

Aus der Abteilung Psychosomatische Medizin und Psychotherapie
(Prof. Dr. med. Ch. Herrmann-Lingen)
im Zentrum Psychosoziale Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Rolle der Linker-Domäne von STAT1 bei der Regulation
transkriptioneller Antworten im Interferon-Signalweg**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jana Christin Bolten
aus
Hannover

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Dr. rer. nat. T. Meyer

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

Tag der mündlichen Prüfung: 04. November 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Buchstaben-Code für proteinogene Aminosäuren	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Die Entdeckung der STAT-Proteine	1
1.2 Die Bedeutung von Zytokinen für STAT-Proteine	4
1.3 Nukleozytoplasmatischer Transport von STAT-Proteinen	9
1.4 Struktur und Domänen der STAT-Proteine	11
1.5 Fragestellung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Humane Zelllinien	18
2.1.2 Chemikalienliste	18
2.1.3 Radiochemikalien	20
2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien	20
2.1.5 Antikörper und Reaktionskits	20
2.1.6 Enzyme und Zytokine	21
2.1.7 Plasmide	22
2.1.8 Oligonukleotide	23
2.1.9 Bakterienstämme und Medien	25
2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkulturmethoden	26
2.2.2 Transfektion der Säugerzellen	27
2.2.3 Behandlung mit Zytokinen und Inhibitoren	27
2.2.4 Mutagenese	28
2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien ..	28

2.2.6	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	28
2.2.7	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	29
2.2.8	Sequenzierung.....	29
2.2.9	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	29
2.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.2.11	Western-Blot-Analyse	31
2.2.12	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA).....	32
2.2.13	Dephosphorylierungs-Assay	33
2.2.14	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	34
2.2.15	Reporter-gen-Assay	35
2.2.16	RNA-Isolation.....	36
2.2.17	cDNA-Herstellung	36
2.2.18	Real-time-PCR.....	37
2.3	Darstellung der STAT1-Kristallstruktur.....	37
2.4	Statistik.....	37
3.	Ergebnisse	38
3.1	STAT1-E436A zeigt ein mit STAT1-WT vergleichbares Phosphorylierungsniveau	39
3.2	Normale Kinetik der IFN γ -induzierten Kernakkumulation von STAT1-E436A	41
3.3	Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-E436A ist vergleichbar mit der von STAT1-WT.....	42
3.4	Identifizierung und Untersuchung eines positiv geladenen Aminosäurerestes in der Linker-Domäne von STAT1	43
3.5	Die Western-Blot-Analyse zeigt eine Hypophosphorylierung von STAT1-K550A	45
3.6	STAT1-K550E besitzt einen ähnlichen Phänotyp wie die K550A-Mutante ...	46
3.7	STAT1-K550A zeigt im Gelshift-Experiment eine inhibierte Bildung von DNA-gebundenen STAT1-Komplexen	47

3.8	STAT1-K550A und STAT1-K550E weisen eine verminderte Kinetik der Kernakkumulation auf	49
3.9	Verminderte Affinität der DNA-Bindung von STAT1-K550A bei mit dem Wildtyp vergleichbarer Dissoziationskinetik	50
3.10	STAT1-K550A zeigt eine normale kooperative DNA-Bindung.....	53
3.11	Durch Behandlung von STAT1-K550A und STAT1-K550E mit Vanadat kann die verminderte Phosphorylierung kompensiert werden.....	55
3.12	Vanadat-Behandlung verbessert die IFN γ -induzierte Kernakkumulation von STAT1-K550A und STAT1-K550E	58
3.13	STAT1-K550A zeigt eine veränderte Dephosphorylierungskinetik	59
3.14	Die <i>In-vitro</i> -Genaktivierung von STAT1-K550A und STAT1-K550E ist vermindert	61
3.15	Die Punktmutante K550A weist eine verminderte Expression bekannter STAT1-Zielgene auf.....	63
4.	Diskussion	65
5.	Zusammenfassung	78
5.1	Summary	79
6.	Literaturverzeichnis.....	80

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere, Absorption
Å	Ångström
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zelle	B-Lymphozyt
°C	Grad Celsius
CBP	CREB-bindendes Protein
c-Cbl	engl.: <i>casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>
CCD	Coiled-coil-Domäne
cDNA	Komplementäre DNA
CIS	engl.: <i>cytokine inducible SH2-containing protein</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	engl.: <i>cAMP response element-binding protein</i>
CRM1	engl.: <i>chromosome region maintenance 1</i>
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsNLS	dimer-spezifisches nukleäres Lokalisationssignal
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay
FCS	Fetales Kälberserum

g	Erdbeschleunigung, Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma-aktivierte Sequenz
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl.: <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazino-Ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM-1	Intrazelluläres-Adhäsions-Molekül-1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
IL	Interleukin
IRF1	IFN-regulierender Faktor 1
ISGF3	IFN-stimulierender Genfaktor 3
ISRE	engl.: <i>interferon stimulated response element</i>
JAK	Janus-Kinase
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
L	Liter
LB	Luria-Broth
LD	Linker-Domäne
m	milli, Meter
M	Molar
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

MIG	engl.: <i>monokine induced by IFNγ</i>
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA
n	Nano
N-Terminus	aminoterminaler Terminus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natrium-ortho-Vanadat
ND	Aminoterninale Domäne
NES	Nukleäres Exportsignal
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPC	Nukleärer Porenkomplex
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
p	piko
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein-Data-Bank
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT (engl.: <i>protein inhibitors of activated STATs</i>)
Poly-dIdC	Polydeoxyinosindeoxycytidylsäure
pSTAT1	STAT1-kodierendes pcDNA3.1-Plasmid
pSTAT1-GFP	STAT1-kodierendes pEGFP-N1-Plasmid
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
pTyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCC1	engl.: <i>regulator of chromosome condensation 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time-PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat

sec	Sekunde(n)
SH1	Src-Homologie-1
SH2	Src-Homologie-2
SH3	Src-Homologie-3
SHP-1	Protein-Tyrosin-Phosphatase-1 mit SH2-Domänen
SHP-2	Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 mit SH2-Domänen
SOCS	Suppressor des Zytokin-Signalwegs (engl.: <i>suppressor of the cytokine signalling</i>)
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
Stauro	Staurosporin
T	tera
T-Zelle	T-Lymphozyt
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween
TC-PTP	T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
T _H 1-Zelle	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2-Zelle	T-Helferzelle Typ 2
TKL	Tyrosinkinase-ähnliche Kinase
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt
v-fps	virales Onkogen des Fujinami-Sarkoma-Virus
v-src	virales Onkogen des Rous-Sarkoma-Virus
WT	Wildtyp

Buchstaben-Code für proteinogene Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

1. Einleitung

Im Rahmen der Zellkommunikation stellt die Signaltransduktion ein entscheidendes Mittel zur Aufrechterhaltung physiologischer Zellfunktionen dar. Dabei handelt es sich um einen Prozess, bei welchem extrazelluläre Botenstoffe auf äußere Reize hin sezerniert werden und über die Bindung an spezifische Rezeptorproteine Signalkaskaden auslösen, die eine gerichtete Zellantwort initiieren. Der JAK-STAT-Signalweg gehört zu den am besten untersuchten und hochkonservierten Signaltransduktionswegen. Durch Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen werden latent im Zytoplasma befindliche Proteine, die sogenannten Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs), phosphoryliert und vermitteln direkt die Signalweiterleitung von der Zellmembran in den Zellkern. Daneben sind STAT-Proteine auch direkt an der Genregulation beteiligt (Darnell et al. 1994; Levy und Darnell 2002). Störungen in diesem empfindlichen System, wie sie durch Punktmutationen innerhalb der STAT-Sequenz hervorgerufen werden können, manifestieren sich an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Signalkaskade und können beim Menschen mit Immundefekten verbunden sein (Chapgier et al. 2006; Dupuis et al. 2001, 2003; Liu L et al. 2011; Sampaio et al. 2012, Smeekens et al. 2011, Takezaki et al. 2012; Tsumura et al. 2012; van de Veerdonk et al. 2011).

1.1 Die Entdeckung der STAT-Proteine

Bei Untersuchungen der $IFN\alpha$ - und $IFN\gamma$ -abhängigen Genaktivierung wurde die Existenz von Proteinen registriert, die sowohl an der Signaltransduktion sowie an der Aktivierung der Transkription beteiligt sind (Fu et al. 1990; Schindler et al. 1992b; Shuai et al. 1992). Nach der Isolation und Sequenzanalyse von zwei bis dahin unbekanntem Proteinen mit Molekulargewichten von 91 kDa und 113 kDa wurden diese zu ersten Mitgliedern einer völlig neuen Proteinfamilie, der STAT-Familie (Fu et al. 1992; Schindler et al. 1992a, b; Shuai et al. 1992). STAT-Proteine wurden daraufhin in vielen Organismen identifiziert. Selbst in niedrigen Eukaryonten wie *Dictyostelium discoideum* (Kawata et al. 1997) wurde ihre Existenz nachgewiesen. Auch bei Nematoden wie *C. elegans* konnte das Vorhandensein von STAT-Molekülen belegt werden, die eine strukturelle Übereinstimmung zu der Domänenstruktur der humanen STAT5b-Proteine aufwies (Liu X et al. 1999). Durch die Entdeckung von JAK- und STAT-Proteinen in *Drosophila melanogaster* wurde ebenfalls die Existenz eines STAT-abhängigen Signal-

weges bei wirbellosen Tieren nachgewiesen (Hou und Perrimon 1997; Yan et al. 1996). Durch die Untersuchung der STAT-Proteine und durch den Nachweis eines mit dem humanen JAK-STAT-Signalweg vergleichbaren Signalwegs bei tierischen Metazoen einschließlich Nematoden, Insekten und anderen Vertebraten konnte gezeigt werden, dass es sich bei den STAT-Proteinen um eine evolutionär hochkonservierte Proteinfamilie handelt (Kawata et al. 1997; Oates et al. 1999; Pascal et al. 2001).

Bisher wurden sieben Mitglieder der humanen STAT-Familie (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6) identifiziert. Diese weisen eine Länge von 750-850 Aminosäureresten auf und besitzen innerhalb der ersten 700 AS eine Sequenzhomologie von 28-40% (Levy und Darnell 2002; Schindler und Darnell 1995). Ihre genetische Information ist im menschlichen Genom auf drei verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Die für STAT1 und STAT4 kodierenden Gene befinden sich auf Chromosom 2, der Locus für STAT2 und STAT6 liegt auf Chromosom 12 und jene für STAT3, STAT5a und -5b auf Chromosom 17 (Copeland et al. 1995; Darnell 1997). Alle Mitglieder der humanen STAT-Familie besitzen den gleichen charakteristischen Aufbau, der aus sechs funktionellen Domänen besteht (**Abb. 1.1**): Der aminoterminalen- (ND), der Coiled-coil- (CCD), der DNA-Binde- (DBD), der Linker- (LD) und der Src-Homologie-2- (SH2-) Domäne gefolgt von der carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) (Chen et al. 1998; Lim und Cao 2006). Die größte Sequenzhomologie liegt hierbei zwischen den AS-Resten 600-700, im aminoterminalen Bereich der SH2-Domäne (Fu et al. 1992; Schindler und Darnell 1995).

STAT-Proteine werden durch Phosphorylierung eines einzelnen kritischen Tyrosinrestes aktiviert (Schindler et al. 1992b, Shuai et al. 1992), welcher im STAT1-Molekül in Position 701 lokalisiert ist (Shuai et al. 1993a). Für die maximale transkriptionelle Aktivität ist bei STAT1 und STAT3 zusätzlich die Phosphorylierung eines Serinrestes in Position 727 notwendig (Wen und Darnell 1997; Wen et al. 1995). Die Variation der STAT-Proteine wird durch alternatives Spleißen weiter erhöht, bei dem funktionell unterschiedliche STAT-Isoformen gebildet werden. Während des Spleißvorganges entstehen beispielsweise bei STAT1 aus derselben DNA-Sequenz zwei STAT1-Isoformen von unterschiedlicher Länge, die als STAT1 α und STAT1 β bezeichnet werden (Horvath 2000; Schindler et al. 1992a).

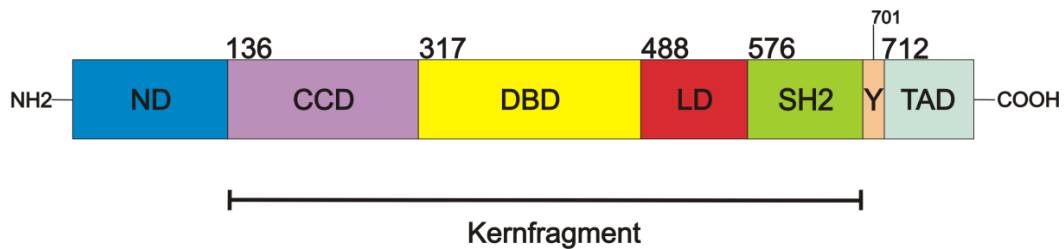


Abb. 1.1: Domänenstruktur von STAT1. Dargestellt ist die Anordnung der einzelnen Domänen der STAT-Proteine am Beispiel von STAT1 α : Aminoterminal Domäne (ND), Coiled-coil-Domäne (CCD), DNA-Bindedomäne (DBD), Linker-Domäne (LD), Src-Homologie-2-Domäne (SH2) sowie Transaktivierungsdomäne (TAD). Das Kernfragment der STAT-Proteine erstreckt sich von der Coiled-coil- bis zur SH2-Domäne. Die Phosphorylierung durch die JAK-Kinase erfolgt am Rest Y701.

Nach der Aktivierung durch externe Botenstoffe kommt es zur Dimerisierung der phosphorylierten STAT-Proteine, wobei sich hier Unterschiede unter den verschiedenen STAT-Mitgliedern zeigen. STAT1, -3, -4, -5a, -5b und -6 bilden überwiegend Homodimere aus, während STAT2 in Form von Homodimeren eine zu schwache DNA-Bindung aufzeigt und daher bevorzugt mit STAT1 Heterodimere bildet (Bluyssen et al. 1995; Darnell 1997; Greenlund et al. 1995; Schindler und Darnell 1995; Shuai et al. 1994). Mithilfe von Mausmodellen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass sich die einzelnen Mitglieder der STAT-Familie auch in ihrer biologischen Funktion unterscheiden. So ist STAT3 im Rahmen der embryonalen Entwicklung von Bedeutung und STAT3-defiziente Mäuse versterben noch in der Embryonalphase (Duncan et al. 1997; Takeda et al. 1997). Wird dagegen das STAT3-Gen in adulten Tieren ausgeschaltet, können weitere pathologische Störungen beobachtet werden, wie z.B. die Beeinträchtigung der entzündungsbedingten Induktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber (Alonzi et al. 2001) oder eine Störung der IL-6-getriggerten T-Zell-Proliferation (Takeda et al. 1998). In STAT1- bzw. STAT2-defizienten Mäusen ist dagegen das angeborene Interferon-abhängige Immunsystem gehemmt. Ein Defizit an STAT2-Proteinen, welche nur durch Typ-I-Interferone aktiviert werden können (Schindler und Darnell 1995; Schindler et al. 1992a), äußert sich in einer Immunschwäche gegenüber viralen Erregern (Levy und Darnell 2002; Park et al. 2000). STAT1 kann dagegen durch eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert werden. Im Mausmodell wird allerdings deutlich, dass sich ein STAT1-Defizit vor allem durch eine Beeinträchtigung der IFN α - und IFN γ -vermittelten Immunität

gegenüber viralen und bakteriellen Erregern äußert, wohingegen bisher keine relevanten Störungen in anderen Zytokinsignalwegen nachweisbar sind (Durbin et al. 1996; Horvath und Darnell 1996; Meraz et al. 1996). In einer pathogenfreien Umgebung ist die Entwicklung von STAT1-Knockout-Mäusen hingegen vollkommen normal, wodurch ein Einfluss von STAT1 auf die Entwicklung ausgeschlossen werden konnte (Darnell 1997; Durbin et al. 1996; Meraz et al. 1996). Jedoch weisen STAT1-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit zur Tumorbildung auf (Shankaran et al. 2001).

Die Aktivierung von STAT4 durch Tyrosinphosphorylierung kann sowohl durch IL-12 als auch durch $\text{IFN}\alpha$ induziert werden (Kaplan et al. 1996b; Nguyen et al. 2002). Bei einer gehemmten IL-12-Antwort ist die STAT4-Aktivierung gestört. Die STAT4-defizienten Mäuse zeigen neben einer gestörten $\text{IFN}\gamma$ -Synthese und einer gestörten Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen auch eine Differenzierungsstörung naiver T-Helferzellen zu Ungunsten der $\text{T}_\text{H}1$ -Zellentwicklung (Kaplan et al. 1996b; Thierfelder et al. 1996). Eine Beeinträchtigung der Lymphozytenfunktion wurde ebenfalls bei STAT6-defizienten Mäusen belegt. Im Mausmodell wurden unter anderem eine defekte Entwicklung reifer $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen sowie eine Störung des Immunglobulin-Klassenwechsels in Plasmazellen nachgewiesen (Kaplan et al. 1996a; Takeda et al. 1996).

Die murine Aminosäuresequenz von STAT5a und STAT5b ist zu 96% identisch (Mui et al. 1995), trotzdem weisen STAT5a- bzw. STAT5b-Knockout-Mäuse einen unterschiedlichen Phänotyp auf. Bei weiblichen STAT5a-defizienten Mäusen sind keine Beeinträchtigungen der Entwicklung zu beobachten, allerdings fehlen die Brustausbildung während der Trächtigkeit und die Fähigkeit zur Laktation. Trotz der großen Sequenzhomologie kann ein STAT5a-Defizit durch STAT5b nicht kompensiert werden (Liu X et al. 1997). Anhand STAT5b-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass STAT5b-Proteine für die geschlechtsspezifische Körpergröße sowie für die Expression von geschlechtsspezifischen Leberproteinen von Bedeutung sind (Udy et al. 1997).

1.2 Die Bedeutung von Zytokinen für STAT-Proteine

STAT-Proteine werden durch eine Kaskade von Tyrosinphosphorylierungen aktiviert, die durch initiale Stimulation von Zellen mit Zytokinen ausgelöst werden. Derzeit sind über 50 Zytokine bekannt, wie z.B. Interferone, Interleukine, GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) und Wachstumshormone, welche über Bindung ihres transmembranen Rezeptors zur Initiierung des JAK-STAT-Signalweges führen

(Darnell et al. 1994; Gao B 2005; Ihle und Kerr 1995; Schindler und Darnell 1995; Shuai 1999). Daneben existieren viele weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren, die nach ihrer Funktion oder anhand ihres Rezeptors in verschiedene Unterklassen eingeteilt werden können (Schooltink und Rose-John 2002). Zytokine sind 15-25 kDa große Polypeptide bzw. Proteine, die im Rahmen der Zellkommunikation als extrazelluläre Botenstoffe von Bedeutung sind (Farrar und Schreiber 1993; Kelker et al. 1983, 1984). Eine für die STAT-Aktivierung wichtige Zytokin-Familie sind die Interferone. Die Induktion von Interferonen wurde erstmals 1957 nach der Behandlung mit lebenden und Hitzeinaktivierten Influenza-Viren an Hühner-Embryos beobachtet (Isaacs und Lindenmann 1987). Seitdem wurden die Interferone sehr genau untersucht und anhand ihrer kristallographischen Darstellung eine Vier-Helix-Struktur identifiziert, welche ebenfalls bei über 50 weiteren Zytokinen nachgewiesen wurde (Ealick et al. 1991; Schindler und Plumlee 2008; Senda et al. 1992). Eingeteilt werden die Interferone in drei Hauptklassen. Die Gruppe der Typ-I-Interferone umfasst acht weitere Unterklassen ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\epsilon$, $IFN\kappa$, $IFN\omega$, $IFN\delta$, $IFN\tau$, $IFN\zeta$), von denen $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\epsilon$, $IFN\kappa$ und $IFN\omega$ auch in humanem Gewebe nachgewiesen wurden (Lefèvre und Boulay 1993; Lefèvre et al. 1998; Oritani und Tomiyama 2004; Pestka et al. 2004; Roberts et al. 1991). Neben der Gruppe von Typ-II-Interferonen, die nur aus $IFN\gamma$ besteht, wurde eine neue Gruppe-III identifiziert, welche die Subklassen $IFN\lambda 1$, $IFN\lambda 2$ und $IFN\lambda 3$ umfasst. Diese wurden früher als IL-29, IL-28A und IL-28B bezeichnet und deren Signalweiterleitung erfolgt ebenfalls über den JAK-STAT-Signalweg. $IFN\gamma$ sowie die Typ-III-Interferone konnten ebenfalls im menschlichen Gewebe nachgewiesen werden (Kotenko et al. 2003; Pestka et al. 1987; Sheppard et al. 2003).

Interferone besitzen eine große biologische Wirksamkeit, die vor allem in der Regulation des Immunsystems liegt. So wurden für Typ-I-Interferone unter anderem antivirale, antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften nachgewiesen. Des Weiteren induzieren sie die Zytotoxizität von T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Monozyten (Clemens 2003; Djeu et al. 1979; Evinger et al. 1981; Gidlund et al. 1978; Herberman et al. 1982; Ortaldo et al. 1983; Pestka 1983; Pestka et al. 2004). Das immunmodulatorisch wirkende $IFN\gamma$ wird wiederum von T-Zellen und NK-Zellen produziert und aktiviert andere immunkompetente Zellen. In Makrophagen induziert $IFN\gamma$ die Bildung reaktiver zytotoxischer Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid (Farrar und Schreiber 1993; Stark et al. 1998), die zur Abtötung phagozytierter pathogener Erreger benötigt werden. Des

Weiteren ist IFN γ für die T-Zell-Differenzierung und den Antikörperwechsel in B-Zellen von Bedeutung (Snapper und Paul 1987; Stark et al. 1998). Im Rahmen der protektiven Immunabwehr sind alle Interferone dazu befähigt, die Expression von MHC-I-Molekülen zu induzieren. Allerdings kann nur IFN γ die Expression von Proteinen der MHC-Klasse II induzieren (Boehm et al. 1997; Revel und Chebath 1986). Neben der IFN-vermittelten Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges aktivieren Interferone noch weitere Signaltransduktionswege wie die MAP-Kinase-Kaskade, die unter anderem bei der Zelldifferenzierung und für das Zellwachstum von Bedeutung ist (Pestka et al. 2004; Sakatsume et al. 1998; Seger und Krebs 1995; Stancato et al. 1997).

Die IFN α - und IFN γ -Signalweiterleitung erfolgt durch Bindung des jeweiligen Interferons an seinen Rezeptor (**Abb. 1.2** und **Abb. 1.3**). Dabei binden IFN α und IFN γ an unterschiedliche membranständige Rezeptoren. Der IFN α -Rezeptor besteht aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, die nach Ligandenbindung dimerisieren. Der IFN α -Rezeptor besitzt selbst keine intrinsische Kinase-Aktivität. Zur Auto- bzw. Transphosphorylierung des Rezeptors sowie zur Aktivierung der STAT-Proteine sind die Janus-Kinasen TYK2 und JAK1 notwendig, die auf zytoplasmatischer Seite nicht-kovalent an den Rezeptor gebunden sind (Müller et al. 1993; Novick et al. 1994; Schindler und Darnell 1995; Velazquez et al. 1992). Diese JAK-Kinasen gehören zu einer Proteinfamilie mit vier Mitgliedern (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2), die jeweils über eine Kinase-Domäne und eine Pseudo-Kinase-Domäne, aber nicht über SH2- oder SH3-Domänen verfügen (Darnell et al. 1994; Rane und Reddy 2000; Wilks et al. 1991). Nach der Bindung der STAT-Proteine an den Rezeptor erfolgt die IFN α -vermittelte Signalweiterleitung über Phosphorylierung eines kritischen Tyrosinrestes in der carboxyterminalen SH2-Domäne (Schindler et al. 1992b; Shuai et al. 1992, 1993a). Phosphorylierte STAT1- und STAT2-Proteine bilden Heterodimere aus, die in einem Komplex mit p48 in den Nukleus gelangen. Dieser trimere Komplex wird als IFN α -stimulierter Genfaktor 3 (ISGF3) bezeichnet und bindet im Kern palindromische ISRE-Sequenzen (*interferon stimulated response element*), wodurch die Transkription IFN α -spezifischer Zielgene eingeleitet wird (Fu et al. 1990, 1992; Levy et al. 1988, 1989; Stark et al. 1998).

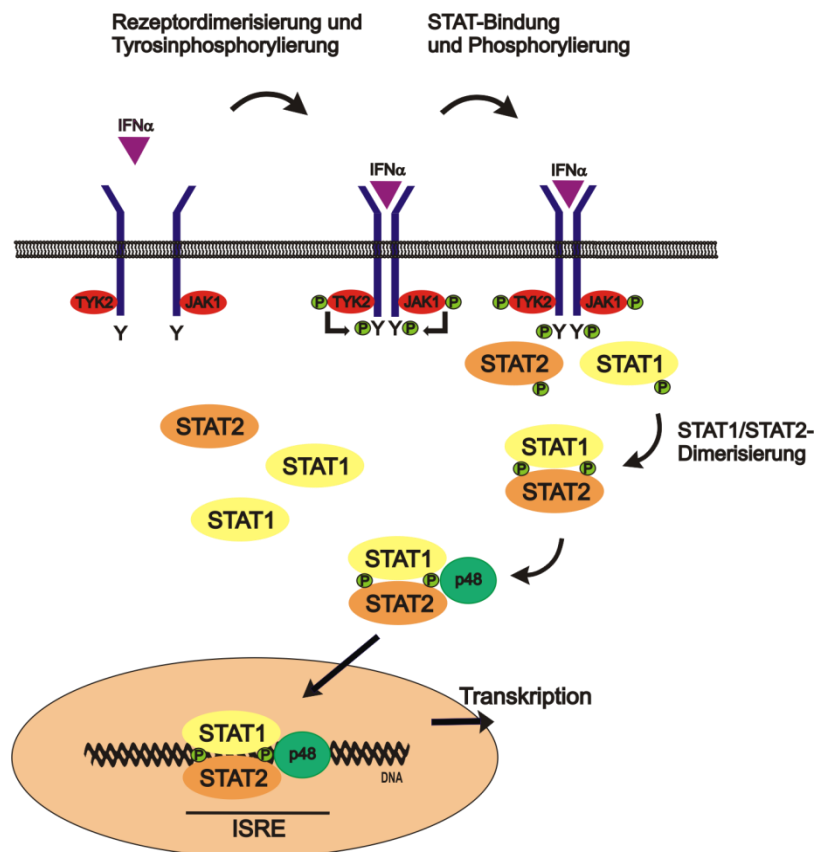


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der IFN α -induzierten STAT-Aktivierung. Die Bindung von IFN α an den Rezeptor initiiert die Rezeptordimerisierung, wodurch Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen (TYK2, JAK1) aktiviert werden und die Phosphorylierung der intrazellulären Rezeptorkette einleiten. Diese bilden Andockstellen für STAT1- und STAT2-Proteine. Die STAT-Monomere werden am kritischen Tyrosinrest phosphoryliert und bilden nach der Rezeptorlösung STAT1/STAT2-Heterodimere aus. Im Komplex mit p48 gelangen sie in den Zellkern und induzieren durch Bindung an IFN α -spezifische Zielsequenzen (ISRE) die Genaktivierung.

Die Signalweiterleitung nach IFN γ -Stimulation erfolgt hingegen über die Ausbildung von STAT1/STAT1-Homodimeren. Dafür bindet funktionell aktives IFN γ an seinen Rezeptor, der aus je zwei IFNGR1- und IFNGR2-Ketten besteht und die nach der Ligandenbindung oligomerisieren (Aguet et al. 1988; Bach et al. 1997; Hemmi et al. 1994). Die Rezeptor-assoziierten Januskinasen JAK 1 und JAK2 initiieren die Auto- bzw. Transphosphorylierung (Darnell et al. 1994; Müller et al. 1993; Stark et al. 1998, Watling et al. 1993). Die aktivierten JAK-Kinasen führen wiederum zur Phosphorylierung eines kritischen Tyrosinrestes in Position 440 des IFNGR1, an den STAT1-Proteine über ihre SH2-Domänen binden und aktiviert werden (Greenlund et al. 1993, 1994, 1995). Nach

Lösung vom Rezeptor bilden die phosphorylierten STAT1-Proteine Homodimere aus und akkumulieren innerhalb kurzer Zeit im Zellkern (Shuai et al. 1994; Stark und Darnell 2012). Die STAT1-Homodimere binden an Gamma-aktivierende Sequenzen (GAS), wodurch die Transkription IFN γ -induzierter Zielgene eingeleitet wird (Darnell et al. 1994; Decker et al. 1991).

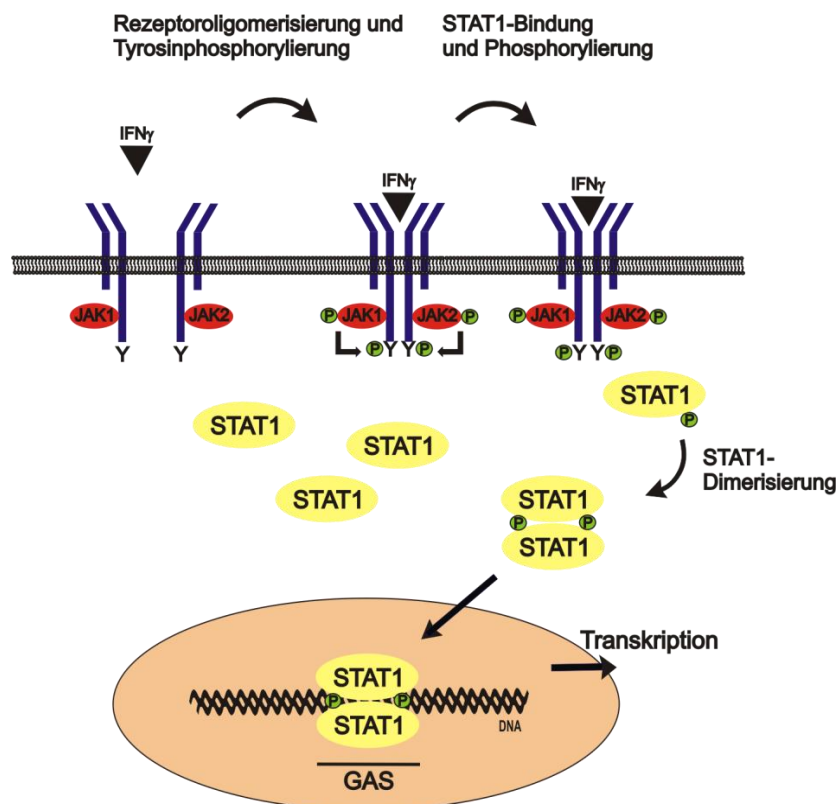


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des IFN γ -vermittelten JAK-STAT-Signalweges. Durch IFN γ -Bindung wird die Rezeptoroligomerisierung initiiert, wodurch die Trans- und Autophosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen ausgelöst wird. Durch Phosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors werden Andockstellen für STAT1-Moleküle generiert. Nach Phosphorylierung von STAT1-Monomeren bilden diese nach Rezeptorlösung Homodimere aus und gelangen in den Zellkern. Die Bindung an spezifische Zielsequenzen, sogenannte Gamma-aktivierte Sequenzen (GAS), induziert die Transkription.

Die Zytokin-induzierte Signalweiterleitung wird durch verschiedene Proteine reguliert, die an unterschiedlichen Stellen in den JAK-STAT-Signalweg eingreifen können. Im Zytoplasma kontrollieren SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signalling*) die Signalweiterleitung. Diese Proteine unterdrücken eine STAT-Aktivierung direkt am Rezep-

tor, entweder durch Bindung an die katalytische Region der JAK-Kinase oder durch direkte Bindung an den Rezeptor. Eine dritte Kontrollfunktion der SOCS-Proteine ist die Degradierung von Signalproteinen (Krebs und Hilton 2001). Die Transkription dieser Negativ-Regulatoren, bestehend aus den Mitgliedern SOCS1-SOCS7 sowie CIS (*cytokine inducible SH2-domain-containing protein*), wird dabei in Abhängigkeit des Zytokin-signals von STAT-Proteinen selbst induziert (Krebs und Hilton 2001; Starr et al. 1997; Yoshimura et al. 1995). Des Weiteren sind im Zytoplasma die Tyrosinphosphatasen SHP-1 und -2 sowie PTP1B (Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B) lokalisiert, die durch Bindung phosphorylierter Kinasen oder des aktivierten Rezeptors die Signalweiterleitung durch Dephosphorylierung verhindern (Levy und Darnell 2002; Rawlings et al. 2004). Für die Dephosphorylierung der STAT-Proteine sind nukleäre Phosphatasen verantwortlich. Die Dephosphorylierung von STAT1- sowie STAT3-Dimeren erfolgt hierbei über die nukleäre Phosphatase TC45 (ten Hoeve et al. 2002; Levy und Darnell 2002; Simoncic et al. 2002). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass SHP-2 in den Zellkern transloziert und dort ebenfalls STAT1-Proteine dephosphoryliert (Wu et al. 2002). Die Zytokin-induzierte Genaktivierung kann außerdem durch PIAS-Proteine (*protein inhibitors of activated STATs*) reguliert werden, die ebenfalls im Kern lokalisiert sind. Hierbei wurde PIAS1 als spezifischer STAT1-Inhibitor identifiziert, ebenso wie PIAS3 zur direkten Hemmung von STAT3 führt (Chung et al. 1997; Liu B et al. 1998).

1.3 Nukleozytoplasmatischer Transport von STAT-Proteinen

Der JAK-STAT-Signalweg gehört zu den am besten untersuchten Signalwegen und stellt ein Paradigma der direkten Signalweiterleitung von extrazellulären Signalen in den Nukleus zur Geninduktion dar. Hierbei müssen die phosphorylierten STAT-Dimere, die eine Größe von ~ 180 kDa haben, die Kernmembran überwinden (Levy und Darnell 2002). Makromoleküle, die eine Größe von 40-60 kDa überschreiten, sind nicht in der Lage, durch freie Diffusion über den Nukleären Porenkomplex (NPC) in den Zellkern zu gelangen und benötigen daher einen aktiven Transportmechanismus (Paine und Feldherr 1972; Weis 1998). Der Nukleäre Porenkomplex (NPC) ist eine makromolekulare Struktur, die aus Nukleoporinen zusammengesetzt ist und einen Tunnel durch die Kernmembran formt. Bei den Nukleoporinen handelt es sich um Proteine, von denen viele hydrophobe Phenylalanin-/Glycinreiche Wiederholungssequenzen aufweisen, die zur Interaktion mit Transportproteinen befähigt sind (Fahrenkrog et al. 2004; Nigg 1997;

Radu et al. 1995a, b). Zu diesen Transportfaktoren gehören Importine bzw. Exportine, die zur Familie der Karyopherine zugeordnet werden (Macara 2001; Rout et al. 2003). Importine erkennen über die spezielle Abfolge basischer Aminosäurereste, der sogenannten NLS-Sequenz (Nukleäres Lokalisationssignal), ihre Interaktionspartner (Cargo-Moleküle) (Fahrenkrog et al. 2004; Macara 2001; Weis 1998).

In STAT-Proteinen konnte bisher nur ein dimer-spezifisches NLS (dsNLS) identifiziert werden, das nicht dem klassischen NLS entspricht, da es nur aus einigen positiven Aminosäureresten besteht, welche in der DNA-Bindedomäne lokalisiert sind. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Importine weder mit unphosphorylierten STAT-Dimeren noch mit STAT-Monomeren interagieren können, da das NLS nur in paralleler Konformation phosphorylierter Dimere zugänglich ist (Fagerlund et al. 2002; Melen et al. 2001; Meyer et al. 2002). Der Import der STAT-Dimere als Cargo-Moleküle erfolgt über einen Komplex mit zwei Molekülen Importin- α 5, die wiederum mit Importin- β einen Importin- α/β -Komplex bilden. Hierbei tritt Importin- β in Wechselwirkung mit den Nukleoporinen und leitet den Durchtritt durch die Kernpore ein (Fagerlund et al. 2002; Görlich et al. 1995; McBride et al. 2002; Moroianu et al. 1995).

Dieser aktive Transportmechanismus wird durch die GTPase Ran reguliert (Görlich et al. 1996). Bedingt durch diese GTPase werden im Zytoplasma hohe Konzentrationen von Ran-GDP erreicht, wodurch Importin mit seinem Substrat beladen wird und in den Zellkern transloziert. Der im Kern lokalisierte Guaninnukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*) RCC1 katalysiert die Umwandlung des importierten Ran-GDP in Ran-GTP. In Anwesenheit der hohen Ran-GTP-Konzentration zerfällt der Importin-Cargo-Komplex und die ungeladenen Importine gelangen wieder in das Zytoplasma (Mattaj und Englmeier 1998; Meyer und Vinkemeier 2004; Ribbeck und Görlich 2001; Weis 1998). Gleichzeitig werden Exportine wie das CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) aufgrund der hohen Ran-GTP-Konzentration mit ihrem Cargo-Molekül beladen und durch die Kernporen in das Zytoplasma geschleust. Die Interaktion zwischen CRM1 und STAT-Proteinen erfolgt dabei über ein nukleäres Exportsignal (NES), das in der Coiled-coil-Domäne von STAT1 identifiziert wurde (Begitt et al. 2000; Mattaj und Englmeier 1998; Meyer und Vinkemeier 2004).

STAT1-Proteine können nur im unphosphorylierten Zustand mit Exportinen interagieren (Meyer et al. 2003, 2004). Nukleäre Tyrosin-Phosphatasen wie die TC45 und SHP-2 führen zur Dephosphorylierung von STAT1-Dimeren und terminieren damit die Kern-

akkumulation, wobei die SHP-2-Phosphatase neben der Tyrosin- auch die Serin-Dephosphorylierung einleitet (ten Hoeve et al. 2002; Shuai und Liu 2003; Wu et al. 2002). Daneben schützt die DNA-Bindung die STAT1-Dimere vor der Dephosphorylierung, da die STAT-Proteine im DNA-gebundenem Zustand nicht mit der TC45-Phosphatase interagieren können (Meyer et al. 2003). Durch Inhibition von CRM1 mit Leptomycin B oder durch die Hemmung sämtlicher energieabhängiger Transportmechanismen in der Zelle konnte allerdings kein vollständiger Export-Stopp von STAT1-Molekülen erreicht werden. Dies lässt auf einen weiteren energieunabhängigen Transportweg schließen, über welchen dephosphorylierte STAT-Proteine die Kernmembran überwinden (Begitt et al. 2000; Marg et al. 2004). Hierbei wurde bereits für unphosphorylierte STAT1-, STAT3- und STAT5-Moleküle ein Carrier- und energieunabhängiger Transportweg beschrieben, der die Translokation zwischen Zellkern und Zytoplasma ermöglicht. Anhand von Mutationsexperimenten konnte bewiesen werden, dass hierbei die Linker-Domäne von Bedeutung ist und dass STAT1-Proteine hierbei in direkte Interaktion mit Nukleoporinen treten (Marg et al. 2004; Meyer et al. 2002).

1.4 Struktur und Domänen der STAT-Proteine

Mittels Sequenzvergleich und durch Mutagenesestudien konnten erste Informationen über die Funktionen von STAT-Proteinen ermittelt werden. Genaue Aussagen über die Zuordnung spezifischer Funktionen zu den einzelnen Domänen sowie über die Domänenstruktur waren allerdings erst nach dreidimensionaler Darstellung der Kristallstruktur von STAT-Molekülen möglich. Erste kristallographische Auflösungen zeigten DNA-gebundene STAT1- und STAT3-Homodimere in phosphorylierter Form (Becker et al. 1998; Chen et al. 1998). Dieses kristallographische Modell umfasste allerdings nur das Kernfragment der STAT-Proteine. Nach der Darstellung der Struktur des N-Terminus von STAT4 konnten aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu STAT1 die erhobenen strukturellen Daten auf den Aminoterminus von STAT1 übertragen werden (Chen et al. 2003; Vinkemeier et al. 1998). Später konnte die tyrosinphosphorylierte Kristallstruktur eines D-STAT α -Homodimers aus *Dictyostelium discoideum* ohne DNA-Bindung in Kristallstruktur dargestellt werden. Anhand dieser kristallographischen Darstellungen wurde erkenntlich, dass die ungebundenen D-STAT-Dimere im Vergleich zu den DNA-gebundenen STAT1- und STAT3-Dimeren unterschiedliche Konformationen aufweisen (Soler-Lopez et al. 2004). Schließlich wurden die kristallographischen Auswertungen

durch die dreidimensionale Darstellung von unphosphorylierten STAT1-Monomeren weiter vervollständigt. Anhand der detailreichen Informationen war es möglich, das Vorkommen von zwei verschiedenen Konformationen der STAT-Dimere zu bestätigen (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008).

Bei STAT1-Dimeren konnte eine parallele und eine antiparallele Form identifiziert werden, die anhand der Ausrichtung der SH2-Domänen unterschieden wird. Bei der parallelen Konformation weisen die SH2-Domänen in die gleiche Richtung, bei der antiparallelen Form in entgegengesetzte Richtungen (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006). Die Umlagerung von der einen in die andere Konformation wird durch eine flexible Region zwischen dem N-Terminus und der Coiled-coil-Domäne ermöglicht, wobei hier vor allem die Länge und nicht die AS-Sequenz entscheidend ist (Mertens et al. 2006). Die Stabilisierung der parallelen Form erfolgt durch gegenseitige Wechselwirkung der SH2-Domänen. Die antiparallele Konformation wird über reziproke aminoterminaler Wechselwirkung sowie durch Interaktionen der Coiled-coil- mit der DNA-Bindedomäne stabilisiert. Funktionell ist die parallele Form für die Rezeptor- und DNA-Bindung obligat, während die antiparallele Ausrichtung zur Dephosphorylierung durch die TC45-Phosphatase essentiell ist (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008; Zhong et al. 2005).

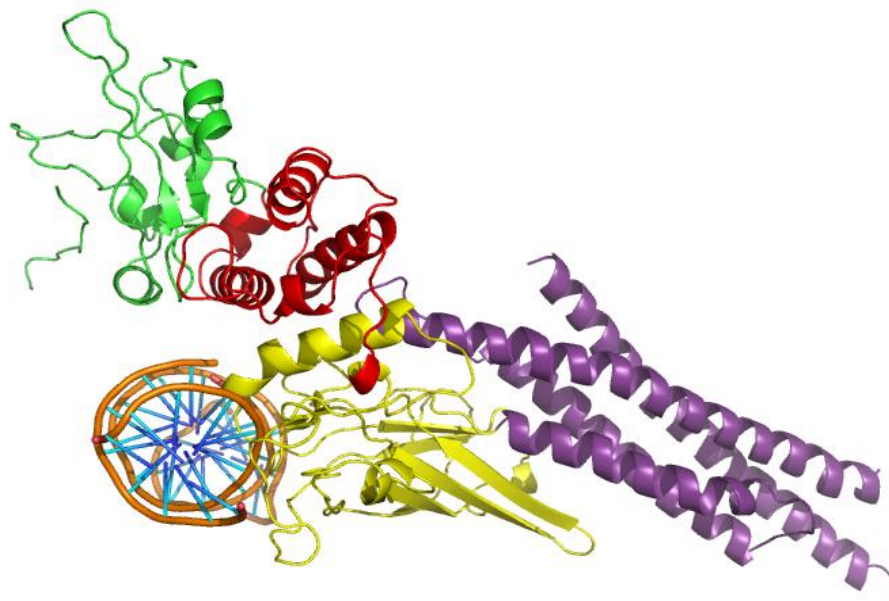


Abb. 1.4: Kristallstruktur eines DNA-gebundenen STAT1-Monomers. Dargestellt sind die vier Domänen des Kernfragments von STAT1 α (vgl. Abb. 1.1). Die Coiled-coil-Domäne ist in violett, die DNA-Bindedomäne in gelb, die Linker-Domäne in rot und die SH2-Domäne in grün

hervorgehoben. Die Darstellung wurde mithilfe des Software-Programmes PyMol unter Verwendung des Protein-Data-Bank-(PDB)-Koordinatendatensatzes 1BF5 erstellt.

Der Aminoterminus von STAT1 umfasst 135 Aminosäurereste und ist nach der SH2-Domäne die am höchsten konservierte Domäne im STAT-Protein, wobei dies vor allem für die ersten ungefähr 100 Aminosäurereste gilt. Anhand der Kristallstruktur von STAT4 konnte gezeigt werden, dass die AS-Reste zu 8 kurzen α -Helices angeordnet sind und einen hakenförmigen Ring ausbilden (Schindler und Darnell 1995; Strehlow und Schindler 1998; Vinkemeier et al. 1998). Obwohl die aminoternale Domäne innerhalb der STAT-Familie eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweist, ist ein Austausch des Aminoterminus unter den einzelnen STAT-Mitgliedern nicht beliebig möglich, was funktionelle Unterschiede dieser Domäne zwischen den STAT-Mitgliedern vermuten lässt (Murphy et al. 2000; Strehlow und Schindler 1998). Durch Mutationsexperimente konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus an vielen wichtigen Funktionen der STAT-Proteine beteiligt ist. Neben der Beeinflussung der Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung bei STAT4 (Murphy et al. 2000) konnte bei STAT1 ein Einfluss auf die nukleäre Translokation sowie auf die Dephosphorylierung nachgewiesen werden (Shuai et al. 1996; Strehlow und Schindler 1998). Nach der Lösung von der DNA und nach der Dephosphorylierung werden STAT1-Dimere über ND:ND-Wechselwirkungen zusammengehalten. Mutations- und ND-Austauschexperimente unterstützen die Bedeutung des Aminoterminus für den Prozess der Tyrosindepshosphorylierung (Mertens et al. 2006; Meyer et al. 2004).

Des Weiteren zeigen Deletionsexperimente von STAT4 und STAT1, bei denen 88 bzw. 44 aminoternale Reste entfernt werden, dass der Aminoterminus die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung von STAT-Dimeren beeinflusst (Xu X et al. 1996). Dies konnte weiterhin durch die Mutation eines hochkonservierten Tryptophanrestes, der an der Oberfläche isolierter ND-Dimere identifiziert wurde, bestätigt werden. Mutiert man diesen Aminosäurerest in Position 37 von STAT1 zu Alanin, ist die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung aufgehoben (Vinkemeier et al. 1998). Im Rahmen weiterer Mutationsexperimente wurde außerdem in Position 77 des STAT1-Proteins ein konservierter Phenylalaninrest in der aminoternalen Domäne identifiziert, nach dessen sequenzspezifischer Mutagenese zu Alanin STAT1 nicht mehr zur Oligomerisierung befähigt ist (Meyer et al. 2004).

Bei Untersuchungen der mit STAT-interagierenden Proteinen konnten weitere Funktionen des Aminoterminus festgestellt werden. Dazu zählen der Einfluss auf die Rezeptorerkennung und die Interaktion mit Koaktivatoren wie dem CREB-bindenden Protein (CBP/p300), das nachweislich neben der carboxyterminalen Domäne auch mit dem Aminoterminus interagiert (Horvath 2000; Zhang JJ et al. 1996). Daneben wurde der N-Terminus als Interaktionsfläche zur Bindung von PIAS-Proteinen identifiziert, die als transkriptionelle Koaktivatoren und Inhibitoren im STAT-Signalweg agieren (Chung et al. 1997; Liu B et al. 1998; Shuai 2000).

Die Coiled-coil-Domäne, bestehend aus vier antiparallelen α -Helices, umfasst im STAT1-Molekül die Aminosäurereste 136-316 (Chen et al. 1998; Levy und Darnell 2002). Sie ist über eine flexible Region von ca. 20 Aminosäureresten mit dem Aminoterminus verbunden (Mertens et al. 2006). Zu ihren Funktionen gehört die Interaktion mit Proteinen und Transkriptionsfaktoren (Shuai 2000; Zhang X et al. 1999). Des Weiteren wird die antiparallele Konformation von STAT1-Dimeren neben der ND:ND-Wechselwirkung über Interaktionen des Phenylalaninrestes in Position 172 der CCD eines Monomers mit Q340, L383, G384, T385, H406, Q408 stabilisiert, die in der DNA-Bindedomäne des kontralateralen Monomers eine Tasche formen. Des Weiteren wurde in der Coiled-coil-Domäne von STAT1 eine leucinreiche helikale Region als nukleäres Exportsignal identifiziert (Begitt et al. 2000).

Die DNA-Bindedomäne gehört neben der Coiled-coil-, der Linker- und der SH2-Domäne zum Kernfragment der STAT-Proteine. Im STAT1-Protein besteht die DBD aus 170 Aminosäuren (317-487) und ist in mehrere β -Faltblätter und Schleifen angeordnet. Die DBD von STAT1 besitzt wie die Transkriptionsfaktoren p50-NF κ B oder p53 eine Immunoglobulin-ähnliche Struktur (Chen et al. 1998; Levy und Darnell 2002). Über die Bindung palindromischer GAS-Sequenzen interagiert die DBD mit der DNA-Doppelhelix, wobei jedes phosphorylierte STAT-Monomer mit einer halben palindromischen Sequenz wechselwirkt (Chen et al. 1998; Decker et al. 1997). Die Protein-DNA-Interaktion stellt die Hauptfunktion der DNA-Bindedomäne dar. Für die Genauigkeit der DNA-Bindung ist ein konservierter Bereich innerhalb der DBD verantwortlich, der sich zwischen den Aminosäureresten 400-500 befindet. Mutationen in diesem Bereich führen zu einer reduzierten DNA-Affinität (Darnell 1997; Horvath et al. 1995; Meyer et al. 2003). Anhand der Kristallstruktur von DNA-gebundenem STAT1 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass STAT1-Proteine sowohl mit der kleinen als auch mit der großen Furche der DNA

wechselwirken. Dabei interagieren die AS-Reste N460 und K336 mit der großen und E421 mit der kleinen Furche (Chen et al. 1998). Weiterhin wird über das NLS (nukleäres Lokalisationssignal) der DBD die Bindung an Importin- α 5 vermittelt und der Kernimport gewährleistet (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al. 2002).

Carboxyterminal zur DBD befindet sich die Linker-Domäne, welche 87 AS-Reste (488-575) umfasst. Die LD besteht aus mehreren α -Helices und interagiert mit der Phosphatbindenden Schleife der SH2-Domäne (Chen et al. 1998; Levy und Darnell 2002). Mithilfe von Substitutionsexperimenten konnte ein Einfluss der LD auf die DNA-Bindung sowie die transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden (Yang et al. 1999). Hierbei zeigen STAT1-Linker-Mutanten eine verminderte transkriptionelle Aktivität aufgrund einer veränderten Dissoziationsrate von DNA. Weitere Mutationsversuche innerhalb der Linker-Domäne konnten aber keine generelle Beeinträchtigung der DNA-Bindung bestätigen (Yang et al. 1999, 2002). Daneben ist die Linker-Domäne am Zytokin-unstimulierten nukleozytoplasmatischen Transport involviert (Marg et al. 2004).

Die SH2-Domäne von STAT1 umfasst die AS-Reste 576-683 und ist die am stärksten konservierte Domäne der STAT-Proteine (Chen et al. 1998; Levy und Darnell 2002; Schindler und Darnell 1995). Die SH2-Domäne wurde ursprünglich in der zytoplasmatischen Tyrosinkinase des Fujinami-Sarkoma-Virus (v-fps) als konservierte, nichtkatalytische Domäne von ca. 100 Aminosäureresten entdeckt. Auch in der Sequenz der Tyrosinkinase Src wurde sie aminoterminal der Kinase-Domäne (SH1-Domäne) identifiziert und daher als Src-Homologie-2-Domäne (SH2) bezeichnet (Koch et al. 1991; Pawson 1988; Sadowski et al. 1986). Durch die spezifische Erkennung und Bindung von Phosphotyrosinmotiven sind SH2-Domänen für die Signalweiterleitung entscheidend (Mayer und Hanafusa 1990; Mayer et al. 1991). Die SH2-Domänen erkennen auch Sequenzen carboxyterminal des phosphorylierten Tyrosinrestes. Dadurch wird ein unterschiedliches Bindeverhalten erreicht, worin die Spezifität der verschiedenen SH2-Domänen begründet wird (Koch et al. 1991; Pawson et al. 2001, Songyang et al. 1993).

Die Regulierung von katalytischen Domänen in Tyrosinkinasen stellt eine weitere Funktion der SH2-Domäne dar. In der Tyrosinkinase v-fps agiert die SH2-Domäne nach Bindung von Phosphotyrosinpeptiden als positiver Effektor, der die enzymatische Aktivität der Kinasedomäne erhöht (Koch et al. 1989). Neben Enzymen besitzen auch viele re-

gulatorisch wirkende Proteine wie das c-Cbl (*casitas b-lineage lymphoma proto-oncogene*) eine SH2-Domäne. Mit ihrer Hilfe ist es dem Adapterprotein möglich, tyrosinphosphorylierte Substrate zu erkennen und die Ubiquitylierung einzuleiten (Joazeiro et al. 1999; Pawson et al. 2001). Das humane Genom kodiert für insgesamt fast 200 verschiedene SH2-Domänen, die in Proteinen verschiedener Signalwege exprimiert werden. Die grundlegende Aufgabe der Phosphotyrosin-gekoppelten Signalweiterleitung ist aber bei allen SH2-Domänen-enthaltenden Proteinen identisch (Gao Q et al. 2004).

Trotz der funktionellen Ähnlichkeit konnte durch den Vergleich bisheriger kristallographischer Analysen nachgewiesen werden, dass sich die SH2-Domäne der STAT-Proteine von anderen Proteinen strukturell deutlich unterscheidet (Gao Q et al. 2004). Die Grundstruktur der SH2-Domäne ($\alpha\beta\beta\alpha$) besteht aus einem zentralen antiparallelen β -Faltblattmotiv ($\beta\text{B}-\beta\text{D}$), das von zwei α -Helices (αA und αB) umgeben ist (Chen et al. 1998, Gao Q et al. 2004, Waksman et al. 1992). Im Vergleich zu der Kristallstruktur der Src-SH2-Domäne (*v-src*) weist die STAT-SH2-Domäne nicht nur einen Unterschied im β -Motiv auf, sondern setzt sich direkt in fünf α -Helices fort, die der Linker-Domäne entsprechen (Gao Q et al. 2004).

Im Rahmen der Signalweiterleitung nimmt die SH2-Domäne der STAT-Proteine zwei Hauptaufgaben wahr. Sie vermittelt die Bindung an den phosphorylierten membranständigen Rezeptoren (Greenlund et al. 1994) und ist für die Homo- bzw. Heterodimerisierung von phosphorylierten STAT-Monomeren verantwortlich. Diese wird über reziproke Wechselwirkungen zwischen der SH2-Domäne und dem phosphorylierten Tyr701 des jeweils anderen STAT1-Monomers erreicht. Hierbei wurde ein konservierter Argininrest in Position 602 der SH2-Domäne von STAT1 identifiziert, der wesentlich an der Dimerisierung von phosphorylierten STAT1-Molekülen beteiligt ist (Chen et al. 1998; Shuai et al. 1993b, 1994).

Die SH2-Domäne ist im STAT1-Molekül über 17 Aminosäurereste mit der carboxy-terminalen Transaktivierungsdomäne flexibel verbunden. Diese ist in ihrer Länge sehr variabel; es wurden 38-200 Aminosäurereste bei den einzelnen STAT-Proteinen beschrieben (Levy und Darnell 2002). In dieser Domäne ist auch der kritische Tyrosinrest in Position 701 im STAT1-Molekül lokalisiert, der durch die JAK-Kinase phosphoryliert wird und für den weiteren Signalverlauf essentiell ist (Darnell et al. 1994, Shuai et al. 1993a). Ebenso wurde in der TAD von STAT1 und STAT3 ein Serinrest in Position 727

identifiziert, welcher für die maximale transkriptionelle Aktivität von Bedeutung ist und nicht wie zuerst angenommen zu einer veränderten DNA-Bindeaffinität führt (Wen und Darnell 1997; Wen et al. 1995). Neben der aminoterminalen Domäne ist die TAD an der Protein-Protein-Interaktion beteiligt und bindet beispielsweise die wichtigen transkriptionellen Koaktivatoren CREB-bindendes Protein (CBP) und p300, deren Acetyltransferaseaktivität zur Transkription benötigt wird (Darnell 1997; Korzus et al. 1998). Obwohl die TAD als wenig konserviert beschrieben wird, konnte die Interaktion mit dem CREB-bindenden Protein bei STAT1, STAT2 und murinem STAT3 gezeigt werden und ist somit nicht auf STAT1 beschränkt (Paulson et al. 1999; Zhang JJ et al. 1996). Weitere Interaktionen der TAD sind mit NCoA1, BRCA1 und MCM5 nachgewiesen (Litterst und Pfitzner 2001; Ouchi et al. 2000; Zhang JJ et al. 1998). Daneben vermittelt die Transaktivierungsdomäne der STAT-Proteine den Stress-induzierten Zelltod (Janjua et al. 2002; Stephanou und Latchman 2003).

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit wurden Mutanten in der Linker-Domäne bzw. zur Kontrolle in der DBD von STAT1 generiert und deren Phänotyp studiert. Ziel dieser Arbeit war es, durch eine Charakterisierung dieser Punktmutanten den Einfluss der Linker-Domäne auf die SH2-Phosphotyrosin-Interaktion innerhalb von STAT1-Dimeren mechanistisch besser zu verstehen. Ausgehend von dem Ausmaß der IFN γ -induzierten Phosphorylierung der STAT1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Molekül wurde nach spezifischen Unterschieden in der *In-vitro*- und *In-vivo*-Genaktivierung gesucht. Mithilfe standardisierter Untersuchungsverfahren konnten die veränderten Eigenschaften der mutierten STAT1-Proteine mit verschiedenen Methoden verifiziert und anhand der erhobenen Ergebnisse Aussagen über den Phänotyp der einzelnen Mutanten sowie ihren Einfluss auf den JAK-STAT-Signalweg getroffen werden. Dabei lag im Fokus dieser Studie, in den mutierten STAT1-Molekülen nach strukturellen oder molekularen Abweichungen zu fahnden, die sich auf die jeweilige Punktmutation zurückführen lassen und damit Rückschlüsse auf die Bedeutung der Linker-Domäne hinsichtlich der SH2-Phosphotyrosin-Interaktion zu erlauben.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Zelllinien

HeLa-S3	Humane Epithelzelllinie des Zervixkarzinoms	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Uwe Vinkemeier, University of Nottingham, UK
U3A	STAT1-defiziente Zelllinie entstanden aus 2fTGH (Fibrosarkom-Zelllinie)	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. U. Vinkemeier

2.1.2 Chemikalienliste

Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EDTA)	Acros Organics, Geel, Belgien
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Ficoll-Paque Plus	Amersham Bioscience, Freiburg
Formaldehyd 37% in H ₂ O	Sigma-Aldrich
Glucose	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth

Glycylglycin	Sigma-Aldrich
N-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazino-Ethansulfonsäure (Hepes)	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
IGEPAL-CA-360	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Carl Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-6-Hydrat	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Natriumcarbonat	Carl Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natrium-ortho-Vanadat	Sigma-Aldrich
Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich
Pefabloc SC	Carl Roth
2-Propanol	Carl Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth
Rotiphorese	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
Staurosporin	Sigma-Aldrich
N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Trypton	Carl Roth
Tween-20	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth

2.1.3 Radiochemikalien

Die α -[³²P]-markierten Desoxynukleotide der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) besaßen eine spezifische Aktivität von 111 TBq/mmol und wurden vor Ablauf ihrer Halbwertszeit eingesetzt.

2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Das für die Herstellung von Puffern, Lösungen und Medien verwendete entionisierte Wasser wurde aus der Millipore-Anlage PURELAB Plus (ELGA, Celle) mit einem Moleküllfilter der Porengröße 0,22 μ m entnommen. Gegebenenfalls wurden die Lösungen auch steril filtriert sowie der pH-Wert mit einem pH-Meter (Sartorius, Göttingen) eingestellt.

2.1.5 Antikörper und Reaktionskits

Antikörper

STAT1 α -p91 (C-24)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Phospho-STAT1 (Tyr 701)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
STAT3 (H-190)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (IRDye 800CW)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Die polyklonalen Antikörper STAT1 α -p91 (C-24) und Phospho-STAT1 (Tyr 701) wurden bei Western-Blot-Experimenten als Primärantikörper eingesetzt. Für die Verwendung wurden sie 1:1000 in 4% BSA in TBS-T (137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) verdünnt. Als Sekundärantikörper kam jeweils der polyklonale IRDye 800CW Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege in einer Verdünnung von 1:10.000 ebenfalls in 4% BSA in TBS-T zum Einsatz.

Die STAT1 α -p91- (C-24) und STAT3-Antikörper (H-190) wurden außerdem bei EMSA-Experimenten in 1:100 PBS (Gibco, Karlsruhe) verdünnt und im Rahmen der Super-shift-Reaktion verwendet.

Reaktionskits

Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green Mix	Thermo Scientific, Dreieich
Luciferase-Assay-System	Promega, Mannheim
peqGold-Plasmid-Miniprep-Kit I	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
peqGold-Total-RNA-Kit	PEQLAB Biotechnologie
QIAGEN-Plasmid Maxi-Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange-II-Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Verso-cDNA-Kit	Thermo Scientific

2.1.6 Enzyme und Zytokine

Enzyme

Complete-Mini-Protease-Inhibitoren	Roche, Grenzach
DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Dpn</i> I-Endonuklease	Stratagene, La Jolla, USA
<i>PfuTurbo</i> -DNA Polymerase	Stratagene
T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase	Biomol International, Plymouth, USA
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

Zytokine

Für die Stimulation der Zellen wurde ausschließlich humanes Interferon- γ (IFN γ) der Firma Biomol (Hamburg) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde IFN γ in dem jeweiligen Zellkulturmedium 1:1000 verdünnt und direkt auf die Zellen pipettiert.

2.1.7 Plasmide

pEGFP-N1	optimierter Vektor mit verbesserter Fluoreszenz zur Expression von N-terminalen GFP-Fusionsplasmiden in Säugerzellen	Clontech, Mountain View, USA
pSTAT1 α -GFP	Humane STAT1 α -cDNA (AS 1-747) in pEGFP-N1	Begitt et al. 2000
pSTAT1 α (E436A)-GFP	durch sequenzspezifische Mutation entstandenes Derivat von pSTAT1 α -GFP1, verwendetes Primerpaar E436AF/E436AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (K550A)-GFP	durch sequenzspezifische Mutation entstandenes Derivat, von pSTAT1 α -GFP1, verwendetes Primerpaar K550AF/K550AR	diese Arbeit
pSTAT1 α (K550E)-GFP	durch sequenzspezifische Mutation entstandenes Derivat, von pSTAT1 α -GFP1, verwendetes Primerpaar K550EF/K550ER	diese Arbeit
pcDNA3.1	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3.1-STAT1 α	humane STAT1 α -cDNA kloniert in pcDNA3.1	Dr. James E. Darnell, New York, USA
pcDNA3.1-STAT1 α (K550A)	durch sequenzspezifische Mutation entstandenes Derivat von pcDNA3.1-STAT1 α , verwendetes Primerpaar K550AF/K550AR	diese Arbeit

pcDNA3.1-STAT1 α (K550E)	durch sequenzspezifische Mutation entstandenes Derivat, von pcDNA3.1-STAT1 α , verwendetes Primerpaar K550EF/K550ER	diese Arbeit
p β Gal	Expressionsvektor der β -Galaktosidase	Stratagene, La Jolla, USA
pGAS3xLy6E	Reportergenkonstrukt mit drei GAS-Bindestellen	Wen et al. 1995
pIC-339	Reportergenvektor mit dem trunkierten Promotor des humanen ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P. T. van der Saag, Utrecht, Niederlande
pIC-1352	Reportergenvektor mit dem Promotor des humanem ICAM-1-Gens	Prof. Dr. P. T. van der Saag

Die Bezeichnung pSTAT1 α -GFP wird im Weiteren durch die Bezeichnung pSTAT1-GFP ersetzt, da in dieser Arbeit nur Plasmide untersucht wurden, die für STAT1 α kodieren. Der Begriff pSTAT1 wird als Akronym bei der Verwendung von pcDNA3.1-STAT1 α -Plasmiden verwendet.

2.1.8 Oligonukleotide

Primer für die sequenzspezifische Mutagenese

E436A F	5'-gcttcactcccttagtttgcaaccaattgtgccagcc-3'
E436A R	5'-ggctggcacaattgggtgcaaaactaagggagtggaagc-3'
K550A F	5'-gtaaggaaaatataaatgatgcaaatttcccttctggc-3'
K550A R	5'-gccagaagggaaaatttgcacatttatatttccttac-3'
K550E F	5'-gtaaggaaaatataaatgatgaaaatttcccttctggc-3'
K550E R	5'-gccagaagggaaaatttgcacatttatatttccttac-3'
E605A F	5'-cttcctgctgcggttcagtgcgagctcccgggaaggggc-3'
E605A R	5'-gcccttcccgggagctgcactgaaccgcagcaggaag-3'

Primer für die Sequenzierung

312f	5'-ttcagagctcgtttggtg-3'
484f	5'-ccttctcctgactccacca-3'
611r	5'-ctccacccatgtgaatgta-3'

Oligonukleotid-Sonden für den elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assay

M67 F	5'-ttttcgacatttcccgtaaatctg-3'
M67 R	5'-ttttcagatttacgggaaatgctg-3'
GASnonGAS F	5'-ttttcgttccccgaaattgacggattacccaac-3'
GASnonGAS R	5'-ttttgttgggtaaatccgtcaattcggggaaacg-3'
2xGAS F	5'-ttttgttccccgaaattgacggattccccgaaac-3'
2xGAS R	5'-ttttgttccgggaaatccgtcaattcggggaaac-3'
2xnonGAS F	5'-ttttcgttaccccaaattgacggattacccaac-3'
2xnonGAS R	5'-ttttgttgggtaaatccgtcaattggggtaaacg-3'

Primer für die RT-PCR

hGAPDH F	5'-gaaggtgaaggtcggagtc-3'
hGAPDH R	5'-gaagatggtgatgggatttc-3'
hIRF1 F	5'-agctcagctgtgagtgta-3'
hIRF1 R	5'-tagctgctgtggtcatcagg-3'
hGBP1 F	5'-ggccagttgctgaaagagc-3'
hGBP1 R	5'-tgacaggaaggctctggtct-3'
hMIG1 F	5'-ccaccgagatccttatcgaa-3'
hMIG1 R	5'-ctaaccgacttggtcttc-3'
hSTAT1 F	5'-ccgtttcatgacctctgt-3'
hSTAT1 R	5'-tgaatattccccgactgagc-3'

Die oben aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Darmstadt) und Tib MolBiol (Berlin) sowie Hartmann Analytic (Braunschweig) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.9 Bakterienstämme und Medien

<i>E. coli</i> DH5 α	Stratagene, La Jolla, USA
	Genotyp: <i>F-ϕ80dlacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44 λthi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene
	Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB $\lambda$$\alpha$$\chi$I⁰Z$\Delta$M15 Tn10 (Tet^r)]</i>

Für die Anzucht der Bakterien wurden LB-Agarplatten, LB-Flüssigmedium oder SOC-Medium verwendet. Die LB-Agarplatten bestanden aus 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, und 1,5% Agar. Das LB-Flüssigmedium setzte sich aus 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl zusammen. Die LB-Agarplatten sowie das LB-Flüssigmedium wurden mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Nach 30-minütiger Autoklavierung bei 121°C und 1,5 bar wurden anschließend je nach verwendeter Plasmid-DNA die Antibiotika Kanamycin (50 μ g/mL) oder Ampicillin (100 μ g/mL) als Selektionsmarker hinzugefügt.

Das für die Transformation benötigte SOC-Medium bestand aus SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7,4), welches nach einer 20-minütigen Autoklavierung bei 121°C mit 20 mM steril gefilterter Glucose supplementiert wurde.

2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt. Herstellerangaben zu den Verbrauchsmaterialien finden sich ebenfalls in der Beschreibung der einzelnen Methoden wieder oder sind, falls nichts weiteres angegeben, auf die folgenden Firmen zurückzuführen: B. Braun AG (Melsungen), Biometra (Göttingen), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhäusen), Nunc (Roskilde, Dänemark), PEQLAP (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Thermo-Fisher (Dreieich), VWR (Darmstadt).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

Kultivierung von Säugerzellen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich U3A- und HeLa-S3-Zellen verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch unter mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken (Hera-safe K2, Thermo Scientific, Dreieich) durchgeführt. Die Zellkultivierung erfolgte in einer mit Wasserdampf gesättigten fünfprozentigen CO₂ Atmosphäre bei 37°C in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen) im Brutschrank (Heraeus, Thermo Scientific). Das Vollmedium der U3A-Zellen bestand aus Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM, Biochrom, Berlin) supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Österreich) und 0,04 µg/mL Puromycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Als Vollmedium für die HeLa-S3-Zellen wurde Quantum 101 HeLa-Medium (PAA) mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) verwendet.

Zellpassage

Für die Erhaltungskultur wurden die konfluenten Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Die Zellen wurden einmal mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) (Gibco, Karlsruhe) gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,2 g/L EDTA, erworben von Biochrom) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Nach kurzer Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe von serumhaltigem Vollmedium gestoppt. Zur Weiterführung der Zellkultur wurde in einem Verdünnungsverhältnis von 1:4 bis 1:6 ausplattiert.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren der Zellen wurde bei einer Konfluenz von ca. 70% vorgenommen. Die adhärennten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in PBS aufgenommen. Anschließend folgte eine Zentrifugation (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg) für 10 min und 1000 rpm bei 20°C. Das Zentrifugat einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurde in 1 mL Einfriermedium (20% FCS, 10% Dimethylsulfoxid in DMEM) aufgenom-

men. Die resuspendierten Zellen wurden über Nacht in einem mit Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) gefüllten Gefrierkontainer (Nalgene, Heidelberg) aufbewahrt und durch langsame Senkung der Temperatur von -1°C bis -3°C pro Stunde unter Verwendung von DMSO auf eine Lagerungstemperatur von -80°C abgekühlt.

Das Wiederauftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte rasch im Wasserbad bei 37°C mit anschließender Resuspension der Zellen in dem jeweiligen Vollmedium. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm und 20°C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert und in Kultur genommen.

2.2.2 Transfektion der Säugerzellen

In dieser Arbeit wurde Plasmid-DNA unter Verwendung des Transfektionsreagenz MegaTran 1.0 (Origen, Rockville, USA) in die humanen Zelllinien eingebracht. Die Transfektion verlief dabei nach Herstellerangaben, wobei für eine 6-Lochplatte je Loch $1,6\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA, bei einer 48-Lochplatte je Loch $0,25\ \mu\text{g}$ DNA und bei einem 8-Kammer-Objektträger je Kammer $0,1\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA eingesetzt wurden. Die DNA wurde in einer $150\ \text{mM}$ NaCl-Lösung verdünnt, mit MegaTran komplementiert und kurz gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde der Ansatz direkt in das auf den Zellen befindliche Vollmedium gegeben. Sechzehn bis vierundzwanzig Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die STAT1-exprimierenden Zellen weiterverarbeitet.

2.2.3 Behandlung mit Zytokinen und Inhibitoren

Die verwendeten Zytokine und Inhibitoren wurden immer im jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt und anschließend die benötigte Menge Medium direkt auf die Zellen pipettiert. Die Stimulation erfolgte mit $10\ \text{ng/mL}$ humanen rekombinanten $\text{IFN}\gamma$ (Biomol, Hamburg) und die Kinase-Inhibition mit $1\ \mu\text{M}$ Staurosporin (Sigma-Aldrich, Taufenkirchen). Durch die Behandlung der Zellen mit $0,8\ \text{mM}$ Vanadat und $0,2\ \text{mM}$ H_2O_2 wurden Tyrosinphosphatasen gehemmt. Die Herstellung einer $0,8\ \text{M}$ Na_3VO_4 -Stammlösung wurde dabei nach den Angaben von Kypta et al. (1988) in H_2O durchgeführt und auf einen pH-Wert von 10 eingestellt.

2.2.4 Mutagenese

Mit dem QuikChange-II-Site-Directed Mutagenesis Kit wurden nach Herstellerangaben Punktmutationen in STAT1-kodierende Plasmide eingefügt. Der PCR-Ansatz enthielt 50 ng Matrizen-DNA, je 125 ng komplementäre Primer, 5 µL 10x Reaktionspuffer, 1 µL dNTP-Mix sowie 2,5 Einheiten *PfuTurbo*-DNA Polymerase. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 50 µL aufgefüllt. Das PCR-Protokoll umfasste nach einer initialen Denaturierungsphase von 30 sec bei 95°C weitere 16 Zyklen bestehend aus der Denaturierung für 30 sec bei 95°C, einem Annealing-Schritt für 1 min bei 55°C und der Elongation für 14 min bei 68°C. Zur Entfernung der parentalen, methylierten DNA-Matrize erfolgte ein *Dpn* I-Verdau für 1 h bei 37°C. Dazu wurden 10 Einheiten *Dpn* I-Restriktionsenzym direkt zum PCR-Amplifikat pipettiert.

2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien

Mithilfe der Hitzeschock-Methode (Cohen et al. 1972) erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in kompetente *E.coli* DH5α-Bakterien bzw. in superkompetente XL1-Blue *E.coli*-Bakterien. Dafür wurden 100 µL der DH5α- bzw. 50 µL der XL1-Blue-Bakterien auf Eis aufgetaut. Die aufgetauten Bakteriensuspensionen wurden mit 10 ng Plasmid-DNA (entsprach 1 µL des Mutageneseansatzes) versetzt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 sec im Falle der DH5α-Bakterien und für 45 sec im Falle der XL1-blue-Bakterien bei 42°C im Wasserbad. Nachfolgend wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert und in 500-1000 µL vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen. Nach einer Inkubation von 1 h bei 225 rpm und 37°C wurden 250 µL der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gehalten.

2.2.6 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die analytische Präparation von Plasmid-DNA wurde eine einzelne transformierte Bakterienkolonie gepickt, in 2 mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker aufgenommen und für 7 h bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde der gesamte Inhalt in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13.000 rpm und RT sedimentiert. Zur Sequenzierung der mutierten Plasmid-

DNA wurde diese mithilfe des peqGold-Plasmid-Miniprep-Kit I (PEQLAP Biotechnologie, Erlangen) nach Herstellerangaben aus dem Zellpellet isoliert.

Um große Mengen an reiner Plasmid-DNA zu isolieren, wurde ein präparativer Ansatz gewählt. Dazu wurden 150 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versehen und mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 225 rpm und 37°C. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 6000 g und RT zentrifugiert und die Plasmid-DNA mithilfe des QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA wurde mit H₂O eluiert, die Konzentration bestimmt und mit H₂O auf 1 µg/µL verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm mit einer 70 µL-UV-Küvette (Brand, Wertheim) bestimmt. Die Messungen wurden mithilfe des Photometers BioPhotometer Plus (Eppendorf) vorgenommen und die Konzentration mit der nachfolgenden Formel bestimmt:

DNA-Konzentration [µg/mL] = $A_{260} \times 50 \times$ Verdünnungsfaktor.

Eine Verunreinigung der Probe wurde durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 280$ nm und durch die Bildung des Quotienten A_{260}/A_{280} nachgewiesen bzw. ausgeschlossen. Bei einem Wert von 1,8 liegt keine Verunreinigung vor.

2.2.8 Sequenzierung

Um die eingefügten Punktmutationen zu bestätigen, erfolgte bei allen in dieser Arbeit vorgenommenen Mutationen eine Sequenzierung der Plasmid-DNA. Die Sequenzierung wurde von SeqLab-Laboratories (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 700 ng Plasmid-DNA und 20 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers verwendet und die Probe mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt.

2.2.9 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Gesamtzellextrakte wurden für Western-Blot-Experimente, Dephosphorylierungs-Assays oder Gelshift-Versuche benötigt. Die gesamte Aufarbeitung der Zellen fand dabei auf Eis statt. Dazu wurden die auf 6-Lochplatten kultivierten Zellen nach

entsprechender Vorbehandlung zweimal mit eiskaltem PBS (Gibco) gewaschen und anschließend je Loch für 5 min in 50 μ L eiskaltem zytosolischen Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 10 mM KCl, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4) lysiert. Kurz vor der Verwendung wurde der zytosolische Extraktionspuffer mit 0,1% IGEPAL-CA-360, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren komplementiert. Die lysierten Zellen wurden nach der Inkubationszeit mit einem Zellschaber gelöst und zur Weiterverarbeitung in 1,5 mL-Reaktionsgefäße pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 10 sec bei 16.000 g und 4°C. Die Zellpellets wurden auf Eis gehalten, während die Überstände in einem neuen Reaktionsgefäß ein zweites Mal für 5 min bei 16.000 g und 4°C pelletiert wurden. Bei den dabei entstandenen Überständen handelte es sich um die zytosolischen Zellextrakte, die in eine neue Generation von 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten wurden. Das Zellpellet, welches im ersten Zentrifugationsschritt entstanden war, wurde mit je 50 μ L nukleärem Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 420 mM KCl, 20% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4) resuspendiert. Auch der nukleäre Extraktionspuffer wurde erst kurz vor der Verwendung mit 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren vervollständigt. Nach der Resuspension folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 15 min bei 16.000 g und 4°C. Die Überstände, bei denen es sich um die nukleären Zellextrakte handelte, wurden entweder mit der gleichen Menge an zytosolischen Extrakten gemischt, um Gesamtzellextrakte herzustellen, oder getrennt für die Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

Für Western-Blot-Experimente wurden die Gesamtzellextrakte mit 6x SDS-Probenpuffer (350 mM Tris-HCl, pH 6,8, 8% SDS, 30% Glycerin, 10% β -Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenolblau) versetzt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

STAT1-Proteine wurden mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend im Western-Blot-Verfahren detektiert. Nach der Hinzugabe von SDS zu den Extraktproben und anschließender Denaturierung, wie oben beschrieben, erfolgte die Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen. Diese bestanden aus einem Trenngel mit 10% (v/v) Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37,

(5:1)), 0,03% APS, 0,16% TEMED, 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8) sowie einem Sammelgel mit 5% Rotiphorese Gel 30, 0,06% APS, 0,2% TEMED, 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8). Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurde zuerst das Trenngel in die Aussparung zwischen zwei Glasplatten gegeben und mit einer Schicht aus Isopropanol bedeckt. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol wieder entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Konstruktion der Geltaschen wurde ein Plastikkamm in das Sammelgel eingelegt.

Eingefrorene Gesamtzellextrakte wurden wiederholt für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend 10-20 µL der Zellextrakte in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine wurde in einem vertikalen Elektrophoresesystem (Minigel-Twin, Biometra, Göttingen) bei einer konstanten Spannung von 11 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,6) durchgeführt.

2.2.11 Western-Blot-Analyse

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) (Millipore, Schwalbach/Ts.) übertragen und konnten durch spezifische Antikörper identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde das elektrische Transferverfahren nach der Semi-Dry-Methode mit dem Fastblot B44 (Biometra, Göttingen) angewandt. Zu Beginn wurde die zuvor hydrophobe PVDF-Membran 5 min in Methanol (Carl Roth, Karlsruhe) aktiviert und danach zweimal für je 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10% Methanol, pH 8) unter Schütteln inkubiert. Nach einer Transferdauer von 90 min und 80 mA pro Blot wurde die Membran 5 min mit TBS-T (137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) gewaschen und 1 h auf dem Schüttler mit 4% BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth) in TBS-T blockiert, um freie unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht unter Schütteln. Anschließend wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran fünfmal für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT unter Schütteln mit dem IRDyegekoppelten Sekundärantikörper. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem LI-COR Odyssey-Sa-Imaging-System (Biosciences, Bad Homburg). Zur Reexponierung mit einem weiteren Erstantikörper wurde die Membran 1 h bei 60°C in Ablösepuffer (2% SDS, 0,7% β-Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) im Wasserbad inkubiert und

gebundene Antikörper entfernt. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T von jeweils 15 min und einem einstündigen Blockierungsschritt mit 4% BSA in TBS-T konnte die Membran erneut mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden.

2.2.12 Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Der Nachweis spezifischer STAT1-DNA-Bindungen wurde mittels elektrophoretischem Mobilitäts-Shift-Assay erbracht (EMSA) (Begitt et al. 2000). Bei diesem Versuch wurde ausgenutzt, dass STAT1-Proteine mit Oligonukleotid-Sonden eine Verbindung eingehen, wodurch ihre elektrophoretische Mobilität im Gel retardiert wird. Die Detektion der Banden erfolgte autoradiographisch durch den Einsatz von radioaktiv markierten Oligonukleotiden mit kanonischen oder degenerierten GAS-Sequenzen.

HeLa- oder U3A-Zellen wurden in 6-Lochplatten in Vollmedium kultiviert und nach entsprechender Vorbehandlung Gesamtzellextrakte bzw. nukleäre und zytosolische Extrakte hergestellt. Zur Analyse der Protein-DNA-Interaktion wurden komplementäre Doppelstrang-Oligonukleotide als Sonden verwendet, die eine singuläre (M67), eine zweifache (2xGAS), zwei degenerierte (2xnonGAS) oder eine singuläre und eine degenerierte GAS-Bindestelle (GASnonGAS) besaßen. Zur radioaktiven Markierung der Sonden wurden die überhängenden Enden der Oligonukleotide verwendet. Die Herstellung der Sonden umfasste zunächst eine Hybridisierungsreaktion, bei der 50 pmol/mL komplementäre Oligonukleotide 5 min bei 95°C in Oligo-Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) inkubiert wurden. Nach langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Nukleotide für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert. Zur radioaktiven Markierung der DNA-Sonden wurden die nicht komplementären 5'-überhängenden Enden mit radioaktiven α -[³²P]-Nukleotiden aufgefüllt. Dazu wurde ein Ansatz mit 0,1 ng der Oligonukleotide und 8 μ L der radioaktiv markierten dNTPs hergestellt und zusammen mit 5 Einheiten des Klenow-Enzyms, ein Fragment der *E.coli*-DNA-Polymerase I, in 5 μ L 10x Eco-Pol-Puffer (New England, Biolabs, Frankfurt am Main) für 25 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 5 min mit einem Überschuss an unmarkierten dNTPs. Beendet wurde die Reaktion mit 1 μ L einer 0,5 mM EDTA-Lösung. Durch dreiminütige Zentrifugation bei 700 g wurden freie Nukleotide mittels Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen (GE Healthcare, München) chromatographisch entfernt.

Für die Bildung von STAT1-DNA-Komplexen wurden 4,5 μ L Gesamtzellextrakte bzw. zytosolische oder nukleäre Extrakte verwendet. Diese wurden für 15 min bei RT mit 0,2 μ L radioaktiv markierter DNA-Sonde, 1 μ L einer Poly-dIdC-Lösung (2 mg/mL), 1,3 μ L DTT (100 mM), 3,5 μ L H₂O und 2,5 μ L 5x Gelshift-Puffer (100 mM Hepes, pH 7,9, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20% Ficoll) inkubiert. Falls weniger als 4,5 μ L Extrakte eingesetzt wurden, wurde das fehlende Volumen durch die Zugabe von 1x PBS oder untransfizierten U3A-Zellextrakten ergänzt, sodass immer mit einer Gesamtmenge von 13 μ L gearbeitet wurde. Durch die Inkubation mit 1,3 μ L polyklonalem STAT1 α -p91-Antikörper bzw. STAT3-Antikörper (beide von Santa Cruz, Kalifornien) konnte im Rahmen einer Supershift-Reaktion die Identifikation der DNA-gebundenen STAT1-Proteine verifiziert werden. Für den kompetitiven Ansatz erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit 2 μ L einer unmarkierten M67-DNA im 750-fachen molaren Überschuss.

Für die Herstellung der Gele wurden 12 mL Rotiphorese Gel (Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)) mit 2,4 mL 10x TBE, 84 mL H₂O, 2 mL 10% APS und 100 μ L TEMED vermischt. Nach der Prääquilibration des 4,8%-igen TBE-Polyacrylamidgels wurden die Proben bei 4°C und 400 V über 2,5 h in 0,25x TBE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt.

Im Anschluss an eine einstündige Vakuumtrocknung auf Whatman-Papier (Albet Lab Science, Dassel) wurden die Gele über Nacht auf eine Phospho-Imager-Folie exponiert und anschließend mittels Fujifilm FLA-5100 Scanner (Fuji, Düsseldorf) eingescannt. Das Auslesen der Imager-Platten erfolgte mithilfe des Auslese-Programmes TINA v. 2.0 (Raytest, Straubenhardt). Die anschließende Bearbeitung wurde mit dem Software-Programmen Aida Image Analyzer v. 4.06 (Raytest) und Corel Draw (Corel, Corel Cooperation, Unterschleißheim) durchgeführt.

2.2.13 Dephosphorylierungs-Assay

Für die *In-vitro*-Dephosphorylierung wurden nach entsprechender Vorbehandlung U3A-Gesamtzellextrakte verwendet. 10 μ L dieser Extrakte wurden mit 10 μ L Dephosphorylierungspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mg/mL BSA, 50 mM KCl, 5 mM EDTA) versetzt, welcher kurz vor seiner Verwendung mit 20 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 2 Einheiten T-Zellprotein-Tyrosin-Phosphatase (TC-PTP) (Biomol International, Plymouth, USA) komplementiert wurde. Die Reaktionsansätze wurden für die

angegebenen Zeiten bei 30°C inkubiert, bis die Reaktion durch die Zugabe von 6x SDS-Probenpuffer und einer dreiminütiger Erhitzung auf 95°C beendet wurde. Das Ausmaß der Dephosphorylierung wurde mittels Western-Blot überprüft.

Die *In-vivo*-Dephosphorylierung wurde mit pSTAT1-WT-GFP bzw. einem Derivat konstitutiv exprimierenden HeLa-S3- oder U3A-Zellen durchgeführt. Nach Stimulation mit 10 ng/mL IFN γ wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin inkubiert. Im Anschluss wurden zytosolische und nukleäre bzw. Gesamtzellextrakte für die Western-Blot-Analyse gewonnen.

2.2.14 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von STAT1-GFP-exprimierenden Zellen erfolgte in 8-Kammer-Objektträgern (Lab-Tek Chamber Slides, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Am Folgetag nach der Transfektion mit den pSTAT1-GFP-Derivaten und pSTAT1-WT-GFP wurden die Zellen wie angegeben mit 10 ng/mL IFN γ bzw. nachfolgend mit 1 μ M Staurosporin für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT. Die Färbung der Zellkerne erfolgte für 10 min unter Schütteln bei RT mit 5 μ g/mL Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) in PBS. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser erfolgte die Eindeckung der Zellen mit Fluoromount-G-Eindeckmedium (Southern Biotech, Birmingham, USA). Die Objektträger wurden lichtgeschützt und gekühlt bei 4°C aufbewahrt.

Mithilfe des Mikroskops Axiovert 200M (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert, wobei die Aufnahme mit einer CCD-Kamera (Intas, Science Imaging Instruments, Göttingen) unter der Verwendung verschiedener Fluoreszenzfilter erfolgte. Die Aufnahmen der GFP-Fusionsproteine wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 480$ nm und die Aufnahmen der mit Hoechst 33258 angefärbten Zellkerne bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm angefertigt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit den Software-Programmen Image-Pro MDA 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, USA) und Corel Draw (Corel, Corel Cooperation, Unterschleißheim) bearbeitet.

2.2.15 Reporteragen-Assay

Mithilfe von verschiedenen Reporteragen-Assays wurde die transkriptionelle Aktivität der einzelnen STAT1-Mutanten überprüft. Zur Untersuchung der Genaktivierung wurden unterschiedliche IFN γ -sensitive Luciferase-Reporteragenkonstrukte, wie z.B. das Ly6E-Gen mit einer dreifachen STAT1-Bindestelle im Promotorbereich (Wen et al. 1995), verwendet. Hierbei wurde ausgenutzt, dass bei der Promotoraktivierung durch Phospho-STAT1 das Enzym Luciferase transkribiert wird, welches in einer nachfolgenden Reaktion die Umsetzung von α -Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Die bei dieser Reaktion emittierte Anzahl von Lichtquanten war dabei proportional zur gebildeten Luciferasemenge und somit auch zu der Menge an phosphorylierten STAT1-Proteinen. Weiterhin wurde mithilfe der Reporteragen pIC-339 und pIC-1352, die den trunkierten bzw. den Volle-Länge-Promoter des humanen ICAM1-Gens enthielten, die Luciferase-Induktion anhand nativer Promotoren mit singulärer GAS-Bindestelle überprüft. Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz wurde ein konstitutiv exprimierter β -Galaktosidase-Reporter kotransfiziert.

Die für das Experiment verwendeten U3A-Zellen wurden in 48-Lochplatten kultiviert. Für die Transfektion wurden je Loch 250 ng STAT1-Plasmid, 200 ng β -Gal-Reporteragen und 70 ng des 3xLy6E-Plasmids, des pIC-339-Plasmids oder des pIC-1352-Plasmids eingesetzt. Es erfolgte eine Sechsfach-Bestimmung je Konstrukt und Behandlung. Am Folgetag nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ inkubiert oder sie blieben unbehandelt. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für die Zelllyse wurde der bei 4°C gelagerte Triton-Glycylglycin-Lysepuffer (25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 1% Triton X-100, 15 mM MgSO $_4$, 4 mM EGTA) mit 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren vervollständigt. Je Loch wurden die Zellen mit 100 μ L des komplementierten Triton-Glycylglycin-Lysepuffers für 15 min bei RT inkubiert und die Lysate anschließend in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C wurden 20 μ L des Überstandes in eine weiße 96-Lochplatte (Nunclon Surface, Dänemark) pipettiert. Mithilfe des Luminometers Centro XS³ LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) wurden im Anschluss je Loch 50 μ L des Luciferase-Assay-Systems injiziert. Nach der Messung durch das Luminometer wurden die Ergebnisse mit dem Software-Programm MikroWin, Version 4.41, ausgewertet.

Zur Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurden weitere 20 μL des Überstandes mit 280 μL Substratlösung, die aus 211 μL Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,2), 66 μL o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG, 4 mg/mL in 100 mM Natriumphosphat-Puffer) und 3 μL 100x Magnesium-Lösung (100 mM MgCl_2 , 4,5 mM β -Mercaptoethanol) bestand, versetzt. Mit Feststellung des enzymatischen Farbumschlags nach 5-20 min wurde die Reaktion mit 500 μL einer 0,5 M Na_2CO_3 -Lösung gestoppt und die β -Galaktosidaseaktivität photometrisch bei 420 nm mit dem Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Ergebnisse der Luciferase-Aktivität wurden auf die β -Galaktosidase-Expression normiert und die Berechnung der Standardabweichungen und des Mittelwerts mit den Software-Programmen Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) und Sigmablott (Systat Software, Erkrath) vorgenommen.

2.2.16 RNA-Isolation

Zur mRNA-Extraktion wurden U3A-Zellen auf 6-Lochplatten in Vollmedium kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel auf Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) supplementiert mit 1% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin. Sofort im Anschluss erfolgte die Transfektion der Zellen mit pcDNA3.1-Konstrukten. Einen Tag später wurden die Zellen für 6 h mit 10 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ stimuliert oder sie blieben unbehandelt. Nach der Inkubationszeit wurde die RNA mithilfe des peqGold-Total-RNA-Kits (PEQLAB) nach Herstellerangaben isoliert und mit 50 μL RNase freiem H_2O eluiert. Die fertiggestellten Proben wurden entweder bei -80°C gelagert oder sofort zu cDNA weiterverarbeitet.

2.2.17 cDNA-Herstellung

Die komplementäre DNA (cDNA) aus der isolierten mRNA wurde mithilfe des Verso-cDNA-Kits (Thermo Fisher Scientific) hergestellt. Nach den Angaben des Herstellers wurde ein Ansatz von 20 μL pipettiert, welcher 8 μL RNA enthielt. Das Protokoll der reversen Transkription umfasste zwei Zyklen. Nach 30-minütiger cDNA-Synthese bei 42°C wurden die Proben in dem zweiten Zyklus für 2 min auf 95°C erhitzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C .

2.2.18 Real-time-PCR

Zur Analyse der Genexpression von STAT1-WT und STAT1-Mutanten wurde eine Real-time-PCR durchgeführt. Nach Herstellerangaben wurde mit dem Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green Mix (Thermo Scientific) ein Reaktionsansatz von 19 μL hergestellt, zu dem 1 μL cDNA hinzugefügt wurde. Für den Ansatz wurden komplementäre Primer (Tib MolBiol, Berlin) verwendet. Die Untersuchung der Genexpression richtete sich hier nach literaturbekannten Zielgenen von STAT1.

2.3 Darstellung der STAT1-Kristallstruktur

Die Positionen der in dieser Arbeit mutierten sowie anderer funktionell wichtiger Aminosäurereste im STAT1-Protein wurden unter Benutzung der in der Protein-Data-Bank (PDB) niedergelegten Strukturdaten graphisch dargestellt. Dazu wurde das Software-Programm PyMol von DeLano Scientific, San Francisco, USA, in der Version v.0.99 verwendet.

2.4 Statistik

Bei allen Genexpressionsanalysen wurde die statistische Signifikanz mithilfe des t-Tests ermittelt. Dazu wurde bei der Real-time-PCR eine Doppelbestimmung vorgenommen sowie eine Sechsfach-Bestimmung bei den Reporter-Gen-Assays. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden anschließend mittels Microsoft Office-Excel und SigmaPlot ausgewertet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Punktmutationen in die Linker-Domäne bzw. in die DBD des STAT1-Moleküls eingeführt und die resultierenden Mutanten hinsichtlich ihrer phänotypischen Eigenschaften im IFN γ -Weg charakterisiert. Besonderes Interesse lag hierbei auf den Auswirkungen der Punktmutationen auf die Tyrosinphosphorylierung und die damit verbundene Regulation der transkriptionellen Antwort durch phosphorylierte STAT1-Dimere. Daher wurden zunächst durch Sequenzvergleich der Mitglieder der humanen STAT-Familie konservierte Aminosäurereste in der DNA-Bindedomäne und der Linker-Domäne identifiziert. Weiterhin wurde mithilfe der STAT1-Kristallstruktur überprüft, ob diese Reste an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind.

In Position 436 des STAT1-Moleküls wurde ein konservierter Glutaminsäurerest entdeckt, welcher sich der DNA-Bindedomäne (**Abb. 3.1**) zuordnen lässt. Der Sequenzvergleich zeigt bei fünf der sieben Mitglieder der humanen STAT-Familie einen konservierten Glutamatrest an homologer Position (**Tab. 3.1**). Nur STAT2 und STAT6 weisen an der entsprechenden Stelle einen anderen Aminosäurerest auf. Mithilfe von sequenzspezifischer Mutagenese wurde der Glutamatrest in Position 436 im STAT1-Molekül gegen Alanin ausgetauscht.

STAT1	429	E	L	H	S	L	S	F	E	T	Q	L	C	Q	441
STAT2	427	E	L	H	I	I	S	F	T	V	K	Y	T	Y	439
STAT3	435	E	L	H	L	I	T	F	E	T	E	V	Y	H	447
STAT4	426	E	L	H	S	I	T	F	E	T	Q	I	C	L	438
STAT5a	439	E	K	F	T	V	L	F	E	S	Q	F	S	V	451
STAT5b	439	E	K	F	T	I	L	F	E	S	Q	F	S	V	451
STAT6	342	E	K	C	A	V	L	F	S	A	S	F	T	L	354

Tab. 3.1: Sequenzvergleich humaner STAT-Proteine. Der Sequenzvergleich aller humanen STAT-Proteine zeigte, dass der Glutamatrest in Position 436 von STAT1 in der Familie der STAT-Proteine konserviert ist.

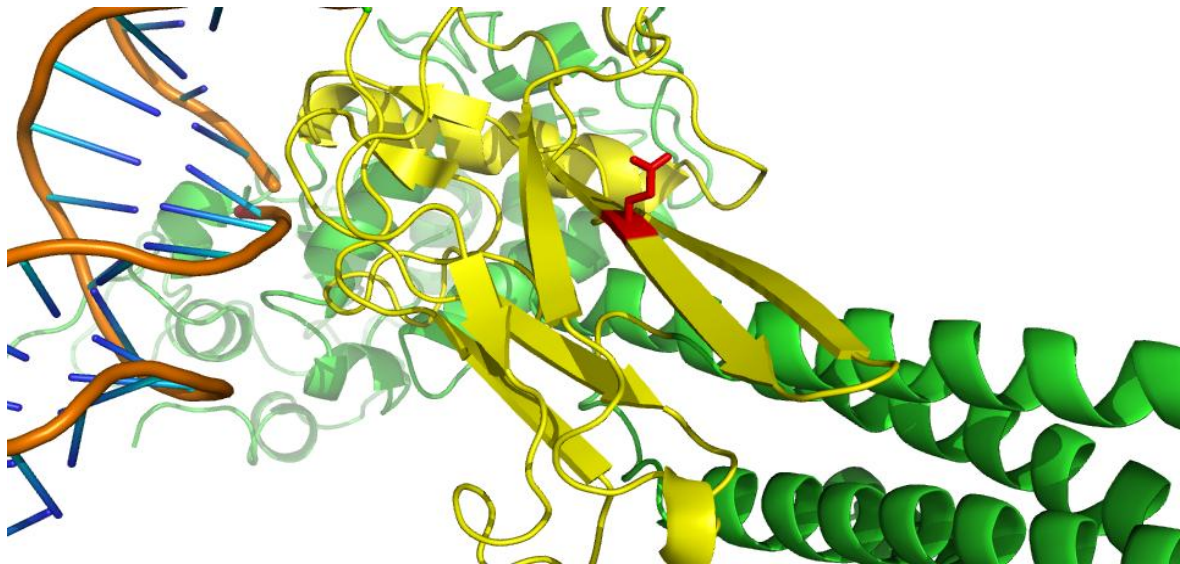


Abb. 3.1: Darstellung des Glutaminsäurerestes in Position 436 in der STAT1-Kristallstruktur. Dargestellt ist der Ausschnitt eines STAT1-Monomers (grün) mit gebundener DNA (orange-blau). Der Glutaminsäurerest in Position 436 (rot) ist in der DNA-Bindedomäne (gelb) lokalisiert. Die Abbildung wurde mithilfe von PyMol unter Verwendung des PDB-Koordinatendatensatzes 1BF5 erstellt.

3.1 STAT1-E436A zeigt ein mit STAT1-WT vergleichbares Phosphorylierungsniveau

Mithilfe von Western-Blot-Analysen wurde die Phosphorylierung von STAT1-E436A nach Stimulation transient transfizierter Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ im Vergleich zu STAT1-WT überprüft. Durch die Zugabe von Staurosporin, einem potenten Kinase-Inhibitor, wurde in diesem Versuch außerdem der zeitabhängige Abbruch der STAT1-Phosphorylierung untersucht. Hierzu wurden HeLa-S3-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP oder pSTAT1-E436A-GFP transfiziert. Zur Feststellung der *In-vivo*-Dephosphorylierung wurden die Zellen nach 45-minütiger Stimulationsdauer mit 10 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ für unterschiedliche Zeitspannen mit 1 μM Staurosporin inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Gesamtzellextrakte und anschließender Verwendung eines Phospho-STAT1-Antikörpers im Immunoblot wurden die Phosphorylierungsbanden detektiert. Zur Bestimmung der Gesamtmenge von STAT1 wurde die Western-Blot-Membran gestrippt und nach mehrmaligem Waschen mit einem Pan-STAT1-Antikörper reexponiert.

Der **Abb. 3.2** ist zu entnehmen, dass nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation in den Extrakten von STAT1-WT-exprimierender Zellen eine deutliche Tyrosinphosphorylierungsbande von STAT1 detektiert wird. Die mit Staurosporin prästimulierten Zellen zeigten bereits nach 15 min ein schwächeres Phosphorylierungssignal als die nicht mit Staurosporin behandelten Zellen. Nach 30-minütiger Staurosporin-Inkubation ist eine weitere Abschwächung der Phospho-STAT1-Bande bei STAT1-WT-exprimierenden Zellen zu erkennen, bis ein Phosphorylierungssignal nach 45 min kaum noch nachgewiesen werden kann. Auch bei STAT1-E436A wird nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation eine deutliche Phosphorylierungsbande detektiert. Mit zunehmender Staurosporin-Inkubation ist eine kontinuierliche Abnahme des Phosphorylierungssignals zu erkennen. Im Rahmen dieses Experimentes konnte dargelegt werden, dass sich die Mutante STAT1-E436A vom WT-Molekül weder in ihrem Phosphorylierungsniveau nach IFN γ -Stimulation noch in ihrer Dephosphorylierungskinetik nach Staurosporin-Behandlung unterscheidet.

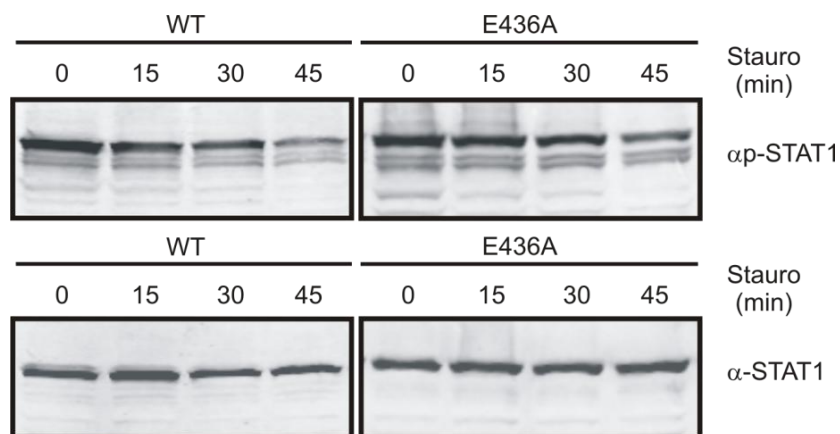


Abb. 3.2: STAT1-E436A und STAT1-WT zeigen die gleiche *In-vivo*-Dephosphorylierungskinetik. U3A-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP oder pSTAT1-E436A-GFP transfiziert und für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 1 μ M Staurosporin für die angegebenen Zeiten. Die obere Abbildung zeigt das Ergebnis nach Inkubation mit einem Phospho-STAT1-Antikörper; das untere Bild zeigt die Reinkubation mit einem STAT1-spezifischen Antikörper.

3.2 Normale Kinetik der IFN γ -induzierten Kernakkumulation von STAT1-E436A

Mithilfe von STAT1-GFP-Fusionsproteinen wurde die Kinetik der IFN γ -induzierten Kernakkumulation fluoreszenzmikroskopisch detektiert. In diesem Experiment wurde die E436A-Mutante bezüglich der Dauer ihrer Kernakkumulation nach erfolgter IFN γ -Stimulation sowie dessen Zusammenbruch nach Staurosporin-Behandlung mit STAT1-WT verglichen. Mittels zielgerichteter Mutagenese unter Verwendung von pEGFP-N1-Plasmiden mit humaner STAT1-cDNA in 5'-Position zur GFP-kodierenden Insertion wurde zunächst die Mutante hergestellt und im Weiteren das zelluläre Verteilungsmuster nach transienter Transfektion in HeLa-S3-Zellen detektiert. Dazu wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert oder alternativ nach der IFN γ -Stimulation mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und die Kerne mit Hoechst 33258 angefärbt. Die nachfolgenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in **Abb. 3.3** zeigen, dass im unstimulierten Zustand sowohl STAT1-WT als auch STAT1-E436A eine panzelluläre Verteilung aufweisen. Nach IFN γ -Stimulation ist bei den WT-Proteinen wie auch bei denen der Punktmutante eine komplette Kernlokalisierung zu beobachten. Durch einstündige Inkubation mit Staurosporin, bei der die Tyrosin-Kinase-Aktivität der JAK-Kinasen inhibiert wurde und infolgedessen keine weitere Phosphorylierung der STAT1-Moleküle mehr stattfand, zeigte sich bei beiden STAT1-Derivaten kein Unterschied im Zusammenbruch der Kernakkumulation. Bereits nach 60-minütiger Staurosporin-Inkubation war die ursprüngliche nukleozytoplasmatische Ruheverteilung der STAT1-Proteine wieder hergestellt.

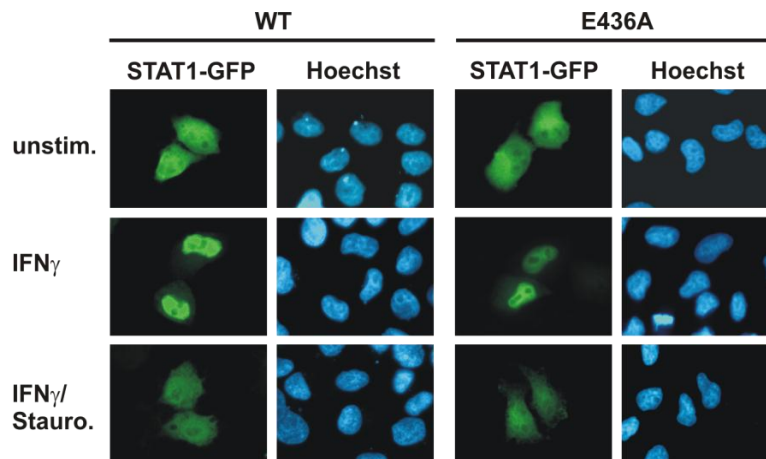


Abb. 3.3: Vergleichbare Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-WT und STAT1-E436A. HeLa-S3-Zellen wurden transient mit pSTAT1-WT-GFP oder pSTAT1-E436A-GFP transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen (obere Reihe), 45 min mit 10 ng/mL IFN γ behandelt (mittlere Reihe) oder nach vorangegangener 45-minütiger IFN γ -Stimulation für 1 h mit 1 μ M Staurosporin inkubiert (untere Reihe). Die Zellkerne der Formalin-fixierten Zellen wurden mit Hoechst 33258 angefärbt.

3.3 Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-E436A ist vergleichbar mit der von STAT1-WT

Die Punktmutante STAT1-E436A zeigte sich in den bisherigen Beobachtungen unauffällig. Sowohl das Phosphorylierungsniveau (**Abb. 3.2**) als auch die Kinetik der Kernakkumulation (**Abb. 3.3**) wiesen keinen merklichen Unterschied zu STAT1-WT auf. Um die Auswirkungen der Mutation auf die Genaktivierung zu überprüfen, wurde ein Reporteragen-Assay durchgeführt.

Das verwendete Luciferase-Reporteragenkonstrukt enthielt einen synthetischen Promotor mit drei hintereinander liegenden GAS-Bindestellen (3xLy6E) in einem Abstand von 10 bp. Durch Co-Transfektion mit einem zweiten Plasmid, welches für die konstitutiv exprimierte β -Galaktosidase kodiert, und anschließender Normierung der Messdaten auf diese Werte wurde eine quantitative Analyse erreicht. U3A-Zellen wurden mit den Plasmiden pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-E436A-GFP und pGAS3xLy6E sowie p β Gal transfiziert. Nach sechsstündiger IFN γ -Stimulation wurde die Luciferase-Aktivität der Gesamtzellextrakte photometrisch bestimmt und auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert. **Abb. 3.4** zeigt eine mit dem Wildtyp vergleichbare

transkriptionelle Aktivität von STAT1-E436A. In allen für die Charakterisierung der Punktmutante durchgeführten Experimenten konnte somit kein von STAT1-WT sich unterscheidender Phänotyp nachgewiesen werden.

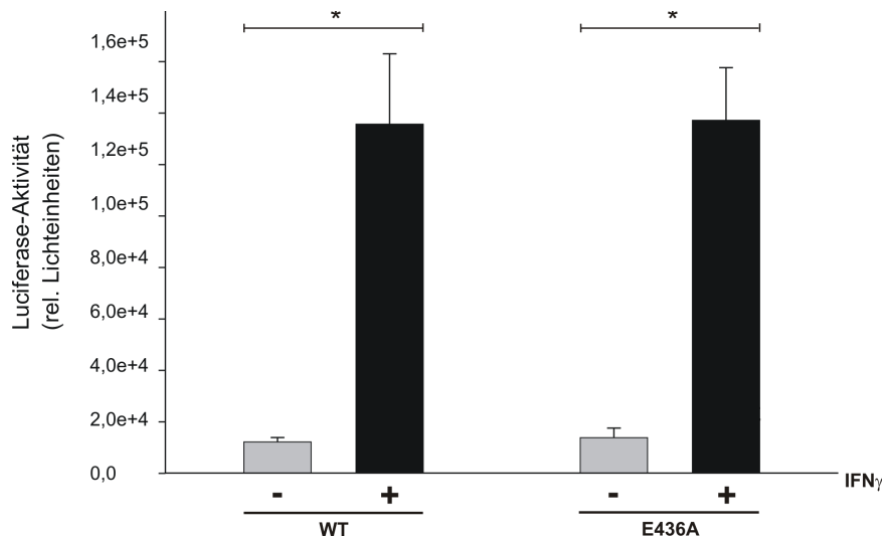


Abb. 3.4: STAT1-E436A weist die gleiche transkriptionelle Aktivität wie STAT1-WT auf. U3A-Zellen wurden mit den Plasmiden pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-E436A-GFP, pGAS3xLy6E und p β Gal transfiziert und in sechs parallelen Ansätzen untersucht. Sechzehn bis vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ inkubiert oder sie blieben unstimuliert. Die Zellextrakte wurden hinsichtlich ihrer Luciferase-Aktivität untersucht und auf die photometrisch erfasste β -Galaktosidase-Aktivität normiert. Dargestellt ist ein Histogramm mit Mittelwerten und Standardabweichungen der normierten Luciferase-Aktivität vor (graue Balken) und nach IFN γ -Stimulation (schwarze Balken). Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede.

3.4 Identifizierung und Untersuchung eines positiv geladenen Aminosäurerestes in der Linker-Domäne von STAT1

Durch Sequenzvergleich aller STAT-Proteine wurde in der Linker-Domäne ein konservierter Lysinrest identifiziert (**Abb. 3.5**), der sich bei STAT1 in Position 550 befindet und im Weiteren untersucht werden soll. Wie **Tab. 3.2** zu entnehmen ist, weisen sechs humane STAT-Mitglieder einen positiv geladenen Aminosäurerest an homologer Stelle auf, davon STAT1 bis STAT4 einen Lysinrest. Lediglich STAT5a besitzt in dieser Position einen Tryptophanrest. Um die Bedeutung dieses Lysinrestes in Posi-

tion 550 von STAT1 genauer zu charakterisieren, wurde eine Substitutionsmutante hergestellt, bei der Lysin durch Alanin ersetzt wurde.

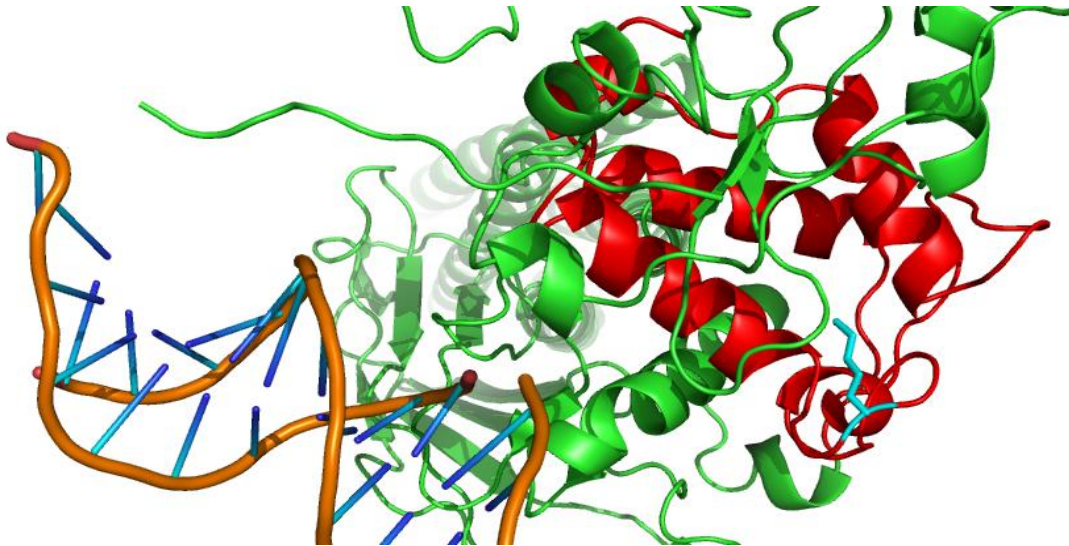


Abb. 3.5: Ausschnitt der STAT1-Kristallstruktur mit K550. In der DNA-gebundenen Form des STAT1-Monomers ist der Lysinrest in Position 550 türkis markiert; die Linker-Domäne ist in rot dargestellt. Die Abbildung wurde mithilfe von PyMol unter Verwendung des PDB-Koordinatendatensatzes 1BF5 erstellt.

STAT1	541	R	F	C	K		E	N	I	N	D	K	N	F	552
STAT2	540	D	F	T	K	R	E	S	P	P	G	K		L	551
STAT3	548	K	F	C	K		E	N	M	A	G	K	G	F	559
STAT4	538	K	F	C	K		E	H	L	P	G	K	S	F	549
STAT5a	557	Q	F	N	R		E	N	L	P	G	W	N	Y	568
STAT5b	557	Q	F	N	R		E	N	L	P	G	R	N	Y	568
STAT6	501	Q	F	N	K		E	I	L	L	G	R	G	F	512

Tab. 3.2: Sequenzhomologie der STAT-Familie im Bereich eines Teiles der Linker-Domäne. In der zum STAT1-Molekül entsprechenden Position 550 befindet sich bei allen Mitgliedern der humanen STAT-Familie mit Ausnahme von STAT5a ein positiv geladener Aminosäurerest.

3.5 Die Western-Blot-Analyse zeigt eine Hypophosphorylierung von STAT1-K550A

Um die Auswirkung der eingeführten Punktmutation bezüglich der Tyrosinphosphorylierung zu beurteilen, wurde diese nach Interferon- γ -Stimulation mithilfe von Western-Blot-Analysen untersucht. Im gleichen Experiment wurde außerdem die *In-vivo*-Dephosphorylierung durch Zugabe von Staurosporin überprüft. HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K550A-GFP transfiziert und nachfolgend für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit Staurosporin erfolgte die Herstellung von Gesamtzellextrakten, die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines Phospho-STAT1-Antikörpers analysiert wurden. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse ist der **Abb. 3.6** zu entnehmen. Bereits nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation weist STAT1-K550A ein vermindertes Phosphorylierungsniveau im Vergleich zum Wildtyp auf. Nach 15-minütiger Inkubation mit Staurosporin ist bei der Punktmutante im Unterschied zu STAT1-WT nur noch eine schwache Phosphorylierungsbande detektierbar. Zur Quantifizierung der Hypophosphorylierung wurde die Western-Blot-Membran gestriipt und nach stringentem Abwaschen des Antikörpers der Reblot mithilfe eines STAT1-Antikörpers entwickelt.

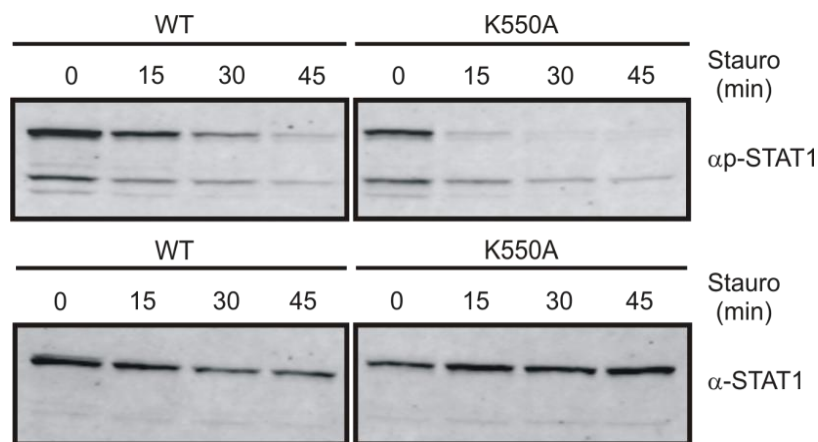


Abb. 3.6: STAT1-K550A weist ein vermindertes Phosphorylierungsniveau auf. Nach Transfektion mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K550A-GFP wurden die verwendeten HeLa-S3-Zellen für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert und für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden hergestellt und im Western-Blot analysiert. Die obere Abbildung zeigt den Blot unter Verwendung eines Phospho-STAT1-

Antikörpers, die untere zeigt den Reblot nach der Behandlung mit einem Pan-STAT1-Antikörper.

3.6 STAT1-K550E besitzt einen ähnlichen Phänotyp wie die K550A-Mutante

Durch den Austausch eines kritischen Lysinrestes in Position 550 des STAT1-Moleküls nach Alanin wurde eine Mutante generiert, die im Western-Blot-Experiment eine deutliche Hypophosphorylierung aufweist (**Abb. 3.6**). Indem der positiv geladene Lysinrestes gegen eine neutrale AS wie Alanin substituiert wurde, erfolgte an dieser Stelle ein Austausch der im nativen Protein geladenen Seitengruppe. Aufgrund des beobachteten Phänotyps von STAT1-K550A ergab sich die Hypothese, dass durch den Wechsel des kritischen Lysinrestes in Position 550 zu einem negativ geladenen AS-Rest die phänotypischen Auswirkungen gegenüber der Alanin-Mutante noch prominenter werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde an der entsprechenden Position im STAT1-Protein Lysin durch Glutamat ersetzt. Die STAT1-K550E-Mutante wurde zunächst unter gleichen Bedingungen wie STAT1-K550A im Vergleich zum Wildtyp mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Dazu wurden STAT1-WT-GFP- bzw. STAT1-K550E-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert, bevor sie für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt wurden. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Phosphorylierung mithilfe eines Phospho-STAT1-Antikörpers überprüft. Um sicher zu stellen, dass das Phosphorylierungsniveau nicht durch unterschiedliche STAT1-Mengen beeinflusst wurde, erfolgte nach stringentem Abwaschen des Phospho-STAT1-Antikörpers die Reinkubation der gleichen Western-Blot-Membran mit einem STAT1-Antikörper.

In **Abb. 3.7** ist zu erkennen, dass die unmutierten Proteine nach IFN γ -Stimulation ein deutliches Phosphorylierungssignal zeigen. Mit zunehmender Dauer der Staurosporin-Inkubation wird die bereits beschriebene kontinuierliche Abnahme des Phosphorylierungssignals bei STAT1-WT registriert. Im Vergleich dazu weist STAT1-K550E eine schwächere Phosphorylierungsbande nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation auf, sodass nach 15-minütiger Staurosporin-Behandlung nur noch ein schwer detektierbares Phospho-STAT1-Signal nachgewiesen werden kann. Demnach weist STAT1-

K550E im Western-Blot-Experiment den gleichen Phänotyp auf wie die STAT1-K550A-Mutante.

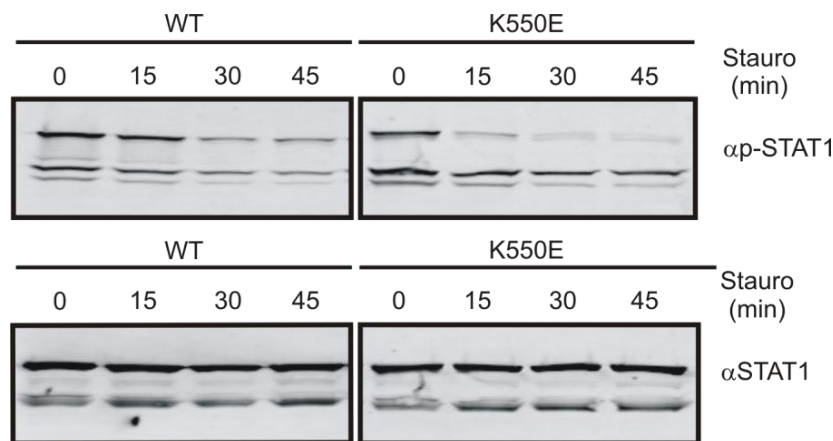


Abb. 3.7: STAT1-K550E zeigt eine Hypophosphorylierung. HeLa-S3-Zellen wurden nach erfolgter Transfektion mit pSTAT1-WT-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Die Gesamtzellextrakte wurden mittels Western-Blot analysiert. Die Verwendung eines Phospho-STAT1-Antikörpers ist in der oberen Abbildung dargestellt, die untere Darstellung zeigt den zugehörigen Reblot nach Reexposition der Membran mit einem Pan-STAT1-Antikörper.

3.7 STAT1-K550A zeigt im Gelshift-Experiment eine inhibierte Bildung von DNA-gebundenen STAT1-Komplexen

Mithilfe des elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) wurde die spezifische DNA-Bindung von STAT1-WT und STAT1-K550A untersucht. U3A-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP oder pSTAT1-K550A-GFP transfiziert, am Folgetag für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert und für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Die hergestellten nukleären Zellextrakte wurden mit radioaktiver M67-Sonde, die eine einfache GAS-Bindestelle besaß, für 15 min inkubiert und anschließend zu gleichen Mengen aufgetragen. Das Ausmaß der Bindung von phosphorylierten STAT1-Proteinen an die Erkennungssequenz der [32 P]-radioaktiv markierten Sonden wurde autoradiographisch ermittelt. Durch den Einsatz von Anti-STAT1 α -Antikörper (α S1) und Anti-STAT3-Antikörper (α S3) im Rahmen einer Super-shift-Reaktion wurde außerdem bewiesen, dass es sich bei den detektierten Banden

um STAT1-DNA-Komplexe handelte. Durch Zugabe von α S1-Antikörpern, die gegen den STAT1-DNA-Komplex gerichtet waren, wurde die Laufgeschwindigkeit aufgrund der Größenzunahme zusätzlich reduziert und somit die STAT1-DNA-Bande im Gel verschoben. Die Inkubation mit STAT3-spezifischem Antikörper führte bei einer vergleichbaren Extraktmenge zu keiner Änderung im Laufverhalten der Komplexe im Sinne eines positiven Supershifts.

Aus **Abb. 3.8** ist ersichtlich, dass nach 45-minütiger Interferon- γ -Stimulation STAT1-K550A eine deutlich schwächere Bande im Vergleich zu STAT1-WT aufweist. Die Ursache der verminderten Bildung von STAT1-DNA-Komplexen könnte auf die bereits nachgewiesene Hypophosphorylierung zurückgeführt werden. Durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit Staurosporin ist bei STAT1-WT weiterhin eine konstante Abnahme der STAT1-DNA-Komplexbildung erkennbar. Dieser kontinuierlicher Rückgang des detektierbaren Signals kann auch bei der Punktmutante beobachtet werden.

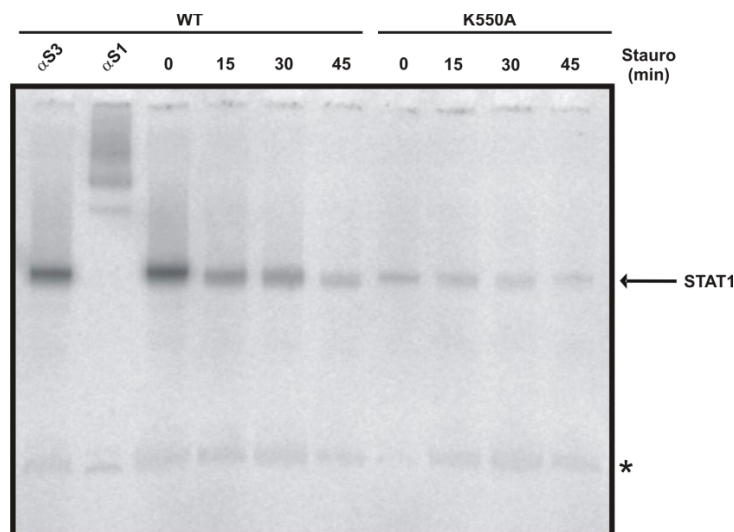


Abb. 3.8: Verminderte Bindung von STAT1-K550A an M67-DNA-Sonde. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Gelshift-Assays. U3A-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K550A-GFP transfiziert und anschließend mit 10 ng/mL Interferon- γ und 1 μ M Staurosporin für die angegebenen Zeiten behandelt. Die hergestellten nukleären Extrakte wurden für 15 min mit einer [32 P]-markierten M67-Sonde inkubiert und nach der Gelelektrophorese autoradiographisch im Vakuum-getrockneten Gel analysiert. Im Rahmen der Supershift-Reaktion wurden Anti-STAT1 α -Antikörper (α S1) und Anti-STAT3-Antikörper (α S3)

verwendet. Die mit dem Pfeil markierten Banden zeigen die detektierten STAT1-DNA-Komplexe. Der Stern markiert unspezifische Banden.

3.8 STAT1-K550A und STAT1-K550E weisen eine verminderte Kinetik der Kernakkumulation auf

Im Folgenden wurde geprüft, ob sich STAT1-K550A und STAT1-K550E auch hinsichtlich ihrer Interferon- γ -induzierten Kernakkumulation von STAT1-WT differenzieren. Für die fluoreszenzmikroskopische Detektion von GFP-Fusionsproteinen wurden HeLa-S3-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP transfiziert. Einen Tag später erfolgte entweder eine 45-minütige Stimulation mit 10 ng/mL IFN γ , eine der IFN γ -Stimulation folgende Staurosporin-Inhibition für 1h oder die Zellen blieben unbehandelt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, nach vorangegangener Fixierung der Zellen sowie Einfärbung der Zellkerne, sind in **Abb. 3.9** gezeigt.

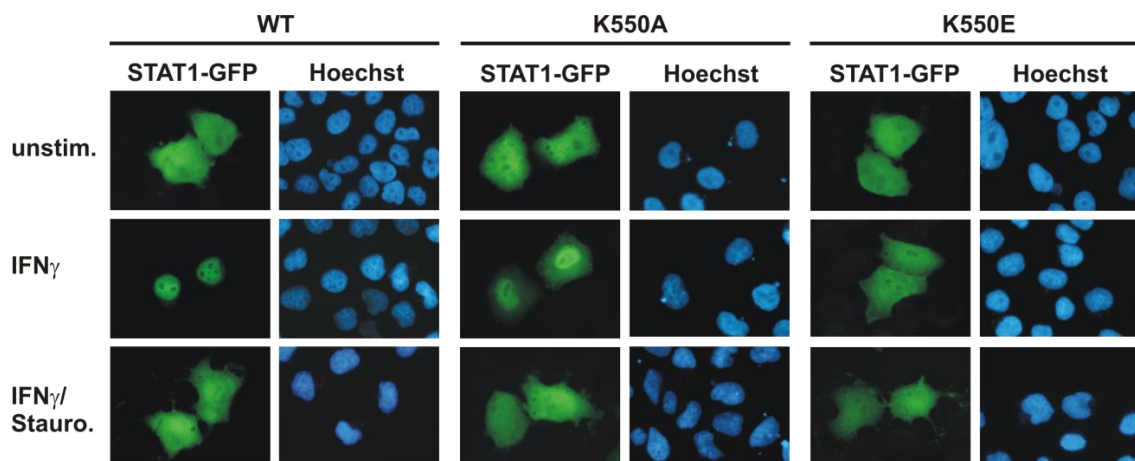


Abb. 3.9: Beeinträchtigte Kernlokalisierung der Punktmutanten gegenüber STAT1-WT. HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP transfiziert. Nach entsprechender Stimulation wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert sowie die Zellkerne mit Hoechst 33258 eingefärbt. Gezeigt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im unstimulierten Zustand (obere Reihe), nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation (mittlere Reihe) und nach 45-minütiger IFN γ -Inkubation mit anschließender Staurosporin-Behandlung (untere Reihe).

In **Abb. 3.9** weisen der Wildtyp sowie die Punktmutanten im unstimulierten Zustand ein panzelluläres Verteilungsmuster der STAT1-Moleküle auf. Eine 45-minütige IFN γ -

Stimulation führt bei STAT1-WT zu einer kompletten Kernakkumulation, während STAT1-K550A neben der Lokalisation von STAT1-Molekülen im Zellkern auch noch eine verbleibende Restfluoreszenz im Zytoplasma aufweist. Bei STAT1-K550E ist hingegen nach der IFN γ -Inkubation kaum eine Änderung der nukleozytoplasmatischen Ruheverteilung zu erkennen. Nach der Staurosporin-Behandlung ist durch den Zusammenbruch der Kernakkumulation bei allen STAT1-Derivaten wieder eine panzelluläre Verteilung detektierbar.

3.9 Verminderte Affinität der DNA-Bindung von STAT1-K550A bei mit dem Wildtyp vergleichbarer Dissoziationskinetik

Aus den bisherigen Experimenten geht hervor, dass STAT1-K550A, ebenso wie die entsprechende Glutamatsubstitution, nach vorheriger Interferon- γ -Stimulation eine Hypophosphorylierung sowie eine kompromittierte STAT1-DNA-Komplexbildung und eine verminderte Kernakkumulation aufweist. Zur Untersuchung der beeinträchtigten DNA-Bindung der Punktmutante wurden weitere Gelshift-Assays durchgeführt. Dazu wurden zellulären Extrakte von STAT1-WT-GFP- sowie STAT1-K550A-GFP-exprimierenden U3A-Zellen nach IFN γ -Stimulation mit verschiedenen [32 P]-markierten DNA-Sonden inkubiert. Eingesetzt wurden eine radioaktiv markierte Sonde mit doppelter GAS-Bindestelle (2xGAS) und eine Sonde mit einfacher gefolgt von einer degenerierten GAS-Bindestelle (GASnonGAS).

Zur Durchführung des elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays wurden die entsprechend transfizierten U3A-Zellen für 45 min mit IFN γ stimuliert. Die daraus hergestellten nukleären Extrakte wurden in unterschiedlichen Ansätzen für 15 min mit den radioaktiv markierten Sonden inkubiert und im Anschluss elektrophoretisch mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Ergebnis der autoradiographischen Detektion ist **Abb. 3.10** zu entnehmen. Sowohl unter Verwendung einer 2xGAS-Sonde wie auch einer GASnonGAS-Sonde zeigt STAT1-WT ein stärkeres Signal.

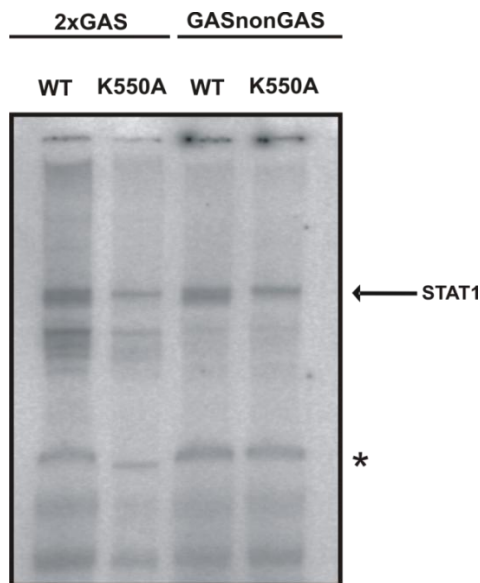


Abb. 3.10: Verminderte DNA-Bindeaffinität von STAT1-K550A. U3A-Zellen wurden mit den angegebenen GFP-Plasmiden transfiziert und am Folgetag für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert. In Gelshift-Assay wurden nukleäre Extrakte mit den angegebenen [32 P]-markierten Sonden inkubiert. Die autoradiographische Auswertung fand nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Vakuum-getrockneten Gelen statt. Der Pfeil zeigt auf STAT1-DNA-Komplexe; der Stern markiert unspezifische Banden.

Das Gelshift-Experiment wurde unter ähnlichen Versuchsbedingungen wiederholt. Hierbei wurde neben der 2xGAS- und der GASnonGAS-Sonde eine weitere radioaktiv markierte Sonde verwendet, die zwei degenerierte GAS-Bindestellen (2xnonGAS) besaß. Des Weiteren wurden die Zellen 30 min mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H $_2$ O $_2$ vorinkubiert. Nach 45-minütiger Stimulation mit IFN γ wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und diese in unterschiedlichen Ansätzen zu 15 min mit den radioaktiv markierten Sonden inkubiert. **Abb. 3.11** zeigt, dass STAT1-WT und STAT1-K550A die unterschiedlich affinen Sonden mit ähnlicher Affinität binden. Die K550A-Mutante ist außerdem in gleicher Weise wie das Wildtyp-Molekül zur Tetramerisierung befähigt.

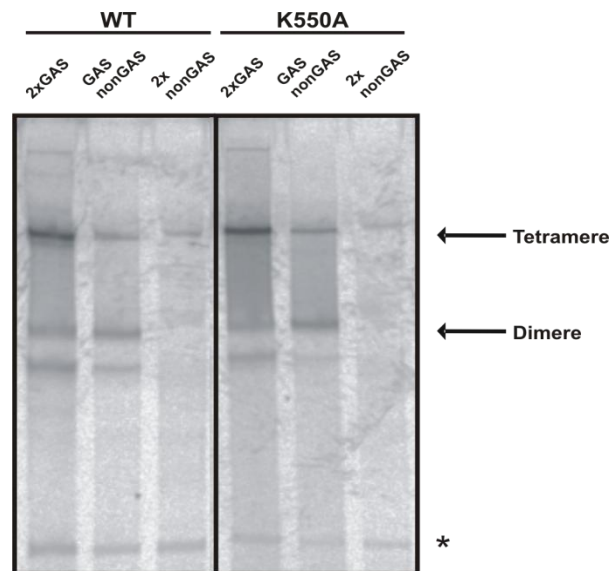


Abb. 3.11: DNA-Bindeaffinität von STAT1-K550A- und -WT-exprimierenden Zellen nach Vanadatexposition. Nach Transfektion der U3A-Zellen mit den entsprechenden pEGFP-N1-Plasmidderivaten wurden die Zellen am Folgetag für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend für 30 min mit Vanadat/H $_2$ O $_2$ inkubiert. Die Zellextrakte wurden anschließend mit den angegebenen [32 P]-markierten Sonden inkubiert. Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte die autoradiographische Auswertung. Die Tetramer-gebundenen STAT1-DNA-Komplexe zeigt der obere Pfeil, die dimeren DNA-gebundenen Komplexe sind durch den unteren Pfeil dargestellt. Der Stern markiert unspezifische Banden.

Durch die Vorinkubation der Zellen mit Vanadat/H $_2$ O $_2$ konnte die gleiche DNA-Bindeaffinität erreicht werden. Eine mögliche Ursache für die reduzierte Bindeaffinität in **Abb. 3.10** könnte daher die im Western-Blot dargestellte Hypophosphorylierung der STAT1-K550A-Mutante (**Abb. 3.6**) sein. Ebenso könnte die verminderte DNA-Bindung auf eine erhöhte Off-Rate von DNA zurückgeführt werden. Um dies zu überprüfen, wurde in einem weiteren Gelretardationsexperiment die Dissoziationskinetik der DNA-Bindung analysiert. Dazu wurde im Vergleich zum Wildtyp neben STAT1-K550A auch die Punktmutante STAT1-K550E untersucht. Die mit den entsprechenden GFP-Plasmiden transfizierten U3A-Zellen wurden mit 10 ng/mL IFN γ und zusätzlich mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H $_2$ O $_2$ inkubiert, um die STAT1-Mutanten auf das gleiche Phosphorylierungsniveau wie den Wildtyp zu bringen. Nach 15-minütiger Vorinkubation mit [32 P]-markierter M67-Sonde wurden die Gesamtzellextrakte für die angegebenen Zeiten mit nicht-radioaktiver M67-DNA im 750-fachen Überschuss

kompetiert. Im Anschluss erfolgten die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und die autoradiographische Detektion. Aus **Abb. 3.12** geht hervor, dass STAT1-WT sowie beide Punktmutanten eine ähnliche Dissoziationskinetik aufweisen. Dadurch konnte eine erhöhte Off-Rate als Ursache der verminderten DNA-Bindung von STAT1-K550A ausgeschlossen werden. Die kompromittierte DNA-Bindeaffinität (**Abb. 3.10**) der Punktmutanten lässt sich daher auf die verminderte Phosphorylierung zurückführen.

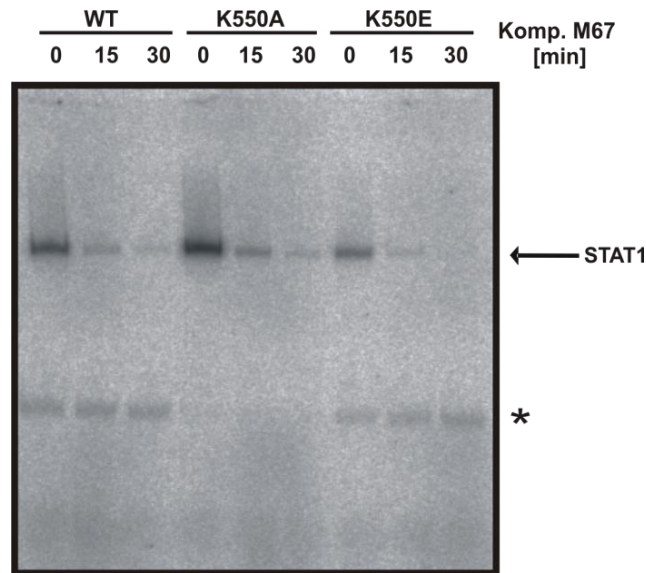


Abb. 3.12: Ähnliche Dissoziationskinetik von STAT1-K550A und STAT1-K550E gegenüber STAT1-WT. Der Abbildung ist das Ergebnis des Gelshift-Assays zu entnehmen. Nach der Transfektion mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A bzw. pSTAT1-K550E und der Stimulation mit IFN γ und Vanadat/H $_2$ O $_2$ wurden aus U3A-Zellen Gesamtzellextrakte gewonnen. Diese wurden für 15 min mit radioaktiv markierter M67-Sonde, die eine einfache GAS-Bindestelle besaß, behandelt und anschließend für die angegebenen Zeiten mit unmarkierter M67-DNA im Überschuss inkubiert. Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Autoradiogramm erstellt, in welchem die STAT1-DNA-Banden (Pfeil) zu erkennen sind. Der Stern kennzeichnet unspezifische Banden.

3.10 STAT1-K550A zeigt eine normale kooperative DNA-Bindung

In einem weiteren EMSA-Experiment wurde die Befähigung zur kooperativen DNA-Bindung der STAT1-K550A-Punktmutante analysiert. Um die Fähigkeit der Tetramerbildung zu überprüfen, wurde eine [32 P]-markierte DNA-Sonde mit zweifacher GAS-Bindestelle in Tandem-Stellung verwendet. Anschließend konnte durch Kompe-

tition mit 750-fachem Überschuss an unmarkierter M67-Sonde der Nachweis einer kooperativen DNA-Bindung des tetrameren Komplexes erbracht werden. Durch die Hinzugabe der unmarkierten Sonde im Überschuss wurden die weniger stabilen STAT1-Dimere von der DNA abgelöst, während stabilere Tetramere weiterhin nachweisbar blieben.

Mit pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-K550A-GFP transfizierte U3A-Zellen wurden 45 min mit 10 ng/mL IFN γ präinkubiert und anschließend zur verstärkten Signaldetektion für 30 min mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H $_2$ O $_2$ behandelt. Nach 15-minütiger Inkubation der nukleären Extrakte mit der radioaktiv markierten Sonde (2xGAS) wurden die Reaktionsansätze für weitere 30 min mit einem 750-fachen Überschuss an unmarkierter M67-DNA inkubiert oder sie blieben unbehandelt. In **Abb. 3.13** sind nach autoradiographischer Detektion Dimer- und Tetramer-Banden anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel zu unterscheiden. STAT1-WT und STAT1-K550A sind beide befähigt, sowohl als Dimere an eine der beiden GAS-Stellen wie auch als Tetramere an die doppelte GAS-Stelle zu binden. Nach 30-minütiger Konkurrenz sind bei beiden STAT1-Derivaten nur noch Tetramerbanden aufgrund der kooperativen DNA-Bindung nachweisbar. Diese Beobachtung wird bei STAT1-WT und bei STAT1-K550A gleichermaßen registriert und bestätigt, dass bei der Punktmutante kein Tetramerisierungsdefekt vorliegt.

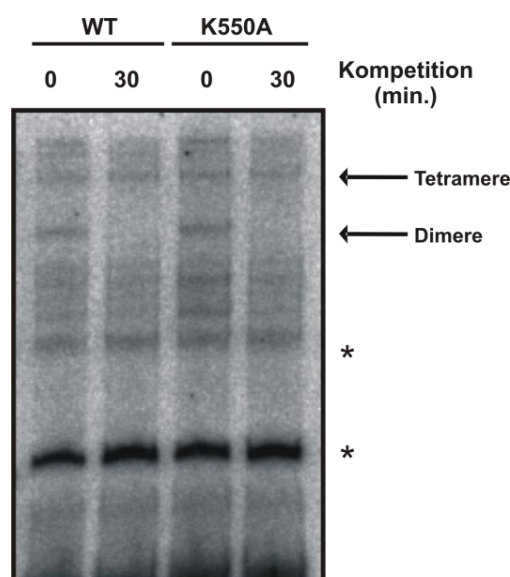


Abb. 3.13: Für STAT1-K550A wird kein Defekt der kooperativen DNA-Bindung registriert. U3A-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-K550A-GFP transfiziert

und am Folgetag für 45 min mit $\text{IFN}\gamma$ sowie für 30 min mit Vanadat/ H_2O_2 behandelt. Die nukleären Extrakte wurden für 15 min mit radioaktiv markierter 2xGAS-Sonde inkubiert und, falls nicht anders angegeben, nachfolgend für 30 min mit einem 750-fachen Überschuss unmarkierter M67-DNA inkubiert. Nach autoradiographischer Detektion der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine sind die Tetramer-gebundenen STAT1-DNA-Komplexe (oberer Pfeil) und die dimeren Komplexe (unterer Pfeil) zu unterscheiden. Unspezifische Banden sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.11 Durch Behandlung von STAT1-K550A und STAT1-K550E mit Vanadat kann die verminderte Phosphorylierung kompensiert werden

Eine mögliche Ursache für die beobachtete Hypophosphorylierung der Mutanten stellt ein prinzipieller Phosphorylierungsdefekt dar. Um auszuschließen, dass ein Defekt der Phosphorylierung vorliegt, wurden nachfolgende Experimente durchgeführt. Durch Zugabe von Vanadat und die dadurch erreichte Inhibition der zuständigen Phosphatasen wurde ausgenutzt, dass die STAT1-Dephosphorylierung gehemmt wird. Mittels Western-Blot-Analyse konnten somit die beiden Punktmutanten hinsichtlich ihrer Tyrosinphosphorylierung nach Vanadat-Zugabe mit dem STAT1-WT verglichen werden. STAT1-WT-GFP-, STAT1-K550A-GFP- oder STAT1-K550E-GFP-exprimierende HeLa-S3-Zellen blieben entweder unbehandelt, wurden für 45 min mit 10 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ stimuliert oder für 45 min mit $\text{IFN}\gamma$ und anschließend für 30 min mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H_2O_2 inkubiert. Die Detektion des Phosphorylierungssignals mithilfe eines Phospho-STAT1-Antikörpers erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine. Zur Bestätigung gleicher STAT1-Mengen wurde der Reblot mittels eines STAT1-spezifischen Antikörpers erstellt. Wie aus **Abb. 3.14** erkenntlich wird, ist bei allen STAT1-Derivaten in den jeweiligen unstimulierten Extrakten keine STAT1-Phosphorylierung nachweisbar. Nach 45-minütiger Interferon- γ -Stimulation wurde bei STAT1-WT eine deutliche Phosphorylierungsbande detektiert, die im Falle der Punktmutanten entsprechend schwächer registriert wurde. Interessanterweise zeigten STAT1-K550A und STAT1-K550E nach 30-minütiger Vanadat-Exposition ein ähnliches Phosphorylierungssignal wie der STAT1-WT.

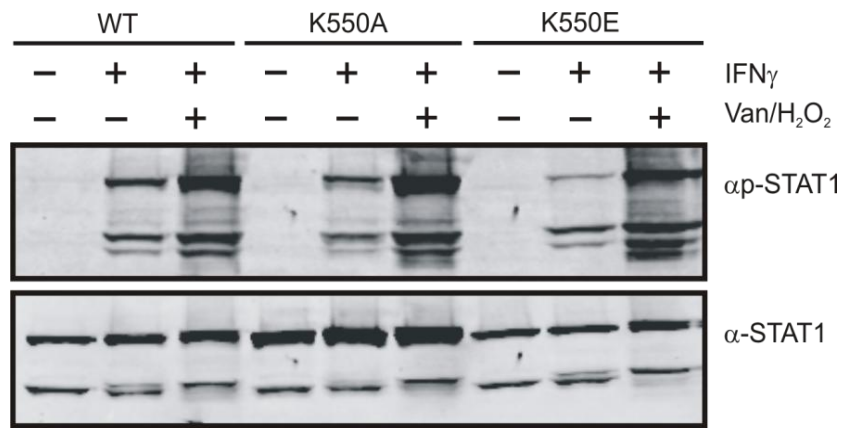


Abb. 3.14: Vanadat-induzierte Hyperphosphorylierung von STAT1-WT, STAT1-K550A und STAT1-K550E. Mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP transfizierte HeLa-S3-Zellen blieben entweder unbehandelt, wurden für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert oder nach 45-minütiger IFN γ -Inkubation für 30 min mit 0,8 mM Vanadat/ 0,2 mM H $_2$ O $_2$ behandelt. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zeigt in der oberen Abbildung die Phosphorylierungsbanden nach der Inkubation mit einem Phospho-STAT1-Antikörper. Der Reblot wurde mithilfe eines STAT1-spezifischen Antikörpers erstellt und ist auf dem unteren Bild dargestellt.

Durch Hemmung der Phosphatase lässt sich für beide Mutanten eine Hyperphosphorylierung induzieren (**Abb. 3.14**). Daher kann bei STAT1-K550A und STAT1-K550E kein prinzipieller Phosphorylierungsdefekt vorliegen. Zur weiteren Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die DNA-Bindung nach Vanadat-Inkubation mittels EMSA-Experimenten überprüft. Dazu wurden U3A-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP transfiziert. Nachfolgend blieben die Zellen entweder unbehandelt, wurden für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert oder nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation anschließend für 30 min mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H $_2$ O $_2$ inkubiert. Der Herstellung von Gesamtzellextrakten schloss sich eine 15-minütige Inkubation mit einem 750-fachen Überschuss an [32 P]-markierter M67-Sonde an. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Banden autoradiographisch erfasst (**Abb. 3.15**). Nach 30-minütiger Vanadat-Behandlung ist eine deutliche Zunahme des DNA-gebundenen Anteils von STAT1-K550A und STAT1-K550E zu erkennen.

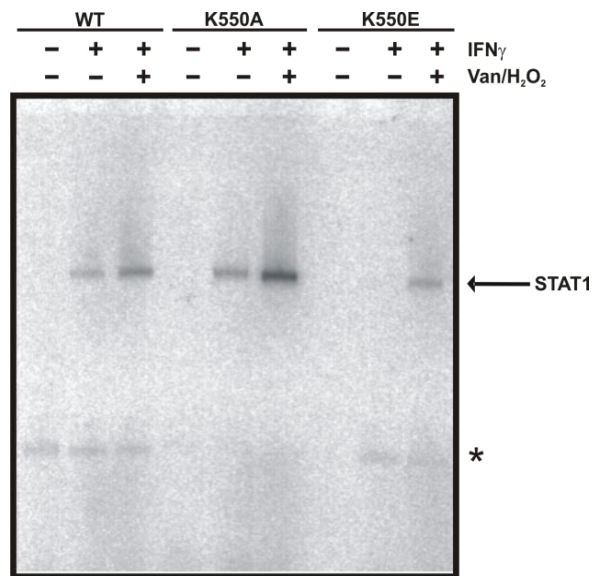


Abb. 3.15: Zunahme der DNA-Bindeaffinität nach Vanadat-Zugabe. STAT1-WT-GFP-, -K550A-GFP- und -K550E-GFP-exprimierende U3A-Zellen wurden mit 10 ng/mL Interferon- γ stimuliert, mit IFN γ alleine oder in Kombination mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM H $_2$ O $_2$ inkubiert oder sie blieben unbehandelt. Nach 15-minütiger Inkubation mit [32 P]-markierter M67-Sonde wurden die Gesamtzellextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Pfeil zeigt die autoradiographisch detektierten STAT1-DNA-Komplexe an. Der Stern markiert unspezifische Banden.

Die in **Abb. 3.14** dargestellte induzierbare Hyperphosphorylierung wurde in einem weiteren EMSA-Experiment bei gleichen Versuchsbedingungen unter Verwendung von HeLa-S3-Zellen überprüft. Anhand der Auswertung des Autoradiogramms (**Abb. 3.16**) wird deutlich, dass die DNA-Bindung von STAT1-K550A durch Vanadat-Inkubation zugenommen hat. Durch Verwendung von HeLa-S3-Zellen konnten neben der Bildung von STAT1-GFP-Homodimeren ebenfalls endogene STAT1/STAT1-Homodimere sowie STAT1-GFP/STAT1-Heterodimere registriert werden. Zur Identifizierung der detektierten Banden wurden die Gesamtzellextrakte in einer Supershift-Reaktion mit einem Anti-STAT1 α -Antikörper (α S1) bzw. einem Anti-STAT3-Antikörper (α S3) inkubiert. Die Änderung im Laufverhalten identifiziert diese Banden als STAT1-DNA-Komplexe. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die beobachtete Hyperphosphorylierung und die damit verbundene Zunahme der DNA-Bindeaffinität nach Vanadat-Zugabe nicht vom verwendeten Zelltyp abhängig sind.

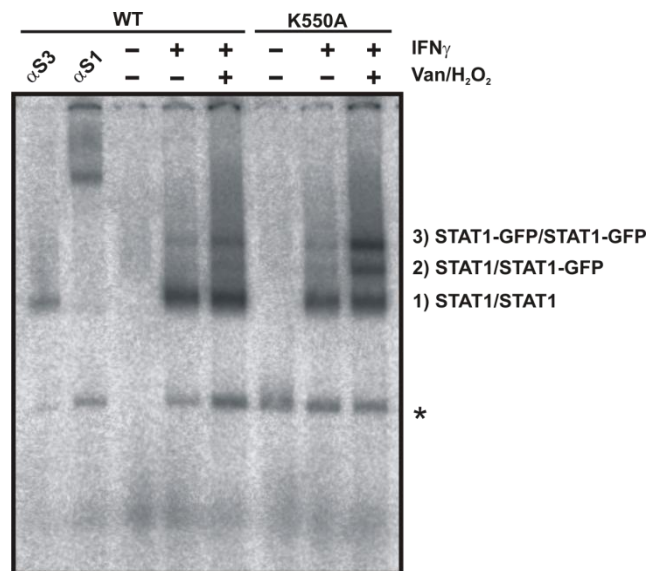


Abb. 3.16: Vanadat-induzierte Hyperphosphorylierung von STAT1-K550A. HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP und pSTAT1-K550A-GFP transfiziert. Nachfolgend blieben sie unbehandelt, wurden für 45 min mit IFN γ stimuliert oder nach 45-minütiger IFN γ -Behandlung für 30 min mit Vanadat/H $_2$ O $_2$ inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation mit einer [32 P]-markierten M67-Sonde wurden die Reaktionsgemische gelelektrophoretisch aufgetrennt und Autoradiogramme von den Vakuum-getrockneten Gelen erstellt. Die Position 1) markiert endogene STAT1/STAT1-Homodimere, 2) zeigt STAT1-GFP-Heterodimere mit endogenem STAT1 und 3) STAT1-GFP-Homodimere. Für die Supershift-Reaktion wurden Anti-STAT1 α -Antikörper (α S1) und Anti-STAT3-Antikörper (α S3) verwendet. Der Stern markiert unspezifische Banden.

3.12 Vanadat-Behandlung verbessert die IFN γ -induzierte Kernakkumulation von STAT1-K550A und STAT1-K550E

Nachdem durch Vanadat-Zugabe eine vollständige Kompensation der Hypophosphorylierung erreicht wurde, wurde im nächsten Schritt die Auswirkung der Vanadat-Induktion auf die verminderte Kernakkumulation der Punktmutanten nach IFN γ -Stimulation untersucht. Es wurde angenommen, dass auch die kompromittierte Kernlokalisation von mutierten Proteinen durch Vanadat kompensiert werden kann. Um dies zu überprüfen, wurden mithilfe von GFP-Fusionsproteinen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von STAT1-WT-GFP-, STAT1-K550A-GFP- und STAT1-K550E-GFP-exprimierenden HeLa-S3-Zellen angefertigt. Die Zellen wurden für 45 min mit IFN γ stimuliert und für die aufgeführten Zeiten mit 0,8 mM Vanadat/0,2 mM

H₂O₂ inkubiert. Im Anschluss wurden sie mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt. In der **Abb. 3.17** wird deutlich, dass Vanadat-Zugabe bei STAT1-K550A eine vollständige Kernakkumulation induziert, sodass nach 60-minütiger Vanadat-Inkubation keine zytoplasmatische Restfluoreszenz mehr detektierbar ist. Für STAT1-K550E wurde ebenfalls ein Anstieg der Kernlokalisierung registriert. Durch die Restfluoreszenz im Zytoplasma ist bei STAT1-K550E allerdings zu erkennen, dass hier auch nach 60-minütiger Vanadat-Inkubation keine vollständige Kernakkumulation erreicht wird.

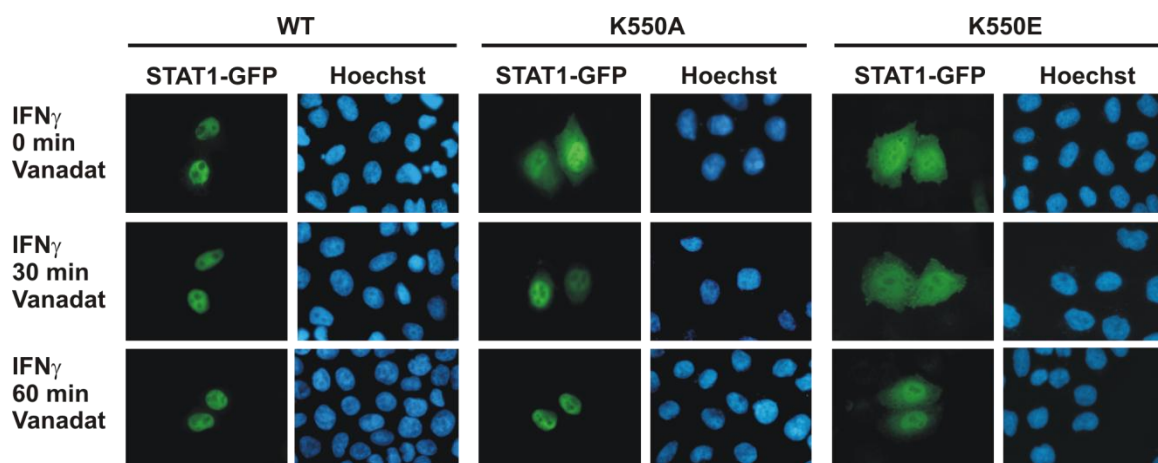


Abb. 3.17: Vanadat-Behandlung steigert die Kernlokalisierung von STAT1-K550A und STAT1-K550E. HeLa-S3-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP transfiziert. Sechzehn bis vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen für 45 min mit Interferon- γ inkubiert (obere Reihe) und nachfolgend für 30 min (mittlere Reihe) oder für 60 min (untere Reihe) mit Vanadat/H₂O₂ behandelt. Nach der Fixierung der Zellen mit 3,7% Formaldehyd/PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

3.13 STAT1-K550A zeigt eine veränderte Dephosphorylierungskinetik

Durch die bisherigen Vanadat-Versuche und die damit vermittelte Hemmung der Phosphatase konnte gezeigt werden, dass sich bei STAT1-K550A und STAT1-K550E eine vollständige Phosphorylierung induzieren lässt und somit kein genereller Phosphorylierungsdefekt vorliegen kann. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete Hypophosphorylierung (**Abb. 3.6 und Abb. 3.7**) auf eine verstärkte Dephosphorylierung zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu beweisen wurde im

Folgendes von STAT1-K550A und STAT1-K550E ein *In-vitro*-Dephosphorylierungs-Assay durchgeführt. Die STAT1-WT-GFP-, STAT1-K550A-GFP- oder STAT1-K550E-GFP-exprimierenden U3A-Zellen wurden 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert. Nach Herstellung der Gesamtzellextrakte erfolgte eine Inkubation bei 30°C mit TC-Protein-Tyrosin-Phosphatase für die angegebenen Zeiten, wodurch eine Dephosphorylierung induziert wurde. Die Western-Blot-Analyse schloss sich der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese an. Durch Behandlung mit einem Phospho-STAT1-Antikörper wurden im Immunoblot die Phosphorylierungsbanden detektiert. Zur Bestimmung der STAT1-Menge wurde nach stringentem Waschen der Reblot mit einem pan-STAT1-Antikörper entwickelt. In **Abb. 3.18** ist das Ergebnis der *In-vitro*-Dephosphorylierung dargestellt. Mit zunehmender TC-PTP-Inkubationsdauer nimmt das Phosphorylierungssignal bei STAT1-K550A und STAT1-K550E stärker ab als bei STAT1-WT. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei STAT1-K550A und STAT1-K550E um Dephosphorylierungsmutanten handelt.

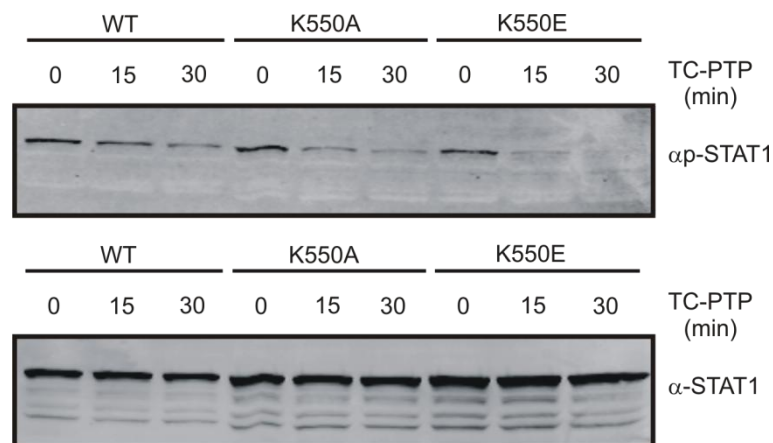


Abb. 3.18: Verstärkte Abnahme des Phosphorylierungssignals bei STAT1-K550A und STAT1-K550E. U3A-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP bzw. pSTAT1-K550E-GFP für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert und Gesamtzellextrakte gewonnen. Nach der Inkubation mit der Tyrosin-Phosphatase TC-PTP bei 30°C für die angegebenen Zeiten erfolgte die Überprüfung der Dephosphorylierungsreaktionen mittels Western-Blot-Analyse. Die Abbildung zeigt im oberen Bild die Behandlung mit einem Phospho-STAT1-Antikörper und auf dem unteren Bild den Reblot nach Inkubation mit einem Pan-STAT1-Antikörper.

3.14 Die *In-vitro*-Genaktivierung von STAT1-K550A und STAT1-K550E ist vermindert

Zur Prüfung der Genaktivierung von STAT1-K550A und STAT1-K550E im Vergleich zu STAT1-WT wurde ein Reporteragen-Assay angewandt. Hierfür wurde ein synthetischer Luciferase-Reporter verwendet, der in Tandem-Position drei GAS-Bindestellen besaß. Nach der Transfektion mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP, den Reportern pGAS3xLy6E und p β -Galaktosidase wurden die U3A-Zellen für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ inkubiert oder unstimuliert belassen. Aus den Zellextrakten wurde die Luciferase-Aktivität photometrisch bestimmt und anschließend auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert. **Abb. 3.19** zeigt, dass beide Punktmutanten eine verminderte Genaktivierung im Vergleich zum Wildtyp-Molekül aufweisen. Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-K550E ist dabei noch deutlich stärker kompromittiert als die von STAT1-K550A. Das verminderte Phosphorylierungsniveau und die daraus resultierende beeinträchtigte DNA-Affinität führen erwartungsgemäß zu einem eindeutigen Defizit der *In-vitro*-Genaktivierung.

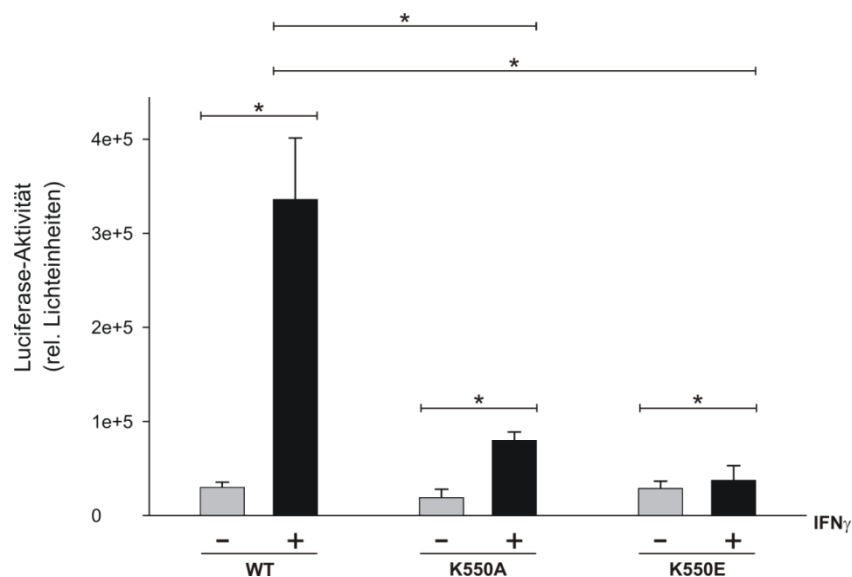


Abb. 3.19: Verminderte transkriptionelle Aktivität von STAT1-K550A und STAT1-K550E im Luciferase-Reporteragen-Assay. U3A-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP sowie mit den Reporteragenkonstrukten pGAS3xLy6E und p β Gal transfiziert und nachfolgend für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ inkubiert (schwarzer Balken) oder sie blieben unstimuliert (grauer Balken). Die photometrisch erfasste Luciferase-Induktion wurde auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert. Es wurden jeweils Sechsfach-

Bestimmungen vorgenommen sowie daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Signifikante Unterschiede in den Messwerten zwischen den angegebenen Gruppen wurden mit einem Stern markiert.

Zur Bestätigung der verminderten *In-vitro*-Genaktivierung wurden STAT1-K550A und STAT1-K550E in weiteren Reporter-Gen-Assays unter Verwendung von nativen Promotoren mit singularer GAS-Bindestelle untersucht. Hierbei fanden das Reporter-Gen pIC-339 mit einem trunkierten Promotor des ICAM-1-Gens und das Reporter-Gen pIC-1352, welches für den Volle-Länge-Promotor des ICAM-1-Gens kodiert, Anwendung. U3A-Zellen wurden diesbezüglich mit den Vektoren pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP und darüber hinaus mit den Reportern pIC-339 oder pIC-1352 und p β Gal transfiziert. Es wurde eine Sechsfach-Bestimmung vorgenommen, bei welcher die Zellen für 6 h mit 10 ng/mL Interferon- γ stimuliert wurden oder unbehandelt blieben. Die gemessene Luciferase-Aktivität der Zellextrakte wurde auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert. **Abb. 3.20** macht deutlich, dass auch unter Verwendung von nativen Promotoren eine kompromittierte Genaktivierung der Punktmutanten STAT1-K550A und STAT1-K550E nach IFN γ -Stimulation beobachtet wird. Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-K550E ist in diesem Fall ebenfalls stärker vermindert als bei der Alanin-Mutante.

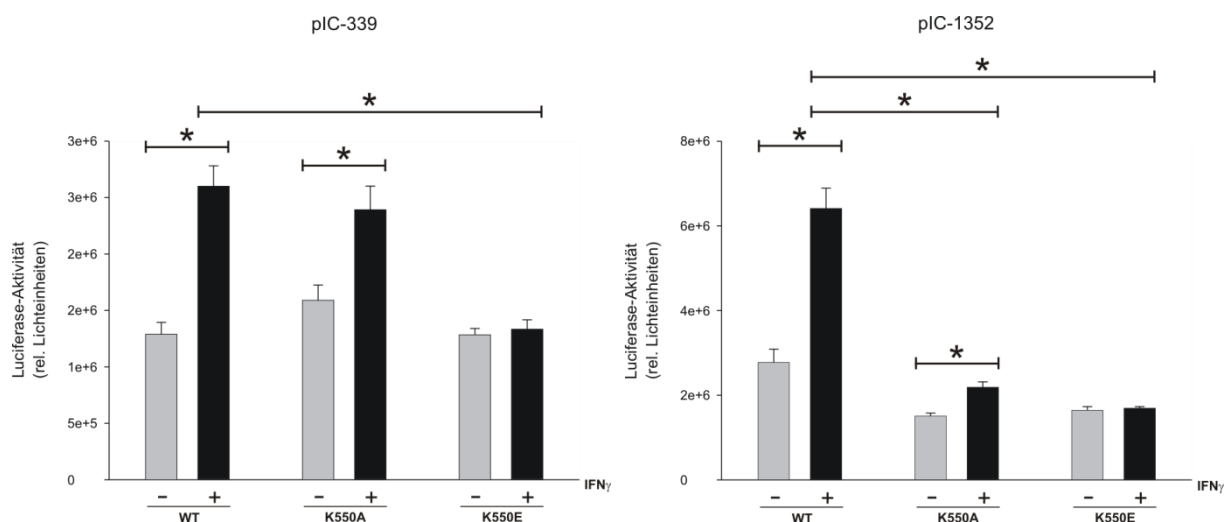


Abb. 3.20: Bestätigung der verminderten Genaktivierung unter Verwendung von nativen Promotorelementen. U3A-Zellen wurden mit den Plasmiden pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-K550A-GFP oder pSTAT1-K550E-GFP, den Vektoren pIC-339 oder pIC-1352 und p β Gal transfiziert. Sechzehn bis vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die

Zellen für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert (schwarzer Balken) oder sie blieben unbehandelt (grauer Balken). Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase-Induktion auf die β -Galaktosidase-Aktivität bezogen. Es wurde eine Sechsfach-Bestimmung vorgenommen. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf sechs unabhängige Transfektionen. Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit Balken angegebenen Gruppen.

3.15 Die Punktmutante K550A weist eine verminderte Expression bekannter STAT1-Zielgene auf

In dieser Arbeit wurde mithilfe der Real-time-PCR die Induktion von nativen STAT1-Zielgenen *in vivo* kontrolliert. Die Untersuchungen der Genexpression wurden im Rahmen einer Doppelbestimmung an vier literaturbekannten endogenen STAT1-Zielgenen vorgenommen, deren Aktivierung durch Interferon- γ -Stimulation induziert wird. In diesem Versuch wurde ausgenutzt, dass über die Messung der emittierten Fluoreszenzsignale eine direkte Aussage über die Menge an Target-DNA möglich war, da die Fluoreszenz proportional mit der Genexpression zugenommen hat. Zur Quantifizierung wurden die gemessenen Expressionsdaten der jeweiligen STAT1-Zielgene auf die Genexpression des Haushaltsgens *gapdh* normiert. Für die Real-time-PCR wurden U3A-Zellen mit den pcDNA-Konstrukten pSTAT1-WT oder pSTAT1-K550A transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen in serumarmen Kulturmedium mit 1% FCS kultiviert und am nächsten Tag für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert oder sie blieben unbehandelt. Aus den STAT1-exprimierenden U3A-Zellen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, dieses mit der Maßgabe, daraus die Genexpression mittels RT-PCR quantitativ bestimmen zu können.

Abb. 3.21 zeigt den Vergleich zwischen STAT1-WT und STAT1-K550A. Es ist zu erkennen, dass der Wildtyp nach Interferon- γ -Stimulation eine deutliche Zunahme der Induktion aller STAT1-Zielgene aufweist. Bei der Punktmutante wird trotz gleicher STAT1-Menge eine verminderte Genexpression detektiert.

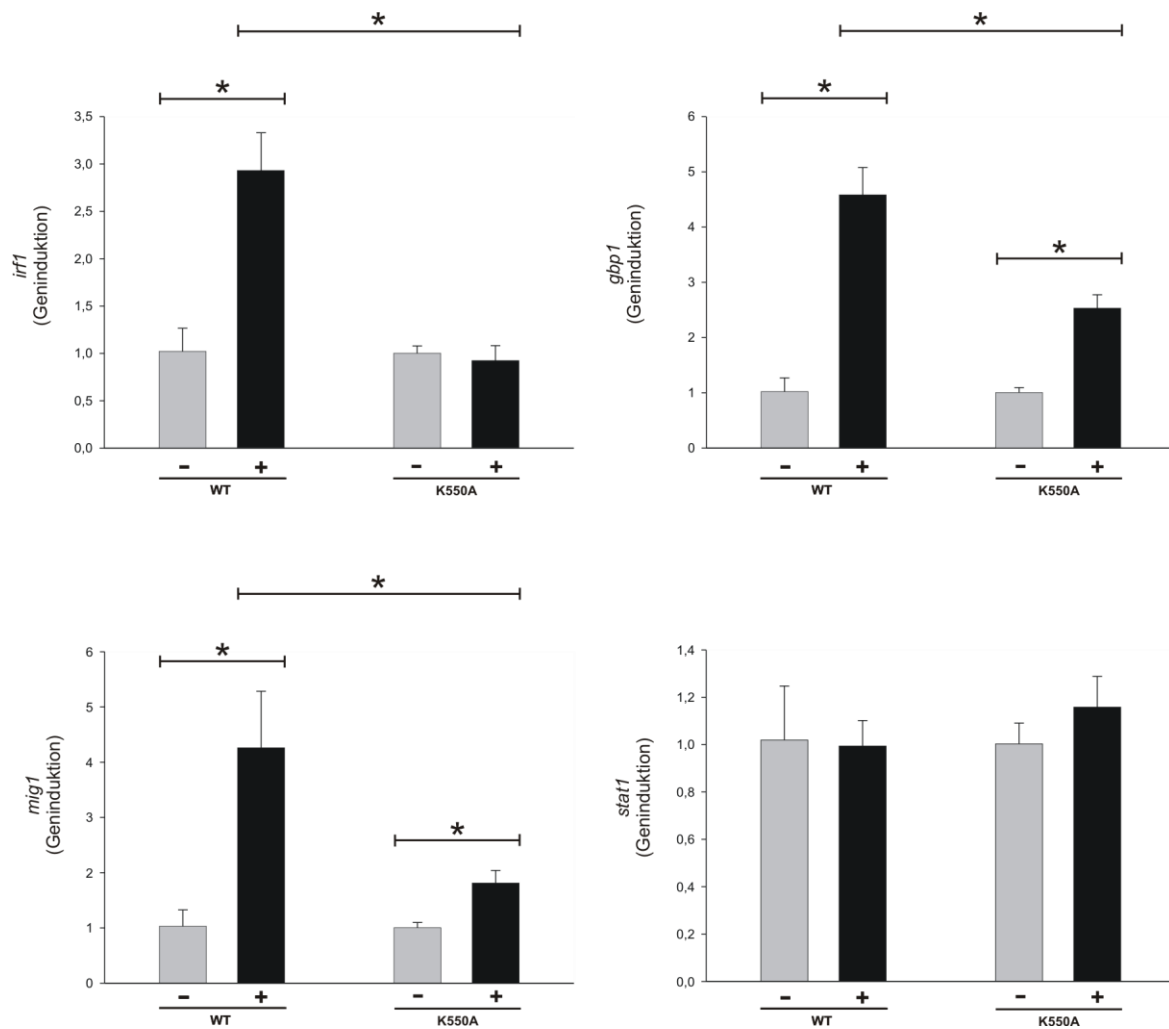


Abb. 3.21: Die Punktmutante K550A zeigt eine verminderte *In-vivo*-Genaktivierung. Die mit pSTAT1-WT oder pSTAT1-K550A transfizierten U3A-Zellen wurden nach der Transfektion in Nährmedium mit 1% FCS kultiviert. Die Zellen wurden am Folgetag für 6 h mit 10 ng/mL Interferon- γ (schwarzer Balken) stimuliert oder blieben unbehandelt (grauer Balken). Nach Extraktion der RNA aus den lysierten Zellen erfolgte die Herstellung der cDNA. Im Zuge der Real-time-PCR wurde die Genexpression von STAT1-Zielgenen ermittelt und auf die Induktion des Haushaltsgenes *gaphd* normiert. Im Rahmen von Doppelbestimmungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit Balken gekennzeichneten Gruppen werden mit Sternen angezeigt.

4. Diskussion

Der JAK-STAT-Signalweg stellt ein paradigmatisches Beispiel der intrazellulären Signalweiterleitung dar, bei der nach Rezeptorbindung von extrazellulären Botenstoffen Informationssignale direkt von der Zellmembran in den Zellkern weitergeleitet werden, um dort die Genexpression zu modulieren (Stark und Darnell 2012). In dieser Arbeit wurde die Rolle der Linker-Domäne von STAT1 in der IFN γ -induzierten Signaltransduktion experimentell neu evaluiert. Hierbei wurden durch sequenzspezifische Mutagenese verschiedene STAT1-Punktmutanten generiert, deren jeweilige Aminosäureaustausche in der DNA-Bindedomäne bzw. der Linker-Domäne liegen. Besonderes Interesse galt hierbei der Bestimmung des DNA-Bindevhaltens und der Tyrosindepshorylierung, die Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung der SH2-Phosphotyrosin-Interaktion erlauben. Durch Punktmutation eines strukturell wichtigen Lysinrestes im Zentrum der Linker-Domäne wurde dessen Einfluss auf die Amplitude der Signalweiterleitung getestet. Eine Vermutung war es, dass die Linker-Domäne über eine Stabilisierung der SH2-Phosphotyrosin-Interaktion für die Aktivierung Interferon-abhängiger Zielgene benötigt wird und dass die eingeführte Punktmutation die SH2-pTyr-Wechselwirkung moduliert.

Der Sequenzvergleich aller humanen STAT-Mitglieder identifizierte einen konservierten Lysinrest in Position 550 im STAT1-Molekül. In den ersten vier Mitgliedern der humanen STAT-Familie, STAT1 bis STAT4, befindet sich in der homologen Position ein positiv geladener Lysinrest und in STAT5b und STAT6 ist dort ein ebenfalls positiv geladener Argininrest lokalisiert (**Tab. 3.2**). In carboxyterminaler Orientierung zur Linker-Domäne ist die SH2-Domäne, deren Grundstruktur aus einer zentralen antiparallelen β -Faltblattstruktur (β B- β D) besteht, welche von zwei α -Helices (α A und α B) umgeben ist (Gao Q et al. 2004; Waksman et al. 1992). Der Argininrest in Position 602, der zur Erkennung der Phosphatgruppe des kontralateralen Monomers im parallelen STAT1-Dimer dient, ist für die Funktion der SH2-Domäne essentiell (Chen et al. 1998; Fu 1992; Shuai et al. 1993b).

Arginin 602 befindet sich im STAT1-Molekül im β B-Strang und ist in allen bisher bekannten SH2-Domänen konserviert. Der invariante Argininrest liegt am Boden einer Bindungstasche an der Oberfläche des STAT1-Proteins. Die Bindung der Phosphatgruppe wird neben der Interaktion zum Arg602 durch weitere Aminosäurereste stabi-

lisiert. Dazu gehören unter anderem die AS-Reste der Phosphat-bindenden Schleife, die zwischen dem β B- und β C-Strang lokalisiert sind (Chen et al. 1998; Kisseleva et al. 2002; Waksman et al. 1992). Nach der IFN γ -vermittelten Phosphorylierung eines kritischen Tyrosinrestes in Position 701 der STAT1-SH2-Domäne bilden tyrosinphosphorylierte STAT1-Monomere Homodimere aus. Die Dimerisierung erfolgt über reziproke SH2-Phosphotyrosin-Interaktionen der beteiligten Phospho-STAT1-Monomere. Um einen Kontakt zwischen dem Phosphotyrosin des einen Monomers und Arg602 des anderen Monomers herzustellen, müssen die beiden SH2-Domänen räumlich umorientiert werden (Chen et al. 1998; Shuai et al. 1993b, 1994).

Generell werden zwei verschiedene Konformationen der tyrosinphosphorylierten STAT-Dimere unterschieden. In der parallelen Konfiguration der Homodimere sind die SH2-Domänen in die gleiche Richtung orientiert. Diese Ausrichtung wird zur Rezeptor- und DNA-Bindung benötigt (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006). Nach Lösung von der DNA müssen tyrosinphosphorylierte STAT1-Dimere eine antiparallele Orientierung einnehmen, um von der TC45-Phosphatase erkannt und dephosphoryliert zu werden. STAT1-Proteine können nur im dephosphorylierten Zustand mithilfe von Transportmechanismen die Kernmembran überwinden (Meyer et al. 2003). In der antiparallelen Konformation zeigen die SH2-Domänen in entgegengesetzte Richtungen und die Stabilisierung erfolgt über ND:ND-Wechselwirkungen sowie über Interaktionen zwischen der Coiled-coil-Domäne mit der DNA-Bindedomäne (Mertens et al. 2006; Zhong et al. 2005).

In den hier vorgestellten Experimenten konnte eine reduzierte Genaktivierung für STAT1-K550A festgestellt werden. Die verminderte transkriptionelle Leistung gegenüber STAT1-WT wurde durch eigene *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuche bestätigt (**Abb. 3.19, 3.20** und **Abb. 3.21**). Die Ursache hierfür liegt zunächst in der Hypophosphorylierung der mutierten Proteine, die in Western-Blot-Versuchen erfasst wurde (**Abb. 3.6**). Die Hypophosphorylierung ist wohl auch der Grund für die reduzierte Bindungsaffinität an GAS-enthaltenden Sonden im Gelshift-Versuch (**Abb. 3.10**). Im Rahmen weiterer EMSA-Experimente konnte dagegen weder eine Änderung der kooperativen DNA-Bindung noch eine erhöhte Dissoziationsrate von STAT1-K550A im Vergleich zu STAT1-WT festgestellt werden (**Abb. 3.12** und **3.13**). Dagegen zeigen *In-vitro*-Dephosphorylierungs-Assays, dass die verminderte Phosphorylierung von STAT1-K550A die Folge einer beschleunigten Dephosphorylierungskinetik ist (**Abb. 3.18**).

Anhand der Hypophosphorylierung und der ihr kausal zugrundeliegenden erhöhten Dephosphorylierungsrate von STAT1-K550A wird deutlich, dass ein Ladungsaustausch in Position 550 im STAT1-Molekül mit der SH2-pTyr-Interaktion interferiert. Bei der Punktmutante STAT1-K550A liegt in Position 550 im STAT1-Molekül eine neutrale Ladung vor. Die in dieser Arbeit zusätzlich charakterisierte Mutante STAT1-K550E besitzt an der entsprechenden Position eine negative Ladung und zeigt in allen Versuchen einen noch prominenteren Phänotyp gegenüber der K550A-Mutante. Im direkten Vergleich zu STAT1-K550A zeigt STAT1-K550E neben der Hypophosphorylierung (**Abb. 3.7**) auch eine stärkere Reduktion der Genaktivierung (**Abb. 3.19** und **Abb. 3.20**).

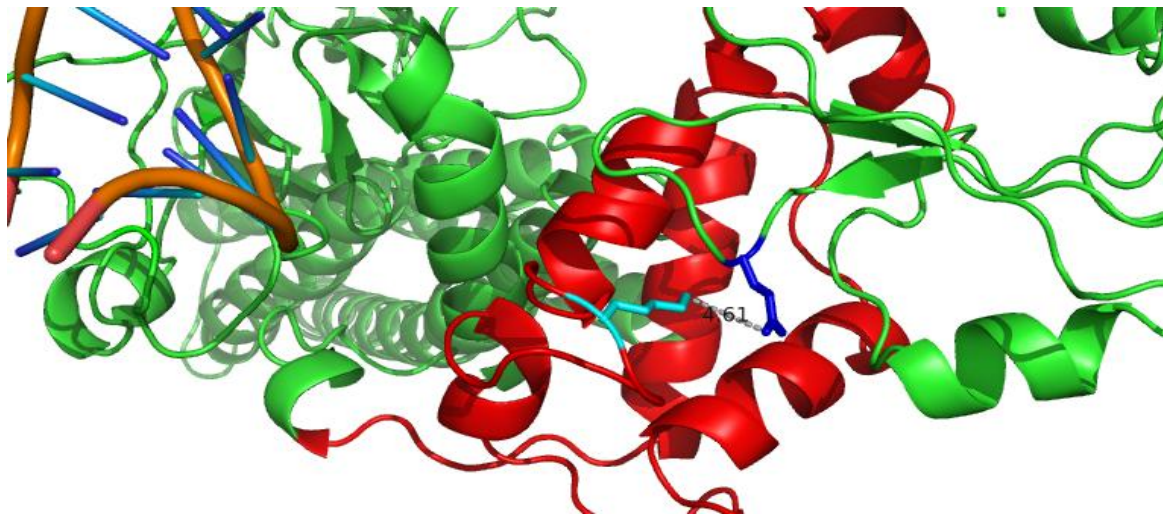


Abb. 4.1: Darstellung der Wechselwirkung von STAT1-K550 mit einem Glutaminsäurerest in Position 605. Abgebildet ist das DNA-gebundene STAT1-Monomer in grün mit der Linker-Domäne in rot. E605 ist in blau hervorgehoben und liegt 4,6 Å von dem Lysinrest in Position 550 entfernt, welcher türkis markiert ist. Die Darstellung wurde mit PyMol mithilfe des PDB-Koordinatendatensatzes 1BF5 erstellt.

In der STAT1-Kristallstruktur wurde in struktureller Nähe zum Lys550 ein Glutamatrest in Position 605 registriert, welcher der SH2-Domäne zugeordnet werden kann. Der Abstand zwischen den beiden AS-Resten beträgt gerade 4.6 Å (**Abb. 4.1**). Glu605 ist wiederum nur 6.8 Å vom Argininrest in Position 602 entfernt (**Abb. 4.2**). Aufgrund des geringen räumlichen Abstandes zwischen Lys550 und Glu605 in der STAT1-Kristallstruktur werden Wechselwirkungen vermutet, die sich auch auf die SH2-pTyr-Bindung auswirken können. Der bei STAT1-K550A beobachtete Phänotyp

lässt eine Störung der SH2-Phosphotyrosin-Bindung vermuten. Wird mittels sequenzspezifischer Mutagenese eine negative Ladung in Position 550 eingeführt, ist die Beeinträchtigung der SH2-pTyr-Interaktion noch gravierender. Denkbar wäre, dass eine in Position 550 neu eingefügte negative Ladung den negativ geladenen Glutamatrest in Position 605 weiter in Richtung der Phosphat-bindende Schleife verschiebt, wodurch dieser stärker mit der Arg602-Phosphatbindung interferieren würde.

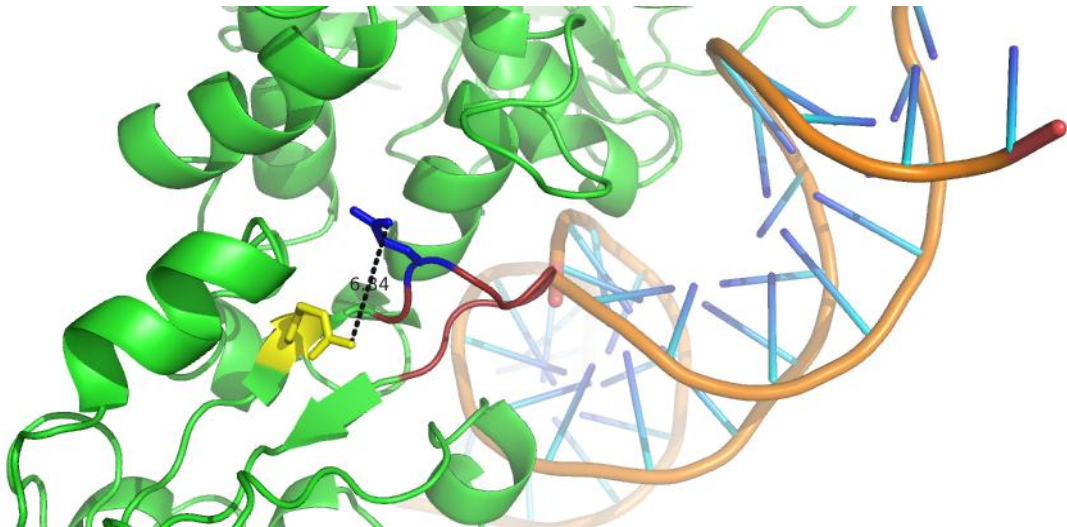


Abb. 4.2: Ausschnitt der STAT1-Kristallstruktur mit R602, E605 und der Phosphat-bindenden Schleife. In der DNA-gebundenen Form des STAT1-Monomers (grün) sind die AS-Reste R602 (gelb) und E605 (blau) sowie die Phosphat-bindende Schleife (dunkelrot) dargestellt. Der Abstand zwischen R602 und E605 ist mit 6,84 Å angegeben. Die Abbildung wurde mit PyMol mittels des PDB-Koordinatendatensatzes 1BF5 erstellt.

Die beeinträchtigte SH2-pTyr-Interaktion von STAT1-K550A und STAT1-K550E führt mutmaßlich zu einer Destabilisierung der parallelen Konformation. Die mutierten Proteine nehmen daher bevorzugt die antiparallele Konfiguration ein. Dadurch sind STAT1-K550A und STAT1-K550E ein bevorzugtes Substrat für die TC45-Phosphatase, wodurch sich die erhöhte Dephosphorylierungsrate erklären lässt (**Abb. 3.18**). Des Weiteren zeigen die mutierten Proteine eine verminderte Akkumulation im Nukleus (**Abb. 3.9**). Eine mögliche Ursache der verminderten Kernlokalisation könnte ein gestörter Kerntransport sein, denn zur Überwindung der Kernmembran müssen die phosphorylierten STAT-Dimere mit Importin- α 5 interagieren. Diese Interaktion wird über ein dimer-spezifisches NLS vermittelt, das nur in pa-

paralleler Konformation der phosphorylierten STAT1-Dimere zugänglich ist (Fagerlund et al. 2002; Melen et al. 2001; Meyer et al. 2002). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass durch eine Vanadat-induzierte Hemmung der Phosphatase (Huyer et al., 1997) eine deutliche Zunahme der Kernakkumulation sowie ein normales Phosphorylierungsniveau von STAT1-K550A und STAT1-K550E in Interferonvorbehandelten Zellen erreicht wird, das mit STAT1-WT vergleichbar ist (**Abb. 3.14** und **3.17**). Ein gestörter Transportmechanismus zur Überwindung der Kernmembran als Ursache der verminderten Kernakkumulation konnte durch diese Experimente somit ausgeschlossen werden. Die Kompensation der reduzierten Phosphorylierung nach Vanadat-Zugabe demonstriert außerdem, dass STAT1-K550A und STAT1-K550E keinen generellen Phosphorylierungsdefekt aufweisen.

Letztlich ist der charakterisierte Phänotyp von STAT1-K550A und STAT1-K550E wohl auf eine Destabilisierung der parallelen Dimer-Konformation zurückzuführen. Im Vergleich zum Wildtyp-Molekül zeigen beide Mutanten eine reduzierte Transkriptionsleistung auf artifiziellen Reportergenkonstrukten mit einer schrittweisen Abstufung gemäß der Ladung der Seitenkette (**Abb. 3.20**). Daraus wird deutlich, dass die flexible Einnahme der verschiedenen Dimer-Konformationen grundlegend für die Interferon-abhängige Signaltransduktion ist. Gleichwohl konnte durch die Analyse der STAT1-Punktmutanten auch die Anfälligkeit der SH2-pTyr-Interaktion durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure dargestellt werden.

Bei Betrachtung der STAT1-Kristallstruktur konnten zwei weitere Lysinreste (**Abb. 4.3**) identifiziert werden, die wie Lys550 einen geringen Abstand zum Glutamat in Position 605 aufweisen. Der Sequenzvergleich aller humanen STAT-Mitglieder zeigt, dass beide Lysinreste konserviert sind. Lys525 konnte dabei ebenfalls der Linker-Domäne von STAT1 zugeordnet werden, während Lys584 in der SH2-Domäne lokalisiert ist. Der Lysinrest in Position 525 der STAT1-Linker-Domäne liegt dabei auf einer anderen α -Helix als K550 und ist 3,1 Å vom Glutamatrest entfernt. Substitutionsexperimente identifizierten STAT1-K525A als Dephosphorylierungsmutante und konnten damit erstmalig die Beteiligung der Linker-Domäne an der Dephosphorylierung nachweisen (Staab 2011). Die K525A-Mutante zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie STAT1-K550A. Es wurde eine Hypophosphorylierung sowie eine verminderte Kernakkumulation und eine reduzierte Genexpression ermittelt. Ebenfalls konnte durch Vanadat-Exposition das Ausmaß der Phosphorylierung signifikant gesteigert

werden (Staab 2011). Der ausgeprägte Phänotyp von STAT1-K525A wurde ebenfalls auf eine Destabilisierung der parallelen Konformation zurückgeführt. In diesem Zusammenhang wurde über Wechselwirkungen zwischen Lys525 und der Phosphatbindenden Schleife hingewiesen. Andere Ursachen der verminderten Genaktivierung wie eine defekte Dimerisierung oder eine veränderte Dissoziationsrate konnten in weiteren Experimenten ausgeschlossen werden (Staab 2011). Der Lysinrest in Position 584 liegt in der SH2-Domäne von STAT1 und ist 6,3 Å vom Glu605 entfernt. Lys584 ist im Rahmen von kristallographischen Analysen von SH2-Domänen aufgefallen (Chen et al. 1998).

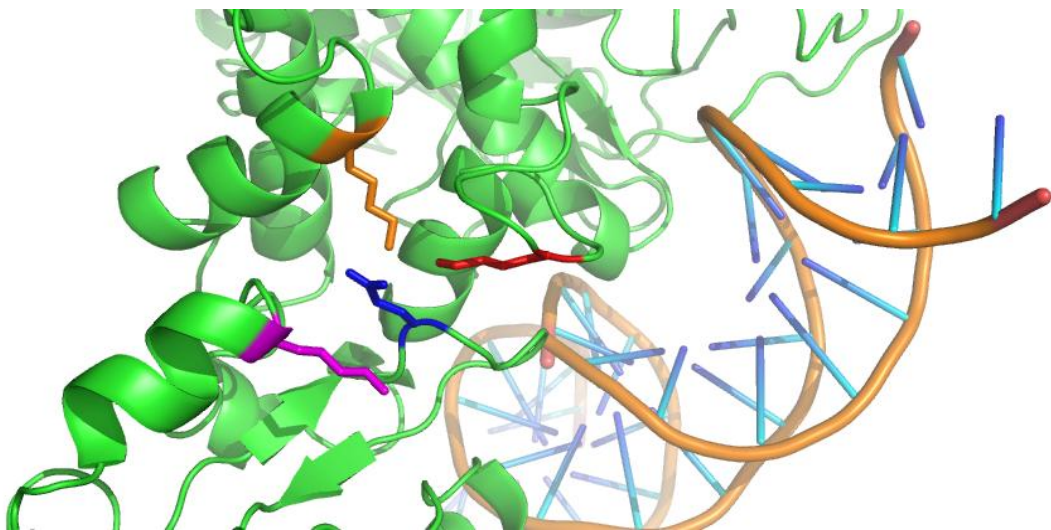


Abb. 4.3: STAT1-Kristallstruktur mit den AS-Resten K550, K525, K584 und E605. Im Ausschnitt des STAT1-Moleküls (grün) sind die Lysinreste K550 (rot), K525 (orange) und K584 (magenta) dargestellt. Diese befinden sich in unmittelbarer Nähe zum Glutamatrest E605 (blau). Die Abbildung wurde mithilfe von PyMol anhand des PDB-Koordinatensatzes 1BF5 erstellt.

Am Beispiel der Src-SH2-Domäne wurden im Vergleich zu anderen SH2-Domänen drei positiv geladene Aminosäurereste identifiziert, die in allen bekannten SH2-Domänen konserviert sind. Dabei handelt es sich um zwei Argininreste in Position 155 und 175 sowie einen Lysinrest in Position 203 der Src-Kinase, die wesentlich an der Bindung und Erkennung der Phosphatgruppe beteiligt sind (Waksman et al. 1992). Nach kristallographischer Darstellung von phosphorylierten STAT1-Dimeren an DNA und Sequenzanalysen konnte in der STAT-SH2-Domäne aber nur ein kon-

servierter Argininrest identifiziert werden. Dieser befindet sich in Position 602 im STAT1-Molekül. Es wird weiterhin angenommen, dass der konservierte Lysinrest in Position 584 im STAT1-Molekül ein Teil der Funktionen des fehlenden zweiten Argininrestes übernimmt (Chen et al. 1998). Interessant wäre jetzt festzustellen, ob durch sequenzspezifische Mutagenese in Position 584 im STAT1-Molekül ein ähnlicher Phänotyp wie bei STAT1-K550A und STAT1-K525A beobachtet werden kann.

Allgemein betrachtet zeichnen sich SH2-Domänen durch einen einheitlichen strukturellen Aufbau von annähernd 100 Aminosäureresten aus, die Phosphotyrosinmotive erkennen und an sie binden können. Die Grundstruktur besteht, wie bereits erwähnt, aus einem zentralen antiparallelen β -Faltblattmotiv, das von einer α -helikalen Struktur ($\alpha\beta\beta\beta\alpha$) eingerahmt wird (Chen et al. 1998; Waksman et al. 1992). Durch eingehende Analysen der Sekundärstruktur wurden Variationen dieser Grundstruktur identifiziert, die strukturelle Unterschiede zwischen der STAT- und der Src-SH2-Domäne deutlich machen. In der SH2-Domäne der Src-Kinase wurde beispielsweise ein zusätzlicher β -Strang nachgewiesen, der als β E oder β E-F bezeichnet wird und für die Phosphotyrosin-Erkennung der Src-Kinase von Bedeutung ist (Gao Q et al. 2004; Waksman et al. 1992). In STAT-Proteinen wurde dagegen eine zusätzliche α -Helix (α B') identifiziert, die zwischen β D und α B lokalisiert ist. Sie scheint im Rahmen der Dimerisierung von Bedeutung zu sein (Chen et al. 1998; Gao Q et al. 2004). Trotz sequenzieller Unterschiede sind einige funktionelle Ähnlichkeiten zu erwähnen. Dem bereits erwähnten Argininrest in Position 155 der Src-SH2-Domäne entspricht laut Shuai und Kollegen (1993b) der Argininrest in Position 602 im STAT1-Molekül (Chen et al. 1998, Shuai et al. 1993b). Allerdings befindet sich Arg155 auf der α A-Helix der Src-SH2-Domäne. Dieser Argininrest interagiert mit der Phosphatgruppe sowie mit dem aromatischen Ring des Tyrosinrestes. Dagegen befindet sich der zweite konservierte Argininrest in Position 175 der Src-Kinase, homolog zum Arg602 im STAT1-Molekül, auf dem β B-Strang der antiparallelen β -Faltblattstruktur und bildet mit Phosphotyrosinmotiven eine Ionenbindung aus (Chen et al. 1998; Waksman et al. 1992). Die bereits erwähnte Phosphat-bindende Schleife befindet sich sowohl bei der Src-Kinase als auch bei STAT-Proteinen zwischen dem β B- und dem β C-Strang der jeweiligen SH2-Domäne (Chen et al. 1998). Die Interaktion mit dem Phosphotyrosin wird vor allem über Wechselwirkungen mit der Phosphat-bindenden Schleife

und AS-Resten des β B-Bogens gewährleistet (Chen et al. 1998; Waksman et al. 1992).

Durch die Erkennung und Bindung von Phosphotyrosinmotiven mithilfe der SH2-Domäne kann die Src-Kinase verschiedene Konformationen einnehmen, wodurch ein aktivierter und ein inaktivierter Zustand unterschieden werden. Der inaktivierte Zustand der Src-Kinase erfolgt durch intramolekulare Interaktionen zwischen der SH2-Domäne und einem phosphorylierten Tyrosinrest in Position 527 der regulatorischen Domäne sowie über Wechselwirkungen der SH3-Domäne mit einer Verbindungsregion. Die Aktivierung der Src-Kinase erfolgt über eine Phosphorylierung am Tyr416 und eine Dephosphorylierung am Tyr572. Somit wird die biologische Aktivität der Src-Kinase wie auch bei STAT-Proteinen durch Phosphorylierung reguliert (Hu et al. 2008; Martin 2001; Thomas und Brugge 1997).

Dabei spielt die Erkennung des phosphorylierten Tyrosinrestes eine wesentliche Rolle und kann anhand der Phosphotyrosin-Bindeaffinität determiniert werden. Verschiedene Aminosäurereste der Src-SH2-Domäne, die in struktureller Nähe zum β B-Arginin lokalisiert sind, wurden nach Alaninen mutiert und die resultierenden Mutanten zeigen eine unterschiedlich starke Reduktion der Phosphotyrosin-Bindeaffinität, womit die Bedeutung des invarianten Argininrestes unterstrichen wird. Daneben wurde auch ein Cysteinrest im β C-Strang entdeckt, nach dessen Mutation ein 10-facher Anstieg der Phosphotyrosin-Bindeaffinität zu verzeichnen ist (Bradshaw et al. 1999). Trotz verschiedener Hypothesen über die Funktion des Cysteinrestes wird im Vergleich zum STAT1-Molekül deutlich, dass die Aminosäurereste um den invarianten Argininrest die SH2-Phosphotyrosin-Interaktion auf verschiedene Weise beeinträchtigen.

In der Src-Kinase geht die SH2-Domäne aminoterminal direkt in eine SH3-Domäne über (Martin 2001). Im STAT-Molekül befindet sich aminoterminal der SH2-Domäne dagegen die Linker-Domäne, wodurch ein weiterer struktureller Unterschied zur Src-Kinase deutlich wird. Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich bei der LD der STAT-Proteine ebenfalls um eine SH3-Domäne handeln würde (Fu 1992). Nach kristallographischer Analyse eines DNA-gebundenen STAT1-Dimers, bestehend aus trunkierten STAT1-Molekülen, wurde die Linker-Domäne aber als α -helikale Struktur identifiziert und entsprach somit nicht dem SH3-typischen β -Faltblattmotiv (Chen et al. 1998; Gao Q et al. 2004; Xu W et al. 1997).

Strukturell betrachtet stellt die LD eine Verbindung zwischen der SH2-Domäne und der DNA-Bindedomäne dar (Chen et al. 1998). Anhand von Mutationsexperimenten konnte ihre Funktion im Rahmen der DNA-Bindung bestätigt werden. Durch die Herstellung einer Doppelmutante KE544-545AA wurde eine erhöhte Dissoziationsrate der DNA-Bindung festgestellt, aus der sich eine verminderte transkriptionelle Genaktivierung ergibt (Yang et al. 1999, 2002).

Anhand weiterer Substitutionsexperimente konnten aber auch STAT1-Mutanten der Linker-Domäne generiert werden, die über keine beeinträchtigte DNA-Bindung verfügen. In diesem Zusammenhang wurde durch Yang und Kollegen ein konservierter Tryptophanrest nach Alanin mutiert, der einen ähnlichen Phänotyp wie die K550A-Mutante zeigt. Dieser Tryptophanrest befindet sich in Position 557 auf der α 10-Helix der STAT1-Linker-Domäne (Chen et al. 1998). Untersuchungen von STAT1-W557A zeigen ebenfalls eine Hypophosphorylierung sowie eine kompromittierte Genexpression. Eine veränderte DNA-Dissoziationsrate konnte als Ursache ausgeschlossen werden. Daneben wurden keine weiteren Experimente zur Aufklärung des Phänotyps veröffentlicht (Yang et al. 2002). Die Vermutung, dass es sich bei STAT1-W557A ebenfalls um eine Dephosphorylierungsmutante handelt, wurde bereits im Vergleich zu STAT1-K525A gewonnen (Staab 2011). Der Tryptophanrest in Position 557 im STAT1-Molekül interagiert mit der Phosphat-bindenden Schleife, die der Stabilisierung der parallelen Konformation von STAT1-Dimeren dient (Chen et al. 1998). Der Phänotyp von STAT1-W557A lässt daher vermuten, dass der AS-Austausch nach Alanin zur Destabilisierung dieser Interaktion führt. Dadurch wird vermutlich das Gleichgewicht zwischen paralleler und antiparalleler Dimer-Konfiguration zu Gunsten Letzterer verschoben, woraus die beschleunigte Dephosphorylierung von mutierten STAT1-Dimeren resultiert.

Die beiden Dephosphorylierungsmutanten STAT1-K550A und STAT1-K525A zeichnen sich wie schon erwähnt durch eine erhöhte Dephosphorylierungsrate aus, die wohl durch die vermutete Destabilisierung der parallelen Konformation bedingt ist. Anhand dieser Punktmutanten wird deutlich, dass der Austausch einzelner Aminosäuren in der Linker-Domäne weitreichende Auswirkungen auf die Stabilität der parallelen Ausrichtung von STAT1-Dimeren hat. Diese Untersuchungen zeigen, dass AS-Reste der LD wesentlich zur Stabilität der parallelen Konformation beitragen, wodurch eine weitere Funktion der LD charakterisiert wird.

Die parallele Orientierung phosphorylierter STAT1-Dimere wird durch reziproke SH2-pTyr-Interaktion stabilisiert und zur Bindung an die DNA benötigt. Nach Lösung von der DNA müssen die phosphorylierten STAT-Dimere wieder dephosphoryliert werden, um die Kernmembran zu überwinden (Meyer et al. 2003). Im Nukleus wird die Dephosphorylierung der STAT1-Proteine über die TC45-Phosphatase gewährleistet. Fehlt die Phosphatase oder wird sie blockiert, verbleiben die phosphorylierten STAT1-Dimere im Kern (ten Hoeve et al. 2002). Der genaue Mechanismus der Dephosphorylierung ist noch nicht geklärt, sicher ist aber, dass die TC45-Phosphatase nur in antiparalleler Konformation der phosphorylierten STAT1-Dimere mit dem Phosphotyrosin interagieren kann (Mertens et al. 2006; Zhong et al. 2005). Die räumliche Reorganisation der phosphorylierten STAT1-Dimere könnte erst nach deren Freisetzung von DNA erfolgen und wird möglicherweise über reziproke Zusammenlagerung der N-Termini vermittelt. Es ist nicht auszuschließen, dass die ND:ND-Wechselwirkung auch die Dissoziation der SH2-pTyr-Bindung beeinflusst. Nach der Zusammenlagerung der N-Termini erfolgt der Konformationswechsel durch räumliche Reorientierung der STAT1-Kernstruktur in antiparalleler Ausrichtung (Mertens et al. 2006). Dadurch ist eine weitere Stabilisierung über Wechselwirkungen der Coiled-coil-Domäne mit der DNA-Bindedomäne möglich (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006). In antiparalleler Konformation zeigen die SH2-Domänen in die entgegengesetzte Richtung, wodurch der TC45-Phosphatase mutmaßlich ein besserer Zugang zur Phosphatgruppe ermöglicht wird (Mao et al. 2005; Zhong et al. 2005). Für die enzymatische Dephosphorylierung ist somit die Funktion der STAT1-N-Termini essentiell. Der N-Terminus ist über eine flexible Region mit der Coiled-coil-Domäne verbunden. Für die Funktion des N-Terminus ist hierbei nicht die Sequenz, sondern die Länge der flexiblen Region entscheidend. Die Untersuchungen von Mertens und Kollegen verdeutlichen damit, dass die STAT1-vermittelte Signalweiterleitung auch in diesem Fall auf Flexibilität und nicht auf Stabilität ausgerichtet ist (Mertens et al. 2006).

Diese genannten Beobachtungen stehen nicht im Widerspruch mit der Vermutung, dass der JAK-STAT-Signalweg nicht per se auf eine hohe Stabilität der reziproken SH2-Phosphotyrosin-vermittelten parallelen Dimer-Konfiguration ausgerichtet ist, sondern sich im Gegenteil durch eine begrenzte Bindeaffinität zwischen den einzelnen Monomeren im STAT-Dimer auszeichnet. Die hier geschilderten eigenen Expe-

rimente sind vereinbar mit der Annahme, dass ein flexibler Wechsel zwischen paralleler und antiparalleler Konformation für eine maximale Genaktivierung wesentlich ist. Des Weiteren zeigen diese Experimente, dass die SH2-Domäne auch für die flexible Reorientierung von phosphorylierten STAT1-Dimeren von Bedeutung ist.

Die evolutionäre Bedeutung der STAT-Signaltransduktion wird vor allem durch die Entdeckung von STAT-Proteinen bei primitiveren Organismen, wie *Dictyostelium discoides* deutlich. STAT-Moleküle konnten auch bei Insekten, wie *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae*, identifiziert werden (Barillas-Mury et al. 1999; Hou und Perrimon 1997; Yan et al. 1996). In diesem Zusammenhang wurde bei Insekten auch die STAT-vermittelte Funktion im Rahmen der Immunantwort gesichert (Barillas-Mury et al. 1999). Daneben konnte bei Invertebraten wie der *Drosophila melanogaster* ein vollständiger JAK-STAT-Signalweg nachgewiesen werden. Dieser enthielt neben den STAT-Proteinen auch Mitglieder der JAK-Familie sowie extrazelluläre Liganden, die diesen Weg anstoßen (Binari und Perrimon 1994).

Neben dem Screening auf STAT-Proteinen wurde auch gezielt nach SH2-Domänen in anderen Proteinen gefahndet, um ihre evolutionäre Tragweite zu bestimmen. SH2-Domänen wurden bei einer Vielzahl von Proteinen entdeckt, die verschiedene biologische Funktionen besitzen. Neben höheren Vertebraten konnten SH2-Domänen auch in niedrigen Metazoen wie *Dictyostelium* und *C. elegans* identifiziert werden (Kawata et al. 1997; Liu X et al. 1999). Weiterhin wurden SH2-Domänen im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, das auf einen frühen evolutionären Ursprung schließen lässt. Die Entdeckung von SH2-Domänen in *Saccharomyces cerevisiae* lässt vermuten, dass SH2-Motive schon vor der phylogenetischen Unterteilung von Pilzen und Tieren bereits auf Höhe der Protisten vorhanden waren (Maclennan und Shaw, 1993).

Der strukturelle Vergleich zwischen der STAT- und der Src-SH2-Domäne zeigte einige Unterschiede, die bereits an anderer Stelle beschrieben wurden. Gao und Kollegen unterscheiden demnach eine Linker-SH2-Domäne von einer Src-SH2-Domäne. In *Dictyostelium* wurde eine SH2-Domäne vom STAT-Typ nachgewiesen (Gao Q et al. 2004). Allerdings konnte keine konventionelle Tyrosinkinase, sondern nur eine Tyrosinkinase-ähnliche Kinase (TKL) identifiziert werden. Daher werden Unterschiede zur klassischen STAT-Aktivierung vermutet. Dennoch konnten auch Übereinstimmungen ermittelt werden, welche zusammen mit dem Vorhandensein einer STAT-

SH2-Domäne auf eine evolutionäre Verwandtschaft hindeutet (Araki et al. 2012). Daneben konnte auch bei *Arabidopsis* SH2-Domänen vom STAT-Typ identifiziert werden (Gao Q et al. 2004). Die strukturellen Unterschiede zu der Src-SH2-Domäne bestätigen weiterhin den frühen evolutionären Ursprung der STAT-SH2-Domäne (Gao Q et al. 2004). Dies führte zu der Annahme, dass die in der Evolution gut konservierten STAT-Proteine wahrscheinlich die ursprüngliche SH2-Domäne beinhalten (Kisseleva et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit über die Rolle die STAT-typische Linker-SH2-Domäne wurde gezeigt, dass Eingriffe in die flexible Domänenarchitektur mit einer Störung der STAT-vermittelten Signaltransduktion verbunden sein können. Die mutationsbedingte Destabilisierung der parallelen Konformation von phosphorylierten STAT1-Dimeren resultiert letztlich in einer inhibierten Aktivierung von IFN γ -gesteuerten Zielgenen. Dieses würde erklären, warum die Dephosphorylierungsmutante STAT1-K550A eine Hypophosphorylierung sowie eine supprimierte Genexpression zeigt. Als molekularer Mechanismus wird eine Destabilisierung der SH2-Phosphotyrosin-Interaktion mit einer Verlagerung des Gleichgewichtes zu einer antiparallelen Ausrichtung der mutierten Proteine vorgeschlagen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine optimale STAT1-induzierte Genexpression nicht durch stabile SH2-Phosphotyrosin-Bindungen erzwungen werden kann. Die JAK-STAT-Signalweiterleitung ist demnach nicht auf eine rigide Molekülstruktur der dimeren STAT1-Moleküle, sondern vielmehr auf Flexibilität bei der Bildung und Lösung von transkriptionell aktiven Dimeren angelegt. Der dynamische Wechsel zwischen einer parallelen sowie antiparallelen Dimer-Konfiguration scheint somit unabdingbar zur effizienten STAT1-vermittelten Signaltransduktion beizutragen. Der Mechanismus der Konformationsänderung von phosphorylierten STAT1-Dimeren ist allerdings bislang nur unzureichend verstanden. Hier müssen sich weitere Experimente anschließen, um aus molekularer Sicht den Vorgang des Konformationswechsels im Detail analysieren zu können. Mithilfe von weiteren Mutationsexperimenten ließen sich vielleicht andere AS-Reste identifizieren, die sich entgegengesetzt auf die Stabilität der SH2-Phosphotyrosin-Interaktion auswirken. Das hier vorgeschlagene Modell, welches der Linker-Domäne eine essentielle Funktion bei dem Wechsel zwischen zwei Dimer-Konfigurationen und möglicherweise auch einem Monomeren austausch zuweist, könnte sicherlich durch die Identifizierung einer Punktmutante in der Linker-Domäne mit gegenteiligem Phäno-

typ, nämlich einer Stabilisierung der SH2-pTyr-Interaktion, eindrucksvoll bestätigt werden. Durch die Stabilisierung der parallelen Konformation müsste diese Mutante ein höheres Phosphorylierungsniveau aufweisen, hätte vermutlich eine verlängerte Phase der IFN γ -induzierten Kernakkumulation und würde eine insgesamt verminderte Sensitivität gegenüber Staurosporin besitzen, wodurch eine hochaffine Bindung an DNA-Sonden resultieren würde. Erwartet wird, dass eine solche Mutante allerdings ebenfalls mit einer reduzierten Genexpression assoziiert ist. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die hier vorgestellten STAT1-Mutanten bei Patienten mit Immundefekten finden lassen, wo sie als Missense-Mutationen kausal für das Krankheitsbild verantwortlich sind.

5. Zusammenfassung

STAT1 (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 1) gehört zu einer evolutionär hochkonservierten Proteinfamilie, die eine essentielle Rolle bei der Weiterleitung von Zytokinsignalen spielt. Das STAT1-Protein ist bei zahlreichen biologischen Prozessen, wie etwa der Zellproliferation oder der Steuerung der Immunantwort, von Bedeutung und gehört zu einer der am besten untersuchten humanen Transkriptionsfaktoren. Bekannt ist, dass die über STAT1 vermittelte Signaltransduktion durch eine Rezeptor-assoziierte Phosphorylierung eines kritischen Tyrosinrestes im carboxyterminalen Molekülbereich von STAT1 initiiert wird. Nach der Ausbildung von transkriptionell aktiven Dimeren translozieren diese in den Zellkern und binden auf den Promotoren von Interferon-gesteuerten Zielgenen. In dieser Arbeit wurden Punktmutanten in der Linker-Domäne des STAT1-Moleküls generiert, um die Bedeutung der reziproken SH2-Phosphotyrosin-Interaktion bei der Bildung von tyrosinphosphorylierten Dimeren in funktioneller Hinsicht studieren zu können. Die Substitution eines kritischen Lysinrestes in Position 550 im STAT1-Protein zu Alanin oder Glutamat war mit einer im Vergleich zum Wildtyp-Molekül verminderten Tyrosinphosphorylierung und einer verkürzten nukleären Akkumulationsphase der mutierten Proteine nach Stimulation von transient exprimierenden Zellen mit Interferon- γ ($\text{IFN}\gamma$) verbunden. Bei normaler Dissoziationskinetik von STAT1-spezifischen DNA-Sequenzen fanden sich für die K550-Mutanten erhöhte *In-vitro*- und *In-vivo*-Dephosphorylierungsraten und identifizierten diese damit als gegenüber dem Wildtyp-Protein bevorzugte Substrate der inaktivierenden TC45-Phosphatase. Die mutationsbedingte Destabilisierung in der Architektur der Linker-Domäne resultierte in einer supprimierten Aktivierung von $\text{IFN}\gamma$ -gesteuerten Zielgenen, wobei die Signalamplitude von der Ladung der eingeführten Seitengruppe bestimmt wurde. Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass der Linker-Domäne eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Tyrosindephosphorylierung zukommt und unterstreichen überdies deren Rolle bei dem vermuteten Austausch zwischen einer parallelen und antiparallelen Dimerkonformation, die für eine optimale Genexpression essentiell ist.

5.1 Summary

Signal transducers and activators of transcription (STATs) constitute an evolutionary highly conserved protein family, which play distinct roles in cytokine signaling. The family member STAT1, probably one of the best-studied human transcription factors, is engaged in numerous biological processes, such as cell proliferation and control of immune responses. It is well known that signaling via STAT1 is initiated by receptor-associated JAK kinases, which phosphorylate a single tyrosine residue in the STAT1 carboxy-terminal domain. Consequently, tyrosine-phosphorylated STAT1 dimers translocate to the nucleus, where they bind to palindromic DNA sequences in the promoter regions of interferon- γ (IFN γ)-responsive genes, termed gamma-activated sites. In this thesis, I have generated point mutants in the linker domain of STAT1 in order to study in more detail the significance of reciprocal SH2-phosphotyrosine interactions for IFN γ -driven gene expression. Substitution of either alanine or glutamate for a critical lysine at position 550 significantly decreased the level of STAT1 tyrosine phosphorylation upon stimulation of cells with IFN γ . Furthermore, IFN γ -induced nuclear accumulation was shortened in the presence of the mutation as compared to the wild-type molecule. Despite normal dissociation kinetics from GAS sites, the two K550 mutants showed increased dephosphorylation rates when exposed *in vitro* to the recombinant STAT1-inactivating TC45 phosphatase. Interestingly, the two mutants demonstrated reduced transcriptional activity on both artificial reporter gene constructs and endogenous STAT1-mediated target genes. In summary, these data indicate the STAT1 linker domain is required for maintaining sufficient amounts of tyrosine-phosphorylated STAT1 by protecting transcriptionally active dimers from their premature enzymatic inactivation.

6. Literaturverzeichnis

Aguet, M; Dembić, Z; Merlin, G (1988): Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* 55, S. 273–280

Alonzi, T; Maritano, D; Gorgoni, B; Rizzuto, G; Libert, C; Poli, V (2001): Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol. Cell. Biol.* 21, S. 1621–1632

Araki, T; Kawata, T; Williams, JG (2012): Identification of the kinase that activates a nonmetazoan STAT gives insights into the evolution of phosphotyrosine-SH2 domain signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, S. E1931-7

Bach, EA; Aguet, M; Schreiber, RD (1997): The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, S. 563–591

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

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

Begitt, A; Meyer, T; van Rossum, M; Vinkemeier, U (2000): Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, S. 10418–10423

Binari, R; Perrimon, N (1994): Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* 8, S. 300–312

Bluyssen, HA; Muzaffar, R; Vlieststra, RJ; van der Made, AC; Leung, S; Stark, GR; Kerr, IM; Trapman, J; Levy, DE (1995): Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, S. 5645–5649

Boehm, U; Klamp, T; Groot, M; Howard, JC (1997): Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, S. 749–795

Bradshaw, JM; Mitaxov, V; Waksman, G (1999): Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase. *J. Mol. Biol.* 293, S. 971–985

Chapgier, A; Boisson-Dupuis, S; Jouanguy, E; Vogt, G; Feinberg, J; Prochnicka-Chalufour, A; Casrouge, A; Yang, K; Soudais, C; Fieschi, C et al. (2006): Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet* 2, S. 1193-1206

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

Chen, X; Bhandari, R; Vinkemeier, U; van Den Akker, F; Darnell, JE; Kuriyan, J (2003): A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal domains of STATs. *Protein Sci.* 12, S. 361–365

Chung, CD; Liao, J; Liu, B; Rao, X; Jay, P; Berta, P; Shuai, K (1997): Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, S. 1803–1805

Clemens, MJ (2003): Interferons and apoptosis. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, S. 277–292

Cohen, SN; Chang, AC; Hsu, L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, S. 2110-2114

Copeland, NG; Gilbert, DJ; Schindler, C; Zhong, Z; Wen, Z; Darnell, JE; Mui, AL; Miyajima, A; Quelle, FW; Ihle, JN et al. (1995): Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29, S. 225–228

Darnell, JE (1997): STATs and gene regulation. *Science* 277, S. 1630–163.

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

Decker, T; Lew, DJ; Mirkovitch, J; Darnell, JE (1991): Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J.* 10, S. 927–932

Decker, T; Kovarik, P; Meinke, A (1997): GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, S. 121–134

Djeu, JY; Heinbaugh, JA; Holden, HT; Herberman, RB (1979): Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.* 122, S. 175–181

Duncan, SA; Zhong, Z; Wen, Z; Darnell, JE (1997): STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev. Dyn.* 208, S. 190–198

Dupuis, S; Dargemont, C; Fieschi, C; Thomassin, N; Rosenzweig, S; Harris, J; Holland, SM; Schreiber, RD; Casanova, JL (2001): Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293, S. 300-303

Dupuis, S; Jouanguy, E; Al-Hajjar, S; Fieschi, C; Al-Mohsen, IZ; Al-Jumaah, S; Yang, K; Chappier, A; Eidenschenk, C; Eid, P et al. (2003): Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat. Genet.* 33, S. 388-391.

Durbin, JE; Hackenmiller, R; Simon, MC; Levy, DE (1996): Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, S. 443–450

Ealick, SE; Cook, WJ; Vijay-Kumar, S; Carson, M; Nagabhushan, TL; Trotta, PP; Bugg, CE (1991): Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* 252, S. 698–702

Evinger, M; Rubinstein, M; Pestka, S (1981): Antiproliferative and antiviral activities of human leukocyte interferons. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, S. 319–329

Fagerlund, R; Mélen, K; Kinnunen, L; Julkunen, I (2002): Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J. Biol. Chem.* 277, S. 30072–30078

Fahrenkrog, B; Köser, J; Aebi, U (2004): The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem. Sci.* 29, S. 175–182

Farrar, MA; Schreiber, RD (1993): The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11, S. 571–611

Fu, XY (1992): A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* 70, S. 323–335

Fu, XY; Kessler, DS; Veals, SA; Levy, DE; Darnell, JE (1990): ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, S. 8555–8559

Fu, XY; Schindler, C; Imbrota, T; Aebersold, R; Darnell, JE (1992): The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, S. 7840–7843

Gao, B (2005): Cytokines, STATs and liver disease. *Cell. Mol. Immunol.* 2, S. 92–100

Gao, Q; Hua, J; Kimura, R; Headd, JJ; Fu, X; Chin, YE (2004): Identification of the linker-SH2 domain of STAT as the origin of the SH2 domain using two-dimensional structural alignment. *Mol. Cell Proteomics* 3, S. 704–714

Gidlund, M; Örn, A; Wigzell, H; Senik, A; Gresser, I (1978): Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 273, S. 759–761

Görlich, D; Kostka, S; Kraft, R; Dingwall, C; Laskey, RA; Hartmann, E; Prehn, S (1995): Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* 5, S. 383–392

Görlich, D; Panté, N; Kutay, U; Aebi, U; Bischoff, FR (1996): Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* 15, S. 5584–5594

Greenlund, AC; Schreiber, RD; Goeddel, DV; Pennica, D (1993): Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J. Biol. Chem.* 268, S. 18103–18110

Greenlund, AC; Farrar, MA; Viviano, BL; Schreiber, RD (1994): Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* 13, S. 1591–1600

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

Hemmi, S; Böhni, R; Stark, G; Di Marco, F; Aguet, M (1994): A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon gamma receptor in human cells. *Cell* 76, S. 803–810

Herberman, RB; Ortaldo, JR; Mantovani, A; Hobbs, DS; Kung, HF; Pestka, S (1982): Effect of human recombinant interferon on cytotoxic activity of natural killer (NK) cells and monocytes. *Cell.Immunol.*67, S. 160–167

ten Hoeve, J; de Jesus Ibarra-Sanchez, M; Fu, Y; Zhu, W; Tremblay, M; David, M; Shuai, K (2002): Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 22, S. 5662–5668

Horvath, CM (2000): STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* 25, S. 496–502

Horvath, CM; Darnell, JE (1996): The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *J. Virol.* 70, S. 647–650

Horvath, CM; Wen, Z; Darnell, JE (1995): A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, S. 984–994

Hou, XS; Perrimon, N (1997): The JAK-STAT pathway in *Drosophila*. *Trends Genet.* 13, S. 105–110

Hu, G; Place, AT; Minshall, RD (2008): Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules. *Chem. Biol. Interact.* 171, S. 177–189

Huyer, G; Liu, S; Kelly, J; Moffat, J; Payette, P; Kennedy, B; Tsaprailis, G; Gresser, MJ; Ramachandran, C (1997): Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* 272, S. 843–851

Ihle, JN; Kerr, IM (1995): Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11, S. 69–74

Isaacs, A; Lindenmann, J (1987): Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J. Interferon Res.* 7, S. 429–438

Janjua, S; Stephanou, A; Latchman, DS (2002): The C-terminal activation domain of the STAT-1 transcription factor is necessary and sufficient for stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 9, S. 1140–1146

Joazeiro, CA; Wing, SS; Huang, H; Levenson, JD; Hunter, T; Liu, YC (1999): The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286, S. 309–312

Kaplan, MH; Schindler, U; Smiley, ST; Grusby, MJ (1996a): Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, S. 313–319

Kaplan, MH; Sun, YL; Hoey, T; Grusby, MJ (1996b): Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, S. 174–177

Kawata, T; Shevchenko, A; Fukuzawa, M; Jermyn, KA; Totty, NF; Zhukovskaya, NV; Sterling, AE; Mann, M; Williams, JG (1997): SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell* 89, S. 909–916

Kelker, HC; Yip, YK; Anderson, P; Vilček, J (1983): Effects of glycosidase treatment on the physicochemical properties and biological activity of human interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* 258, S. 8010-8013

Kelker, HC; Le, J; Rubin, BY; Yip, YK; Nagler, C; Vilček, J (1984): Three molecular weight forms of natural human interferon-gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 259, S. 4301-4304

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

Koch, CA; Moran, M; Sadowski, I; Pawson, T (1989): The common src homology region 2 domain of cytoplasmic signaling proteins is a positive effector of v-fps tyrosine kinase function. *Mol. Cell. Biol.* 9, S. 4131–4140

Koch, CA; Anderson, D; Moran, MF; Ellis, C; Pawson, T (1991): SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252, S. 668–674

Korzus, E; Torchia, J; Rose, DW; Xu, L; Kurokawa, R; McInerney, EM; Mullen, TM; Glass, CK; Rosenfeld, MG (1998): Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, S. 703–707

Kotenko, SV; Gallagher, G; Baurin, VV; Lewis-Antes, A; Shen, M; Shah, NK; Langer, JA; Sheikh, F; Dickensheets, H; Donnelly, RP (2003): IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4, S. 69–77

Krebs, DL; Hilton, DJ (2001): SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, S. 378–387

Kypta, RM; Hemming, A; Courtneidge, SA (1988): Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* 7, S. 3837–3844

Lefèvre, F; Boulay, V (1993): A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J. Biol. Chem.* 268, S. 19760–19768

Lefèvre, F; Guillomot, M; D'Andréa, S; Battegay, S; La Bonnardière, C (1998): Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family. *Biochimie* 80, S. 779–788

Levy, DE; Darnell, JE (2002): Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, S. 651–662

Levy, DE; Kessler, DS; Pine, R; Reich, N; Darnell, JE (1988): Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev.* 2, S. 383–393

Levy, DE; Kessler, DS; Pine, R; Darnell, JE (1989): Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes Dev.* 3, S. 1362–1371

Lim, CP; Cao, X (2006): Structure, function and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2, S. 536–550

Litterst, CM; Pfitzner, E (2001): Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. *J. Biol. Chem.* 276, S. 45713–45721

Liu, B; Liao, J; Rao, X; Kushner, SA; Chung, CD; Chang, DD; Shuai, K (1998): Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, S. 10626–10631

Liu, L; Okada, S; Kong, XF; Kreins, AY; Cypowyj, S; Abhyankar, A; Toubiana, J; Itan, Y; Audry, M; Nitschke, P et al. (2011): Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Exp. Med.* 208, S. 1635-1648

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

Liu, X; Quinn, AM; Chin, YE; Fu, XY (1999): STAT Genes Found in *C. elegans*. *Science* 285, S. 167a

Macara, IG (2001): Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, S. 570-94

Maclennan, AJ; Shaw, G (1993): A yeast SH2 domain. *Trends Biochem. Sci.* 18, S. 464–465

Mao, X; Ren, Z; Parker, GN; Sonderrmann, H; Pastorello, MA; Wang, W; McMurray, JS; Demeler, B; Darnell, JE, Chen, X (2005): Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol. Cell* 17, S. 761–771

Marg, A; Shan, Y; Meyer, T; Meissner, T; Brandenburg, M; Vinkemeier, U (2004): Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J. Cell Biol.* 165, S. 823–833

Martin, GS (2001): The hunting of the Src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, S. 467–475

Mattaj, IW; Englmeier, L (1998): Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* 67, S. 265–306

Mayer, BJ; Hanafusa, H (1990): Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, S. 2638–2642

Mayer, BJ; Jackson, PK; Baltimore, D (1991): The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, S. 627–631

McBride, KM; Banninger, G; McDonald, C; Reich, NC (2002): Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J.* 21, S. 1754–1763

Melen, K; Kinnunen, L; Julkunen, I (2001): Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J. Biol. Chem.* 276, S. 16447–16455

Meraz, MA; White, JM; Sheehan, KC; Bach, EA; Rodig, SJ; Dighe, AS; Kaplan, DH; Riley, K; Greenlund, AC; Campbell, D et al. (1996): Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, S. 431–442

Mertens, C; Zhong, M; Krishnaraj, R; Zou, W; Chen, X; Darnell, JE (2006): Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* 20, S. 3372–3381

Meyer, T; Vinkemeier, U (2004): Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 271, S. 4606–4612

Meyer, T; Begitt, A; Lödige, I; van Rossum, M; Vinkemeier, U (2002): Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* 21, S. 344–354

Meyer, T; Marg, A; Lemke, P; Wiesner, B; Vinkemeier, U (2003): DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev.* 17, S. 1992–2005

Meyer, T; Hendry, L; Begitt, A; John, S; Vinkemeier, U (2004): A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J. Biol. Chem.* 279, S. 18998–19007

Moroianu, J; Blobel, G; Radu, A (1995): Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, S. 2008–2011

Mui, AL; Wakao, H; O'Farrell, AM; Harada, N; Miyajima, A (1995): Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J.* 14, S. 1166–1175

Müller, M; Briscoe, J; Laxton, C; Guschin, D; Ziemiecki, A; Silvennoinen, O; Harpur, AG; Barbieri, G; Witthuhn, BA, Schindler, C et al. (1993): The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* 366, S. 129–135

Murphy, TL; Geissal, ED; Farrar, JD; Murphy, KM (2000): Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 20, S. 7121–7131

Nguyen, KB; Watford, WT; Salomon, R; Hofmann, SR; Pien, GC; Morinobu, A; Gadina, M; O'Shea, JJ; Biron, CA (2002): Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297, S. 2063–2066

Nigg, EA (1997): Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, S. 779–787

Novick, D; Cohen, B; Rubinstein, M (1994): The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77, S. 391–400

Oates, AC; Wollberg, P; Pratt, SJ; Paw, BH; Johnson, SL; Ho, RK; Postlethwait, JH; Zon, LI, Wilks, AF (1999): Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line. *Dev. Dyn.* 215, S. 352–370

Oritani, K; Tomiyama, Y (2004): Interferon-zeta/limitin: novel type I interferon that displays a narrow range of biological activity. *Int. J. Hematol.* 80, S. 325–331

Ortaldo, JR; Mantovani, A; Hobbs, D; Rubinstein, M; Pestka, S; Herberman, RB (1983): Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int. J. Cancer* 31, S. 285–289

Ouchi, T; Lee, SW; Ouchi, M; Aaronson, SA; Horvath, CM (2000): Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, S. 5208–5213

Paine, PL; Feldherr, CM (1972): Nucleocytoplasmic exchange of macromolecules. *Exp. Cell Res.* 74, S. 81–98

Park, C; Li, S; Cha, E; Schindler, C (2000): Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13, S. 795–804

Pascal, A; Riou, JF; Carron, C; Boucaut, JC; Umbhauer, M (2001): Cloning and developmental expression of STAT5 in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 106, S. 171–174

Paulson, M; Pisharody, S; Pan, L; Guadagno, S; Mui, AL; Levy, DE (1999): Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. *J. Biol. Chem.* 274, S. 25343–25349

Pawson, T (1988): Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction. *Oncogene* 3, S. 491–495

Pawson, T; Gish, GD; Nash, P (2001): SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* 11, S. 504–511

Pestka, S (1983): The human interferons--from protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between, and beyond. *Arch. Biochem. Biophys.* 221, S. 1–37

Pestka, S; Langer, JA; Zoon, KC; Samuel, CE (1987): Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56, S. 727–777

Pestka, S; Krause, CD; Walter, MR (2004): Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, S. 8–32

Radu, A; Blobel, G; Moore, MS (1995a): Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, S. 1769–1773

Radu, A; Moore, MS; Blobel, G (1995b): The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* 81, S. 215–222

Rane, SG; Reddy, EP (2000): Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19, S. 5662–5679

Rawlings, JS; Rosler, KM; Harrison, DA (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell. Sci.* 117, S. 1281–1283

Revel, M; Chebath, J (1986): Interferon-activated genes. *Trends in Biochemical Sciences* 11, S. 166–170

Ribbeck, K; Görlich, D (2001): Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* 20, S. 1320–1330

Roberts, RM; Cross, JC; Leaman, DW (1991): Unique features of the trophoblast interferons. *Pharmacol.Ther.* 51, S. 329–345

Rout, MP; Aitchison, JD; Magnasco, MO; Chait, BT (2003): Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol.* 13, S. 622–628

Sadowski, I; Stone, JC; Pawson, T (1986): A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol. Cell. Biol.* 6, S. 4396–4408

Sakatsume, M; Stancato, LF; David, M; Silvennoinen, O; Saharinen, P; Pierce, J; Larner, AC; Finbloom, DS (1998): Interferon gamma activation of Raf-1 is Jak1-dependent and p21ras-independent. *J. Biol. Chem.* 273, S. 3021–3026

Sampaio, EP; Bax, HI; Hsu, AP; Kristosturyan, E; Pechacek, J; Chandrasekaran, P; Paulson, ML; Dias, DL; Spalding, C; Uzel, G et al. (2012): A novel STAT1 mutation associated with disseminated mycobacterial disease. *J. Clin.Immunol.* 32, S. 681-689

Schindler, C; Darnell, JE (1995): Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64, S. 621–651

Schindler, C; Plumlee, C (2008): Interferons use the JAK-STAT pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, S. 311–318

Schindler, C; Fu, XY; Imbrota, T; Aebbersold, R; Darnell, JE (1992a): Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, S. 7836–7839

Schindler, C; Shuai, K; Prezioso, VR; Darnell, JE (1992b): Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 257, S. 809–813

Schootink, H; Rose-John, S (2002): Cytokines as therapeutic drugs. *J. Interferon Cytokine Res.* 22, S. 505–516

Segar, R; Krebs, EG (1995): The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, S. 726–735

Senda, T; Shimazu, T; Matsuda, S; Kawano, G; Shimizu, H; Nakamura, KT; Mitsui, Y (1992): Three-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon-beta. *EMBO J.* 11, S. 3193–3201

Shankaran, V; Ikeda, H; Bruce, AT; White, JM; Swanson, PE; Old, LJ; Schreiber, RD (2001): IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, S. 1107–1111

Sheppard, P; Kindsvogel, W; Xu, W; Henderson, K; Schlutsmeyer, S; Whitmore, TE; Kuestner, R; Garrigues, U; Birks, C; Roraback, J et al. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4, S. 63–68

Shuai, K (1999): The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, S. 405–422

Shuai, K (2000): Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, S. 2638–2644

Shuai, K; Liu, B (2003): Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, S. 900–911

Shuai, K; Schindler, C; Prezioso, VR; Darnell, JE (1992): Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258, S. 1808–1812

Shuai, K; Stark, GR; Kerr, IM; Darnell, JE (1993a): A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 261, S. 1744–1746

Shuai, K; Ziemiecki, A; Wilks, AF; Harpur, AG; Sadowski, HB; Gilman, MZ; Darnell, JE (1993b): Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 366, S. 580–583

Shuai, K; Horvath, CM; Huang, LH; Qureshi, SA; Cowburn, D; Darnell, JE (1994): Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, S. 821–828

Shuai, K; Liao, J; Song, MM (1996): Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol. Cell. Biol.* 16, S. 4932–4941

Simoncic, PD; Lee-Loy, A; Barber, DL; Tremblay, ML; McGlade, CJ (2002): The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr. Biol.* 12, S. 446–453

Smeekens, SP; Plantinga, TS; van de Veerdonk, FL; Heinhuis, B; Hoischen, A; Joosten, LA; Arkwright, PD; Gennery, A; Kullberg, BJ; Veltman, JA; Lilic, D; van der Meer, JW; Netea, MG et al. (2011): STAT1 hyperphosphorylation and defective IL12R/IL23R signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *PLoS One* 6, S. e29248

Snapper, CM; Paul, WE (1987): Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, S. 944–947

Soler-Lopez, M; Petosa, C; Fukuzawa, M; Ravelli, R; Williams, JG; Müller, CW (2004): Structure of an activated Dictyostelium STAT in its DNA-unbound form. *Mol. Cell* 13, S. 791–804

Songyang, Z; Shoelson, SE; Chaudhuri, M; Gish, G; Pawson, T; Haser, WG; King, F; Roberts, T; Ratnofsky, S; Lechleider, RJ et al. (1993): SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, S. 767–778

Staab, J: Molekulare Determinanten der Dephosphorylierung und Genaktivierung des Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 1. Naturwissenschaftliche Dissertation Marburg 2011

Stancato, LF; Sakatsume, M; David, M; Dent, P; Dong, F; Petricoin, EF; Krolewski, JJ; Silvennoinen, O; Saharinen, P; Pierce, J et al. (1997): Beta interferon and oncostatin M activate Raf-1 and mitogen-activated protein kinase through a JAK1-dependent pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, S. 3833–3840

Stark, GR; Darnell, JE (2012): The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, S. 503–514

Stark, GR; Kerr, IM; Williams, BR; Silverman, RH; Schreiber, RD (1998): How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, S. 227–264

Starr, R; Willson, TA; Viney, EM; Murray, LJ; Rayner, JR; Jenkins, BJ; Gonda, TJ; Alexander, WS; Metcalf, D; Nicola, NA et al. (1997): A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, S. 917–921

Stephanou, A; Latchman, DS (2003): STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 84, S. 239–244

Strehlow, I; Schindler, C (1998): Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J. Biol. Chem.* 273, S. 28049–28056

Takeda, K; Tanaka, T; Shi, W; Matsumoto, M; Minami, M; Kashiwamura, S; Nakanishi, K; Nobuaki, Y; Kishimoto, T; Akira, S (1996): Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, S. 627–630

Takeda, K; Noguchi, K; Shi, W; Tanaka, T; Matsumoto, M; Yoshida, Kishimoto, T; Akira, S (1997): Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, S. 3801–3804

Takeda, K; Kaisho, T; Yoshida, N; Takeda, J; Kishimoto, T; Akira, S (1998): Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.* 161, S. 4652–4660

Takezaki, S; Yamada, M; Kato, M; Park, MJ; Maruyama, K; Yamazaki, Y; Chida, N; Ohara, O; Kobayashi, I; Ariga, T (2012): Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J. Immunol.* 189, S. 1521-1526

Tsumura, M; Okada, S; Sakai, H; Yasunaga, S; Ohtsubo, M; Murata, T; Obata, H; Yasumi, T; Kong, XF; Abhyankar, A et al. (2012): Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Hum.Mutat.* 33, S. 1377-1387

Thierfelder, WE; van Deursen, JM; Yamamoto, K; Tripp, RA; Sarawar, SR; Carson, RT; Sangster, MY; Vignali, DAA; Doherty, PC; Grosveld, GC et al. (1996): Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, S. 171–174

Thomas, SM; Brugge, JS (1997): Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, S. 513–609

Udy, GB; Towers, RP; Snell, RG; Wilkins, RJ; Park, SH; Ram, PA; Waxman, DJ; Davey, HW (1997): Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, S. 7239–7244

van de Veerdonk, FL; Plantinga, TS; Hoischen, A; Smeekens, SP; Joosten, LA; Gilissen, C; Arts, P; Rosentul, DC; Carmichael, AJ; Smits-van der Graaf, CA et al. (2011): STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 365, S. 54-61

Velazquez, L; Fellous, M; Stark, GR; Pellegrini, S (1992): A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70, S. 313–322

Vinkemeier, U; Moarefi, I; Darnell, JE; Kuriyan, J (1998): Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279, S. 1048–1052

Waksman, G; Kominos, D; Robertson, SC; Pant, N; Baltimore, D; Birge, RB; Cowburn, D; Hanafusa, H; Mayer, BJ; Overduin, M et al. (1992): Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358, S. 646–653

Watling, D; Guschin, D; Müller, M; Silvennoinen, O; Witthuhn, BA; Quelle, FW; Rogers, NC; Schindler, C; Stark, GR; Ihle, JN et al. (1993): Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* 366, S. 166–170

Weis, K (1998): Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 23, S. 185–189

Wen, Z; Darnell, JE (1997): Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* 25, S. 2062–2067

Wen, Z; Zhong, Z; Darnell, JE (1995): Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, S. 241–250

Wenta, N; Strauss, H; Meyer, S; Vinkemeier, U (2008): Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, S. 9238–9243

Wilks, AF; Harpur, AG; Kurban, RR; Ralph, SJ; Zürcher, G; Ziemiecki, A (1991): Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11, S. 2057–2065

Wu, TR; Hong, YK; Wang, X; Ling, MY; Dragoi, AM; Chung, AS; Campbell, AG; Han, ZY; Feng, GS; Chin, YE (2002): SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J. Biol. Chem.* 277, S. 47572–47580

Xu, W; Harrison, SC; Eck, MJ (1997): Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, S. 595–602

Xu, X; Sun, YL; Hoey, T (1996): Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, S. 794–797

Yan, R; Small, S; Desplan, C; Dearolf, CR; Darnell, JE (1996): Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* 84, S. 421–430

Yang, E; Wen, Z; Haspel, RL; Zhang, JJ; Darnell, JE (1999): The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, S. 5106–5112

Yang, E; Henriksen, MA; Schaefer, O; Zakharova, N; Darnell, JE (2002): Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J. Biol. Chem.* 277, S. 13455–13462

Yoshimura, A; Ohkubo, T; Kiguchi, T; Jenkins, NA; Gilbert, DJ; Copeland, NG; Hara, T; Miyajima, A (1995): A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* 14, S. 2816–2826

Zhang, JJ; Vinkemeier, U; Gu, W; Chakravarti, D; Horvath, CM; Darnell, JE (1996): Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, S. 15092–15096

Zhang, JJ; Zhao, Y; Chait, BT; Lathem, WW; Ritzi, M; Knippers, R; Darnell, JE (1998): Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *EMBO J.* 17, S. 6963–6971

Zhang, X; Wrzeszczynska, MH; Horvath, CM; Darnell, JE (1999): Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 19, S. 7138–7146

Zhong, M; Henriksen, MA; Takeuchi, K; Schaefer, O; Liu, B; ten Hoeve, J; Ren, Z; Mao, X; Chen, X; Shuai, K; Darnell, JE et al. (2005): Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, S. 3966–3971

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer für die Einarbeitung in die Grundlagenforschung und die Bereitstellung dieses hochinteressanten Dissertationsthemas. Den Erfolg dieser Arbeit verdanke ich vor allem seinen motivierenden Anregungen, den freundlichen Ermutigungen und seiner ständigen Diskussionsbereitschaft. Ich möchte mich außerdem für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die sehr gute wissenschaftliche Betreuung und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Herrmann-Lingen für die wissenschaftliche Unterstützung und sein stetes Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Ein großer Dank geht außerdem an Frau Dr. Julia Staab für ihre verständnisvolle und ermutigende Unterstützung bei der RT-PCR und für die Durchsicht der Arbeit. Ihre gute fachliche Betreuung und ihre konstruktive Hilfe haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön geht ferner an Frau Anke Gregus und Frau Heike Hühn für ihre freundliche Einarbeitung in den Laboralltag, ihre Unterstützung bei einigen Experimenten sowie die nette und produktive Zusammenarbeit.

Bei den Arbeitsgruppen der Abteilung Neurodegeneration, Neuroimmunology/ IMSF und Neurophysiology bedanke ich mich ganz herzlich für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und die Nutzung der Laborgeräte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Christoph danken, die mich bei der Korrektur unterstützt haben, mich immerwährend motivierten und damit wesentlich zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen haben.