analysiert. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (SLy1, obere Reihe und NPM1, untere Reihe) und sekundärer anti-mouse bzw. anti-rabbit HRP-gekoppelter AK. Input: 1 µg Proteinlysate der transfizierten HEK 293T Zellen. Belichtungszeiten: SLy1 1 s; NPM1 1 s.

Ergebnisse

SLy1 wird im Zelllysate der mit SLy1-myc transfizierten HEK 293T Zellen und der IP mittels myc-AK der transfizierten Zellen detektiert. In den mit Leervektor transfizierten Zellen ist kein SLy1 nachweisbar, ebenso wenig in der dazugehörigen IP mittels myc-AK. NPM1 lässt sich in beiden Zelllysaten (Input) nachweisen, da es im Gegensatz zu SLy1 ubiquitär exprimiert wird. In den IPs mittels myc-AK ist NPM1 ausschließlich in der Probe, die auch SLy1 enthielt, detektierbar.

Bei der Analyse der Interaktion von SLy1-HA mit NPM1 zeichnet sich ein ähnliches Bild (Abbildung 14).

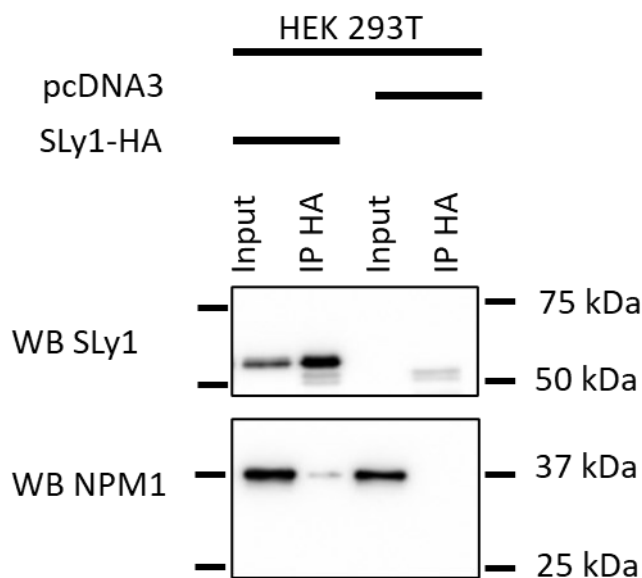


Abbildung 14 Interaktionsanalyse von SLy1-HA und NPM1

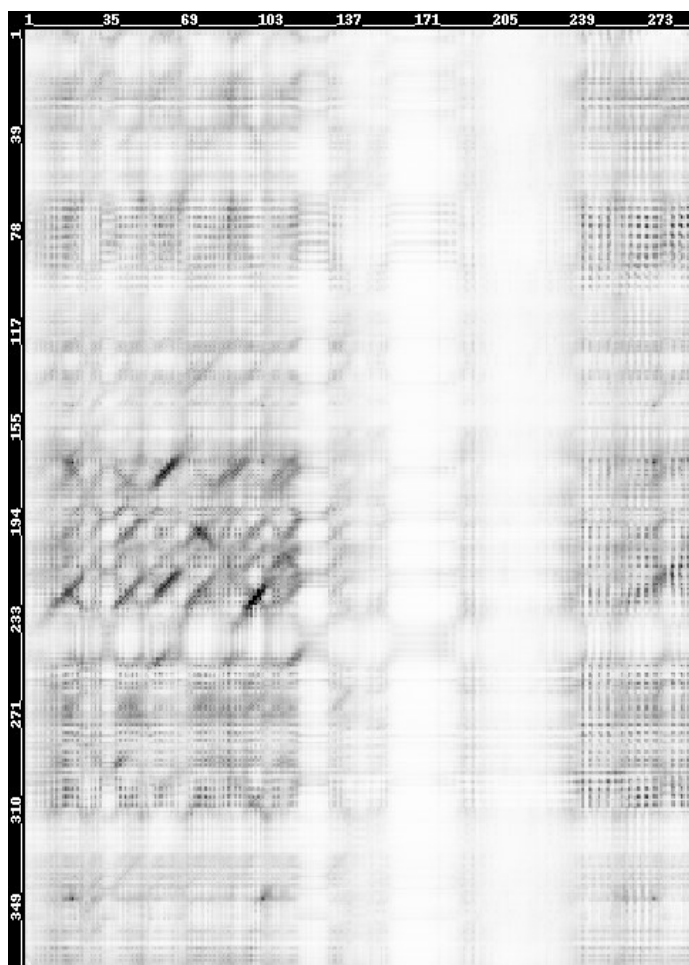
Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von HA-getaggttem SLy1 aus HEK 293T Zelllysaten (n=3). HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder SLy1-HA Konstrukten transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels HA Antikörper und anschließender Western Blot Analyse analysiert. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (SLy1, obere Reihe und NPM1, untere Reihe) und sekundärer anti-mouse bzw. anti-rabbit HRP gekoppelter AK. Input: 1 µg Proteinlysate der transfizierten HEK 293T Zellen. Belichtungszeiten: SLy1: 1 s; NPM1: 2 s.

Auch hier lässt sich SLy1 nur in den mit SLy1-HA transfizierten Proben und der dazugehörigen IP nachweisen. NPM1 wird in beiden Zelllysaten und der IP mittels HA-AK, die SLy1 enthält, detektiert. Auf Höhe von ca. 50 kDa zeigt sich bei beiden IPs eine schwache zweigeteilte Bande. Diese entspricht der schweren

Ergebnisse

IgG Bande des HA-AK, welche durch den sekundären anti-rabbit-AK ebenfalls erkannt wird.

Nach der Identifizierung und Überprüfung der Interaktion stellte sich die Frage, mittels welcher Domäne SLy1 mit NPM1 interagiert. Dafür wurde zunächst eine Interaktionssimulation mittels RaptorX Complex Contact durchgeführt (Wang, Sun et al. 2017, Zhou, Wang et al. 2017, Wang, Sun et al. 2018, Zeng, Wang et al. 2018) (Abbildung 15).



AS Position SLy1	AS Position NPM1	Wahrscheinlichkeit der Interaktion
229	100	0.695028
229	102	0.662192
230	101	0.660826
232	99	0.660706
231	100	0.640545
231	98	0.603209
232	101	0.597638
228	103	0.573477
230	100	0.541893
229	101	0.528903
227	102	0.515817
231	99	0.503076
230	103	0.485493
228	102	0.481974

Abbildung 15 Interaktionsanalyse SLy1-NPM1 mittels Raptor X

links: Contact map mit SLy1 auf der y-Achse und NPM1 auf der X-Achse, Farbintensität repräsentiert Interaktionswahrscheinlichkeit, rechts: AS Paare mit der höchsten Wahrscheinlichkeit der Interaktion.

Die höchste Wahrscheinlichkeit der Interaktion findet sich bei den AS 228-232 des SLy1 Proteins und 98-103 des NPM1 Proteins. Die AS 98-103 des NPM1 Proteins sind Teil einer Nukleären Export Signaldomäne (Okuwaki 2008). Die Interaktionsstelle auf Seiten des SLy1 Proteins liegt demnach am

Ergebnisse

wahrscheinlichsten in der SH3 Domäne, welche von AS 176-233 reicht (Beer, Scheikl et al. 2005). Zur Bestätigung der Computersimulation wurden HEK 293T Zellen mit flag-getaggten Deletionskonstrukten von SLy1 transfiziert. In den Konstrukten von SLy1 sind spezifisch jeweils die SAM, SH3 oder NLS Domäne deletiert.

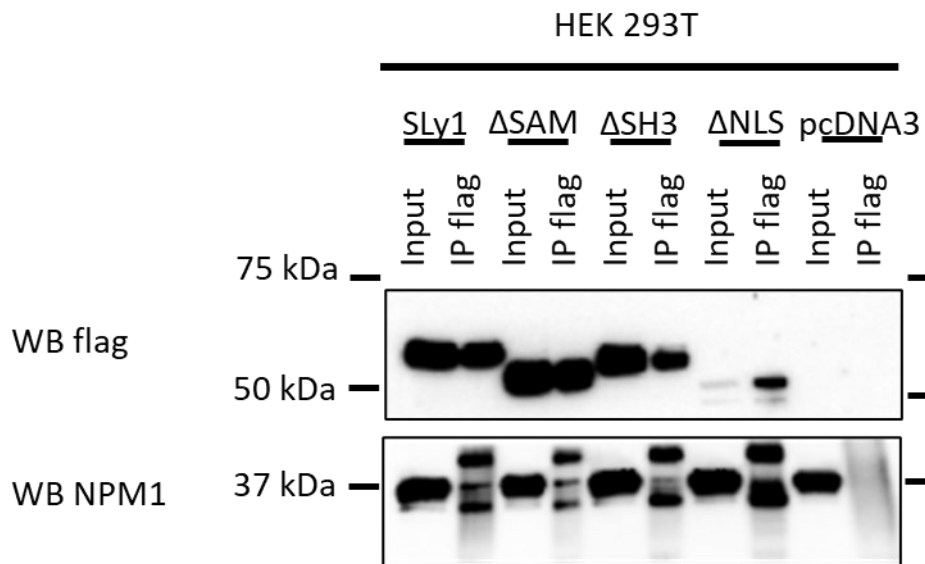


Abbildung 16 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und NPM1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von flag-getaggten SLy1 Deletionskonstrukten aus HEK 293T Zelllysaten (n=3). HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder SLy1-flag Deletionskonstrukten transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels flag-Antikörper und anschließender Western Blot Analyse analysiert. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (flag, obere Reihe und NPM1, untere Reihe) und sekundärer anti-mouse bzw. Clean-Blot HRP-gekoppelter AK. Input: 1 µg Proteinlysate der transfizierten HEK 293T Zellen Belichtungszeiten: flag: 120 s; NPM1: 60 s.

Die Analyse der Immunopräzipitationen verschiedener SLy1 Konstrukte zeigt keine eindeutige Interaktionsstelle (Abbildung 16). SLy1 kann mittels des flag-Antikörpers in allen Zelllysaten und IPs außer der mit dem Leervektor transfizierten Proben nachgewiesen werden. NPM1 kann in allen Zelllysaten als ubiquitäres Protein gefunden werden. In allen SLy1 enthaltenden IPs zeigen sich zwei kräftige Banden bei ca. 42 kDa und 35 kDa und zudem eine schwächere Bande bei 37 kDa auf der Höhe der NPM1 Bande. In der IP mittels flag-AK des Zelllysats von mit Leervektor transfizierten HEK 293T Zellen, zeigt sich keine Bande, sondern nur ein verwaschener Schleier. Da sich eine Bande auf Höhe

von NPM1 in allen IPs der Deletionskonstrukte detektieren lässt, kann durch die Deletionskonstrukte die Bindungsstelle von SLy1 an NPM1 nicht geklärt werden. Der Nachweis der NPM1 Banden gestaltet sich schwierig, da der NPM1 detektierende anti-mouse Antikörper ebenfalls den denaturierten zur IP genutzten flag-Antikörper erkennt. Ein Ausweichen auf das Clean-Blot Reagenz ist nicht möglich, da dieses nur in sehr geringem Ausmaß an den NPM1 Antikörper bindet.

3.3 Analyse des FOXO1 Signalweges

Der IL-7R Signalweg ist in den sich entwickelnden Thymozyten durch Abwesenheit von SLy1 gestört. Aber nicht nur in der Entwicklung, sondern auch in reifen T-Zellen behält der IL-7R Signalweg seine Relevanz. Dabei konnte gezeigt werden, dass FOXO1 für die Expression der IL-7 R alpha Kette notwendig ist. FOXO1 defiziente reife T-Zellen sind nicht in der Lage den IL-7R hoch zu regulieren (Kerdiles, Beisner et al. 2009, Ouyang, Beckett et al. 2009). FOXO1 war auch in SLy1-defizienten Thymozyten und reifen T-Zellen Gegenstand vorheriger Untersuchungen.

Dabei wurde festgestellt, dass nach T-Zell-Rezeptorstimulation FOXO1 und SLy1 aus dem Nukleus in das Zytoplasma exportiert werden. Die Abwesenheit von SLy1 führt in T-Zellen zu einem schnelleren Reimport von FOXO1 nach der TCR Stimulation. Bei SLy1 und FOXO1 konnte eine Interaktion mit 14-3-3 Proteinen nachgewiesen werden (Schäll, Schmitt et al. 2015). Auch eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen wurde mittels Immunopräzipitation aus mit SLy1 und FOXO1 Plasmiden transfizierten HEK 293T Zellen untersucht. Dabei konnte jedoch keine Interaktion zwischen FOXO1 und SLy1 festgestellt werden (Schäll 2015).

3.3.1 Interaktionen im FOXO1 Signalweg in HEK 293T Zellen

Zur Verifizierung der Daten von Schäll wurden HEK 293T Zellen mit SLy1-flag und FOXO1-myc transfiziert und eine Interaktion mittels Immunopräzipitation mit flag- bzw. myc-AK untersucht. Als Leerkontrolle wurden Immunopräzipitationen aus mit pcDNA3 transfizierten HEK 293T Zellen genutzt (Abbildung 17).

Ergebnisse

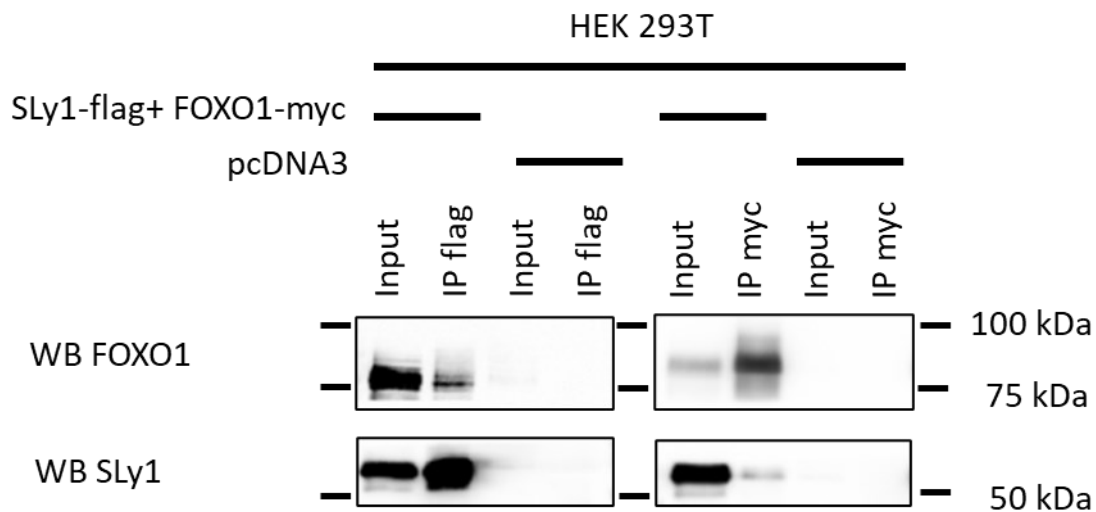


Abbildung 17 Interaktionsanalyse von FOXO1-myc und SLy1-flag

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von flag- und myc-getaggttem SLy1 aus HEK 293T Zelllysaten (n=3). HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder SLy1-flag und FOXO1-myc transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels flag- bzw. myc-Antikörper und anschließender Western Blot Analyse analysiert. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (FOXO, obere Reihe und SLy1, untere Reihe) und sekundärer anti rabbit HRP-gekoppelter AK. Input: 1 µg Proteinlysate der transfizierten HEK 293T Zellen. Belichtungszeiten: FOXO1: 120 s (links)/ 1 s (rechts); SLy1 1 s (links)/ 5 s (rechts).

In der Western Blot Analyse zeigt sich bei FOXO1 jeweils eine Bande in mit FOXO1-myc/ SLy1-flag transfizierten HEK 293T Zelllysaten (Input). Zudem ist eine kräftige FOXO1 Bande in der IP mittels myc und eine schwache Bande in der IP mittels flag-AK sichtbar. Bei SLy1 zeigt sich eine Bande jeweils im mit beiden Plasmiden transfizierten HEK 293T Zelllysate (Input). Außerdem kann in der IP mittels flag-AK eine kräftige und in der IP mittels myc-AK eine schwache Bande auf Höhe von SLy1 nachgewiesen werden. Der Input und die IP der mit Leervektor transfizierten HEK 293T Zellen zeigt keine Banden. FOXO1 ist zwar in geringem Maße auch in HEK 293T Zellen exprimiert, jedoch ist die Menge im Vergleich zu den transfizierten Proteinmengen so gering, dass keine Bande beobachtet werden kann. Insgesamt sprechen die Daten entgegen der Beobachtungen von Schäll für eine Interaktion zwischen SLy1 und FOXO1.

3.3.2 *Erweiterte Analyse möglicher Interaktionspartner im FOXO1 Signalweg*

Nach dem Nachweis der Interaktion FOXO1-SLy1 in HEK 293T Zellen wurde versucht, die möglichen Bindungsstellen der Proteine zu identifizieren. Dazu folgte eine Analyse der möglichen Interaktionsstellen mittels Raptor X Complex Contact (Wang, Sun et al. 2017, Zhou, Wang et al. 2017, Wang, Sun et al. 2018, Zeng, Wang et al. 2018). Dabei wurden verschiedene Aminosäuren innerhalb der Proteine gefunden, welche mit gewisser Wahrscheinlichkeit interagieren (Abbildung 18). Es zeigt sich jedoch kein einheitliches Bild, das auf eine bestimmte Bindungsstelle innerhalb der Proteine hinweisen würde.

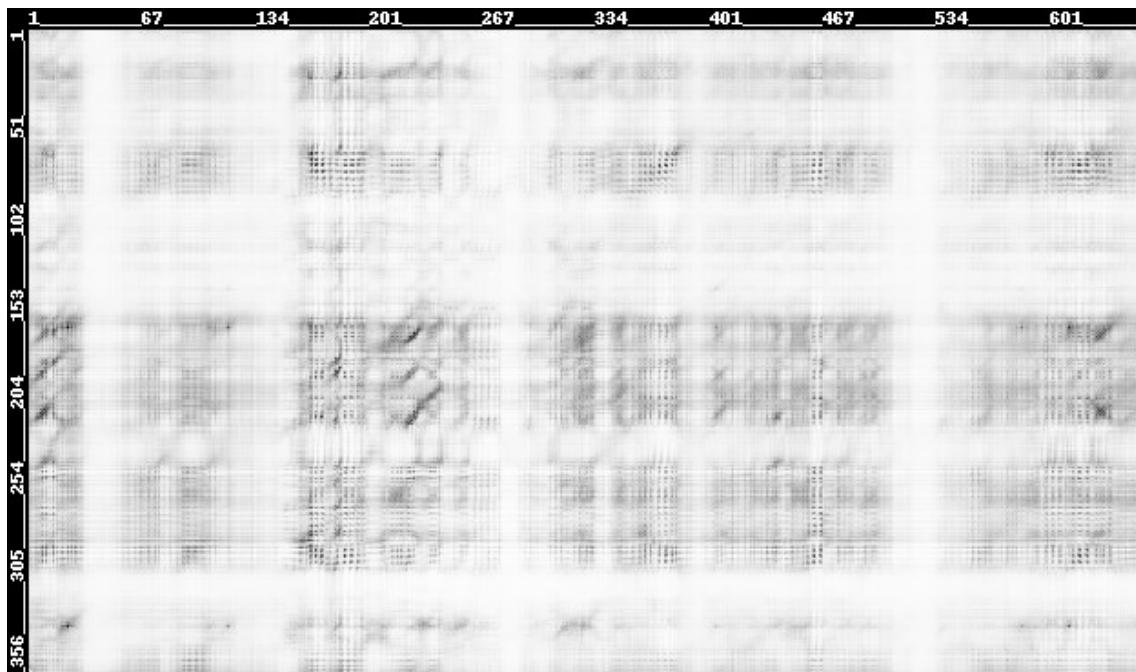


Abbildung 18 Interaktionsanalyse SLy1-FOXO1 mittels Raptor X

Contact map mit SLy1 auf der y-Achse und FOXO1 auf der X-Achse, Farbintensität repräsentiert die Interaktionswahrscheinlichkeit.

Ergänzend zur Raptor X Analyse wurden HEK 293T Zellen mit FOXO1-myc und SLy1 Konstrukten, in denen spezifische Domänen deletiert waren, transfiziert. Anschließend wurden Immunopräzipitationen aus den Zelllysaten der transfizierten HEK 293T Zellen durchgeführt. Als Leerkontrolle wurden Immunopräzipitationen von mit pcDNA3 Leervektor transfizierten HEK 293T Zellen verwendet. Bei der Analyse der FOXO1 Immunopräzipitationen mittels

Ergebnisse

myc-AK aus den mit SLy1 Konstrukten transfizierten HEK 293T Zellen kann keine Bindung von FOXO1 an die SLy1 Konstrukte festgestellt werden (Abbildung 19).

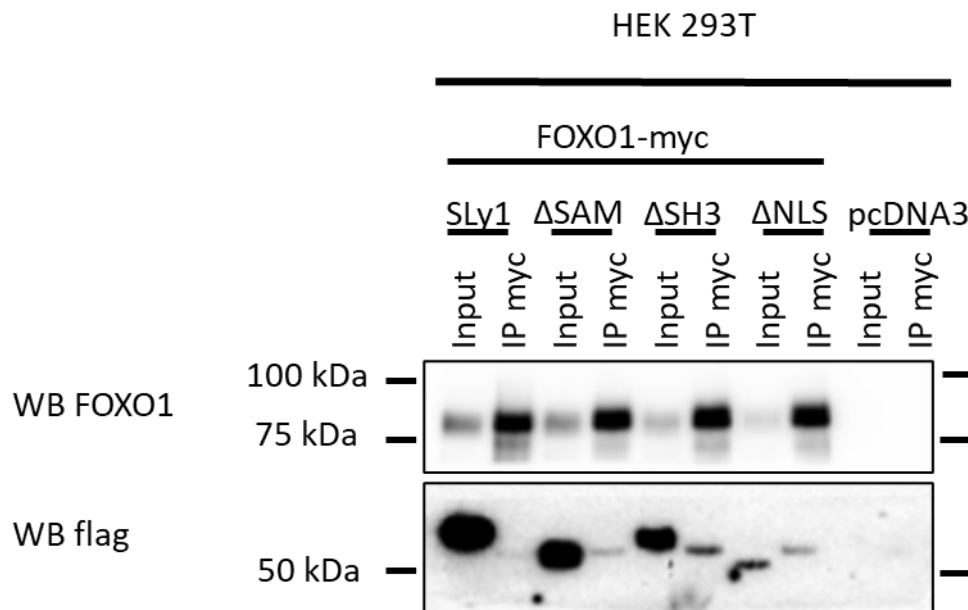


Abbildung 19 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und FOXO1-myc mittels IP myc
Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation mittels myc-AK aus HEK 293T Zelllysaten (n=3) HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder SLy1-flag Deletionskonstrukten und FOXO1-myc transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels myc Antikörper und anschließender Western Blot Analyse analysiert. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (FOXO1, obere Reihe und flag, untere Reihe) und sekundärer Clean Blot HRP-gekoppelter AK. Input: 1 µg Proteinlysate der transfizierten HEK 293T Zellen. Belichtungszeiten: FOXO1: 1s; flag: 300s.

FOXO1 kann in allen mit FOXO1-myc transfizierten Zelllysaten und in den dazugehörigen IPs mittels myc-AK detektiert werden. In der Leerkontrolle ist FOXO1 weder im Input, noch in der flag-IP nachweisbar. Der Nachweis von SLy1 erfolgt mittels des getaggteten flag Konstruktes. Dabei können zwar Signale in den IPs im Gegensatz zur Leerkontrolle auf Höhe der 55 kDa Bande detektiert werden. Diese weichen aber in ihrer Größe von den SLy1 Konstrukten ab und müssen daher als Bande des flag-Antikörpers gewertet werden.

Die Immunopräzipitation der verschiedenen SLy1 Konstrukte mittels flag-AK liefert im Gegensatz zur Analyse der IPs mittels myc-AK Hinweise für eine Interaktion von SLy1 mit FOXO1 (Abbildung 20).

Ergebnisse

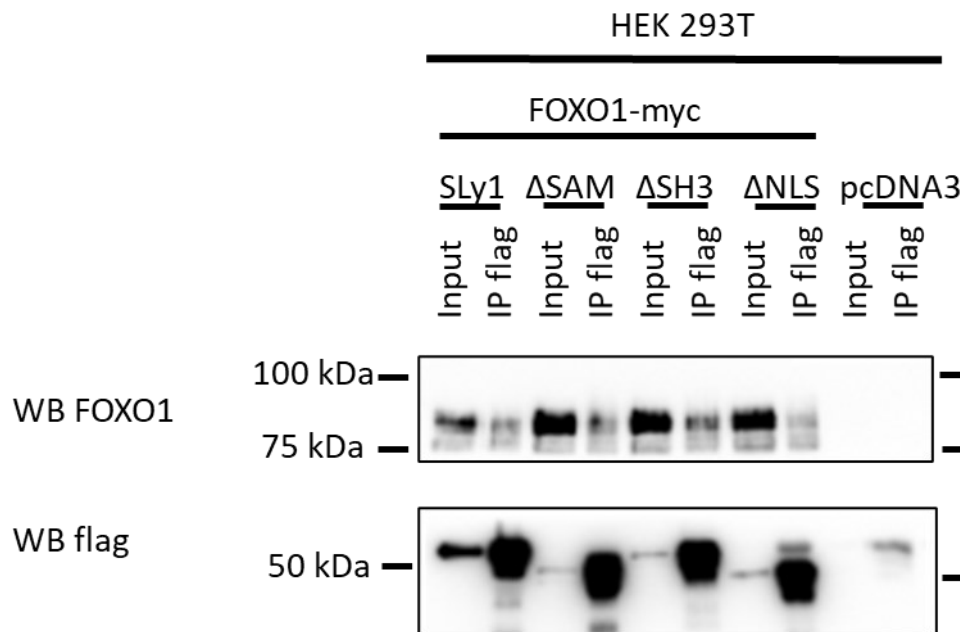


Abbildung 20 Interaktionsanalyse von SLy1-Konstrukten und FOXO1-myc mittels IP flag
Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation mittels flag-AK aus HEK293T Zelllysaten. N=3 HEK 293T Zellen wurden mit Leervektor pcDNA3 (Negativkontrolle) oder SLy1-flag Deletionskonstrukten und FOXO1-myc transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Ko-Immunopräzipitation mittels flag-Antikörper und anschließender Western Blot Analyse analysiert. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (FOXO1, obere Reihe und flag, untere Reihe) und sekundärer Clean Blot bzw. anti-mouse HRP-gekoppelter AK. Input: 0,05 μ g Proteinlysat der transfizierten HEK293T Zellen. Belichtungszeiten: FOXO1: 120 s; flag: 1 s.

SLy1 kann anhand des flag-AK in allen mit einem Konstrukt transfizierten Zelllysaten und den dazugehörigen IPs nachgewiesen werden. FOXO1 wird als kräftige Bande in allen mit FOXO1-myc transfizierten Zelllysaten (Input) detektiert. Schwächere Banden sind in den IPs mittels flag-AK nachweisbar, welche SLy1 Konstrukte enthalten. Dabei bestehen keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen SLy1 Deletionskonstrukten. Es kann daher nicht auf eine Interaktionsstelle geschlossen werden. In der IP mittels flag-AK aus dem mit Leervektor transfizierten Zelllysate wird erwartungsgemäß keine Bande durch den FOXO1-AK detektiert.

3.3.3 Interaktionen im FOXO1 Signalweg in Loucy Zellen

Nach dem Nachweis der Interaktion FOXO1-SLy1 in FOXO1 und SLy1 überexprimierenden HEK 293T Zellen stellt sich die Frage, ob diese Interaktion auch in Loucy Zellen nachweisbar ist. (Abbildung 21).

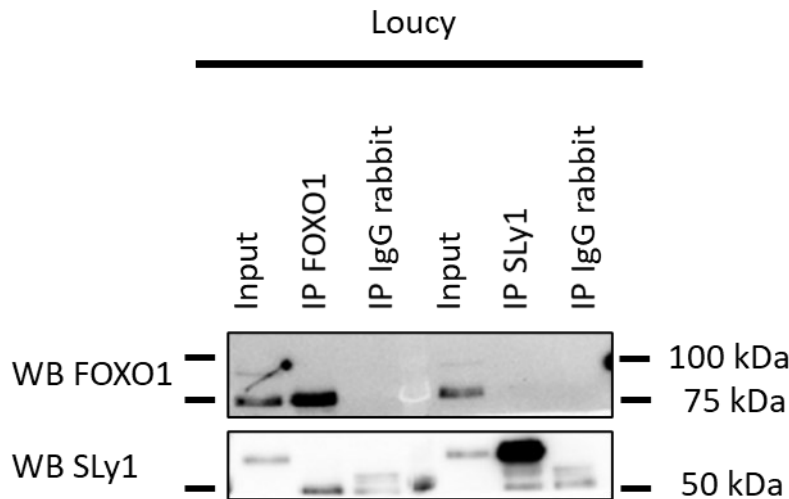


Abbildung 21 Interaktionsanalyse von FOXO1 und SLy1

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunpräzipitation von SLy1 und FOXO1 aus Loucy Proteinlysate (n=3.) Als Negativkontrolle diente eine Immunpräzipitation von korrespondierendem IgG rabbit. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (FOXO1, obere Reihe und SLy1, untere Reihe) und sekundärer Clean Blot gekoppelter-HRP Antikörper. Input: 2,5 µg Loucy Proteinlysate. Belichtungszeiten: FOXO1:120 s, SLy1: 10 s.

In der Analyse der IPs mittels FOXO1- und SLy1-AK zeigt sich eine durch den SLy1-AK detektierte kräftige Bande in der SLy1-IP auf Höhe von 55 kDa, jedoch keine Bande in der FOXO1-IP. Im Einklang dazu findet sich eine starke durch FOXO1 detektierte Bande auf Höhe von 75 kDa in der FOXO1-IP, während in der SLy1-IP keine Bande sichtbar ist. Die Leerkontrollen der IgG rabbit-IP weisen auf Höhe von 50 kDa jeweils unspezifische Banden auf, die durch die schwere IgG Bande erklärt werden können. Zusammenfassend kann in Loucy Zellen kein Hinweis auf eine Interaktion von SLy1 und FOXO1 gefunden werden.

3.4 Analyse der Immunopräzipitation aus Loucy Zellen mittels Massenspektrometrie

Auf der Suche nach weiteren möglichen Interaktionspartnern von SLy1, die bis jetzt nicht im direkten Fokus lagen, wurde eine Massenspektrometrie von Immunopräzipitationen mittels pSLy1-AK, SLy1-AK und IgG rabbit als Negativkontrolle durchgeführt. Dabei zeigte sich in einem Vorversuch in der IP mittels pSLy1-AK eine deutliche Anreicherung von Proteinen. Deshalb wurde der pSLy1-AK für die Wiederholungen (N=6) der Immunopräzipitationen ausgewählt. In der Analyse der Massenspektrometrie zeigte sich eine große Zahl an in der pSLy1-IP angereicherten Proteinen.

Nach Analyse mittels Student t-Test werden 581 Proteine als signifikant angereichert gewertet. SLy1 zeigte dabei das größte Verhältnis der Intensität zwischen pSLy-IP und IgG rabbit-IP übereinstimmend mit einer guten Effektivität der Immunopräzipitation (Abbildung 22).

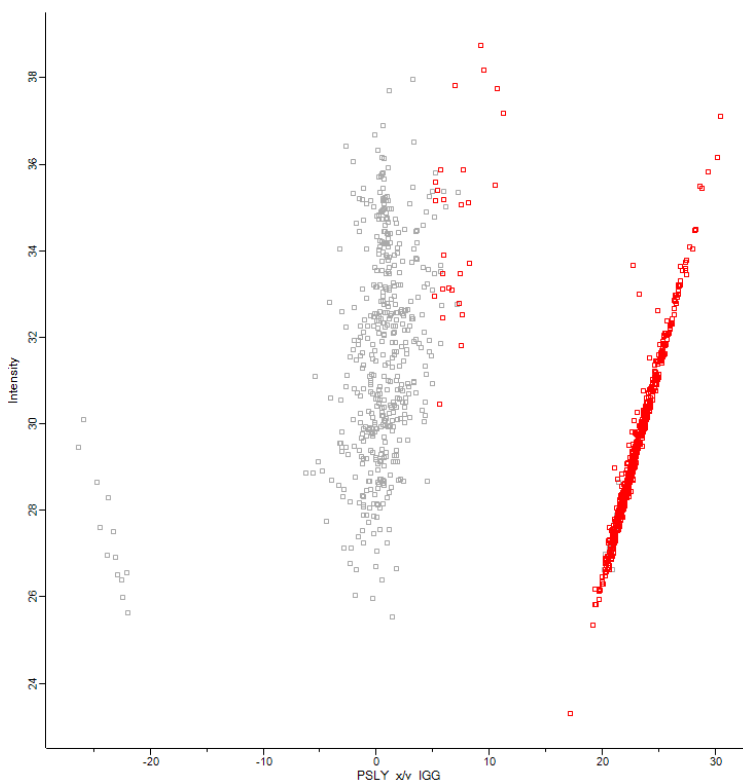


Abbildung 22 Boxplot Massenspektrometrie pSLy1/ IgG rabbit

Graphische Darstellung von in der Massenspektrometrie der Immunopräzipitation mittels pSLy1-AK detektierter Proteine (n=6). IgG rabbit-IP als Negativkontrolle.

Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob eine Anreicherung der Proteine durch eine unspezifische Bindung des pSLy1-AK bedingt sein könnte, wurde eine BLAST Analyse der Erkennungssequenz des pSLy1-AK (LGRRSSSFKDFAKC) durchgeführt. Dabei wurden 177 Proteine identifiziert, welche zumindest teilweise eine Übereinstimmung mit der Suchsequenz aufweisen. Von diesen wurden vier Proteine in der Massenspektrometrie als signifikant erhöht erkannt, eines davon ist SLy1 selbst (SASH3). Die relativ begrenzte Übereinstimmung von maximal zehn von 14 Aminosäuren lässt es dennoch unwahrscheinlich erscheinen, dass der SLy1-AK an die drei anderen Proteine bindet (Tabelle 1).

Tabelle 1 Ergebnisse der BLAST Analyse Erkennungssequenz pSLy-AK vs. in der Massenspektrometrie detektierte Proteine

ID Protein	Name Protein	pSLy1/ IgG	Übereinstimmung Länge	Übereinstimmung Prozent
O75995	SAM and SH3 domain-containing protein 3 (SLy1)	30,4531	14	100%
Q9P2F8	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2	20,6356	10	80%
A0FGR8	Extended synaptotagmin-2	5,91301	7	87,5%
Q9BRR8	G patch domain-containing protein 1	21,0427	8	75%

ID Protein entspricht UniProtKB ID. pSLy1/ IgG entspricht dem Verhältnis zwischen detektierter Menge des jeweiligen Proteins in der Massenspektrometrie der pSLy1-IP zu detektierter Menge des Proteins in der Massenspektrometrie der IgG-IP. Länge Übereinstimmung der AS Sequenzen angegeben in AS und in %.

In der Analyse der Massenspektrometrie wurde eine sehr große Anzahl von Proteinen detektiert. Dies macht es schwierig, alle Proteine in Bezug auf SLy1 einzeln zu betrachten. Stattdessen wurden Cluster aus Proteinen gebildet, die in verschiedenen Stoffwechselprozessen der Zellen beteiligt sind.

Arefanian et al. haben in NK-Zellen beschrieben, dass SLy1 mit Ribosomenkomponenten assoziiert ist. Interessanterweise wurden in der

Ergebnisse

Massenspektrometrie einige Riboproteine als signifikant erhöht erkannt (Tabelle 2).

Tabelle 2 Massenspektrometrisch detektierte Riboproteine in der pSLy1-IP

Name Protein	Name Gen	pSLy1/ IgG	Student t-Test	pSLy1/ IgG signifikant
60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1	23,64	+	+
28S ribosomal protein S36, mitochondrial	MRPS36	23,3	+	+
40S ribosomal protein S27-like	RPS27L	23,2	+	+
40S ribosomal protein SA	RPSA	22,9	+	+
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	MRPS23	21,8	+	+
39S ribosomal protein L45, mitochondrial	MRPL45	20,53	+	+
60S ribosomal protein L30	RPL30	2,10	+	-
40S ribosomal protein S9	RPS9	0,85	+	-
60S ribosomal protein L28	RPL28	0,69	+	-

pSLy1/ IgG entspricht dem Verhältnis zwischen detektierter Menge des jeweiligen Proteins in der Massenspektrometrie der pSLy1-IP zu detektierter Menge des Proteins in der Massenspektrometrie der IgG-IP. Student t-Test: Cut off: Student's T-test p-value = 0,01, + bedeutet signifikant im Student t-Test. Cut off Verhältnis pSLy1/ IgG signifikant =5

Im Zusammenhang mit Ribosomen ist auch das Splicing ein relevanter Zellprozess. In der Massenspektrometrie wurde eine Vielzahl signifikant angereicherter Splicing Faktoren detektiert (Tabelle 3).

Tabelle 3 Massenspektrometrisch detektierte Splicing Faktoren in der pSLy1-IP

Name Protein	Name Gen	pSLy1/ IgG
Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	27,37
Splicing factor U2AF 35 kDA subunit	U2AF1	26,75
Pre-mRNA splicing regulator	WTAP	26,72
Pre-mRNA splicing factor 38 B	PRPF38B	25,69
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	PUF60	25,15
Pre-mRNA-splicing factor SPF27	BCAS2	24,92

Ergebnisse

Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3	24,18
Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	23,44
Pre-mRNA-splicing factor RBM22	RBM22	23,21
Splicing factor 3A subunit 2	SF3A2	23,07
Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6	22,98
Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	SREK1	22,95
Splicing factor, suppressor of white-apricot homolog	SFSWAP	22,88
Serine/arginine-rich splicing factor 8	SRSF8	22,73
Splicing factor 1	SF1	22,71
Survival of motor neuron-related-splicing factor 30	SMNDC1	22,43
Splicing factor, arginine/serine-rich 19	SCAF1	22,35
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	DHX38	22,32
Splicing factor 3B subunit 5	SF3B5	21,73
Pre-mRNA-splicing factor ISY1 homolog	ISY1	21,59
Nuclear speckle splicing regulatory protein 1	NSRP1	21,19
Pre-mRNA-splicing factor CWC22 homolog	CWC22	19,83
Serine/arginine-rich splicing factor 10	SRSF10	7,41
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRPF8	5,43

pSLy1/ IgG entspricht dem Verhältnis zwischen detektierter Menge des jeweiligen Proteins in der Massenspektrometrie der pSLy1-IP zu detektierter Menge des Proteins in der Massenspektrometrie der IgG-IP.

SLy1 kann am Serinrest 27 phosphoryliert werden. Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, welche Kinasen dafür verantwortlich sind. In der Massenspektrometrie waren diverse Kinasen signifikant angereichert und können so Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen sein (Tabelle 4).

Ergebnisse

Tabelle 4 Massenspektrometrisch detektierte Kinasen in der pSLy1-IP

Name Protein	Name Gen	pSLy1 / IgG
Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	KIDINS220	26,7
Serine/threonine-protein kinase mTOR	MTOR	25,18
Serine/threonine-protein kinase LATS1	LATS1	25
Casein kinase II subunit alpha	CSNK2A2	24,91
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1	TLK1	24,86
Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	PIP4K2A	24,69
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 3, mitochondrial	PDK3	24,61
Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	23,95
Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	EIF2AK2	23,89
Dual specificity protein kinase CLK3	CLK3	23,8
Dual specificity protein kinase CLK2	CLK2	23,68
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2	TLK2	23,67
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1; Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3	PRS1	23,54
Tyrosine-protein kinase ABL1	ABL1	23,52
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	CAMK2G	23,52
Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	PIK3R4	23,3
Cyclin-dependent kinase 9	CDK9	23,15
Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	PIK3C3	23,02
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial	PDK1	22,82
C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	SPAG9	22,72
Dual specificity protein kinase CLK1	CLK1	22,63

Ergebnisse

Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha;Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein	PIPSI	22,54
A-kinase anchor protein 13	AKAP13	22
TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	TNIK	21,93
Cyclin-dependent-like kinase 5	CDK5	21,8
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3;Serine/threonine-protein kinase MARK1	MARK3	21,54
Protein kinase C-binding protein 1	ZMYND8	21,43
Rho-associated protein kinase 1	ROCK1	21,4
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	EIF2AK3	21,1
A-kinase anchor protein 8-like	AKAP8L	21
Serine/threonine-protein kinase D2	PRKD2	20,98
A-kinase anchor protein 17A	AKAP17A	20,25
Casein kinase II subunit alpha;Casein kinase II subunit alpha 3	CSNK2A1	7,63

pSLy1/ IgG entspricht dem Verhältnis zwischen detektierter Menge des jeweiligen Proteins in der Massenspektrometrie der pSLy1-IP zu detektierter Menge des Proteins in der Massenspektrometrie der IgG IP.

In der Massenspektrometrie wurde eine große Anzahl an in der Zellzyklussteuerung beteiligter Proteine detektiert. Zum einen sind diverse Cyclin dependent Kinasen zu finden, welche in Tabelle 4 aufgeführt sind. Zum anderen wurden Cycline durch die Massenspektrometrie detektiert (Tabelle 5).

Tabelle 5 Massenspektrometrisch detektierte Cycline in der pSLy1-IP

Name Protein	Name Gen	pSLy1/ IgG
Cyclin-K	CCNK	25,2157
G2/mitotic-specific cyclin-B2	CCNB2	22,7396

pSLy1/ IgG entspricht dem Verhältnis zwischen detektierter Menge des jeweiligen Proteins in der Massenspektrometrie der pSLy1-IP zu detektierter Menge des Proteins in der Massenspektrometrie der IgG IP.

In vorherigen Untersuchungen wurden 14-3-3 Proteine als mögliche Bindungspartner erkannt. In der Massenspektrometrie der pSLy1-IP und IgG rabbit IP konnten diverse 14-3-3 Proteine detektiert werden (Tabelle 6). Eine

Ergebnisse

signifikante Anreicherung in der pSLy1-IP ist ausschließlich beim 14-3-3 Protein Eta identifizierbar.

Tabelle 6 Massenspektrometrisch detektierte 14-3-3 Proteine in der pSLy1-IP

Name Protein	ID Protein	pSLy1/ IgG	Student t- Test
14-3-3 protein eta	YWHAH	23,0587	+
14-3-3 protein theta	YWHA Q	1,726	-
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	0,244	-
14-3-3 protein beta/alpha;14-3-3 protein beta/alpha, N-terminally processed	YWHAB	-0,3	-
14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed	YWHA G	-0,32	-
14-3-3 protein epsilon	YWHAE	-2,01	-

pSLy1/ IgG entspricht dem Verhältnis zwischen detektierter Menge des jeweiligen Proteins in der Massenspektrometrie der pSLy1-IP zu detektierter Menge des Proteins in der Massenspektrometrie der IgG-IP. ID Protein entspricht UniProtKB ID. Student t-Test: Cut off: Student's T-test p-value = 0,01, + bedeutet signifikant im Student t-Test, - bedeutet nicht signifikant.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurden außerdem in Hinblick auf eine mögliche Rolle von SLy1 im IL-7R Signalweg untersucht. Unter den von der Massenspektrometrie erkannten Proteinen spielt NPM1 eine Rolle im genannten Signalweg. Dieses wurde sowohl in der IgG Probe als auch in der pSLy1-IP Probe identifiziert. Das Verhältnis von NPM1 zwischen pSLy1-IP und IgG rabbit beträgt 0,25. Es gibt dementsprechend eine Anreicherung in der pSLy1-IP, diese war jedoch nicht signifikant. Des Weiteren konnte p53 in der Massenspektrometrie detektiert werden. Dieses war jedoch ebenfalls nicht signifikant erhöht in der pSLy1-IP. Die anderen in der Western Blot Analyse der pSLy1-IP untersuchten Proteine einschließlich STAT5 wurden in der Massenspektrometrie nicht detektiert.

3.5 Untersuchung des IL-7R Signalwegs in An- und Abwesenheit von SLy1 in Jurkat Zellen

Die Interaktionsanalyse von SLy1 mit Proteinen des IL-7R Signalweges konnte mögliche Bindungspartner identifizieren. Die Untersuchungen wurden in der T-ALL Zelllinie Loucy in Anwesenheit von SLy1 durchgeführt. Bisherige Untersuchungen zu SLy1 in der Thymozytenentwicklung wurden hauptsächlich an Maus Thymozyten durchgeführt. Die Entscheidung für Loucy Zellen als Modell für humane Thymozyten bietet nun neue Einblicke in die humane T-Zell- und Leukämieentstehung. Dabei stellt sich die Frage, ob die in Maus Thymozyten beobachteten Veränderungen durch Abwesenheit von SLy1 auch in humanen Zellen zu beobachten sind. Um dies zu untersuchen, sollten humane T-ALL SLy1 KO Zellen hergestellt werden. Da Loucy Zellen sich nur schwer transduzieren lassen, wurden Jurkat Zelllinien für den KO ausgewählt. Die Deletion von SLy1 wurde in Jurkat Zellen über die CRISPR/Cas Methode erreicht. Dafür wurde das Cas9 Plasmid sowie zwei verschiedene SLy1-spezifische gRNA bzw. eine Kontroll gRNA mit Hilfe von Lentiviren in Jurkat Zellen transduziert. Die gRNAs binden an unterschiedlichen Stellen im SLy1 Gen und leiten die Cas9 Genschere zum SLy1 Gen, welches dann geschnitten und somit deletiert wird. Anschließend wurden Proteinlevel von SLy1 und der im IL-7R Signalweg involvierten Proteine in den entstandenen Zelllinien untersucht. Zudem wurden die in HEK 293T und Loucy Zellen beobachteten Interaktionen des STAT5-p53 Crosstalks in den Jurkat Zellen in An- und Abwesenheit von SLy1 betrachtet.

3.5.1 Verifizierung des Knockdowns von SLy1

Zur Verifizierung des Knockdowns wurde zunächst die Transduktionseffizienz der einzelnen Plasmide überprüft. Das Cas9 Plasmid kodiert neben der Genschere ebenfalls für RFP, welches dann über Fluoreszenz im PE Kanal in der Durchflusszytometrie bestimmt werden kann (Abbildung 23). Neben Cas9 wurden drei verschiedene gRNAs in die Zellen transduziert. Zwei davon (LV03 432 und LV03 434) kodieren für gRNAs, die im SLy1 Gen binden. Die neg. ctrl gRNA kodiert nicht spezifisch für das SLy1 Gen und dient als Negativkontrolle für den KO. Außerdem kodieren die gRNA Plasmide für GFP, dessen Fluoreszenz im FITC Kanal der Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Zur

Ergebnisse

Überprüfung der Transduktionseffizienz kann somit die Analyse der Fluoreszenz der transduzierten fluoreszierenden Proteine RFP und GFP im PE bzw. FITC Kanal der Durchflusszytometrie genutzt werden (Abbildung 24).

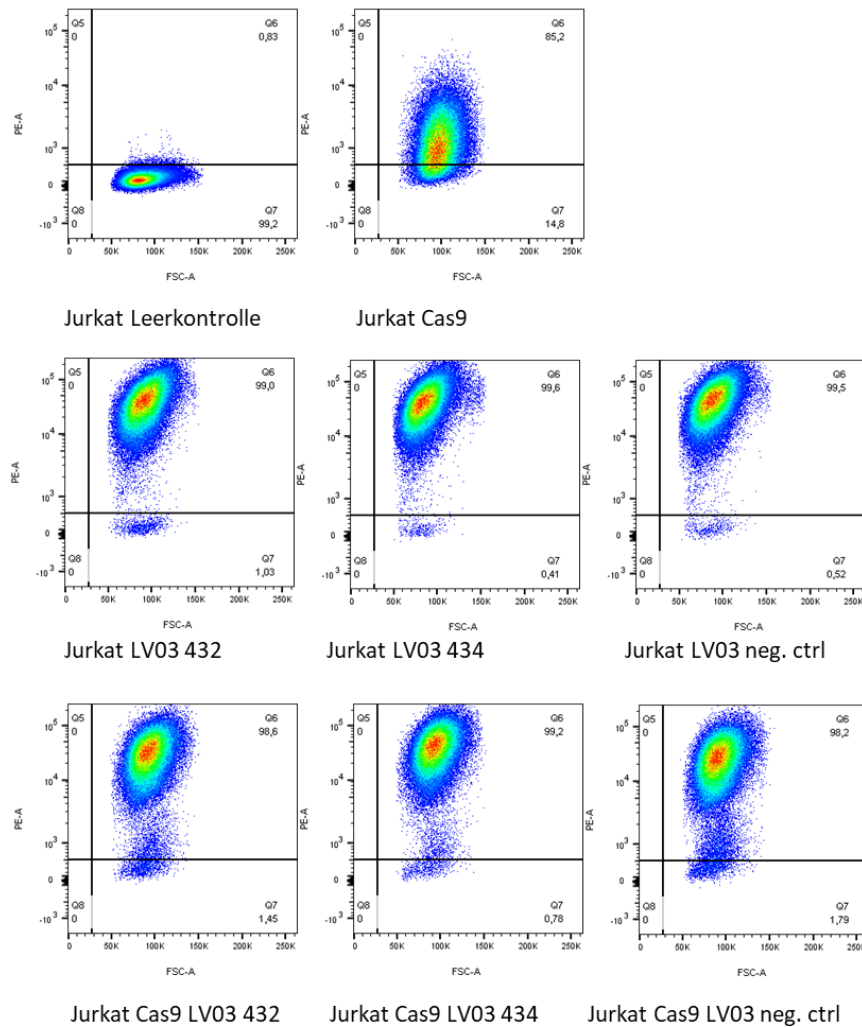


Abbildung 23 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Jurkatvarianten anhand von FSC und PE

Transduktionseffizienz gemessen über RFP Fluoreszenzsignalintensität im PE-Kanal in transduzierten Jurkat-Zellen im Vergleich zur Jurkat Leerkontrolle. Das Cas9 Plasmid kodiert für Cas9 und RFP, die LV03 Plasmide kodieren für eine gRNA und GFP. LV03 432 und LV03 434 kodieren für gRNA die spezifisch im SLy1 Gen bindet, LV03 neg. ctrl kodiert für gRNA, die nicht im SLy1 Gen bindet und als Negativkontrolle dient.

Für Cas9 wurde eine Transduktionseffizienz von 85 % erreicht. Die gRNA Plasmide wurden einzeln zu 99 % aufgenommen.

In der Analyse der mit Cas9 und jeweils einer gRNA transduzierten Jurkat Zellen fällt auf, dass das GFP der gRNA Plasmide in den Frequenzbereich der PE

Ergebnisse

überstrahlt (Abbildung 24, mittlere Reihe). Dadurch ist in den doppelt transduzierten Zellen keine genaue Bestimmung der Transduktionseffizienz von Cas9 gemessen an der RFP Signalintensität im PE Kanal möglich.

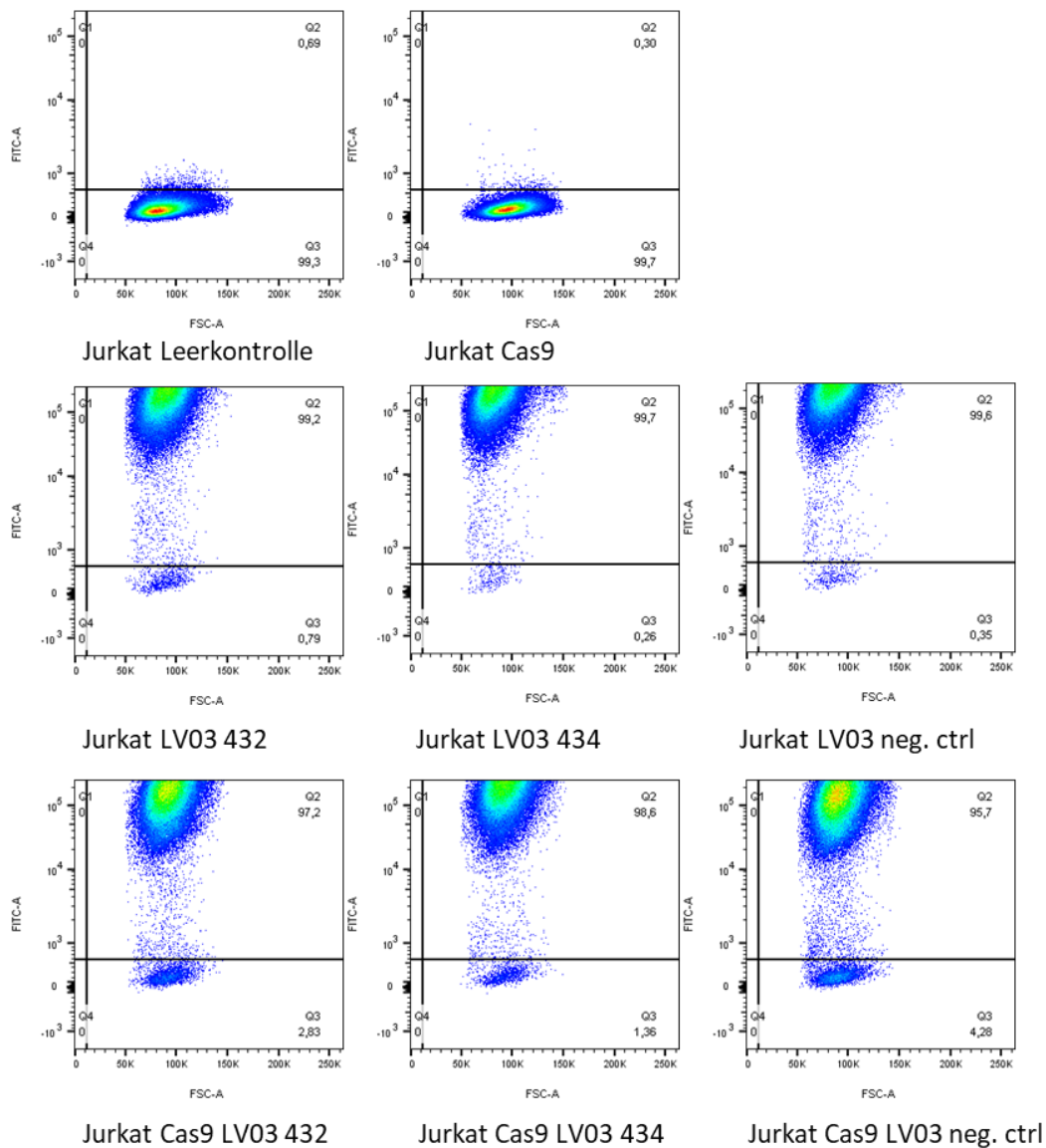


Abbildung 24 Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Jurkatvarianten anhand von FSC und FITC

Transduktionseffizienz gemessen über GFP Fluoreszenzsignalintensität im FITC-Kanal in transduzierten Jurkat-Zellen im Vergleich zur Jurkat Leerkontrolle. Das Cas9 Plasmid kodiert für Cas9 und RFP, die LV03 Plasmide kodieren für gRNA und GFP. LV03 432 und LV03 434 kodieren für gRNA die spezifisch im SLy1 Gen bindet, LV03 neg. ctrl kodiert für gRNA, die nicht im SLy1 Gen bindet und als Negativkontrolle dient.

Nach der Feststellung dieser hohen Transduktionseffizienz wurde die Effizienz der SLy1-Deletion überprüft. Die Knockdown- und Kontrollzelllinien wurden

Ergebnisse

mittels Western Blot auf ihre SLy1 Expression hin untersucht (Abbildung 25). Die SLy1 Menge wurde dafür ins Verhältnis zur β -Aktin Expression gesetzt. In der Analyse kann eine um 92 % reduzierte SLy1 Expression in LV03 432 Cas9 Jurkat Zellen und eine ca. 80%ige Reduktion der SLy1 Expression in LV03 434 Cas9 Jurkat Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. Da dies keinem kompletten Knockout entspricht, werden die Zelllinien mit reduzierter SLy1 Expression als Knockdown (KD) Zellen bezeichnet.

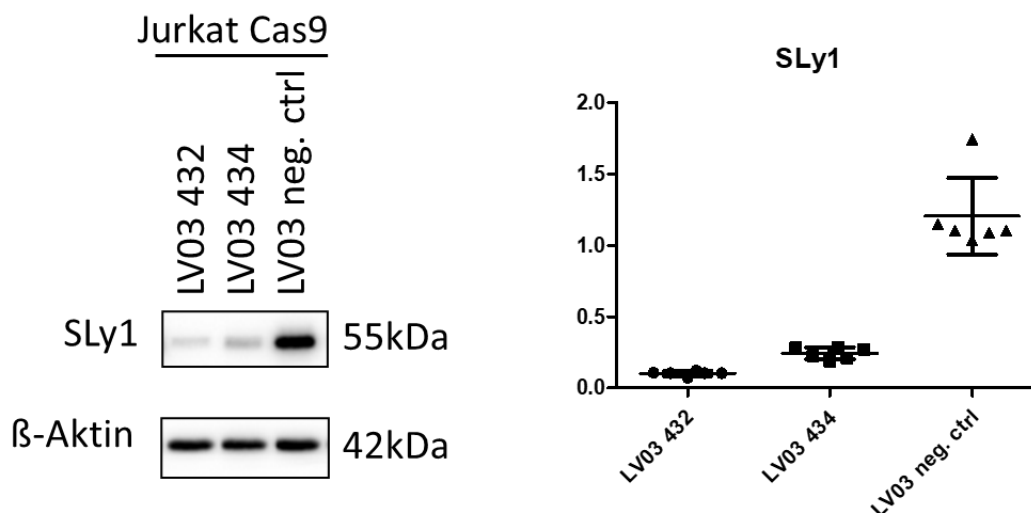


Abbildung 25 Western Blot Analyse SLy1 Knockdown in Jurkat Zellen

Links: Repräsentative Western Blot Analyse des Proteinlysats von Jurkat Zellen transduziert mit Cas9 und verschiedenen LV03 gRNAs. Detektion der Proteine mittels SLy1 und β -Aktin Primärantikörper, sowie anti rabbit HRP gekoppeltem Sekundär AK. Rechts: Boxplot der Western Blot Analyse von n=6 Proteinlysaten, Mittels Image Lab Software wurden die Integrale der Banden und somit die semiquantitative Proteinmenge bestimmt. SLy1 Level wurden im Verhältnis zum β -Aktin Level aufgetragen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen sind eingetragen.

3.5.2 Expressionsmuster auf Proteinebene in SLy1-KD Jurkat Zelllinien

Voruntersuchungen haben in SLy1 KO Thymozyten erhöhte Level von STAT5 im IL-7R Signalweg aufgezeigt (Schäll 2015, Kloos 2021). Nun stellte sich die Frage, ob ähnliche Beobachtungen auch bei einem SLy1 Knockdown (KD) in Jurkat Zelllinien gemacht werden können. In der Western Blot Analyse der Jurkat SLy1-KD Zelllinien zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der STAT5 Proteinmenge im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 26).

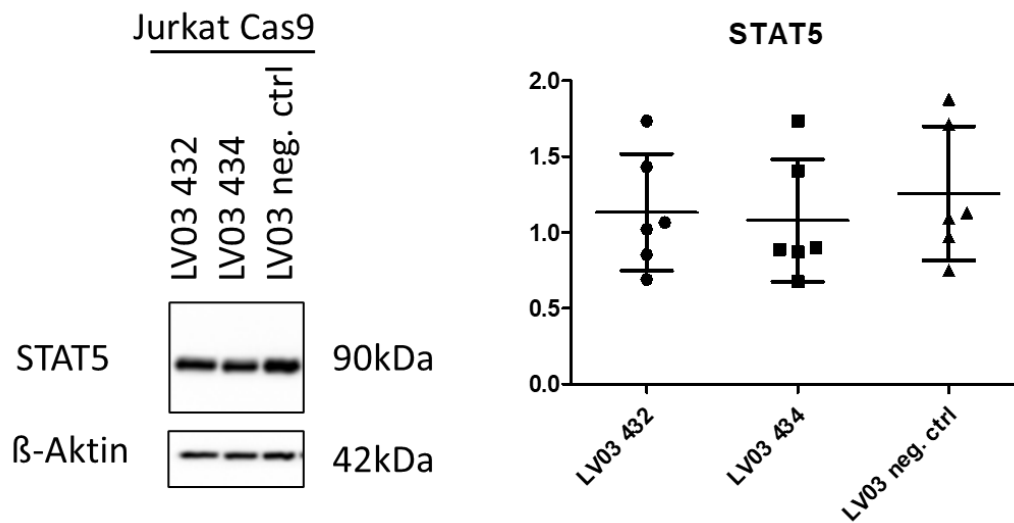


Abbildung 26 Analyse der STAT5 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien

Links: Repräsentative Western Blot Analyse. Zelllinien 432 und 434 entsprechen SLy1 Knockdown Zelllinien, neg. ctrl dient als Negativkontrolle. Proteinmengen wurden mittels STAT5 und β -Aktin (Ladekontrolle) primärem AK sowie sekundärem anti-rabbit HRP-gekoppeltem AK detektiert. Rechts: Boxplot der Western Blot Analyse von n=6 Proteinlysaten. Mittels Image Lab Software wurden die Integrale der Banden und somit die semiquantitative Proteinmenge bestimmt. STAT5 Level wurden im Verhältnis zum β -Aktin Level aufgetragen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen sind eingetragen.

In Vorarbeiten mit SLy1 KO Thymozyten wurden bisher keine Daten zu Bard1 erhoben. In Jurkat SLy1-KD Zelllinien können keine signifikanten Unterschiede der Bard1 Expression im Vergleich zur SLy1 exprimierenden Negativkontrolle gefunden werden (Abbildung 27).

NPM1 war bis jetzt ebenfalls nicht im Fokus der Untersuchungen zu SLy1. Dementsprechend gibt es noch keine Daten zu der Expression dieses Proteins in WT Thymozyten im Vergleich zu SLy1 KO Thymozyten. Anhand der bekannten Hochregulierung von STAT5 und p53 in SLy1 KO Thymozyten, würde eine Hemmung von NPM1 durch SLy1 die vorherigen Beobachtungen erklären. In der Analyse der Jurkat Zellen kann jedoch keine signifikante Änderung der NPM1 Level in den zwei Knockdown Linien im Vergleich zur Negativkontrolle gefunden werden (Abbildung 28).

Ergebnisse

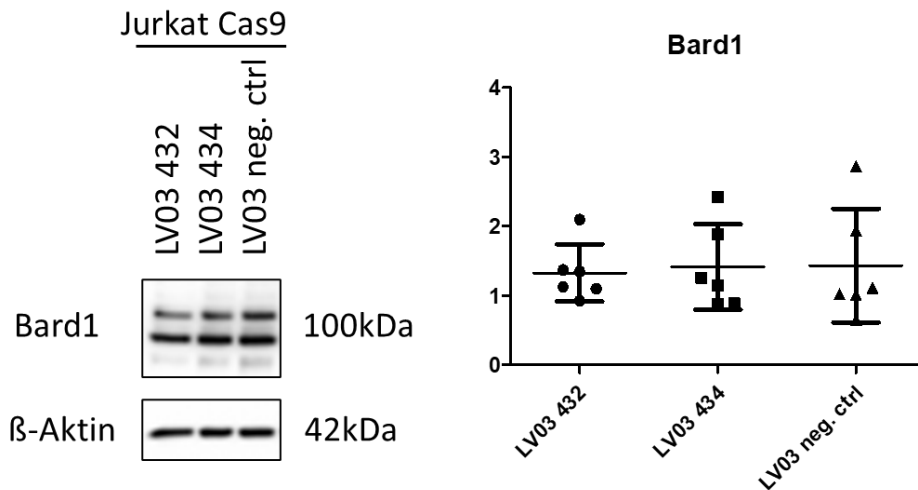


Abbildung 27 Analyse der Bard1 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien

Links: Repräsentative Western Blot Analyse. Zelllinien 432 und 434 entsprechen SLy1 Knockdown Zelllinien, neg. ctrl dient als Negativkontrolle. Proteinmengen wurden mittels Bard1 und β -Aktin (Ladekontrolle) primärem AK sowie sekundärem anti-rabbit HRP-gekoppeltem AK detektiert. Rechts: Boxplot der Western Blot Analyse von n=6 Proteinlysaten. Mittels Image Lab Software wurden die Integrale der Banden und somit die semiquantitative Proteinmenge bestimmt. Bard1 Level wurden im Verhältnis zum β -Aktin Level aufgetragen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen sind eingetragen.

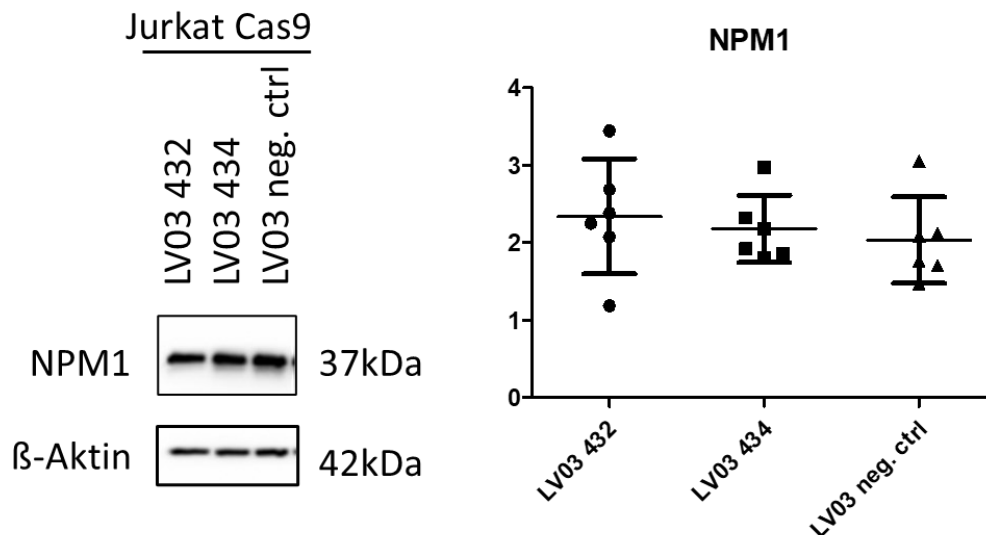


Abbildung 28 Analyse der NPM1 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien

Links: Repräsentative Western Blot Analyse. Zelllinien 432 und 434 entsprechen SLy1 Knockdown Zelllinien, neg. ctrl dient als Negativkontrolle. Proteinmengen wurden mittels NPM1 und β -Aktin (Ladekontrolle) primärem AK sowie sekundärem anti-rabbit bzw. anti-mouse HRP-gekoppeltem AK detektiert. Rechts: Boxplot der Western Blot Analyse von n=6 Proteinlysaten. Mittels Image Lab Software wurden die Integrale der Banden und somit die semiquantitative Proteinmenge bestimmt. NPM1 Level wurden im Verhältnis zum β -Aktin Level aufgetragen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen sind eingetragen.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Mdm2 Level in SLy1 KO und WT Thymozyten konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Schneider 2021). Auch bei Analyse der Mdm2 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien können keine signifikanten Veränderungen durch An- bzw. Abwesenheit von SLy1 detektiert werden (Abbildung 29).

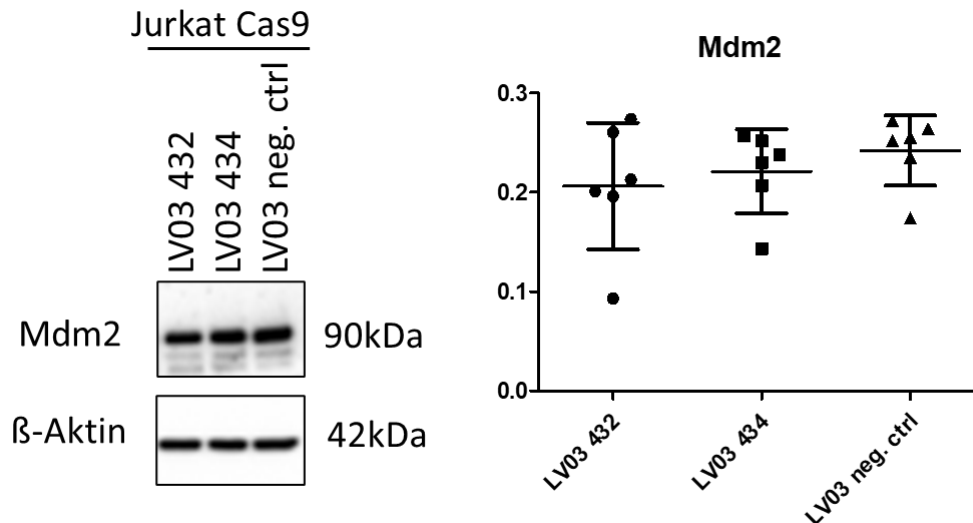


Abbildung 29 Analyse der Mdm2 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien

Links: Repräsentative Western Blot Analyse. Zelllinien 432 und 434 entsprechen SLy1 Knockdown Zelllinien, neg. ctrl dient als Negativkontrolle. Proteinmengen wurden mittels Mdm2 und β -Aktin (Ladekontrolle) primärem AK sowie sekundärem anti-rabbit bzw. anti-mouse HRP-gekoppeltem AK detektiert. Rechts: Boxplot der Western Blot Analyse von n=6 Proteinlysaten. Mittels Image Lab Software wurden die Integrale der Banden und somit die semiquantitative Proteinmenge bestimmt. Mdm2 Level wurden im Verhältnis zum β -Aktin Level aufgetragen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen sind eingetragen.

In SLy1 KO Thymozyten konnten erhöhte Mengen p53 festgestellt werden. (Gruber 2021, Schneider 2021). Nun sollte überprüft werden, ob dies auch in Jurkat SLy1 KD-Zelllinien zutreffend ist. p53 konnte jedoch weder in den als Negativkontrolle dienenden Jurkat Zellen, noch in den SLy1-KD Jurkat Zelllinien detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Schäll konnte zeigen, dass FOXO1 nach T-Zell Rezeptorstimulation in Abwesenheit von SLy1 schneller wieder in den Zellkern reimportiert wird. Dabei wurden jedoch keine Veränderungen in der Gesamtproteinmenge von FOXO1 festgestellt (Schäll 2015). Die Untersuchung der FOXO1 Proteinlevel in Jurkat SLy1-KD und WT Zellen weist ebenfalls keine Änderungen der Proteinlevel nach (Abbildung 30).

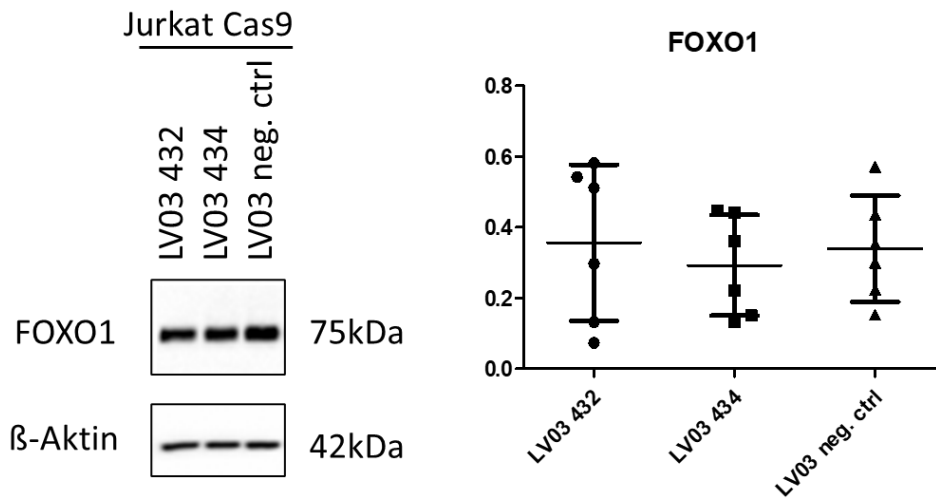


Abbildung 30 Analyse der FOXO1 Proteinlevel in Jurkat Zelllinien

Links: Repräsentative Western Blot Analyse. Zelllinien 432 und 434 entsprechen SLy1 Knockdown Zelllinien, neg. ctrl dient als Negativkontrolle. Proteinmengen wurden mittels FOXO1 und β -Aktin (Ladekontrolle) primärer AK sowie sekundärem anti-rabbit HRP-gekoppeltem AK detektiert. Rechts: Boxplot der Western Blot Analyse von n=6 Proteinlysaten. Mittels Image Lab Software wurden die Integrale der Banden und somit die semiquantitative Proteinmenge bestimmt. FOXO1 Level wurden im Verhältnis zum β -Aktin Level aufgetragen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen sind eingetragen

3.5.3 Interaktionen in An- und Abwesenheit von SLy1 in Jurkat Zelllinien

SLy1 Knockdown scheint zumindest in Jurkat Zelllinien keine Auswirkungen auf Proteinlevel im STAT5-p53 Crosstalk zu haben. Deshalb stellt sich die Frage, ob es stattdessen einen Einfluss auf die Stärke der Interaktionen im Crosstalk besitzt.

Zunächst wurde die Interaktion zwischen Bard1- und NPM1 betrachtet (Abbildung 31).

Ergebnisse

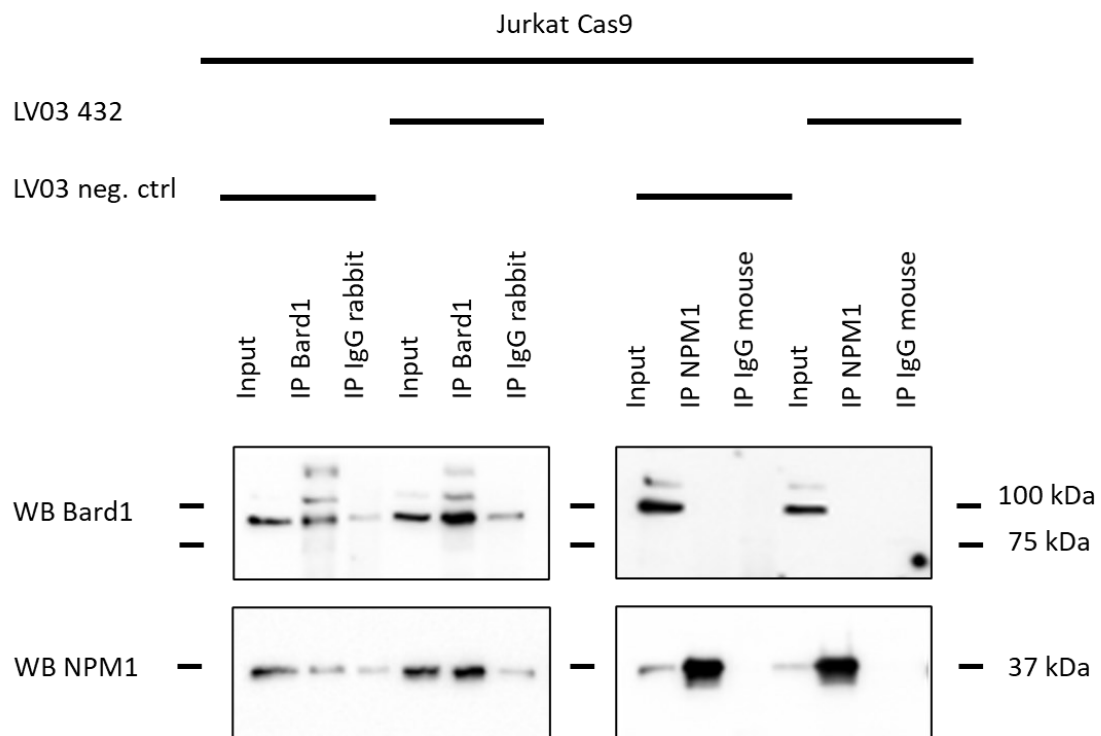


Abbildung 31 Interaktionsanalyse von Bard1 und NPM1 in Jurkat Zelllinien

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von Bard1 und NPM1 aus Jurkat Cas9 LV03 432 und Jurkat Cas9 LV03 neg. ctrl Proteinlysate (n=2). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG (IP IgG mouse bzw. IP IgG rabbit). Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (Bard1, obere Reihe und NPM1, untere Reihe) und sekundärer anti-mouse bzw. Clean Blot HRP-gekoppelter AK. Input: 1 µg Jurkat Proteinlysate. Belichtungszeit: Bard1: 20 s (links)/ 60 s (rechts); NPM1: 1 s.

In der IP mittels NPM1-AK zeigt sich bei der Jurkat neg ctrl und der Jurkat SLy1-KD Zelllinie 432, wie schon in den Loucy Zellen, eine kräftige NPM1 Bande. Es ist jedoch keine Bard1 Bande detektierbar. In der IP mittels Bard1-AK zeigt sich interessanterweise jeweils eine Bande bei Bard1 und bei NPM1, was für eine Interaktion dieser beiden Proteine in den Jurkat Zellen spricht. Allerdings werden in der Detektion mittels NPM1 und Bard1 auch Banden in der Negativkontrolle des IgG rabbits sichtbar. Deshalb kann nicht sicher gesagt werden, ob die beobachteten Banden auf Grund einer Interaktion zwischen NPM1 und Bard1 oder auf Grund einer unspezifischen Detektion eines AKs entstanden sind. Es gibt keine wesentlichen Unterschiede in der Ausprägung der Banden in den Jurkat Cas9 432 bzw. den Jurkat Cas9 neg ctrl Zelllinien. Die Ausprägung der Interaktion ist somit unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von SLy1.

Ergebnisse

Ein relevanter Faktor im Crosstalk zwischen STAT5 und p53 scheint die Interaktion zwischen STAT5 und NPM1 zu sein (Ren, Aerts et al. 2016). In Loucy Zellen kann diese Interaktion nicht nachgewiesen werden. In den Jurkat Zelllinien kann in der NPM1-IP keine Coimmunopräzipitation von STAT5 detektiert werden (Abbildung 32). In der IP mittels STAT5B-AK kann jedoch mittels Western Blot Analyse eine Bande auf Höhe von NPM1 gefunden werden. Allerdings zeigt sich eine Bande auf der gleichen Höhe ebenso bei der Negativkontrolle. Somit ist auch in Jurkat Zelllinien nicht von einer Interaktion zwischen STAT5 und NPM1 auszugehen. Die An- und Abwesenheit von SLy1 bewirkt auch hier keine relevanten Veränderungen.

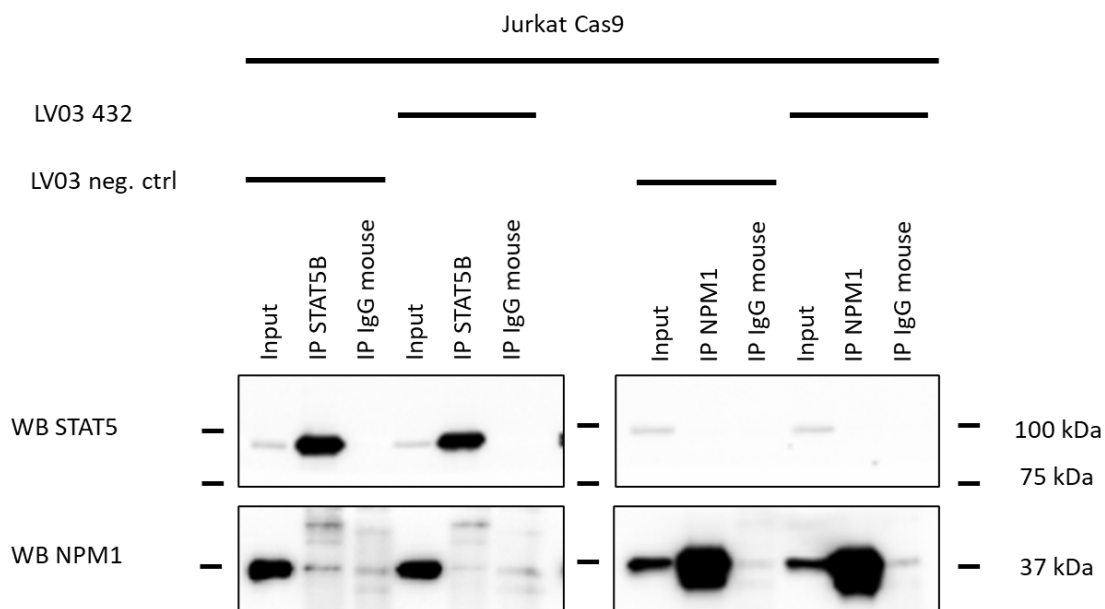


Abbildung 32 Interaktionsanalyse von STAT5 und NPM1 in Jurkat Zelllinien

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von STAT5B und NPM1 aus Jurkat Cas9 LV03 432 und Jurkat Cas9 LV03 neg. ctrl Proteinlysate (n=2). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG mouse. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (STAT5, obere Reihe und NPM1, untere Reihe) und sekundärer anti-mouse bzw. Clean Blot HRP-gekoppeltem AK. Input: 1 µg Jurkat Proteinlysate. Belichtungszeit: STAT5: 30 s (links); 60 s (rechts); NPM1: 10 s.

Als nächstes wurde die Interaktion zwischen p53 und Mdm2 betrachtet (Abbildung 33). Dabei muss beachtet werden, dass in der Analyse der Proteinkonzentrationen in Jurkat Zelllinien weder in An-, noch in Abwesenheit von SLy1 p53 detektiert werden konnte. Somit ist eine beobachtbare Interaktion der beiden Proteine sehr unwahrscheinlich.

Ergebnisse

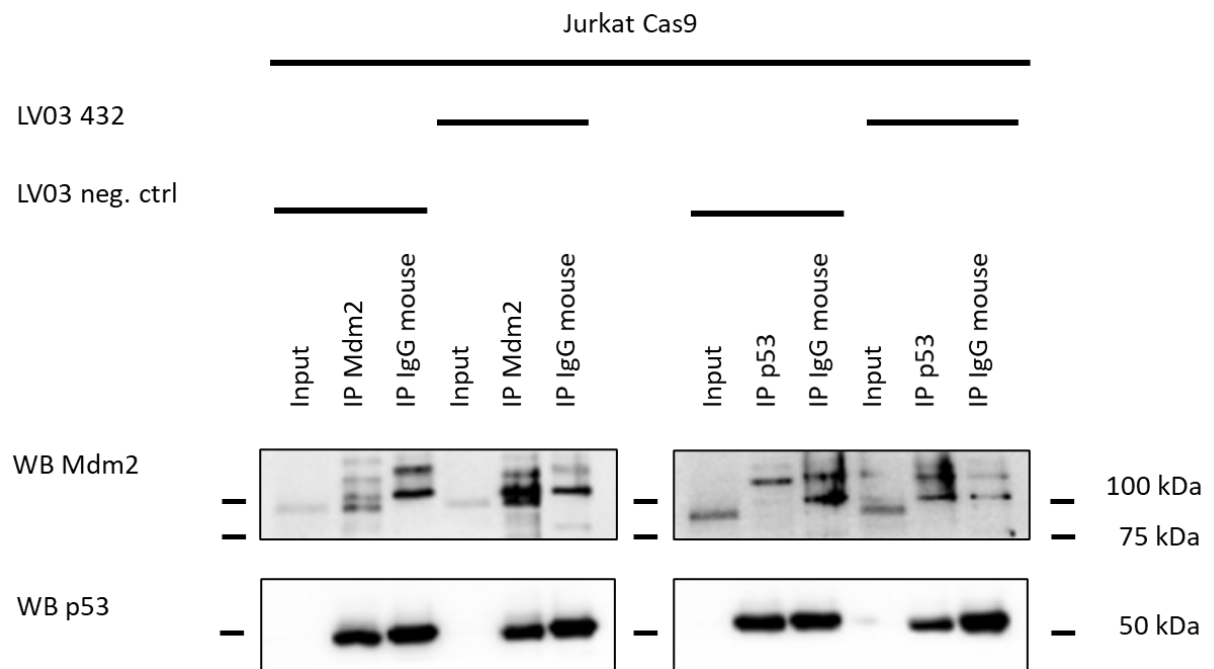


Abbildung 33 Interaktionsanalyse von p53 und Mdm2 in Jurkat Zelllinien

Repräsentative Western Blot Analyse der Immunopräzipitation von p53 und Mdm2 aus Jurkat Cas9 LV03 432 und Jurkat Cas9 LV03 neg. ctrl Proteinlysate (n=2). Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation von korrespondierendem IgG mouse. Die Detektion erfolgte mittels angegebener primärer AK (Mdm2, obere Reihe und p53, untere Reihe) und sekundärer anti-mouse HRP-gekoppelter AK. Input: 5 µg Jurkat Proteinlysate. Belichtungszeit: Mdm2: 60 s; p53: 20 s.

In der Analyse der IP mittels Mdm2-AK zeigt sich eine Bande auf Höhe der Mdm2 Input Bande, die zum Teil jedoch von zwei höher gelegenen IgG Banden überdeckt wird. In der Detektion mittels p53-AK zeigt sich im Input keine Bande, dafür sind aber sowohl in der Negativkontrolle als auch in der Mdm2-IP kräftige Banden beobachtbar, welche durch den sekundären AK detektiertes IgG darstellen. Die Abwesenheit von Banden im Input unterstützt auch hier die Beobachtung aus 3.3., dass in Jurkat Zelllinien kein p53 detektierbar ist. In der IP mittels p53-AK sind ebenfalls kräftige IgG Banden auf Höhe von p53 nachweisbar, die eventuelle p53 Banden überdecken. Auf Höhe der Mdm2 Input Bande lässt sich in der p53-IP kein Mdm2 detektieren. In Anbetracht der Abwesenheit von p53 ist dies plausibel. Die An- und Abwesenheit von SLy1 scheint hier keine Veränderungen hervorzurufen.

4 Diskussion

SLy1 wird eine wichtige Funktion in der Thymozytenentwicklung zugeschrieben. Voruntersuchungen konnten in DN Thymozyten eine Hochregulation des IL-7R Signalweges, sowie eine Hochregulation von p53 bei den Gesamtthymozyten und damit einhergehend eine erhöhte Apoptoserate feststellen (Schäll 2015, Gruber 2021, Kloos 2021). Die Hochregulierung des IL-7R Signalweges sollte eigentlich eine erhöhte Proliferation und Viabilität zur Folge haben. Zudem sollte im Zuge des IL-7R / p53 Crosstalks eine Herunterregulation von p53 zu beobachten sein (Ren, Aerts et al. 2016). Da dies in SLy1 KO Thymozyten nicht der Fall ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass SLy1 im Crosstalk der beiden Signale beteiligt ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe von Immunopräzipitationen Interaktionspartner zu identifizieren. Die Analyse erfolgte durch Western Blot und Massenspektrometrie.

4.1 Analyse möglicher Interaktionspartner

Es wurde eine Analyse von möglichen Interaktionspartnern mit Hilfe der Immunopräzipitation von SLy1 aus Loucy Zellen vorgenommen.

Loucy Zellen sind eine T-ALL Zelllinie, welche weder CD4 noch CD8 exprimiert, und deshalb am ehesten dem Status der DN Thymozyten zugeordnet werden kann. Die Einordnung der Loucy Zelllinie als frühe unreife T-ALL und damit einer im Vergleich zu anderen Zelllinien großen Ähnlichkeit zu Thymozyten spricht für die Verwendung als Modell (Van Vlierberghe, Ambesi-Impiombato et al. 2011, Anderson, Harrold et al. 2014). Jedoch exprimieren ca. 50 % der Loucy Zellen einen $\gamma\delta$ -TCR- Rezeptor (DSMZ). Dies deutet daraufhin, dass Loucy Zellen Ähnlichkeiten zu $\gamma\delta$ T-Zellen aufweisen. Die Rolle von SLy1 in $\gamma\delta$ T-Zellen wurde bisher nicht untersucht. Es muss dementsprechend bei der Interpretation der Ergebnisse in den Loucy Zellen beachtet werden, dass sie zwar einige Übereinstimmungen mit der Differenzierung von DN Thymozyten aufweisen, allerdings auch relevante Unterschiede bestehen.

In der Analyse möglicher Interaktionspartner mittels Immunopräzipitation wurden FOXO1, STAT5 und NPM1 als potentielle Interaktionspartner identifiziert.

4.1.1 Interaktion SLy1-NPM1

Die Interaktion SLy1-NPM1 konnte sowohl im Loucy Zelllysat, als auch in SLy1 überexprimierenden HEK 293T Zellen nachgewiesen werden. Um die Validität der Interaktion weiter zu untersuchen, wäre es interessant mit immunhistochemischen Färbungen die Verteilung von SLy1 und NPM1 in der Zelle zu betrachten. NPM1 ist ein größtenteils nukleär vorkommendes Protein (Michalik, Yeoman et al. 1981). Einige Autoren beschreiben jedoch auch für NPM1 das Shuttling eines geringen Proteinanteils aus dem Nukleus ins Zytoplasma (Falini, Mecucci et al. 2005). SLy1 wurde sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Fraktion beschrieben (Beer, Scheikl et al. 2005). Dabei stellt sich die Frage, ob in simultanen immunhistochemischen Färbungen eine Überlappung von NPM1/SLy1 feststellbar ist. Eine weitere Methode, um die Interaktion zu untermauern, wäre proximity-dependent biotinylation (PDB) (Samavarchi-Tehrani, Samson et al. 2020). Dabei würde eine Biotin-Ligase an SLy1 gekoppelt werden. Diese wäre bei räumlicher Nähe von SLy1 mit NPM1 in der Lage, NPM1 zu biotinylieren. Mit Hilfe von Biotin Pull Down Assays und Detektion von NPM1 im Pull Down könnte so die räumliche Nähe von SLy1 und NPM1 verifiziert werden.

Sollte sich auch in weiteren Experimenten die Interaktion zwischen SLy1 und NPM1 bestätigen, stellt sich die Frage nach der Bedeutung und Art der Interaktion.

NPM1 spielt eine Rolle in diversen intrazellulären Prozessen wie Ribosomogenese, DNA Mismatch repair und Apoptose. Außerdem scheint NPM1 an der Entstehung von verschiedenen Leukämien beteiligt zu sein (Box, Paquet et al. 2016).

Im Rahmen der Ribosomogenese ist NPM1 essentiell für die Bildung und Organisation des Nukleolus. NPM1 ist in der Lage, verschiedene ribosomale Proteine zu rekrutieren. Zudem kann es die Transkription ribosomaler RNA über Histonorganisation regulieren (Murano, Okuwaki et al. 2008, Mitrea, Cika et al. 2016, Mitrea, Cika et al. 2018, Okuwaki, Saito et al. 2021).

SLy1 wurde in NK Zellen im Zusammenhang mit der Ribosomogenese diskutiert. Dabei wurde auch bereits eine mögliche Zusammenarbeit mit NPM1 betrachtet.

Diskussion

In NK Zellen befindet sich SLy1 jedoch ausschließlich im Zytoplasma und eine räumliche Nähe mit NPM1 konnte so ausgeschlossen werden (Arefanian, Schäll et al. 2016). Da in der T-ALL Zelllinie Loucy nun Hinweise auf eine Interaktion gefunden wurden, lohnt es sich, die Ribosomen als Wirkort von SLy1 auch in T-Zellen bzw. Thymozyten zu betrachten.

Neben der Ribosomogenese wird auch eine Involvierung von NPM1 in DNA-Reparaturmechanismen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von NPM1 zu einer Instabilität des Genoms führt (Wang, Budhu et al. 2005). Insbesondere die Interaktion zwischen NPM1 und den unduplizierten Zentrosomen scheint dabei essentiell für die Bewahrung der Genomintegrität zu sein. Zudem konnte eine Beteiligung von NPM1 an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen gezeigt werden (Lee, Park et al. 2005). Die Interaktion von SLy1 mit NPM1 eröffnet die Frage, ob SLy1 auch an Prozessen der DNA-Reparatur beteiligt sein könnte. Im Rahmen von Vorarbeiten wurden bereits Proteine des DNA Damage Repair (DDR)-Signalweges untersucht. Dabei wurde eine Hochregulation von ATM, ATR, Chk1 und Chk2 festgestellt (Gruber 2021, Schneider 2021). Eine direkte Interaktion der Proteine mit SLy1 kann mit Hilfe der Massenspektrometrie allerdings nicht festgestellt werden.

Dennoch wäre es spannend zur weiteren Untersuchung der Funktion von SLy1 in der DNA-Reparatur, die Reaktion von Thymozyten oder T-ALL-Zellen in An- und Abwesenheit von SLy1 auf DNA-Strangbruch-initiiierende Zytostatika wie z.B. 5-Fluorouracil (Pyrimidinanalogon) zu untersuchen.

NPM1 wird außerdem eine Rolle in der Apoptose Regulation zugeschrieben. Dabei wurde in Zellen mit herunterreguliertem NPM1 eine größere Anfälligkeit für Apoptose beobachtet. Umgekehrt scheinen hohe NPM1 Level die Zellen vor dem Zelltod zu bewahren (Wu, Chang et al. 2002, Wu, Chang et al. 2002). NPM1 kann in die Apoptose Regulation über Interaktion mit p14^{ARF} eingreifen. Dabei hält NPM1 das Protein über direkte Bindung im Nukleolus fest. Nach Apoptoseinduzierenden Stimuli scheint NPM1 p14^{ARF} freizugeben. p14^{ARF} ist dann in der Lage Mdm2 zu binden. Über diese Bindung verhindert es den Mdm2 mediierten Abbau von p53. Durch erhöhte p53 Level kann dann Apoptose induziert werden (Korgaonkar, Hagen et al. 2005).

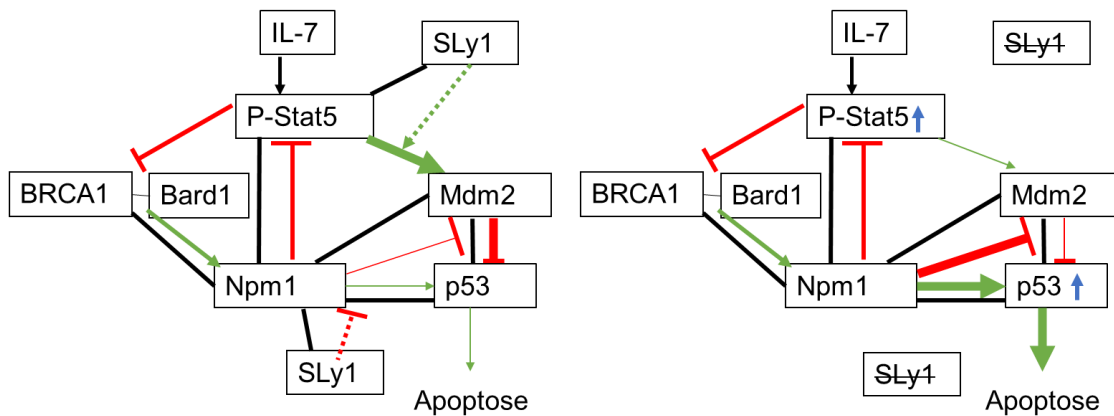


Abbildung 34 IL-7R/ p53 Crosstalk in An- und Abwesenheit von SLy1

Modifiziert nach (Ren, Aerts et al. 2016). Schematische Darstellung IL-7-R/ p53 Crosstalk in Anwesenheit von SLy1 (links) und in Abwesenheit von SLy1 (rechts). grün = Förderung, rot = Hemmung, schwarz = nachgewiesene Interaktionen, dünne Pfeile: verringerte Wirkung, dicke Pfeile: verstärkte Wirkung.

Im Crosstalk von STAT5 und p53 lässt sich die Interaktion SLy1-NPM1 gut integrieren. Um die, in SLy1-defizienten Thymozyten beobachtete, Hochregulation von p53 und STAT5 zu erklären, müsste eine Hemmung der Interaktion zwischen p53 und NPM1 durch SLy1 erfolgen (Abbildung 34). In der Raptor X Analyse wurde die Bindestelle von SLy1 an NPM1 in der Nukleären Export Signaldomäne von NPM1 identifiziert. Möglicherweise könnte SLy1 durch Bindung an die Export Signaldomäne ein Shuttling von NPM1 aus seinem aktiven Kompartiment ins Zytoplasma bewirken. Damit könnte NPM1 nicht mit p53 interagieren und dieses nicht vor dem Mdm2 mediierten Abbau schützen. Die Abwesenheit von SLy1 hingegen würde durch NPM1 die p53 Degradation verhindert werden, wodurch es zu einer erhöhten Apoptoserate kommt.

Veränderungen von NPM1 wurden in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben. So wurde ein Fusionstranskript zwischen NPM1 und ALK in anaplastischen großzelligen Non-Hodgkin Lymphomen beobachtet (Morris, Kirstein et al. 1994). In einem Drittel der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) Patienten werden Mutationen oder Rearrangements von NPM1 detektiert (Falini, Mecucci et al. 2005). Die Häufigkeit und diagnostische Relevanz dieser Mutationen führte zur Einführung der NPM1 mutierten AML als eigene AML Subgruppe in der WHO-Klassifikation (Vardiman, Thiele et al. 2009). Die

Mutationen des NPM1 betreffen ausschließlich den C-Terminus des Proteins und resultieren in Veränderungen der Tertiärstruktur im Bereich des Nucleolar Localization Signals, wodurch NPM1 vermehrt im Zytoplasma lokalisiert wird (Falini, Nicoletti et al. 2007). Dabei gab es Hinweise auf einen cancerogenen Effekt dieser Mutationen (Liso, Bogliolo et al. 2008). Es muss beachtet werden, dass SLy1 in AML Zellen nicht exprimiert wird. Beobachtete Zusammenhänge der Leukämieentstehung in diesen Zellen lassen demnach keine Rückschlüsse auf eine Beteiligung von SLy1 zu. In der ALL Klassifikation spielt die NPM1 Mutation keine Rolle (Cancer 2017). Für zukünftige Forschung wäre es interessant, mögliche NPM1 Mutationen mit SLy1 Expression in ALL Zellen zu korrelieren.

Insgesamt bietet die Analyse der Interaktion NPM1-SLy1 vielfältige Ansatzpunkte für tiefergehende Untersuchungen. Die Ausgangshypothese, dass SLy1 mit Proteinen des IL-7R Signalweges interagiert, kann mit den aktuellen Daten plausibel belegt werden.

4.1.2 Interaktion STAT5-SLy1

Neben NPM1 wurde auch STAT5 als möglicher Interaktionspartner von SLy1 identifiziert. Allerdings konnte STAT5 nur im Immunopräzipitat mittels SLy1 der Loucy und Jurkat Zellen nachgewiesen werden. In HEK 293T Zellen war kein Nachweis der Interaktion möglich. Dementsprechend sollte die mögliche Bindung von STAT5 an SLy1 auf weiteren Wegen wie z.B. immunhistochemischen Färbungen oder der PDB untersucht werden. Zudem ist zu beachten, dass eine Interaktion zwischen STAT5 und NPM1 beschrieben wurde (Ren, Aerts et al. 2016). Eine zusätzliche Analyse der Interaktion STAT5-NPM1 mittels Raptor X kann keine eindeutigen Bindungsstellen identifizieren. Wenn die Bindungsstelle von STAT5 an NPM1 in einer anderen Region liegt als die Bindungsstelle von SLy1 an NPM1, dann wäre es möglich, dass STAT5 in der Immunopräzipitation von SLy1 detektiert wird, weil die beiden Proteine gleichzeitig an NPM1 binden. In Loucy und Jurkat Zellen war die in der Literatur beschriebene Interaktion zwischen STAT5 und NPM1 allerdings nicht detektierbar. Um auszuschließen, dass die STAT5 Bindung an SLy1 über NPM1 erfolgt, könnte man NPM1 KO

Diskussion

Loucy oder Jurkat Zellen generieren und anschließend untersuchen, ob eine Interaktion zwischen STAT5 und SLy1 nachweisbar ist.

Die Analyse der Interaktion SLy1-STAT5 mittels Raptor x Complex Contact ergab eine Bindungsstelle, die in der SH3 Domäne von SLy1 und in der DNA Binding Domäne von STAT5 liegt (Able, Burrell et al. 2017). Eine Bindung von SLy1 an diese Domäne könnte die Funktion von STAT5 als Transkriptionsaktivator vermindern oder fördern, indem es die Bindung an DNA-Abschnitte beeinflusst. Sollte sich in weiteren Experimenten zeigen, dass STAT5 ein Interaktionspartner von SLy1 ist, bieten sich verschiedene Ansatzpunkte zur Diskussion der Bedeutung dieser Verbindung.

In SLy1-defizienten Thymozyten wurden erhöhte Level an STAT5 sowie Bcl-2 detektiert (Schäll 2015, Kloos 2021). Dies sind proproliferative Proteine, die in den SLy1-defizienten Thymozyten jedoch nicht zu einem vermehrten Überleben führen. Dementsprechend kann vermutet werden, dass die Abwesenheit von SLy1 einige Exekutivfunktionen von STAT5 hemmt. SLy1 würde demnach eine fördernde Rolle auf STAT5 ausüben. Allerdings scheint SLy1 die downstream von STAT5 liegende Bcl-2 Expression zu hemmen oder nicht zu beeinflussen, da die Abwesenheit von SLy1 hier eine Erhöhung der Bcl-2 Level bewirkt.

Es wurde beschrieben, dass eine konstitutive STAT5 Aktivierung zu erniedrigten p53 Proteinleveln in B-Zell-Lymphomen führt (Joliot, Cormier et al. 2006). In CML wurde im Einklang dazu beobachtet, dass der Knockdown von STAT5A erhöhte p53 Level zur Folge hat (Casetti, Martin-Lannerée et al. 2013). Dies war in SLy1 defizienten Thymozyten nicht der Fall. Trotz hoher STAT5 Level gab es hohe p53 Level. In diesem Zusammenhang würde der Wegfall von SLy1 die Interaktionskette verhindern bzw. hemmen. SLy1 würde also im Normalfall den Regelkreis unterstützen, oder sogar ein Teil davon sein. Dabei ist zu beachten, dass viele der beschriebenen Interaktionen in Zelllinien beobachtet wurden, in denen SLy1 nicht exprimiert wird. Es ist also fraglich, ob die dort beobachteten Prinzipien in Thymozyten ebenfalls zutreffen. Zudem wurde in AML Zelllinien beschrieben, dass eine STAT5 Inhibition erniedrigte p53 Level im Zuge einer erhöhten Interaktion zwischen Mdm2 und p53 bewirkt. (Pei, Zhuang et al. 2021). Dies steht im Einklang mit den in SLy1 KO Thymozyten erhobenen Daten.

Insgesamt scheinen die Zusammenhänge zwischen STAT5 Expression und p53 Proteinlevel sehr stark je nach Kontext zu variieren (Ren, Aerts et al. 2016).

Die Interaktion zwischen SLy1 und STAT5 bietet im Zuge des in SLy1 KO Thymozyten gestörten STAT5-p53 Crosstalks diverse Erklärungen an. Eine weitere Verifizierung der Interaktion ist jedoch dringend notwendig. Dabei muss auch geklärt werden, ob STAT5 direkt an SLy1 bindet, oder ob eine indirekte Bindung über NPM1 stattfindet.

4.1.3 Interaktion FOXO1- SLy1

FOXO1 erwies sich als dritter möglicher Interaktionspartner von SLy1. Dabei ist zu beachten, dass eine Interaktion zwischen den beiden in HEK 293T Zellen im überexprimierten Zustand nachgewiesen konnte. In Loucy Zellen konnte allerdings weder in der IP mittels FOXO1-AK SLy1, noch in der IP mittels SLy1-AK FOXO1 detektiert werden. Diese Interaktion bedarf dementsprechend noch weiterer Experimente zur Verifizierung. Insbesondere ist zu beachten, dass sowohl bei SLy1 als auch bei FOXO1 Bindungen an 14-3-3 Proteine beobachtet wurden. Es wurde auch diskutiert, ob SLy1 und FOXO1 gleichzeitig an 14-3-3 Proteine binden (Schäll, Schmitt et al. 2015). Durch die Überexprimierung von SLy1 und FOXO1 könnten alle Bindungsstellen der 14-3-3 Proteine durch die beiden Proteine besetzt werden. Dies würde zu einem Nachweis von SLy1 in der FOXO1-IP und *vice versa* führen, ohne dass tatsächlich eine direkte Interaktion vorliegt. Um eine indirekte Interaktion über 14-3-3 Proteine auszuschließen, wäre es möglich 14-3-3 KO-Zellen zu generieren und anschließend die Immunopräzipitationsversuche von FOXO1 und SLy1 zu wiederholen.

Die Analyse möglicher Bindungsstellen zwischen SLy1 und FOXO1 mittels Raptor X Complex Contact konnte im Gegensatz zu STAT5 und NPM1 keine clusterartig angeordnete Bindungsstelle aufzeigen. Auch die Analyse der IPs von SLy1 Deletionskonstrukten konnte keinen genauen Aufschluss über die Bindungsstellen geben. Die Tatsache, dass die Interaktion mit Hilfe des SLy1-AK nicht detektiert werden kann, deutet daraufhin, dass die Bindungsstelle möglicherweise in der Nähe der AK Bindungsstelle liegt. Dies wäre im Bereich der Phosphorylierungsstelle Serin 27 an dem Nukleus Lokalisationssignal. Dies steht auch im Einklang mit der Beobachtung, dass SLy1 ebenso wie FOXO1 nach

Diskussion

Phosphorylierung aus dem Zellkern exportiert wird. Dementsprechend könnte die Phosphorylierung notwendig sein, um eine Interaktion der beiden Proteine zu ermöglichen.

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion von FOXO1 und SLy1 bieten sich erneut immunhistochemische Färbungen und PDB an. Zudem könnten die IPs aus anderen Zelllysaten wie z.B. aus Thymozyten oder anderen T-ALLs wiederholt werden, um auszuschließen, dass nur in Loucy Zellen keine Interaktion nachweisbar ist. Es wäre interessant, einen an anderer Stelle im SLy1 Protein bindenden AK zur IP aus Loucy Zellen zu nutzen. Man könnte so ausschließen, dass FOXO1 durch konkurrierende Bindung des spezifischen AK an der Bindestelle nicht coimmunopräzipitiert werden kann.

Eine direkte Bindung von FOXO1 an SLy1 könnte das Verbleiben von FOXO1 nach TCR Aktivierung in T-Zellen durch Bindung an SLy1 erklären. In SLy1 defizienten T-Zellen erfolgt nach TCR Aktivierung ein Export von FOXO1 und daran anschließend ein verschnellertes Reimport. Das wiederum verursacht eine Hemmung des Zellzyklus durch die von FOXO1 zur Transkription angeregten Proteine (Schäll, Schmitt et al. 2015). Dabei ist es interessant zu betrachten, ob FOXO1 nur im Zytoplasma an SLy1 binden kann oder ob eine Interaktion auch im Zellkern beobachtbar ist.

In der Literatur ist zudem eine Interaktion zwischen NPM1 und FOXO1 beschrieben (Bucur, Wanami et al. 2008). Demzufolge könnte die beobachtete Interaktion auch auf gleichzeitiger Bindung von SLy1 und FOXO1 an NPM1 beruhen. Die Interaktion zwischen NPM1 und FOXO1 ist in Loucy Zellen jedoch nicht nachweisbar. Auch hier wäre es interessant, die Interaktion zwischen SLy1 und FOXO1 in Abwesenheit von NPM1 zu betrachten.

Die Interaktion zwischen FOXO1 und SLy1 wurde in vorherigen Untersuchungen bereits postuliert (Schäll 2015). Der Nachweis der Bindung in SLy1 und FOXO1 überexprimierenden HEK 293T Zellen kann die Hypothese des gleichzeitigen Exports von SLy1 und FOXO1 aus dem Zellkern nach TCR Aktivierung erklären. Zur weiteren Verifizierung ist es essentiell, die Interaktion auch in WT Zelllinien ohne Überexprimierung nachzuweisen.

4.2 Interaktionen im STAT5-p53 Crosstalk

Garcia-Cano et al. beschrieben die gleichzeitige Bindung von Mdm2 und HERC2 an p53 (García-Cano, Sánchez-Tena et al. 2020). Diese Interaktion konnte in transfizierten HEK 293T Zellen bestätigt werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob auch in Loucy Zellen eine solche Interaktion nachweisbar ist. Dabei konnte HERC2 auf Grund seiner Größe und mangelndem spezifischen AK nicht detektiert werden. Deshalb wurde ausschließlich die Interaktion zwischen p53 und Mdm2 betrachtet. Diese konnte zumindest in der p53-IP in den Loucy Zellen nachgewiesen werden.

Okuwaki postulierte eine Bindung von NPM1 an den BRCA1 Bard1 Komplex (Okuwaki 2008). Diese Interaktionen können in den Bard1/ BRCA1 überexprimierenden HEK 293T Zellen nachgewiesen werden. In der Untersuchung der Bindung in Loucy Zellen ließ sich BRCA1 nicht eindeutig detektieren. Deshalb wurde nur die Interaktion zwischen Bard1 und NPM1 betrachtet. Diese ließ sich in der IP mittels Bard1-AK nachweisen.

Die ebenso beschriebene Interaktion zwischen STAT5 und NPM1 war nicht detektierbar (Ren, Aerts et al. 2016).

Im Anschluss sollte erforscht werden, ob die An- bzw. Abwesenheit von SLy1 das Vorhandensein der Interaktionen beeinflusst. Dabei muss beachtet werden, dass diese Interaktionen oftmals in Zellreihen beschrieben wurden, die kein SLy1 exprimieren. Da Loucy Zellen sich nicht lentiviral transduzieren ließen, war es nicht möglich die Interaktionen in An- und Anwesenheit von SLy1 in Loucy Zellen zu betrachten. Stattdessen wurde auf die leichter transduzierbaren Jurkat Zellen zurückgegriffen. Hier wurden die Interaktionen p53-Mdm2, STAT5-NPM1 und NPM1-Bard1 betrachtet.

In der Interaktion p53-Mdm2 ist zu beachten, dass p53 zwar in Loucy Zellen gut detektiert werden konnte, in Jurkat Zellen war p53 jedoch nicht nachweisbar. Daher ließ sich in Jurkat Zellen die Interaktion zwischen p53 und Mdm2 nicht erkennen. Ebenso gab es keine eindeutigen Hinweise auf eine Interaktion zwischen NPM1 und Bard1 bzw. NPM1 und STAT5, weder in der Jurkat Kontrolle, noch in der SLy1 KD Zelllinie. Es konnte somit in Jurkat Zellen keine

Beeinflussung des STAT5-p53 Crosstalks durch die Abwesenheit von SLy1 festgestellt werden.

Insgesamt kann mit Hilfe der Immunopräzipitation keine valide quantitative Aussage zum Vorhandensein von verschiedenen Interaktionen getroffen werden. Die Methode ist zu ungenau, um die Stärke von Interaktionen abschätzen zu können. Es ist nur möglich, qualitativ die Aussage des Vorhandenseins oder der Abwesenheit einer Interaktion zu begutachten.

4.3 Protein Level in den Jurkat SLy1 Knockdown Zelllinien

Zur Bestätigung der in Thymozyten beobachteten Zusammenhänge mit erhöhter STAT5 Konzentration und erhöhter p53 Konzentration wurden SLy1 KD Jurkat Zellen generiert. Dabei wurde statt der in den vorherigen Untersuchungen verwendeten Loucy Zellen auf Jurkat Zellen zurückgegriffen, da nur mit diesen die lentivirale Transduktion mit ausreichender Effizienz funktionierte. Jurkat Zellen exprimieren CD4 und einen funktionalen TCR. Damit sind sie eher dem SP Stadium der Thymozyten bzw. T-Helferzellen zuzuordnen (Abraham and Weiss 2004). So lassen sich die Ergebnisse nicht eins zu eins auf DN Thymozyten übertragen. Außerdem ist zu beachten, dass Leukämiezellen immer eine starke Transformation von den Ausgangszellen darstellen. Thymozyten sind eine fragile Zellspezies, die nur zu einem marginalen Anteil überleben. Damit unterscheiden sie sich grundlegend von Leukämiezellen, die nicht nur potentiell unsterblich, sondern auch stark proliferierend sind. Jurkat Zellen haben eine Verdopplungszeit von 40 Stunden, Loucy Zellen von 48 h (DSMZ , DSMZ). Insofern ist es fragwürdig, ob Ergebnisse aus Jurkat oder Loucy Zellen auf tatsächliche sich entwickelnde Lymphozyten übertragbar sind. Auf der anderen Seite bietet der Einblick in Leukämiezellen aber die Möglichkeit, potentielle Ansatzpunkte für die Krebsforschung zu identifizieren.

In der Untersuchung der Proteinlevel der Jurkat KD Zellen kann eine Reduktion der SLy1 Expression um über 90 % in der LV03 432 Linie und über 80 % in der LV03 434 Linie festgestellt werden. In bisherigen Untersuchungen wurde in SLy1-defizienten Thymozyten eine STAT5 und p53 Hochregulierung gezeigt (Schäll 2015, Gruber 2021, Schneider 2021). Dies, sowie weitere in den Signalweg involvierte Proteine sollten nun auch in der T-ALL Zelllinie überprüft

werden. Bei den Mengen der Proteine Bard1, Mdm2, NPM1, STAT5 und FOXO1 konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Zum Teil zeigten sich leichte Tendenzen, die jedoch nicht mit der Menge an SLy1 in den beiden KD Zelllinien korrelierten. p53 konnte weder in WT noch in den KD Jurkat Zellen detektiert werden. SLy1 scheint hauptsächlich in der Entwicklung der Lymphozyten eine tragende Rolle zu spielen. Es ist darum nicht verwunderlich, dass in der stabilen, nicht mehr evolvierenden Jurkat Zelllinie die Rolle von SLy1, zumindest für die Produktion der untersuchten Proteine, keine Relevanz besitzt. Es bleibt jedoch spannend zu erfahren, wie die bisher nicht untersuchten NPM1 und Bard1 Level sich in SLy1-defizienten und WT Thymozyten verhalten.

Interessanterweise konnte bei den SLy1-defizienten Jurkat Zellen ein geringfügig langsames Wachstum im Vergleich zu den WT Zellen festgestellt werden. Der Effekt war gering und nicht signifikant, blieb über die Zeit jedoch relativ konstant. Wenn SLy1 in dieser T-ALL Zelllinie zu einem stärkeren Wachstum führen sollte, so bietet dies Ansätze für die Leukämiebehandlung. Eine spezifische Inhibition von SLy1 könnte so ein potentieller Angriffspunkt einer individualisierten Leukämietherapie mittels Antikörper oder small-molecule Inhibitoren sein.

4.4 Massenspektrometrische Analyse

In der Massenspektrometrie wurden 581 signifikant angereicherte Proteine identifiziert. Jedes einzelne dieser Proteine zu analysieren, sprengt den Rahmen dieser Doktorarbeit. Stattdessen sollen relevante Gruppen und Cluster von Proteinen betrachtet werden, die potentiell weiter zu erforschen sind.

Zunächst wurde nach Proteinen gesucht, die in vorherigen Untersuchungen bereits als Interaktionspartner identifiziert wurden. Von den in der Interaktionsanalyse mittels Western Blot beobachteten Proteinen konnte nur NPM1 von der Massenspektrometrie erkannt werden. NPM1 ist jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle. Dies kann die Vermutung nicht unterstützen, dass SLy1 mit NPM1 interagiert. Auch die Interaktionen mit STAT5 und FOXO1 konnten nicht bestätigt werden. Interessanterweise wurde p53 in der Massenspektrometrie als leicht erhöht detektiert. Eine Bindung von p53 an SLy1 konnte jedoch in der Western Blot Analyse nicht gefunden werden. Die Detektion in der Massenspektrometrie war zudem zwar im Student t-Test

Diskussion

auffällig, das Verhältnis zwischen der Anreicherung in der IP pSLy1 zu IgG lag jedoch unter dem Cut off von 5. Deshalb kann weiterhin von keiner Bindung zwischen den beiden Proteinen ausgegangen werden. Die im Western Blot untersuchten Proteine Bard1 und Mdm2 waren ebenso wie BRCA1 nicht nachweisbar.

Neben dem Crosstalk über NPM1 sind auch SOCS1 und Miz-1 potentielle Kandidaten für eine Beeinflussung sowohl des IL-7R Signalweges als auch des p53 Signalweges (Wanzel, Russ et al. 2008, Kosan, Saba et al. 2010, Ribeiro, Melão et al. 2018). Beide Proteine können nicht durch Massenspektrometrie der pSLy1-IP detektiert werden. Es findet sich in dieser Untersuchung somit kein Anhalt für ein Eingreifen von SLy1 in den Crosstalk über SOCS1 und Miz-1

In vorherigen Arbeiten wurden 14-3-3 Proteine als mögliche Bindungspartner identifiziert. Zudem wurde die Hypothese aufgestellt, dass 14-3-3 Proteine SLy1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma shuttle (Schäll, Schmitt et al. 2015). Auch in der Massenspektrometrie wurden einige 14-3-3 Proteine detektiert. Signifikant erhöht war dabei 14-3-3 eta. Frühere Studien haben bereits die 14-3-3 Proteine tau und beta als Bindungspartner identifiziert (Brandt 2010). Dabei wurde jedoch auch festgestellt, dass die Bindungsstelle dieser Proteine mit SLy1 im Bereich des phosphorylierten Serinrestes liegt. Der in der vorliegenden Arbeit zur IP genutzte AK bindet an den phosphorylierten Serinrest. Damit war es nicht möglich in dieser IP an der gleichen Stelle bindende Proteine zu identifizieren.

In früheren Studien zu SLy1 wurden zudem vielfältige Proteine, welche in den Zellzyklus eingreifen untersucht. In der Massenspektrometrie konnten verschiedene Cycline und Cyclin-dependent Kinasen detektiert werden. Signifikant im Student t-Test und im Verhältnis pSLy1/ IgG war dabei die Anreicherung von Cyclin K, Cdk9, G2/mitotisch specific cyclin B2, und CDK5. Anhand der Ergebnisse scheint eine Involvierung von SLy1 in die Zellzyklusteuerung wahrscheinlich und bietet Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits Bindungen von SLy1 an diverse ribosomale Proteine in NK Zellen detektieren (Arefanian, Schäll et al. 2016). Von diesen waren einige auch in der Massenspektrometrie nachweisbar. Keines der damals

Diskussion

erkannten Proteine war in einem signifikant erhöhten Verhältnis pSLy1/ IgG von über 5 detektierbar. Im Student t-Test signifikant waren jedoch RPL30, RPS9 und RPL28. Interessanterweise wurden sowohl mitochondriale als auch nukleäre ribosomale Proteine in der Massenspektrometrie erkannt. Dabei stellt sich die Frage, ob SLy1 auch in den Mitochondrien vertreten ist. Brandt konnte das Vorhandensein von SLy1 in der mitochondrialen Fraktion bereits nachweisen (Brandt 2010). Anhand der nun erhobenen Daten bietet es sich an, sich noch einmal auf die Bedeutung der Funktion von SLy1 in Mitochondrien zu fokussieren. Insgesamt scheint sich der Verdacht zu erhärten, dass SLy1 eine Rolle in der Ribosomogenese spielen könnte. Da die Untersuchung in Loucy Zellen durchgeführt wurde, erscheint es möglich, dass SLy1 nicht nur in NK-Zellen, sondern auch in T-Zellen und in Thymozyten in die Ribosomogenese eingreift.

Im Zusammenhang mit den Riboproteinen fällt zudem auf, dass SLy1 mit vielen am Splicing Prozess beteiligten Proteinen coimmunopräzipitiert. Es erscheint also möglich, dass SLy1 als Adapterprotein in den gesamten Prozess der Translation inklusive Splicing miteingreift. Wäre SLy1 auch am Splicing Prozess beteiligt, so würde dies gut zu der Vielfalt der durch SLy1-Defizienz veränderten Stoffwechselprozesse passen. Es bietet sich also an, in zukünftiger Forschung den Splicing Prozess in An- und Abwesenheit von SLy1 genauer zu untersuchen. Insbesondere wäre es interessant zu sehen, ob SLy1 mit Komponenten des Splicing Komplexes in den immunhistochemischen Färbungen kolokalisiert.

Ein bisher ungeklärter Punkt in der Forschung zu SLy1 ist die Frage nach der phosphorylierenden Kinase. Es konnte gezeigt werden, dass SLy1 mindestens eine Phosphorylierungsstelle am Serinrest 27 besitzt (Beer, Scheikl et al. 2005). Zudem wurde beschrieben, dass SLy1 nach der Phosphorylierung insbesondere nach TCR Aktivierung in das Zytoplasma exportiert wird (Schäll, Schmitt et al. 2015). Dabei blieb jedoch offen, welche der Kinasen tatsächlich die Phosphorylierung vornimmt. In der Massenspektrometrie konnten diverse Kinasen identifiziert werden, die Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein können.

Diskussion

Bei der Betrachtung der Kinasen muss jedoch beachtet werden, dass die Immunopräzipitation mittels eines AK erfolgte, welcher die Phosphorylierungsstelle am Serinrest 27 erkennt. Kinasen, die ausschließlich an dieser Stelle binden, können also mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht erfasst werden.

Vorherige Untersuchungen ließen vermuten, dass SLy1 von PI3K bzw. Proteinkinase C abhängigen Signalwegen phosphoryliert wird. (Astoul, Laurence et al. 2003, Beer, Scheikl et al. 2005) Die Bindung von 2 Subunits der PI3K bestätigt eine mögliche Phosphorylierung von SLy1 durch PI3K. Der PI3K Signalweg ist an der Regulation von anti-apoptotischen, mitogenen und stressinduzierten Signalwegen beteiligt. So kann die Kinase bspw. über Phosphorylierungen die Proteinkinasen C, B und D, sowie Akt aktivieren, welche ihrerseits Einfluss auf diverse Zellfunktionen haben (Krasilnikov 2000). Interessanterweise konnte in Loucy Zellen als frühe T-ALL Zelllinie, eine hohe Sensibilität gegenüber PI3K Signalweg Inhibition im Vergleich zu reiferen T-ALL Zelllinien festgestellt werden (Lonetti, Cappellini et al. 2015). Der PI3K Signalweg scheint eine wichtige Funktion in der Thymozytenentwicklung speziell am β -Selektionspunkt am Übergang von DN3 zu DN4 zu spielen. Dieser Prozess ist auch in SLy1-defizienten Thymozyten gestört. Bei der Betrachtung der Bedeutung der möglichen Interaktion zwischen PI3K und SLy1 wäre zu klären, ob PI3K ausschließlich SLy1 downstream aktivieren kann, oder ob SLy1 seinerseits auch einen Einfluss auf PI3K hat.

Brandt hat festgestellt, dass SLy1 in der Lage ist, verschiedene Phosphoinositole zu binden (Brandt 2010). Dabei stellt sich die Frage, ob die entsprechenden Kinasen coimmunopräzipitiert wurden, weil sie zeitgleich mit SLy1 an die Phosphoinositole binden oder ob es tatsächlich eine separate Interaktion gibt.

Als ein weiterer potentieller Interaktionspartner wurde mTOR detektiert. In der T-Zell Entwicklung wird mTOR durch Notch Ligandenbindung aktiviert, was über die Expression von CD71 und CD98 zu einer Proliferation von T-Zellen führt (Ciofani and Zúñiga-Pflücker 2005). In SLy1-defizienten Thymozyten wurde eine verminderte Hochregulation von CD71 und CD98 nach Notch Ligandenbindung festgestellt. SLy1 scheint also für die Aktivierung des mTOR Signalweges

Diskussion

relevant zu sein (Reis, Pfeffer et al. 2009). Im Zuge dessen könnte eine direkte Interaktion von SLy1 und mTOR die Exekutivfunktionen von mTOR aktivieren oder unterstützen.

mTOR spielt zudem eine zentrale Rolle im Stoffwechsel von Zellen und ist Angriffspunkt der auf dem Markt erhältlichen Medikamente Everolimus und Sirolimus (Rapamycin)(Neuhaus, Klupp et al. 2001). Die Inhibition von mTOR führt zu einer Immunsuppression und kann auch in der Therapie von Nierenzellkarzinomen eingesetzt werden (Zou, Tao et al. 2020). In T-ALL Zellen wurde beschrieben, dass die Hochregulation des pro-proliferativen Bcl-2 nicht nur von STAT5, sondern auch über den mTOR/Akt Signalweg reguliert wird (Oliveira, Akkapeddi et al. 2019). Eine Interaktion von mTOR und SLy1 bietet somit interessante Diskussionsansätze für die Entstehung von Leukämiezellen. Insbesondere die Tatsache, dass die Interaktion in der T-ALL Zelllinie beobachtet wurde, gibt einen Hinweis darauf, dass SLy1 in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Leukämien eine Rolle spielen könnte. Es bietet sich dementsprechend an, in zukünftigen Untersuchungen die Auswirkungen von SLy1 auf den mTOR und Akt Signalweg zu betrachten.

Auch die Tausled like Kinasen (TLK) 1 und 2 wurden beide signifikant angereichert. TLKs scheinen eine Wächterfunktion über das Genom auszuüben. Es wurde beschrieben, dass sie in DNA Replikation und Reparatur sowie Zellzykluskontrolle involviert sind (Segura-Bayona and Stracker 2019). Eine besondere Assoziation mit Krankheitsentitäten von Lymphozyten oder in für Thymozyten relevante Signalwege wurde jedoch nicht beschrieben. Die weitere Analyse der potentiellen Interaktion kann möglicherweise eine Involvierung von SLy1 und TLK in bisher unbekannte Signalkaskaden zeigen, ist jedoch im Zuge der Untersuchung der Rolle von SLy1 in Thymozyten nicht vorrangig einzustufen. Als weitere bindende Kinase fällt die Tyrosin-protein Kinase ABL 1 auf. Diese ist vom in der CML entdeckten Philadelphia Chromosom, in dem das ABL Kinase Gen mit dem BCR Gen fusioniert ist, bekannt. Das BCR-ABL Protein zeichnet sich durch eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität im Vergleich zur WT ABL Kinase aus. Die erhöhte Kinaseaktivität bedingt eine verstärkte Zellproliferation und kann so zur Entwicklung von malignen hämatologischen Neoplasien führen (Kurzrock,

Kantarjian et al. 2003). Nicht nur in der CML, sondern auch in der ALL kann das Philadelphia Chromosom eine Rolle spielen (De Klein, Hagemeijer et al. 1986). Eine interessante Frage ist, ob SLy1 nicht nur mit ABL1, sondern auch mit dem BCR-ABL Fusionsprotein interagiert und somit womöglich eine bisher nicht untersuchte Funktion in der Krebsentstehung spielen kann.

Insgesamt kann die Massenspektrometrie gute Anregungen bieten, um weiter zu forschen. Sie bedarf allerdings einer weiteren sorgfältigen Untersuchung der identifizierten Proteine, um tatsächlich von einer Interaktion ausgehen zu können. Die große Menge der detektierten Proteine ist zudem ungewöhnlich für die Immunopräzipitation mit einem spezifischen AK. Zwar wurde durch BLAST Analyse der Bindungssequenz mit den identifizierten Proteinen sichergestellt, dass zumindest keine gleiche Bindungsstelle vorliegt. Dennoch ist es möglich, dass der AK nicht nur an seine vorgegebene Bindungsstelle bindet, sondern auch an anderen nicht angegebenen Mustern. Dies ist anhand der Daten so nicht voneinander zu unterscheiden. Deshalb sollten die Untersuchungen, wenn möglich, noch einmal mit einem AK, der an einer anderen Stelle im Protein bindet, bzw. mit anderen Methoden wie WB oder Immunhistochemie überprüft werden. Außerdem gilt es zu beachten, dass der AK im Bereich der Phosphorylierung des SLy1 Protein im Nukleären Lokalisationssignal bindet. Andere Proteine, die also in diesem Bereich binden würden, können über eine Immunopräzipitation so *per definitionem* nicht erfasst werden. Dies ist insofern problematisch, als dass die Phosphorylierung von SLy1 in diversen Vorarbeiten als relevanter Punkt in der Regulation von SLy1 gewertet wurde. Interaktionen an dieser Stelle im Protein sind demnach wahrscheinlich.

4.5 Klinischer Ausblick

Die Rolle von SLy1 in murinen NK-Zellen und Thymozyten wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beleuchtet. Die vorliegende Arbeit am Modell der T-ALL Zelllinien ermöglicht die Erweiterung der Untersuchungen auf humane Leukämien.

Die beobachtete Interaktion von SLy1 mit NPM1 bietet dabei diverse Diskussionsansätze. In AML weisen 30 % der Patienten Mutationen im NPM1 Gen auf (Falini, Mecucci et al. 2005). Dies findet Berücksichtigung im

Diskussion

Klassifikationssystem der AML, in der NPM1 Mutationen eine Subkategorie darstellen (Cancer 2017). AML sind jedoch myeloische Erkrankungen und in Myeloischen Zellreihen ist SLy1 nicht nachweisbar. Deshalb stellt sich die Frage, ob NPM1 auch in ALL oder CLL Erkrankungen eine Rolle spielt. Es gibt nur eine Quelle, die eine Beteiligung von NPM1 in lymphatischen Erkrankungen belegt (Handschuh, Wojciechowski et al. 2018). Möglicherweise stellt auch die Abwesenheit ebendieser Beobachtungen eine wichtige Aussage dar. Es wäre möglich, dass NPM1 über SLy1 und andere Proteine in lymphatischen Zellen anders in Stoffwechselprozesse eingebunden ist, und in lymphatischen Leukämien praktisch keine Rolle spielt. Die bemerkenswerte Rolle von SLy1 in der Thymozytenproliferation suggeriert vor allem in frühen T-ALL Stadien eine Relevanz von SLy1 und bietet interessante Ansätze für zukünftige Forschungen. Kürzlich wurden SLy1 Gendeletionen in Patienten mit kombinierter Immundefizienz beschrieben (Delmonte, Bergerson et al. 2021). Dabei wurden erniedrigte CD4 T-Helferzellen und eine verminderte T-Zell Proliferation festgestellt. Zudem konnten eine NK- und B-Zell Lymphopenie sowie Neutropenie detektiert werden. Die Untersuchungen in den SLy1-defizienten Patienten bestätigen die Beobachtungen an SLy1 KO Mäusen. Das Adapterprotein SLy1 wird somit erstmals im kausalen Zusammenhang mit einer klinischen Manifestation beschrieben.

Für die Zukunft wird es wichtig sein, die Erkenntnisse über SLy1 aus der Grundlagenforschung in die klinische Forschung zu integrieren. Dabei lohnt es sich vor allem, die Rolle von SLy1 in der Leukämieentstehung, sowie die Funktion von SLy1 im Immunsystem von immun-defizienten Patienten zu beleuchten.

5 Zusammenfassung

Sowohl der IL-7R Signalweg, als auch der p53 Signalweg sind essentiell für die Entwicklung der Thymozyten. NPM1 ist in der Lage, die Expression bzw. Aktivierung von sowohl STAT5, als auch von p53 zu beeinflussen und steht somit im Mittelpunkt des Crosstalks des IL-7R-STAT5 und des p53 Signalweges.

In SLy1-defizienten Thymozyten ist der pro-tropische IL-7R-Signalweg hochreguliert. Unerwarteterweise führt dies nicht über den Crosstalk mit NPM1 zu niedrigen p53 Leveln. Stattdessen werden in SLy1-defizienten Thymozyten erhöhte p53 Level einhergehend mit einer erhöhten Apoptoserate detektiert.

Mittels Western Blot Analyse von Immunopräzipitationen wurden Interaktionen des STAT5-p53 Crosstalks zunächst in HEK 293T Zellen bestätigt. In der T-ALL Zelllinie Loucy als Modell für humane Thymozyten konnte anschließend die Interaktion p53-Mdm2 und Bard1-NPM1 nachgewiesen werden.

Immunopräzipitationen mittels SLy1-AK ergaben Hinweise auf Interaktionen zwischen SLy1 und STAT5 sowie von SLy1 und NPM1. Es kann damit bestätigt werden, dass SLy1 über direkte Interaktionen in den STAT5-p53 Crosstalk eingreift. FOXO1 ist in reifen Thymozyten ebenfalls in der Lage in den IL-7R Signalweg einzugreifen. Mittels Western Blot Analyse von Immunopräzipitationen konnten Belege für eine direkte Interaktion zwischen SLy1 und FOXO1 im überexprimierten Zustand in HEK 293T Zellen gefunden werden.

Die Analyse der pSLy1-Immunopräzipitation mittels Massenspektrometrie lieferte zahlreiche Ansatzpunkte für die Suche nach weiteren Interaktionspartnern.

Die Nutzung der T-ALL Zelllinie Loucy für die Interaktionspartneranalyse bietet die Möglichkeit neben der Thymozytenentwicklung auch neue Erkenntnisse über die Rolle von SLy1 in der Leukämieentstehung zu gewinnen. Zur Analyse der Funktion von SLy1 in einer T-ALL Zelllinie wurden zudem Jurkat SLy1 Knockdown (KD) Zelllinien hergestellt und der Effekt auf Proteinlevel und Interaktionsmuster im STAT5-p53 Crosstalk untersucht. Dabei scheint SLy1 zumindest in Jurkat Zellen in diesem Signalweg keine aktive Rolle zu spielen.

Dennoch kann die vorliegende Arbeit eine Funktion von SLy1 im STAT5-p53 Crosstalk durch den Nachweis der direkten Interaktionen von SLy1 mit STAT5 und mit NPM1 in der T-ALL Zelllinie Loucy bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

- Able, A. A., J. A. Burrell and J. M. Stephens (2017). "STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity." Biology (Basel) **6**(1).
- Abraham, R. T. and A. Weiss (2004). "Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm." Nature Reviews Immunology **4**(4): 301-308.
- Alves, N. L., O. Richard-Le Goff, N. D. Huntington, A. P. Sousa, V. S. Ribeiro, A. Bordack, F. L. Vives, L. Peduto, A. Chidgey, A. Cumano, R. Boyd, G. Eberl and J. P. Di Santo (2009). "Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(5): 1512-1517.
- Anderson, N. M., I. Harrold, M. R. Mansour, T. Sanda, M. McKeown, N. Nagykar, J. E. Bradner, G. Lan Zhang, A. T. Look and H. Feng (2014). "BCL2-specific inhibitor ABT-199 synergizes strongly with cytarabine against the early immature LOUCY cell line but not more-differentiated T-ALL cell lines." Leukemia **28**(5): 1145-1148.
- Arefanian, S., D. Schäll, S. Chang, R. Ghasemi, R. Higashikubo, A. Zheleznyak, Y. Guo, J. Yu, H. Asgharian, W. Li, A. E. Gelman, D. Kreisel, A. R. French, H. Zaher, B. Plougastel-Douglas, L. Maggi, W. Yokoyama, S. Beer-Hammer and A. S. Krupnick (2016). "Deficiency of the adaptor protein SLy1 results in a natural killer cell ribosomopathy affecting tumor clearance." Oncolmmunology **5**(12): e1238543.
- Astoul, E., A. D. Laurence, N. Totty, S. Beer, D. R. Alexander and D. A. Cantrell (2003). "Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways." J Biol Chem **278**(11): 9267-9275.
- Barak, Y., T. Juven, R. Haffner and M. Oren (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." Embo j **12**(2): 461-468.
- Beer, S., T. Scheikl, B. Reis, N. Hüser, K. Pfeffer and B. Holzmann (2005). "Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice." Mol Cell Biol **25**(21): 9646-9660.
- Beer, S., A. B. Simins, A. Schuster and B. Holzmann (2001). "Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells." Biochim Biophys Acta **1520**(1): 89-93.
- Box, J. K., N. Paquet, M. N. Adams, D. Boucher, E. Bolderson, K. J. O'Byrne and D. J. Richard (2016). "Nucleophosmin: from structure and function to disease development." BMC Molecular Biology **17**(1).
- Brandt, S. (2010). Interaktionsanalyse der Adaptorproteine SLy1 und SLy2. Dr. rer. nat, Heinrich-Heine-Universität.
- Bucur, O., L. Wanami, A. Singh, J. Plati, A. Melet and R. Khosravi-Far (2008). "Novel partner of FoxO1 and FoxO3a tumor suppressors: New functional insights." Cancer Research **68**(9 Supplement): 1552-1552.
- Buday, L. (1999). "Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins." Biochim Biophys Acta **1422**(2): 187-204.
- Cancer, I. A. f. R. o. (2017). WHO Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon.
- Casetti, L., S. Martin-Lannerée, I. Najjar, I. Plo, S. Augé, L. Roy, J. C. Chomel, E. Lauret, A. G. Turhan and I. Dusanter-Fourt (2013). "Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine

- kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells." Cancer Res **73**(7): 2052-2058.
- Casorati, G., G. De Libero, A. Lanzavecchia and N. Migone (1989). "Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood." Journal of Experimental Medicine **170**(5): 1521-1535.
- Ceredig, R., F. Lynch and P. Newman (1987). "Phenotypic Properties, Interleukin 2 Production, and Developmental Origin of a `Mature" Subpopulation of L^{yt}-2⁺ L3T4⁺ mouse Thymocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**(23): 8578-8582.
- Chetoui, N., M. Boisvert, S. Gendron and F. Aoudjit (2010). "Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway." Immunology **130**(3): 418-426.
- Ciofani, M. and J. C. Zúñiga-Pflücker (2005). "Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism." Nat Immunol **6**(9): 881-888.
- Coffey, A. J., R. A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G. R. Howell, J. M. Bye, A. P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, R. Pavitt, J. Wilkinson, M. Leversha, E. Huckle, C. J. Shaw-Smith, A. Dunham, S. Rhodes, V. Schuster, G. Porta, L. Yin, P. Serafini, B. Sylla, M. Zollo, B. Franco, A. Bolino, M. Seri, A. Lanyi, J. R. Davis, D. Webster, A. Harris, G. Lenoir, G. de St Basile, A. Jones, B. H. Behloradsky, H. Achatz, J. Murken, R. Fassler, J. Sumegi, G. Romeo, M. Vaudin, M. T. Ross, A. Meindl and D. R. Bentley (1998). "Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene." Nat Genet **20**(2): 129-135.
- Colombo, E., J.-C. Marine, D. Danovi, B. Falini and P. G. Pelicci (2002). "Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53." Nature Cell Biology **4**(7): 529-533.
- Crispe, I. N., L. A. Husmann and M. J. Bevan (1986). "T cell receptor expression and receptor-mediated induction of clonal growth in the developing mouse thymus. High surface beta-chain density is a requirement for functional maturity." Eur J Immunol **16**(10): 1283-1288.
- De Klein, A., A. Hagemeijer, C. R. Bartram, R. Houwen, L. Hoefsloot, F. Carbonell, L. Chan, M. Barnett, M. Greaves, E. Kleihauer and et al. (1986). "bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia." Blood **68**(6): 1369-1375.
- Delmonte, O. M., J. R. E. Bergerson, T. Kawai, H. S. Kuehn, D. H. McDermott, I. Cortese, M. T. Zimmermann, A. K. Dobbs, M. Bosticardo, D. Fink, S. Majumdar, B. Palterer, F. Pala, N. R. Dsouza, M. Pouzolles, N. Taylor, K. R. Calvo, S. R. Daley, D. Velez, A. Agharahimi, K. Myint-Hpu, L. K. Dropulic, J. J. Lyons, S. M. Holland, A. F. Freeman, R. Ghosh, M. B. Similuk, J. E. Niemela, J. Stoddard, D. B. Kuhns, R. Urrutia, S. D. Rosenzweig, M. A. Walkiewicz, P. M. Murphy and L. D. Notarangelo (2021). "SASH3 variants cause a novel form of X-linked combined immunodeficiency with immune dysregulation." Blood **138**(12): 1019-1033.

- Donskoy, E. and I. Goldschneider (1992). "Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice." J Immunol **148**(6): 1604-1612.
- DSMZ JURKAT ACC 282.
- DSMZ LOUCY ACC 394.
- Egawa, T., R. E. Tillman, Y. Naoe, I. Taniuchi and D. R. Littman (2007). "The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells." J Exp Med **204**(8): 1945-1957.
- Eijkelenboom, A. and B. M. Burgering (2013). "FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(2): 83-97.
- Ewing, T., M. Egerton, A. Wilson, R. Scollay and K. Shortman (1988). "Subpopulations of CD4- CD8- murine thymocytes: differences in proliferation rate in vivo and proliferative responses in vitro." Eur J Immunol **18**(2): 261-268.
- Falini, B., C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettrossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P. G. Pelicci and M. F. Martelli (2005). "Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype." N Engl J Med **352**(3): 254-266.
- Falini, B., I. Nicoletti, M. F. Martelli and C. Mecucci (2007). "Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features." Blood **109**(3): 874-885.
- Falk, I., G. Nerz, I. Haidl, A. Krotkova and K. Eichmann (2001). "Immature thymocytes that fail to express TCRbeta and/or TCRgamma delta proteins die by apoptotic cell death in the CD44(-)CD25(-) (DN4) subset." Eur J Immunol **31**(11): 3308-3317.
- Fowlkes, B. J., L. Edison, B. J. Mathieson and T. M. Chused (1985). "Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells." Journal of Experimental Medicine **162**(3): 802-822.
- Fry, T. J. and C. L. Mackall (2005). "The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance." J Immunol **174**(11): 6571-6576.
- García-Cano, J., S. Sánchez-Tena, J. Sala-Gaston, A. Figueras, F. Viñals, R. Bartrons, F. Ventura and J. L. Rosa (2020). "Regulation of the MDM2-p53 pathway by the ubiquitin ligase HERC2." Molecular Oncology **14**(1): 69-86.
- Ghazawi, F. M., E. M. Faller, P. Parmar, A. El-Salfiti and P. A. MacPherson (2016). "Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins are induced by IL-7 and target surface CD127 protein for degradation in human CD8 T cells." Cellular Immunology **306-307**: 41-52.
- Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda and A. Zlotnik (1993). "A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression." The Journal of Immunology **150**(10): 4244-4252.
- Gruber, L.-C. (2021). Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 im p53-Signalweg. Dr.med, Eberhard-Karls-Universität.
- Hamilton, G., A. G. Abraham, J. Morton, O. Sampson, D. E. Pefani, S. Khoronenkova, A. Grawenda, A. Papaspyropoulos, N. Jamieson, C.

- McKay, O. Sansom, G. L. Dianov and E. O'Neill (2014). "AKT regulates NPM dependent ARF localization and p53mut stability in tumors." Oncotarget **5**(15): 6142-6167.
- Handschuh, L., P. Wojciechowski, M. Kazmierczak, M. Marcinkowska-Swojak, M. Luczak, K. Lewandowski, M. Komarnicki, J. Blazewicz, M. Figlerowicz and P. Kozlowski (2018). "NPM1 alternative transcripts are upregulated in acute myeloid and lymphoblastic leukemia and their expression level affects patient outcome." J Transl Med **16**(1): 232.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz and M. Oren (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature **387**(6630): 296-299.
- Heltemes-Harris, L. M. and M. A. Farrar (2012). "The role of STAT5 in lymphocyte development and transformation." Curr Opin Immunol **24**(2): 146-152.
- Hoffman, E. S., L. Passoni, T. Crompton, T. M. Leu, D. G. Schatz, A. Koff, M. J. Owen and A. C. Hayday (1996). "Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo." Genes Dev **10**(8): 948-962.
- Hong, C., M. A. Luckey and J. H. Park (2012). "Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development." Semin Immunol **24**(3): 151-158.
- Jiang, Q., J. Huang, W. Q. Li, T. Cavinato, J. R. Keller and S. K. Durum (2007). "Role of the Intracellular Domain of IL-7 Receptor in T Cell Development." The Journal of Immunology **178**(1): 228-234.
- Jiang, Q., W. Q. Li, F. B. Aiello, R. Mazzucchelli, B. Asefa, A. R. Khaled and S. K. Durum (2005). "Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin." Cytokine & Growth Factor Reviews **16**(4): 513-533.
- Jiang, Q., W. Q. Li, R. R. Hofmeister, H. A. Young, D. R. Hodge, J. R. Keller, A. R. Khaled and S. K. Durum (2004). "Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members." Mol Cell Biol **24**(14): 6501-6513.
- Joliot, V., F. Cormier, H. Medyouf, H. Alcalde and J. Ghysdael (2006). "Constitutive STAT5 activation specifically cooperates with the loss of p53 function in B-cell lymphomagenesis." Oncogene **25**(33): 4573-4584.
- Kelly, A. P., D. K. Finlay, H. J. Hinton, R. G. Clarke, E. Fiorini, F. Radtke and D. A. Cantrell (2007). "Notch-induced T cell development requires phosphoinositide-dependent kinase 1." Embo j **26**(14): 3441-3450.
- Kerdiles, Y. M., D. R. Beisner, R. Tinoco, A. S. Dejean, D. H. Castrillon, R. A. DePinho and S. M. Hedrick (2009). "Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor." Nat Immunol **10**(2): 176-184.
- Khaled, A. R., K. Kim, R. Hofmeister, K. Muegge and S. K. Durum (1999). "Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14476-14481.
- Khaled, A. R., W. Q. Li, J. Huang, T. J. Fry, A. S. Khaled, C. L. Mackall, K. Muegge, H. A. Young and S. K. Durum (2002). "Bax deficiency partially corrects interleukin-7 receptor alpha deficiency." Immunity **17**(5): 561-573.
- Klein, L. (2009). "Dead man walking: how thymocytes scan the medulla." Nature Immunology **10**(8): 809-811.

- Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen and K. A. Hogquist (2014). "Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)." Nat Rev Immunol **14**(6): 377-391.
- Kloos, I. (2021). Die Rolle von SLy1 bei der Entwicklung einer T-Zell-akuten lymphatischen Leukämie. Dr. med, Eberhard-Karls-Universität.
- Korgaonkar, C., J. Hagen, V. Tompkins, A. A. Frazier, C. Allamargot, F. W. Quelle and D. E. Quelle (2005). "Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function." Mol Cell Biol **25**(4): 1258-1271.
- Kosan, C., I. Saba, M. Godmann, S. Herold, B. Herkert, M. Eilers and T. Möröy (2010). "Transcription factor miz-1 is required to regulate interleukin-7 receptor signaling at early commitment stages of B cell differentiation." Immunity **33**(6): 917-928.
- Koyasu, S., L. K. Clayton, A. Lerner, H. Heiken, A. Parkes and E. L. Reinherz (1997). "Pre-TCR signaling components trigger transcriptional activation of a rearranged TCR alpha gene locus and silencing of the pre-TCR alpha locus: implications for intrathymic differentiation." Int Immunol **9**(10): 1475-1480.
- Krasilnikov, M. A. (2000). "Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation." Biochemistry (Mosc) **65**(1): 59-67.
- Kukuk, L., A. J. Dingley, J. Granzin, L. Nagel-Steger, P. Thiagarajan-Rosenkranz, D. Ciupka, K. Hänel, R. Batra-Safferling, V. Pacheco, M. Stoldt, K. Pfeffer, S. Beer-Hammer, D. Willbold and B. W. Koenig (2019). "Structure of the SLy1 SAM homodimer reveals a new interface for SAM domain self-association." Sci Rep **9**(1): 54.
- Kurki, S., K. Peltonen, L. Latonen, T. M. Kiviharju, P. M. Ojala, D. Meek and M. Laiho (2004). "Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation." Cancer Cell **5**(5): 465-475.
- Kurzrock, R., H. M. Kantarjian, B. J. Druker and M. Talpaz (2003). "Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics." Ann Intern Med **138**(10): 819-830.
- Kyewski, B. and L. Klein (2006). "A central role for central tolerance." Annu Rev Immunol **24**: 571-606.
- Lacorazza, H. D., H. E. Porritt and J. Nikolich-Žugich (2001). "Dysregulated Expression of Pre-T α Reveals the Opposite Effects of Pre-TCR at Successive Stages of T Cell Development." The Journal of Immunology **167**(10): 5689-5696.
- Lee, S. Y., J. H. Park, S. Kim, E. J. Park, Y. Yun and J. Kwon (2005). "A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks." Biochem J **388**(Pt 1): 7-15.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**(3): 323-331.
- Li, W. Q., Q. Jiang, E. Aleem, P. Kaldis, A. R. Khaled and S. K. Durum (2006). "IL-7 promotes T cell proliferation through destabilization of p27Kip1." J Exp Med **203**(3): 573-582.

- Lin, J. X., T. S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J. A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E. T. Bloom, J. Mietz, S. John and et al. (1995). "The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15." Immunity **2**(4): 331-339.
- Liso, A., A. Bogliolo, V. Freschi, M. P. Martelli, S. A. Pileri, M. Santodirocco, N. Bolli, M. F. Martelli and B. Falini (2008). "In human genome, generation of a nuclear export signal through duplication appears unique to nucleophosmin (NPM1) mutations and is restricted to AML." Leukemia **22**(6): 1285-1289.
- Lonetti, A., A. Cappellini, A. M. Spartà, F. Chiarini, F. Buontempo, C. Evangelisti, C. Evangelisti, E. Orsini, J. A. McCubrey and A. M. Martelli (2015). "PI3K pan-inhibition impairs more efficiently proliferation and survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines when compared to isoform-selective PI3K inhibitors." Oncotarget **6**(12): 10399-10414.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.
- Mackall, C. L., T. J. Fry and R. E. Gress (2011). "Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application." Nature Reviews Immunology **11**(5): 330-342.
- Maki, C. G. (1999). "Oligomerization Is Required for p53 to be Efficiently Ubiquitinated by MDM2." Journal of Biological Chemistry **274**(23): 16531-16535.
- Mazzucchelli, R. and S. K. Durum (2007). "Interleukin-7 receptor expression: intelligent design." Nat Rev Immunol **7**(2): 144-154.
- Mazzucchelli, R. I., S. Warming, S. M. Lawrence, M. Ishii, M. Abshari, A. V. Washington, L. Feigenbaum, A. C. Warner, D. J. Sims, W. Q. Li, J. A. Hixon, D. H. Gray, B. E. Rich, M. Morrow, M. R. Anver, J. Cherry, D. Naf, L. R. Sternberg, D. W. McVicar, A. G. Farr, R. N. Germain, K. Rogers, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and S. K. Durum (2009). "Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice." PLoS One **4**(11): e7637.
- Michalik, J., L. C. Yeoman and H. Busch (1981). "Nucleolar localization of protein B23 (37/5.1) by immunocytochemical techniques." Life Sci **28**(12): 1371-1379.
- Mitrea, D. M., J. A. Cika, C. S. Guy, D. Ban, P. R. Banerjee, C. B. Stanley, A. Nourse, A. A. Deniz and R. W. Kriwacki (2016). "Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA." Elife **5**.
- Mitrea, D. M., J. A. Cika, C. B. Stanley, A. Nourse, P. L. Onuchic, P. R. Banerjee, A. H. Phillips, C. G. Park, A. A. Deniz and R. W. Kriwacki (2018). "Self-interaction of NPM1 modulates multiple mechanisms of liquid-liquid phase separation." Nat Commun **9**(1): 842.
- Moll, U. M. and O. Petrenko (2003). "The MDM2-p53 Interaction." Molecular Cancer Research **1**(14): 1001-1008.
- Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George and A. J. Levine (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." Cell **69**(7): 1237-1245.

- Morris, S. W., M. N. Kirstein, M. B. Valentine, K. G. Dittmer, D. N. Shapiro, D. L. Saltman and A. T. Look (1994). "Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma." Science **263**(5151): 1281-1284.
- Munitic, I., J. A. Williams, Y. Yang, B. Dong, P. J. Lucas, N. El Kassar, R. E. Gress and J. D. Ashwell (2004). "Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis." Blood **104**(13): 4165-4172.
- Murano, K., M. Okuwaki, M. Hisaoka and K. Nagata (2008). "Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity." Mol Cell Biol **28**(10): 3114-3126.
- Neuhaus, P., J. Klupp and J. M. Langrehr (2001). "mTOR inhibitors: an overview." Liver Transpl **7**(6): 473-484.
- Nikolić-Žugić, J. (1991). "Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of $\alpha\beta$ T cells." Immunology Today **12**(2): 65-70.
- Okuwaki, M. (2008). "The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein." J Biochem **143**(4): 441-448.
- Okuwaki, M., S. Saito, H. Hirawake-Mogi and K. Nagata (2021). "The interaction between nucleophosmin/NPM1 and the large ribosomal subunit precursors contribute to maintaining the nucleolar structure." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1868**(1): 118879.
- Oliveira, M. L., P. Akkapeddi, D. Ribeiro, A. Melão and J. T. Barata (2019). "IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update." Adv Biol Regul **71**: 88-96.
- Osborne, L. C., S. Dhanji, J. W. Snow, J. J. Priatel, M. C. Ma, M. J. Miners, H. S. Teh, M. A. Goldsmith and N. Abraham (2007). "Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice." J Exp Med **204**(3): 619-631.
- Ouyang, W., O. Beckett, R. A. Flavell and M. O. Li (2009). "An Essential Role of the Forkhead-Box Transcription Factor Foxo1 in Control of T Cell Homeostasis and Tolerance." Immunity **30**(3): 358-371.
- Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes and A. Singer (2004). "Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival." Immunity **21**(2): 289-302.
- Pei, H. Z., X. Zhuang, M. Yang, Y. Guo, Z. Chang, D. Zhang, Y. Zhao, L. Yu, B. Lu, X. Xu, Y. Chen and Z. J. Zhao (2021). "FLT3 Inhibitors Induce p53 Instability Due to Increased Interaction between p53 and MDM2 By Inhibiting STAT5 Phosphorylation in Acute Myeloid Leukemia." Blood **138**: 3333.
- Peng, S. L. (2008). "Foxo in the immune system." Oncogene **27**(16): 2337-2344.
- Peschon, J. J., P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, J. D. Meyer and B. L. Davison (1994). "Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice." J Exp Med **180**(5): 1955-1960.
- Peter Heinrich, M. M., Lutz Graeve (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg, Springer Verlag.

- Qiao, F. and J. U. Bowie (2005). "The many faces of SAM." Sci STKE **2005**(286): re7.
- Ramesh, N., T. Morio, R. Fuleihan, M. Worm, A. Horner, E. Tsitsikov, E. Castigli and R. S. Geha (1995). "CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGMX-1)." Clin Immunol Immunopathol **76**(3 Pt 2): S208-213.
- Reis, B., K. Pfeffer and S. Beer-Hammer (2009). "The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development." BMC Immunology **10**(1): 38.
- Ren, Z., J. L. Aerts, H. Vandenplas, J. A. Wang, O. Gorbenko, J. P. Chen, P. Giron, C. Heirman, C. Goyvaerts, E. Zacksenhaus, M. D. Minden, V. Stambolic, K. Breckpot and J. De Grève (2016). "Phosphorylated STAT5 regulates p53 expression via BRCA1/BARD1-NPM1 and MDM2." Cell Death Dis **7**(12): e2560.
- Repass, J. F., M. N. Laurent, C. Carter, B. Reizis, M. T. Bedford, K. Cardenas, P. Narang, M. Coles and E. R. Richie (2009). "IL7-hCD25 and IL7-Cre BAC transgenic mouse lines: new tools for analysis of IL-7 expressing cells." Genesis **47**(4): 281-287.
- Ribeiro, D., A. Melão, R. van Boxtel, C. I. Santos, A. Silva, M. C. Silva, B. A. Cardoso, P. J. Coffey and J. T. Barata (2018). "STAT5 is essential for IL-7-mediated viability, growth, and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells." Blood Adv **2**(17): 2199-2213.
- Saint-Ruf, C., K. Ungewiss, M. Groettrup, L. Bruno, H. J. Fehling and H. von Boehmer (1994). "Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene." Science **266**(5188): 1208-1212.
- Saito, T. and N. Watanabe (1998). "Positive and negative thymocyte selection." Crit Rev Immunol **18**(4): 359-370.
- Samavarchi-Tehrani, P., R. Samson and A.-C. Gingras (2020). "Proximity Dependent Biotinylation: Key Enzymes and Adaptation to Proteomics Approaches*." Molecular & Cellular Proteomics **19**(5): 757-773.
- Sato, K., R. Hayami, W. Wu, T. Nishikawa, H. Nishikawa, Y. Okuda, H. Ogata, M. Fukuda and T. Ohta (2004). "Nucleophosmin/B23 Is a Candidate Substrate for the BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase." Journal of Biological Chemistry **279**(30): 30919-30922.
- Sawicka, M., G. L. Stritesky, J. Reynolds, N. Abourashchi, G. Lythe, C. Molina-París and K. A. Hogquist (2014). "From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection." Front Immunol **5**: 19.
- Schäll, D. (2015). Das Adapterprotein SLY1- Ein Zelltyp-spezifischer Regulator des Immunsystems. Dr.rer.nat, Eberhard-Karls-Universität.
- Schäll, D., F. Schmitt, B. Reis, S. Brandt and S. Beer-Hammer (2015). "SLY1 regulates T-cell proliferation during *Listeria monocytogenes* infection in a Foxo1-dependent manner." European Journal of Immunology **45**(11): 3087-3097.
- Scheikl, T., B. Reis, K. Pfeffer, B. Holzmann and S. Beer (2009). "Reduced notch activity is associated with an impaired marginal zone B cell development and function in Sly1 mutant mice." Mol Immunol **46**(5): 969-977.

- Schneider, B. (2021). Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 in der T-Zell-Entwicklung, Eberhard-Karls-Universität
- Segura-Bayona, S. and T. H. Stracker (2019). "The Tousled-like kinases regulate genome and epigenome stability: implications in development and disease." Cellular and Molecular Life Sciences **76**(19): 3827-3841.
- Singer, A., S. Adoro and J. H. Park (2008). "Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice." Nat Rev Immunol **8**(10): 788-801.
- Trop, S., M. Rhodes, D. L. Wiest, P. Hugo and J. C. Zúñiga-Pflücker (2000). "Competitive Displacement of pT α by TCR- α During TCR Assembly Prevents Surface Coexpression of Pre-TCR and $\alpha\beta$ TCR." The Journal of Immunology **165**(10): 5566-5572.
- Van De Wiele, C. J., J. H. Marino, B. W. Murray, S. S. Vo, M. E. Whetsell and T. K. Teague (2004). "Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation." J Immunol **172**(7): 4235-4244.
- Van Vlierberghe, P., A. Ambesi-Impiombato, A. Perez-Garcia, J. E. Haydu, I. Rigo, M. Hadler, V. Tosello, G. Della Gatta, E. Paietta, J. Racevskis, P. H. Wiernik, S. M. Luger, J. M. Rowe, M. Rue and A. A. Ferrando (2011). "ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias." J Exp Med **208**(13): 2571-2579.
- Vardiman, J. W., J. Thiele, D. A. Arber, R. D. Brunning, M. J. Borowitz, A. Porwit, N. L. Harris, M. M. Le Beau, E. Hellström-Lindberg, A. Tefferi and C. D. Bloomfield (2009). "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes." Blood **114**(5): 937-951.
- Venkitaraman, A. R. and R. J. Cowling (1994). "Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the alpha chain of the interleukin-7 receptor." Eur J Immunol **24**(9): 2168-2174.
- von Freeden-Jeffry, U., N. Solvason, M. Howard and R. Murray (1997). "The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression." Immunity **7**(1): 147-154.
- von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach and R. Murray (1995). "Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine." J Exp Med **181**(4): 1519-1526.
- Wang, S., S. Sun, Z. Li, R. Zhang and J. Xu (2017). "Accurate De Novo Prediction of Protein Contact Map by Ultra-Deep Learning Model." PLOS Computational Biology **13**(1): e1005324.
- Wang, S., S. Sun and J. Xu (2018). "Analysis of deep learning methods for blind protein contact prediction in CASP12." Proteins **86 Suppl 1**(Suppl 1): 67-77.
- Wang, W., A. Budhu, M. Forgues and X. W. Wang (2005). "Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication." Nat Cell Biol **7**(8): 823-830.
- Wanzel, M., A. C. Russ, D. Kleine-Kohlbrecher, E. Colombo, P.-G. Pelicci and M. Eilers (2008). "A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth." Nature Cell Biology **10**(9): 1051-1061.

- Wofford, J. A., H. L. Wieman, S. R. Jacobs, Y. Zhao and J. C. Rathmell (2008). "IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival." Blood **111**(4): 2101-2111.
- Wu, M. H., J. H. Chang, C. C. Chou and B. Y. Yung (2002). "Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation." Int J Cancer **97**(3): 297-305.
- Wu, M. H., J. H. Chang and B. Y. Yung (2002). "Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression." Carcinogenesis **23**(1): 93-100.
- Xue, H. H., J. Bollenbacher, V. Rovella, R. Tripuraneni, Y. B. Du, C. Y. Liu, A. Williams, J. P. McCoy and W. J. Leonard (2004). "GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells." Nat Immunol **5**(10): 1036-1044.
- Yu, Q., B. Erman, J. H. Park, L. Feigenbaum and A. Singer (2004). "IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgammat: impact on thymocyte development." J Exp Med **200**(6): 797-803.
- Yücel, R., H. Karsunky, L. Klein-Hitpass and T. Möröy (2003). "The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus." J Exp Med **197**(7): 831-844.
- Zeng, H., S. Wang, T. Zhou, F. Zhao, X. Li, Q. Wu and J. Xu (2018). "ComplexContact: a web server for inter-protein contact prediction using deep learning." Nucleic Acids Res **46**(W1): W432-w437.
- Zhou, T.-M., S. Wang and J. Xu (2017). Deep learning reveals many more inter-protein residue-residue contacts than direct coupling analysis, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Zou, Z., T. Tao, H. Li and X. Zhu (2020). "mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges." Cell & Bioscience **10**(1): 31.
- Zufferey, R., T. Dull, R. J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldini and D. Trono (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol **72**(12): 9873-9880.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik, Abteilung für Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie unter Betreuung von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Sandra Beer-Hammer.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder Tessa Stefan, Claudia Müller und Renate Riehle von mir eigenständig durchgeführt. Der On bead digest erfolgte durch Katrin Junger. Die Massenspektrometrische Analyse inklusive der statistischen Auswertung dieser Methode wurde in der Arbeitsgruppe von Karsten Boldt durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung von meiner Doktormutter durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Veröffentlichungen

8.1. Posterveröffentlichungen

Mareen Kraft, Sandra Beer-Hammer: Interaction analysis of SLy1 in thymocytes, 2021,12. Autumn School (DGfI), Merseburg, Deutschland.

8.2. Publikation in Vorbereitung

Lena Gruber*, Isabel Kloos*, **Mareen Kraft***, Helen Kümmerle*, Christin Nothnagel*, Sandra Beer-Hammer (* gleicher Beitrag):
The role of SLy1 in IL-7R signalling

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben:

Zuerst danke ich Frau Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer für die professionelle Anleitung und hervorragende Betreuung.

Zudem möchte ich Prof Dr. Dr. Nürnberg danken für die Möglichkeit, am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik zu promovieren.

Ein herzliches Dankeschön gilt zudem den Mitarbeitern des Instituts- insbesondere Renate Riehle und Claudia Müller für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Fragen.

Ein weiteres Dankeschön gilt dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) für die finanzielle und ideelle Förderung.

Ich danke Nathalie Simon, Muhsin Aldoori und Mark Tamm für die lustigen gemeinsamen Stunden im Labor. Außerdem möchte ich mich bei Tessa Stefan, Helen Kümmerle, Christin Nothnagel und Jannika Botzenhardt für intensive Gespräche und gute Denkanstöße bedanken.

Abschließend gilt ein großes Dankeschön meiner Familie und meinen Freunden für das Hochhalten meiner Motivation und die immer offene Ohren bei Problemen.