

Aus der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie

(Prof. Dr. med. Ch. Herrmann-Lingen)

im Zentrum Psychosoziale Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Beitrag der SH2-Domäne von STAT1 zur Regulation
transkriptioneller Antworten im Interferon- γ -abhängigen
Signalweg**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Talayeh Giveh Chian Zadeh

aus

Teheran

Göttingen 2014

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

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Kube

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Rainer Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 10. November.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Proteinogene Aminosäuren	X
1 Einleitung.....	11
2 Material und Methoden	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Humane Zelllinien	24
2.1.2 Liste der Chemikalien	24
2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen.....	26
2.1.4 Radiochemikalien.....	26
2.1.5 Antikörper und Reaktionskits	26
2.1.6 Zytokine	27
2.1.7 Enzyme	27
2.1.8 Plasmide	28
2.1.9 Oligonukleotide	29
2.1.10 Bakterienstämme und Medien	30
2.1.11 Geräte und Verbrauchsmaterialien	31
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Zellkulturmethoden	31
2.2.2 Transfektion der Säugerzellen	33
2.2.3 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren und Zytokinen.....	33
2.2.4 Mutagenese	33
2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA.....	34
2.2.6 Plasmid-DNA-Gewinnung aus Bakterien	34
2.2.7 Konzentrationsbestimmung isolierter Plasmid-DNA.....	35
2.2.8 Sequenzierung.....	35
2.2.9 Gewinnung von Gesamtzellextrakten	35

2.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
2.2.11	Analyse mittels Western-Blot.....	37
2.2.12	Dephosphorylierungs-Assay.....	38
2.2.13	Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	38
2.2.14	Reportergen-Assay.....	39
2.2.15	Elektrophoretischer Mobilitätshift-Assay (EMSA).....	40
2.2.16	Isolation von RNA.....	41
2.2.17	Herstellung der cDNA.....	42
2.2.18	Real-time-PCR.....	42
2.2.19	Statistik.....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Sequenzhomologie von STAT1-E524.....	43
3.2	Homologie von STAT1-E585.....	44
3.3	STAT1-E585A zeigt ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau.....	44
3.4	Normale Kinetik der IFN-induzierten Kernakkumulation von STAT1-E524A und -E585A.....	47
3.5	Die Hyperphosphorylierung führt bei STAT1-E585A zu einer verstärkten DNA-Bindung.....	49
3.6	STAT1-E524A und STAT1-E585A besitzen eine normale Dissoziationsrate von DNA.....	51
3.7	STAT1-E524A und -E585A haben eine normale Affinität zu DNA.....	52
3.8	Kein Unterschied in der Dephosphorylierungskinetik zwischen STAT1-WT und STAT1-E585A.....	54
3.9	Die Hyperphosphorylierung führt zu einer geänderten Reportergen-Aktivität von STAT1-E585A.....	55
3.10	Erhöhte Expression des <i>mcp1</i> -Gens durch STAT1- E585A.....	58
4	Diskussion.....	60
5	Literaturverzeichnis.....	73

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere, Absorption
Å	Ångström
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galaktosidase
B-Zelle	B-Lymphozyt
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel
c-Cbl	engl.: <i>casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>
CBP	CREB-bindendes Protein
CCD	Coiled-coil-Domäne
cDNA	komplementäre DNA
CIS	engl.: <i>cytokine-inducible SH2-containing protein</i>
CO ₂	Kohlendioxid
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	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung
dsNLS	dimer-spezifisches nukleäres Lokalisationssignal
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-Tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, auch: 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
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
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
L	Liter
LB	Luria-Broth
LD	Linker-Domäne
m	Milli
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	Amino-Terminus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natrium-Ortho-Vanadat
ND	Aminoternale Domäne
NES	Nukleäres Exportsignal
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPC	Nukleärer Porenkomplex
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT
Poly-dIdC	Poly-Desoxyinosin-Desoxycytidin-Säure
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
pTyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCC1	engl.: <i>guanine nucleotide exchange factor</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
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

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

In mehrzelligen Organismen dienen extrazelluläre Botenstoffe der Zell-Zell-Kommunikation und der Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen. Auf einen externen Reiz hin werden beispielsweise Zytokine sezerniert und lösen zelluläre Antworten aus. Der von Zytokinen ausgehende JAK-STAT-Signalweg ist wohl einer der am besten untersuchten Signalwege dieser Art (**Levy und Darnell 2002**). Die Bindung eines Zytokins an seinen spezifischen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung im carboxyterminalen Rezeptormolekül. Diese Änderung löst eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade aus, die innerhalb weniger Minuten zur Aktivierung bzw. Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Signaltransduktoren und Aktivatoren (STATs) und damit verbunden zu einer veränderten Genexpression führt. Nach der Bindung des spezifischen Zytokins an seinen entsprechenden Rezeptor werden durch nicht-kovalent Rezeptor-gebundene Janus-Kinasen zytoplasmatisch lokalisierte STAT-Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert. Diese vermitteln die direkte Weiterleitung des Signals von den Rezeptoren der Zelloberfläche in den Nukleus (**Darnell et al. 1994; Levy und Darnell 2002**). Alterationen im JAK-STAT-Signalweg können sich an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Signalkaskade manifestieren und beim Menschen bestimmte Defekte des Immunsystems auslösen. Beispiele für eine Störung dieses Signalwegs können Punktmutationen innerhalb des STAT1-Gens sein, die die Funktion des Proteins bei Immunantworten beeinträchtigen (**Dupuis et al. 2001, 2003; Chappier et al. 2006; Liu et al. 2011; Sampaio et al. 2012; Smeekens et al. 2011; van de Veerdonk et al. 2011; Takezaki et al. 2012; Tsumura et al. 2012**).

Zytokine und ihre Bedeutung für die STAT-Proteine

Die Aktivierung von STAT-Proteinen erfolgt durch eine Kaskade von Tyrosinphosphorylierungen, welche wiederum durch die Stimulation der Zellen mit Zytokinen hervorgerufen werden. Bei diesen Zytokinen handelt es sich um kleine Glykoproteine, die ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa und eine Aminosäurelänge von 100-200 aufweisen (**Schooltink und Rose-John 2002**). Sie sind eine bedeutende Botengruppe für die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und Organen (**Kelker et al. 1983, 1984; Farrar und Schreiber 1993**). Zu ihren wichtigsten Aufgaben gehören die Steuerung der Immunantwort und damit verbunden die Kontrolle des

Aktivitätszustandes von immunkompetenten Zellen. Desweiteren übernehmen die Zytokine eine zentrale Rolle bei Entwicklungs-, Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Bis dato sind weit über 100 verschiedene Zytokine beschrieben worden, ohne das eine einheitliche Nomenklatur dieser großen Gruppe existiert (**Schooltink und Rose-John 2002**). Zu der Superfamilie der Zytokine zählen eine große Anzahl unterschiedlicher Wachstumsfaktoren, Interleukine (IL), Chemokine sowie Interferone (IFN), die sich in ihren strukturellen Merkmalen voneinander unterscheiden (**Thomson 1998; Nicola 1994**). Ein besonderes Augenmerk dieser Dissertation liegt auf den zuletzt genannten Interferonen, da sie einen essentiellen Beitrag zur Aktivierung des STAT1-Proteins leisten. 1957 wurde im Rahmen der Behandlung von Hühner-Embryos mit lebenden und Hitze-inaktivierten Influenza-Viren erstmalig eine Interferon-Induktion festgestellt (**Isaacs und Lindemann 1987**). Man fand heraus, dass es sich dabei um mehrfach exprimierte Zytokine handelt, die immunmodulatorische, antiproliferative sowie antivirale Eigenschaften besitzen. Ihre große biologische Wirksamkeit wird vor allem in der Regulation des Immunsystems deutlich. Sie bilden die erste Achse bei der Immunabwehr gegenüber viralen Erregern und tragen zur Immunkontrolle maligner Zellen bei (**Kaplan et al. 1998**). Die Bezeichnung Interferon verweist auf ihre Fähigkeit zur Interferenz mit Virusinfektionen (**Isaacs und Lindenmann 1987**). Anhand ihrer kristallographischen Darstellung stellte man fest, dass sie eine Vier-Helix-Struktur besitzen, die bei über 50 weiteren Zytokinen identifiziert werden konnte (**Ealick et al. 1991; Senda et al. 1992; Schindler und Plumlee 2008**).

Die Familie der Interferone untergliedert sich in die Typ-I-Interferone α/β , ω und τ , das Typ-II-Interferon γ und das Typ III-Interferon λ (**Platanias 2005**). Die Gruppe der Typ-I-Interferone schließt acht weitere Unterklassen mit ein (IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω , IFN δ , IFN τ , IFN ζ). Der Nachweis von IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ und IFN ω aus dieser Unterklasse war auch in humanem Gewebe möglich (**Roberts et al. 1991; Lefèvre und Boulay 1993; Lefèvre et al. 1998; Oritani und Tomiyama 2004; Pestka et al. 2004**). Die Typ-I-Interferone besitzen antiproliferative, proapoptotische sowie antivirale Eigenschaften und werden als Reaktion auf eine Virusinfektion in Fibroblasten und Leukozyten produziert. Desweiteren übernehmen sie eine wichtige Rolle bei der Induktion der Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen, T-Zellen und Monozyten (**Gidlund et al. 1978; Djeu et al. 1979; Evinger et al. 1981; Herberman**

et al. 1982; Ortaldo et al. 1983; Pestka 1983; Novick et al. 1994; Clemens 2003; Pestka et al. 2004). Sie binden an ihren spezifischen Rezeptor, den Interferon- α -Rezeptor (IFNAR), der sich aus den zwei Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zusammensetzt (**Novick et al. 1994**). Das IFN γ -Gen wird hingegen nach Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen nur in T-Zellen und zytotoxischen Lymphozyten gebildet und aktiviert andere immunkompetente Zellen. In Makrophagen führt IFN γ -Stimulation beispielsweise zur Bildung von Stickstoffmonoxid und einigen reaktiven, zytotoxischen Sauerstoffspezies (**Farrer und Schreiber 1993; Stark et al. 1998**), die bei der Abtötung phagozytierter pathogener Erreger unabkömmlich sind. IFN γ übernimmt zudem auch im Rahmen des Antikörperwechsels in B-Zellen sowie der T-Zell-Differenzierung eine wichtige Rolle (**Snapper und Paul 1987; Stark et al. 1998**). Hier erfolgt die Bindung an einen spezifischen Klasse-II Zytokin-Rezeptor (Interferon-Gamma-Rezeptor), der die Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges zur Folge hat. Sämtliche kernhaltige Zellen, Erythrozyten damit ausgenommen, exprimieren IFNGR auf ihrer Oberfläche (**Langer und Pestka 1988**).

Das dritte Mitglied der Interferon-Familie wurde erst vor kurzem identifiziert. Sowohl der Nachweis der Typ-III-Interferone als auch der von IFN γ war in humanem Gewebe möglich (**Pestka et al. 1987; Kotenko et al. 2003; Sheppard et al. 2003**). Die Typ-III-Interferone umfassen die Unterklassen IFN λ 1, IFN λ 2 und IFN λ 3, die ehemals unter den Bezeichnungen IL-29, IL-28A und IL-28B bekannt waren und deren Signalweiterleitung ebenfalls über den JAK-STAT-Signalweg erfolgt. Neben der Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges sind Interferone auch in der Lage, andere Signaltransduktionswege zu aktivieren. Einer dieser Signalwege ist zum Beispiel die MAP-Kinase-Kaskade, die unter anderem für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung bedeutsam ist (**Seeger und Krebs 1995; Stancato et al. 1997; Sakatsume et al. 1998; Pestka et al. 2004**). Alle Interferone können die Bildung von MHC-I-Molekülen über einen von IRF-1- (*Interferon-regulatory factor 1*) abhängigen Weg herbeiführen (**Chang et al. 1992**), während die Expression von MHC II nur durch IFN γ über CIITA (*MHC class II transactivator*) möglich ist (**Mach et al. 1996; Boehm et al. 1997; Loppnow 2001**).

Die Familie der STAT-Proteine

STAT-Proteine kommen in Vertebraten (**Oates et al. 1999; Pascal et al. 2001; Sung et al. 2003**) und Insekten sowie im Schleimpilz *Dictyostelium* vor (**Yan et al. 1996; Kawata et al. 1997; Barillas-Mury et al. 1999; Liu et al. 1999**). Auch bei Nematoden wie *Caenorhabditis elegans* konnte man das Vorhandensein von STAT-Molekülen beweisen, welche strukturell mit der Domänenstruktur der humanen STAT-Moleküle übereinstimmen (**Liu et al. 1999**). Zudem konnte die Entdeckung von JAK- und STAT-Proteinen in *Drosophila melanogaster* als Beweis eines STAT-regulierten Signalwegs bei Wirbellosen dienen (**Yan et al. 1996; Hou und Perrimon 1997**). Somit konnte bestätigt werden, dass STAT-Proteine in sämtlichen tierischen mehrzelligen Organismen evolutionär konserviert sind, wobei Pflanzen und Pilze hier die Ausnahme bilden (**Darnell 1997**). Ihre Existenz wurde erstmalig bei Untersuchungen der IFN α - und IFN γ -abhängigen Genaktivierung entdeckt. Nach Isolation und Sequenzanalyse zweier Proteine, die bis dahin unbekannt waren und ein Molekulargewicht von 91 kDa und 113 kDa besaßen, wurden sie zu den Mitgliedern einer neuen Proteinfamilie, der STAT-Familie, ernannt (**Fu et al. 1990; Fu et al. 1992; Schindler et al. 1992; Shuai et al. 1992**).

Die Familie der humanen STAT-Proteine zählt aktuell sieben Mitglieder: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Ihre genetische Information befindet sich im menschlichen Genom auf drei verschiedenen Chromosomen. STAT1 und STAT4 befinden sich auf Chromosom 2, STAT3, STAT5a und 5b auf Chromosom 12 und STAT2 sowie STAT6 auf dem Chromosom 17 (**Copeland et al. 1995; Darnell 1997**). Alle Mitglieder der STAT-Familie besitzen eine Länge von ca. 750-850 Aminosäureresten und verfügen über eine Sequenzhomologie von 28-40% innerhalb der ersten 700 AS (**Schindler und Darnell 1995; Levy und Darnell 2002**). Sie gleichen sich in ihrem Molekulargewicht, das etwa 80-113 kDa beträgt, und verfügen über dieselbe charakteristische Struktur von sechs funktionellen Domänen, wie sie in der **Abb. 1** demonstriert wird.

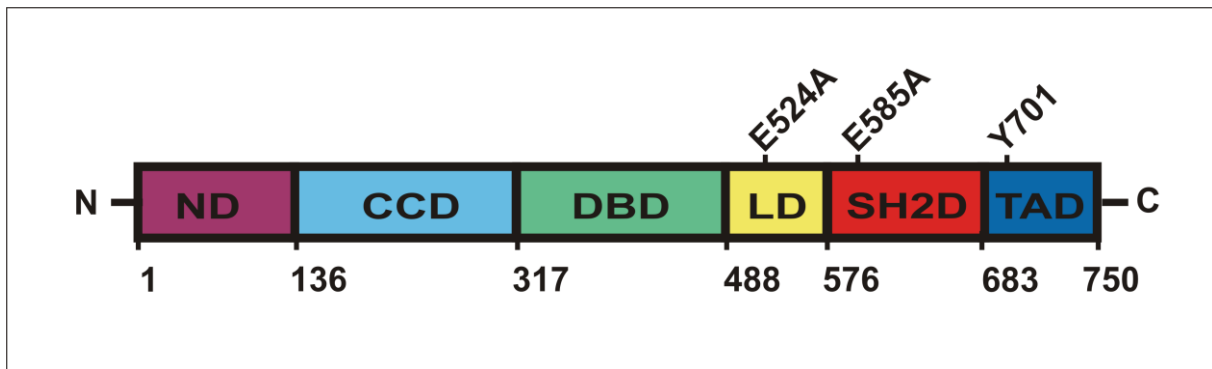


Abb. 1: Domänenstruktur der STAT-Proteine mit Darstellung der beiden in dieser Arbeit behandelten Punktmutanten. NH₂: aminoterminal Domäne, CCD: Coiled-coil-Domäne, DBD: DNA-Bindedomäne, LD: Linker-Domäne, SH2: Src-Homologie-2-Domäne; TAD: Transaktivierungsdomäne, Y701: Phosphotyrosinrest.

Auf die aminoterminal Domäne folgen die Coiled-coil- (CCD), die DNA-Binde- (DBD), die Linker- (LD), die Src-Homologie-2- (SH2-), und die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne (TAD) (Darnell 1997; Chen et al. 1998; Horvath 2000; Levy und Darnell 2002; Lim und Cao 2006). Jede dieser Domänen besitzt unterschiedliche Funktionen. Die größte Sequenzhomologie liegt hierbei zwischen den AS-Resten 600-700 im Bereich der SH2-Domäne (Fu et al. 1992; Schindler und Darnell 1995). Bei den STAT-Proteinen findet sich ein kritischer hochkonservierter Tyrosinrest, der von JAK-Kinasen erkannt und phosphoryliert wird und für die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine essentiell ist (Schindler et al. 1992; Shuai et al. 1993; Vinkemeier et al. 1998). STAT1, -3, -5a und -5b besitzen zudem noch einen konservierten Serinrest im carboxyterminalen Bereich, in dem eine Phosphorylierung durch Serin-Threonin-Kinasen stattfindet (Zhang et al. 1995). Innerhalb der STAT-Familie kommt es zudem zu einer Steigerung der Komplexität, da STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6 durch proteolytischen Abbau bzw. durch differentielles Spleißen verändert werden können (Schindler et al. 1992; Schaefer et al. 1995; Wang et al. 1996). Daraus resultiert beispielsweise, dass STAT1 und STAT3 jeweils in zwei unterschiedlichen Isoformen, α und β , vorkommen. Beide sind Spleißvarianten desselben Gens, mit dem Unterschied, dass die β -Isoform am carboxyterminalen Ende eine Trunkierung aufweist und deshalb nicht transkriptionell aktiv ist (Horvath 2000; Decker und Kovarik 2000; Lödige et al. 2005).

Im Rahmen von Mäuseexperimenten konnte bewiesen werden, dass die einzelnen Mitglieder der STAT-Familie bei zahlreichen zellulären Prozessen, wie der Immunantwort, Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und der Apoptose, unterschiedliche Aufgaben übernehmen. STAT1 beispielsweise ist nach Aktivierung durch den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) in der Lage, Apoptose über einen Fas-abhängigen Weg oder über die Regulation der basalen Expression von Caspasen auszulösen (**Chin et al. 1997; Kumar et al. 1997; Lee et al. 2000; Ouchi et al. 2000**). Durch Mausmodelle mit STAT1-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass die fehlende STAT1-Expression insbesondere zu einer Beeinträchtigung der IFN α - und IFN γ -vermittelten Immunantwort gegenüber viralen und bakteriellen Erregern führt, während Störungen in anderen Signalwegen bisher nicht beobachtet werden konnten. Kommen die STAT1-Knockout-Mäuse hingegen mit keinem Pathogen in Berührung, steht ihrer normalen Entwicklung nichts im Wege. Somit konnte ein Einfluss von STAT1 auf die Entwicklung der Mäuse nicht nachgewiesen werden (**Durbin et al. 1996; Horvath und Darnell 1996; Meraz et al. 1996**). In anderen Experimenten konnte bei STAT1-defizienten Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit für Tumorbildung beobachtet werden (**Shankaran et al. 2001**). Zudem kommt den durch Interferon oder epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) stimulierten STAT1- und STAT2-Proteinen eine zentrale Rolle in der Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen zu, indem sie das Zellwachstum über IRF1 oder p21 inhibieren (**Chin et al. 1996; Bromberg et al. 1998; Park et al. 2000; Zimmermann et al. 2005; Zhao et al. 2007**). Eine defiziente Expression von STAT2-Protein, dessen Aktivierung allein durch Typ-I-Interferone möglich ist (**Schindler et al. 1992; Schindler und Darnell 1995**), führt ebenfalls zu einem Immundefekt gegenüber viralen Erregern (**Park et al. 2000; Levy und Darnell 2002**).

Ein weiteres Beispiel für die Rolle der STAT-Proteine ist die Bedeutung von STAT3 im Rahmen der embryonalen Entwicklung. Mäuse mit fehlender STAT3-Expression sterben schon in der Embryonalphase (**Duncan et al. 1997; Takeda et al. 1997**). Erfolgt die Ausschaltung des STAT3-Gens hingegen in adulten Tieren, werden weitere pathologische Defekte, wie zum Beispiel eine Störung der IL-6-getriggerten T-Zell-Proliferation (**Takeda et al. 1998**) oder eine Beeinträchtigung der entzündungsbedingten Induktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber (**Alonzi et al. 2001**), beobachtet. Die Aktivierung von STAT4 kann sowohl durch IFN α als auch

durch IL-12 hervorgerufen werden (**Kaplan et al. 1996; Nguyen et al. 2002**). Wird die IL-12-Antwort inhibiert, resultiert eine Störung der STAT4-Aktivierung. STAT4-defiziente Mäuse haben eine gestörte Zytotoxizität natürlicher Killerzellen, einen Defekt der IFN γ -Synthese und eine fehlerhafte Differenzierung naiver T-Helferzellen zu Ungunsten der TH1-Entwicklung (**Kaplan et al. 1996; Thierfelder et al. 1996**).

Trotz 96% identischer muriner Aminosäuresequenz von STAT5a und STAT5b (**Mui et al. 1995**) wurden bei STAT5a- bzw. STAT5b-Knockout-Mäusen unterschiedliche Phänotypen nachgewiesen. Weibliche STAT5a-defiziente Mäuse zeigen eine abnorme Mammogenese und Laktationsauffälligkeiten. STAT5b ist hierbei trotz ähnlicher Sequenzhomologie nicht dazu in der Lage, das STAT5a-Defizit zu kompensieren (**Liu et al. 1997**). Als weiteres Beispiel für die Wichtigkeit der STAT-Proteine sollen STAT6-defiziente Mäusen dienen, bei denen eine Störung der Lymphozytenfunktion nachgewiesen werden konnte. Im Mausmodell wurde eine Störung des Immunglobulin-Klassenwechsels in Plasmazellen und eine Entwicklungsstörung reifer TH2-Zellen festgestellt (**Kaplan et al. 1996; Takeda et al. 1996**).

Struktureller Aufbau der STAT-Proteine

Alle Mitglieder der STAT-Proteinfamilie besitzen den gleichen Aufbau aus sechs funktionell und strukturell konservierten Domänen, welcher im Folgenden anhand der Architektur des STAT1-Moleküls erläutert wird. Mithilfe von kristallographischen Analysen von phosphorylierten DNA-gebundenen STAT1- und 3-Homodimeren (**Becker et al. 1998; Chen et al. 1998**) konnte bewiesen werden, dass dimere STAT-Proteine, die über ihre SH2-Domänen untereinander in Verbindung stehen, mit der DNA interagieren. Allerdings wurden die Strukturdaten lediglich von trunkiertem STAT erhalten, dem die N-terminale und die Transaktivierungsdomäne fehlten, da eine Kristallisation des Volle-Länge-Moleküls an DNA nicht gelang. Da jedoch die Kristallstruktur der isolierten N-terminalen Domäne von STAT4 bekannt ist, konnte mithilfe dieser Struktur ein Modell entwickelt werden, das auch zum Verständnis der Interaktion der N-Termini von STAT1-Dimeren verwendet werden konnte (**Baden et al. 1998; Chen et al. 1998; Vinkemeier et al. 1998; Chen et al. 2003**).

Zusätzlich konnte in weiteren Versuchen bewiesen werden, dass STAT1-Dimere in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen können: eine parallele und eine

antiparallele Form. Der Unterschied zwischen diesen beiden Formen liegt in der Ausrichtung der SH2-Domänen. Bei der antiparallelen Konformation zeigen die SH2-Domänen beider Monomere in entgegengesetzte Richtungen, während sie bei der parallelen Konformation in dieselbe Richtung gerichtet sind (**Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006**). Für die Konformationsänderung von der einen in die andere Form ist eine flexible Region zwischen dem N-Terminus und der Coiled-coil-Domäne notwendig. Hierbei spielt maßgeblich deren Länge, nicht aber die Aminosäuresequenz dieses Bereiches eine entscheidende Rolle (**Mertens et al. 2006**). Die Stabilisierung der antiparallelen Form erfolgt über Interaktionen der Coiled-coil-Domäne mit der DNA-Bindedomäne sowie möglicherweise durch reziproke aminoterminaler Wechselwirkungen. Die parallele Form hingegen wird allein durch gegenseitige Wechselwirkung der SH2-Domänen stabilisiert. Während die antiparallele Konformation des Proteins für die Dephosphorylierung durch die TC45-Phosphatase essentiell ist, kommt der parallelen Konformation des Proteins bei der DNA-Bindung eine entscheidende Aufgabe zu (**Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008; Zhong et al. 2005**).

Der JAK-STAT-Signalweg und seine Regulation

Die Gemeinsamkeit aller Zytokin-Rezeptoren besteht darin, dass sie sich aus einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einer die Zellmembran einmal durchquerenden Transmembran-Domäne sowie einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne zusammensetzen. Durch die Bindung von Interferon an seinen spezifischen Rezeptor kommt es zu einer Oligomerisierung der weiter oben genannten Rezeptor-Untereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 sowie einer Dimerisierung der Rezeptor-Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2. Beide, IFNAR und IFNGR, gehören zu den Klasse-II-Zytokin-Rezeptoren (**Bach et al. 1997**). Da sie selbst über keine intrinsische Kinase-Aktivität verfügen, sind zur Auto- bzw. Transphosphorylierung des Rezeptors sowie zur Aktivierung der STAT-Proteine die Janus-Kinasen unentbehrlich. Diese befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran und sind dort nicht-kovalent an den Rezeptor gebunden (**Velazquez et al. 1992; Müller et al. 1993; Novick et al. 1994; Schindler und Darnell 1995, Darnell 1997**). Diese JAK-Kinasen sind Mitglieder einer vierköpfigen Proteinfamilie, die sich aus den Kinasen JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 zusammensetzt. Allen gemeinsam ist, dass sie eine Pseudo-Kinase-Domäne und eine Kinase-Domäne besitzen, jedoch nicht mit SH2-

oder SH3-Domänen ausgestattet sind (**Wilks et al. 1991; Darnell et al. 1994; Rane und Reddy 2000**).

Beim IFN α/β -vermittelten Signalweg erfolgt durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor eine Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors mit der Folge einer Kaskade von JAK-katalysierten Tyrosinphosphorylierungen. Diese bewirkt letztlich eine Heterodimerisierung von STAT1 und STAT2, die über eine Wechselwirkung des Phosphotyrosins des einen Monomers mit einem Argininrest in der SH2-Tasche des anderen Monomers die Dissoziation vom Rezeptor einleitet (**Shuai et al. 1994; Greenlund et al. 1995; Becker et al. 1998; Chen et al. 1998**). Danach bilden die tyrosinphosphorylierten STAT-Heterodimere einen trimeren Komplex mit p48 und werden daraufhin in den Nukleus transportiert. Der trimere Komplex aus den STAT-Proteinen und dem p48 ist als IFN-stimulierter Genfaktor 3 (ISGF3) bekannt, der im Zellkern palindromische ISRE-Sequenzen (*interferon-stimulated response element*) erkennt und an sie bindet, wodurch die Transkription IFN α/β -spezifischer Zielgene eingeleitet wird (**Levy et al. 1988, 1989; Fu et al. 1990, 1992; Shuai et al. 1992; Darnell et al. 1994; Stark et al. 1998**).

Die IFN γ -Stimulation hingegen löst eine Signalweiterleitung über die Ausbildung von STAT1/STAT1-Homodimeren aus. Nachdem IFN γ an seinen spezifischen Rezeptor gebunden hat, werden die Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen JAK1 und JAK2 aktiviert, die die Auto- bzw. Transphosphorylierung durchführen (**Müller et al. 1993; Watling et al. 1993; Darnell et al. 1994; Stark et al. 1998**). Danach folgt die Phosphorylierung eines kritischen Tyrosinrestes in Position 440 des IFNGR1 durch die Janus-Kinasen. An diesen Tyrosinrest können nun STAT1-Proteine über ihre SH2-Domäne binden und ebenfalls phosphoryliert werden (**Greenlund et al. 1993, 1994, 1995**). Nach der Tyrosinphosphorylierung lösen sich die STAT-Moleküle vom Rezeptor und akkumulieren nun als Homodimere binnen weniger Minuten im Nukleus (**Shuai et al. 1994; Stark und Darnell 2012**). Im Zellkern erkennen die STAT1-Homodimere spezifische Gamma-aktivierte-Sequenzen (GAS) und führen so zur Transkription IFN γ -induzierter Zielgene (**Darnell et al. 1994; Decker et al. 1991**). Zusammenfassend ermöglicht also die Bindung des Liganden an seinen spezifischen Rezeptor und die damit verbundene Aktivierung des Rezeptor-Komplexes eine

direkte Weitervermittlung des Signals in den Nukleus und löst dadurch eine Änderung der Genexpression in der stimulierten Zelle aus (**Darnell et al. 1994**).

Der Regulation dieses Signalweges, vor allem der Negativregulation, wird eine große Bedeutung zugeschrieben, da eine Fehlregulation oder anhaltende Aktivierung zu Krebs oder Immunerkrankungen führen kann. Die Inaktivierung kann sowohl durch zytoplasmatische als auch durch nukleäre Proteine erfolgen, die an unterschiedlichen Stellen des Signalweges eingreifen. Alle im Folgenden beschriebenen Negativ-Regulatoren bzw. Inhibitoren werden abhängig von der Stärke des Zytokinsignals von den STAT-Proteinen selbst induziert (**Starr und Hilton 1999; Levy und Darnell 2002**). Eine Gruppe solcher negativ-regulierender Proteine des Signalweges sind die zytoplasmatischen SOCS-Proteine (*suppressor of cytokine signaling*), bestehend aus den Mitgliedern SOCS1, SOCS7 sowie CIS (*cytokine-inducible SH2-domain-containing protein*). SOCS1 und SOCS7 binden an die katalytische Region der JAK-Kinasen, wodurch ihre Autophosphorylierung gehemmt und folglich die Phosphorylierung der STAT-Proteine am konservierten Tyrosinrest verhindert werden kann. CIS kompetitiert hingegen mit dem STAT-Protein um die Bindungsregion am Rezeptor selbst und führt so zu dessen Inaktivierung (**Starr und Hilton 1999; Rawlings et al. 2004**). Eine weitere Kontrollfunktion der SOCS-Proteine umfasst die Degradierung von Signalproteinen (**Krebs und Hilton 2001**). Eine weitere Gruppe zytoplasmatischer Negativregulatoren sind die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 sowie PTP1B (Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B), die entweder an die phosphorylierten Kinasen oder an den aktivierten Rezeptor binden und somit die Signalweiterleitung durch Dephosphorylierung inhibieren (**Levy und Darnell 2002; Rawlings et al. 2004**). Die STAT-Aktivierung kann jedoch auch im Nukleus inhibiert werden. Eine Möglichkeit zur Regulation der Zytokin-induzierten Genaktivierung im Nukleus sind die PIAS-Proteine (*protein inhibitors of activated STATs*). PIAS1 interagiert hierbei mit STAT1, wohingegen PIAS3 als spezifischer Inhibitor von STAT3 identifiziert wurde (**Chung et al. 1997; Liu et al. 1998, Starr und Hilton 1999**). Durch die Interaktion von PIAS mit den STAT-Dimeren soll die für die Transkription wichtige DNA-Bindung erschwert sein (**Rawlings et al. 2004**). Phosphorylierte STAT-Moleküle können auch mithilfe von nukleären Phosphatasen wieder dephosphoryliert werden. Die Dephosphorylierung von STAT1-Dimeren geschieht hierbei mit mithilfe der nukleären Phosphatase TC45 (**ten Hoeve et al. 2002; Levy und Darnell 2002; Simoncic et al. 2002**). Eine

Dephosphorylierung der im Zytoplasma befindlichen aktiven STAT-Proteine geschieht durch die Bindung der Phosphatase an phosphorylierte Kinasen bzw. an den aktivierten Rezeptor. Zu den Phosphatasen, die hauptsächlich für die Dephosphorylierung im Zytoplasma verantwortlich sind, gehören die PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*), SHP-1 (*SH2-containing phosphatase 1*) und SHP-2 (**Levy und Darnell 2002; Rawlings et al. 2004**). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass SHP-2 in den Zellkern transloziert und dort auch STAT1-Proteine dephosphorylieren kann (**Wu et al. 2002**). Inaktivierte bzw. dephosphorylierte STAT1-Moleküle werden aus dem Nukleus in das Zytoplasma zurück transportiert, wo in Abhängigkeit vom Rezeptorzustand ein erneuter Aktivierungszyklus beginnen kann. Zusätzlich wurde eine Zytokin-unabhängige fortwährende Translokation der STAT-Proteine zwischen Zellkern und Zytoplasma beschrieben (**Meyer et al. 2004**).

Der Transport der STAT-Proteine zwischen Zytoplasma und Nukleus

Die Liganden-vermittelte Dimerisierung des Rezeptors führt, wie oben bereits beschrieben, zum Auslösen einer Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungen, die die Rekrutierung der zytoplasmatischen STAT-Moleküle zum Rezeptor und deren nachfolgende Phosphorylierung zur Folge hat. Die auf diese Weise entstandenen phosphorylierten STAT-Dimere (Größe ~ 180 kDa) müssen nun durch die Kernmembran in den Zellkern gelangen (**Levy und Darnell 2002**). Man nahm zunächst an, dass STAT-Proteine erst nach ihrer Aktivierung in den Zellkern gelangen, um die Transkription bestimmter Zielgene zu beeinflussen. Nach heutigem Kenntnisstand existiert jedoch ein nukleozytoplasmatischer Transport, welcher auch in Abwesenheit von Zytokinen unphosphorylierte STAT-Moleküle in den bzw. aus dem Zellkern transportiert (**Meyer et al. 2004**). Die Kernmembran besitzt zum Molekültransfer nukleäre Porenkomplexe (NPC), die als Filter für den Transport höhermolekularer Proteine fungieren (**Mattaj und Englmeier 1998; Weis 1998**). Da es sich bei den STAT-Molekülen um Makromoleküle handelt, die eine Größe von 40-60 kDa weit überschreiten, sind sie nicht dazu in der Lage, als phosphorylierte Dimere den NPC mittels freier Diffusion zu durchqueren, um in den Zellkern zu gelangen, sondern sind daher auf die Hilfe eines aktiven Transportmechanismus angewiesen (**Paine und Feldherr 1972; Weis 1998**).

Die auf diese Weise transportierten Moleküle interagieren über Rezeptoren, die je nach Funktion als Importine (Importrezeptoren) oder Exportine (Exportrezeptoren) bezeichnet werden und in die Familie der Karyopherine gehören (**Macara 2001; Rout et al. 2003**). Importine benötigen für die Interaktion mit den Cargo-Proteinen eine spezielle Abfolge basischer Aminosäurereste, die sogenannte NLS-Sequenz (nukleäres Lokalisationssignal) (**Weis 1998; Macara 2001; Körner et al. 2003; Fahrenkrog et al. 2004**). In den letzten Jahren konnte man nachweisen, dass die DNA-Bindedomäne von STAT1, STAT2 und STAT3 ein konserviertes NLS besitzt, welches allerdings nicht einem klassischen NLS entspricht und nur im Dimer funktionsfähig ist (**Melen et al. 2001; Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al. 2002**). Weiterhin wurde anhand von Untersuchungen mit aminoterminalen Deletionsmutanten demonstriert, dass die Anwesenheit des Aminoterminus für die Kernakkumulation unabdingbar ist. Die betroffenen Mutanten zeigten nach Zytokin-Stimulation nicht die typische Kernakkumulation der STAT-Proteine, wie sie beim WT beobachtet wurde (**Strehlow und Schindler 1998; Meyer und Vinkemeier 2004**).

Man fand heraus, dass STAT1 im Zytoplasma als antiparalleles Dimer und als Monomer vorliegt, bei dem das NLS maskiert ist und erst durch Tyrosin-Phosphorylierung und reziproke SH2-Wechselwirkung der beiden STAT1-Monomere frei zugänglich wird (**Zhong et al. 2005**). Das bedeutet, dass Importine weder mit unphosphorylierten STAT-Dimeren noch mit STAT-Monomeren interagieren können, da das NLS nur in paralleler Konformation phosphorylierter Dimere funktional ist (**Fagerlund et al. 2002; Melen et al. 2001; Meyer et al. 2002**). Phospho-STAT1-Dimere sind in der Lage, mithilfe ihrer frei zugänglichen NLS-Sequenz an Importin α 5 zu binden (**Sekimoto et al. 1997; Nardozi et al. 2010**). Dieses bildet mit Importin β ein Cargo-Importin α/β -Komplex, wobei Importin β mit RanGTPase interagiert und den Durchtritt durch die Kernpore einleitet (**Mattaj und Englmeier 1998; Weis 1998; Görlich und Kutay 1999**). Die Interaktion mit der GTPase Ran ist deshalb notwendig, weil es sich hierbei um einen aktiven Transport handelt, wodurch die nötige Energie für den Transportprozess geliefert wird. Die Aktivität der GTPase wird hierbei durch einen Ran-GDP-/RanGTP-Gradienten gewährleistet. Durch die Funktion der GTPase herrscht im Zytoplasma ein Überschuss an Ran in Form von Ran-GDP, während im Zellkern die Ran-GTP-Form dominiert. Da Ran-GTP im Zyto-

plasma durch RanBP-1 (*Ran-binding protein*) und RanGAP (*Ran-GTPase-activating protein*) hydrolysiert wird, ist die Konzentration von Ran-GTP deshalb im Zytosol niedriger als im Kern. Das im Zytosol befindliche Ran-GDP bindet an NTF-2 (*nuclear transport factor*) und bildet somit einen Dimer-Komplex, der alsdann in den Zellkern transportiert wird. Dort bindet Ran-GDP an RanGEF (*guanine nucleotide exchange factor*), der für die Synthese des Ran-GTP zuständig ist und zudem zu der hohen Ran-GTP Konzentration im Zellkern beiträgt (**Görlich und Kutay 1999; Kalab et al. 2002**). Ran-GTP wiederum ist für die Bindung des Cargo-Proteins an Exportin und für die Auflösung des Importin-Cargo-Komplexes verantwortlich (**Weis 1998**). Mit steigender Konzentration des Ran-GTP im Zellkern zerfällt der Importin-Cargo-Komplex und die ungeladenen Importine können nun wieder durch die Kernporen in das Zytoplasma gelangen (**Mattaj und Englmeier 1998; Meyer und Vinkemeier 2004; Ribbeck und Görlich 2001; Weis 1998**). In der gleichen Zeit werden, bedingt durch die hohe Ran-GTP-Konzentration, Exportine wie das CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) mit ihren Cargo-Molekülen beladen und schleusen diese durch die Kernporen ins Zytosol zurück.

Auch beim Export der STAT1-Proteine aus dem Nukleus spielt eine spezifische Sequenz eine Rolle, die sich beim STAT1-Molekül in der Coiled-coil-Domäne befindet und als nukleäres Exportsignal (NES) bezeichnet wird (**Begitt et al. 2000; Meyer und Vinkemeier 2004**). Nach heutigem Kenntnisstand weiß man, dass nur unphosphorylierte STAT-Proteine den Kern verlassen können (**Meyer et al. 2003, 2004**). Somit hängt die Dauer der Kernakkumulation maßgeblich von der Dephosphorylierungskinetik der Proteine und somit von der Beteiligung bzw. Aktivität nukleärer Tyrosin-Phosphatasen ab (**Haspel et al. 1996; Haspel und Darnell 1999; Meyer et al. 2003**). Solange die Dimere an DNA gebunden vorliegen, sind sie vor Dephosphorylierung geschützt. Nur im ungebundenen Zustand werden sie von der Phosphatase erkannt und dephosphoryliert (**Meyer et al. 2003**). Allerdings konnte man durch die Hemmung sämtlicher energieabhängiger Transportmechanismen der Zelle bzw. durch die Inhibition von CRM1 mit Leptomycin B keinen vollständigen Export-Stopp der STAT1-Moleküle beobachten. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass weitere energieunabhängige Transportwege existieren, mit deren Hilfe dephosphorylierte STAT-Proteine die Kernmembran überwinden können (**Begitt et al. 2000; Marg et al. 2004**).

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, mit Hilfe von eigens generierten STAT1-Mutanten die Rolle der SH2-Domäne im Interferon-abhängigen JAK-STAT-Signalweg besser zu verstehen. Bei der Charakterisierung dieser Mutanten diente die Menge der IFN γ -induzierten Tyrosin-Phosphorylierung dieser Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Molekül als Referenz für phänotypische Unterschiede. Ausgehend von diesen Punktmutanten erwies sich die Suche nach molekularen und strukturellen Unterschieden zum Wildtyp-Molekül als hilfreich für ein vertieftes Verständnis der physiologischen Bedeutung der SH2-Domäne von STAT1.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Humane Zelllinien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um eine Epithelzelllinie eines Zervix-Karzinoms, die als HeLa-S3 bezeichnet wird. Zudem kamen U3A-Zellen zum Einsatz, bei denen es sich um eine STAT1-defiziente Zelllinie handelt, die aus der Fibrosarkom-Zelllinie 2fTGH entstanden ist. Beide Zelllinien wurden von Prof. Dr. Uwe Vinkemeier (University of Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Liste der Chemikalien

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
Ethylendioxy-bis-(Ethylennitrilo)-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	Carl Roth
2-Propanol	Carl Roth
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Carl Roth
Rotiphorese-Gel	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 Medien, Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen wurde entionisiertes Wasser aus der Millipore-Anlage PURELAB Plus (ELGA, Celle) verwendet, welches einen Moleküllfilter mit der Porengröße 0,22 µm besaß. Falls möglich erfolgte zum einen die Filtration der Lösungen unter sterilen Umständen, zum anderen eine Einstellung der pH-Wert-Messung mit einem pH-Meter (Sartorius, Göttingen).

2.1.4 Radiochemikalien

Die Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) stellte α-[³³P]-markierte Desoxy-nukleotide (ATP) zur Verfügung, die eine spezifische Aktivität von 111 TBq/mmol aufwiesen und vor Ablauf ihrer Halbwertszeit zum Einsatz kamen.

2.1.5 Antikörper und Reaktionskits

Antikörper

STAT1α-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
IRDye 800CW Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

Bei Western-Blot-Experimenten fanden die polyklonalen Antikörper STAT1α-p91 (C-24) und Phospho-STAT1 (Tyr 701) in Form von Primärantikörpern Verwendung. Für den Gebrauch erfolgte ihre Verdünnung (1:1000) in 4% BSA in TBS-T (137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,05%). Das polyklonale IRDye 800CW Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege wurde in diesen Experimenten jeweils als Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000, ebenfalls in 4 % BSA in TBS-T, verwendet. Zudem kamen

die STAT1 α -p91- (C-24) und STAT3-Antikörper (H190) auch in Rahmen von EMSA Experimenten bei Supershift-Reaktionen zum Einsatz, dort jedoch mit einer Verdünnung von 1:10 in PBS (Gibco, Karlsruhe).

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 Zytokine

Die Stimulation der Zellen erfolgte alleinig mit humanem Interferon- γ (IFN γ) der Firma Biomol (Hamburg). Die Verdünnung des IFN γ erfolgte, wenn nicht anders angegeben, 1:2000 im jeweiligen Zellmedium, um danach direkt auf die Zellen pipettiert zu werden.

2.1.7 Enzyme

In dieser Arbeit wurden der Complete Mini Protease Inhibitor (Roche, Grenzach) im Rahmen der Herstellung von Gesamtzellextrakten und beim Reporter-gen-Assay bzw. Dephosphorylierungs-Assay zur Herstellung bestimmter Pufferlösungen verwendet.

Die *DpnI*-Endonuklease ist ein aus einem *E. coli*-Stamm hergestelltes Restriktionsenzym, welches vom *dpnI*-Gen des *Diplococcus pneumoniae* G41 exprimiert wird. Dieses Enzym wurde von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen und für Mutagenese-Experimente verwendet.

Die DNA-Polymerase I, auch Klenow-Enzym genannt, ist das größere der beiden Proteinfragmente der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli*. Sie entsteht nach enzymatischer Spaltung mit Subtilisin und verfügt noch über die 5'→3' Polymerase-Aktivität und 3'→5' Exonuklease-Aktivität (*proof reading*). Allerdings besitzt sie nicht

mehr die 5'→3' Exonuklease-Aktivität. Für diese Arbeit wurde sie von New England Biolabs bezogen und zur Markierung von doppelsträngigen DNA-Sonden verwendet.

PfuTurbo-DNA-Polymerase ist die verbesserte Version der Pfu-DNA-Polymerase. Sie diente in dieser Arbeit der Amplifikation der DNA und wurde von der Firma Stratagene bezogen. TC-PTP, auch bekannt als PTPN2 (Protein-Tyrosin-Phosphatase N2), ist ein Enzym mit einer katalytischen Domäne und N-terminaler GST-Markierung. Für diese Arbeit wurde sie von der Firma Biomol International (Plymouth, USA) bezogen.

Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinprotease, die zu den Endopeptidasen gehört und Proteine an bestimmten Stellen spalten kann. Da sie ein pH-Wert-Optimum von 7-8 besitzt, ist ihre Leistung bei basischen Bedingungen am effektivsten. In dieser Arbeit wurde sie zur Lösung adhärenter Zellen vom Boden der Kulturschalen benutzt und von PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

2.1.8 Plasmide

Bei dem Plasmid pEGFP-N1 handelt es sich um einen 4,7 kb langen, optimierten Vektor mit verbesserten Fluoreszenzeigenschaften, der in seiner Multi-Cloning-Site eine Neomycinresistenz-Kassette besitzt. Die humane STAT1-DNA wurde in die Multi-Cloning-Site inseriert. Das pSTAT1 α -GFP-Konstrukt wurde bei Begitt et al. (2000) beschrieben und diente der Expression von N-terminalen GFP-Fusionsplasmiden von STAT1 in Säugierzellen. Der Vektor enthält eine SV40-Polyadenylierungssequenz für das Fusionsgen sowie eine Polyadenylierungssequenz aus dem Thymidinkinase-Gen des Herpes-Simplex-Virus für das Neomycin-Gen. Der Vektor wurde von der Firma Clontech (Mountain View, USA) bezogen.

Die beiden Plasmide pSTAT1 α (E524A)-GFP und pSTAT1 α (E585A)-GFP wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenzspezifisch mutiert. Zum Einfügen der Mutation wurde für das Konstrukt pSTAT1 α (E524A)-GFP das Primerpaar E425AF/E425AR und für pSTAT1 α (K585A)-GFP das Paar K585AF/K585AR verwendet. Sämtliche Primer wurden von Sigma zur Verfügung gestellt.

Bei dem Plasmid pcDNA3.1 handelt es sich um einen 5,4 kb langen eukaryontischen Expressionsvektor, der eine Ampicillinresistenz-Kassette besitzt. Die humane STAT1- α -cDNA wurde in pcDNA3.1 kloniert (Dr. James E. Darnell, New York, USA). In

dieser Arbeit wird die Bezeichnung pSTAT1 α -GFP durch die die oben erwähnte Bezeichnung pSTAT1-GFP ersetzt, da im Rahmen dieses Projekts nur die für STAT1 α kodierenden Plasmide untersucht werden. Im Weiteren wird die Bezeichnung pSTAT1 als Abkürzung für pcDNA3.1-STAT1 α -Plasmide benutzt.

Die beiden Plasmide pcDNA3.1-STAT1 α (E524A) und pcDNA3.1-STAT1 α (E585A) wurden im Rahmen dieser Arbeit sequenzspezifisch mutiert. Zum Einfügen der Mutation wurde bei pcDNA3.1-STAT1 α (E524A) das Primerpaar E524AF/E524AR und pcDNA3.1-STAT1 α (E585A) das Primerpaar E5855AF/E585AR verwendet. Beide Primerpaare wurden von Sigma zur Verfügung gestellt.

Beim p β Gal-Plasmid handelt es sich um einen 7,4 kb langen Expressionsvektor der β -Galactosidase, der im Rahmen von Reporter-Gen-Assays zum Einsatz kam. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen.

Die Plasmide pGAS3xLy6E und pIC-339 sind Reporter-Gen-Konstrukte. Das Konstrukt pGAS3xLy6E besitzt drei GAS-Bindestellen und wurde von Wen et al. (1995) beschrieben; pIC339 dagegen beinhaltet einen trunkierten Promotor des humanen ICAM-1-Gens und wurde von Prof. Dr. P. T. van der Saag (Utrecht, Niederlande) beschrieben.

2.1.9 Oligonukleotide

Primer für die sequenzspezifische Mutagenese

E524A F	5'-ctgaacatgttgggagcgaagcttcttggcctaacgcc-3'
E524A R	5'-ggcgtaggaccaagaagcttcgctcccaacatgttcag-3'
E585A F	5'-gggcttcatcagcaaggcgcgagagcgtgccctgttg-3'
K585A R	5'-caacagggcacgctctcgcgcttgctgatgaagccc-3'

Primer für die Sequenzierung

484f	5'-ccttctcctgactccacca-3'
611R	5'-ctccacccatgtgaatgtga-3'

Oligonukleotid-Sonden für den elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assay

M67 F	5'-ttttcgacatttcccgtaaatctg-3'
M67 R	5'-ttttcagatttacgggaaatgtcg-3'
GASnonGAS F	5'-ttttcgtttccccgaaattgacggattacccaac-3'
GASnonGAS R	5'-ttttgtggggtaaaccgtcaatttcggggaaacg-3'
2xGAS F	5'-ttttgtttccccgaaattgacggattccccgaaac-3'
2xGAS R	5'-ttttgtttcggggaaatccgtcaatttcggggaaac-3'
2xnonGAS F	5'-ttttcgtttaccccaattgacggattacccaac-3'
2xnonGAS R	5'-ttttgtggggtaaaccgtcaattggggtaaacg-3'

Primer für die RT-PCR

hGAPDH F	5'-gaaggtgaaggctggagtc-3'
hGAPDH R	5'-gaagatggtgatggatttc-3'
hIRF1 F	5'-agctcagctgtgagtgta-3'
hIRF1 R	5'-tagctgctgtggcatcagg-3'
hGBP1 F	5'-gggccagttgctgaaagagc-3'
hGBP1 R	5'-tgacaggaaggctctggtct-3'
hMIG1 F	5'-ccaccgagatccttatcgaa-3'
hMIG1 R	5'-ctaaccgactggctgcttc-3'
hSTAT1 F	5'-ccgtttcatgacctctgt-3'
hSTAT1 R	5'-tgaatattccccgactgagc-3'

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.10 Bakterienstämme und Medien

Bei den Bakterienstämmen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, handelt es sich um *E.coli* DH5 α und *E.coli* XL1-Blue. Beide wurden von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Je nach Art des Plasmids waren für die Entstehung von Bakterienkolonien verschiedene LB-Agarplatten, LB-Flüssigmedium oder SOC-Medium notwendig. Die LB-Agarplatten setzten sich aus 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl und 1,5% Agar zusammen, während das LB-Flüssigmedium aus 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl zusammengesetzt war. Bei beiden erfolgte unter Zugabe von NaOH die Einstellung des pH-Wertes von 7. Danach erfolgte eine 30-minütige Autokla-

vierung bei 121°C und 1,5 bar und anschließend je nach verwendeter Plasmid-DNA die Zugabe des Antibiotikums Kanamycin (50 mg/mL) oder Ampicillin (100 mg/mL) als Selektionsmarker. SOC-Medium, welches für die Transformation eingesetzt wurde, setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7,4. Dieses wurde nach einer 20-minütigen Autoklavierung bei 121°C mit 20 mM steril gefilterter Glucose supplementiert.

<i>E.coli</i> DH5α	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 λαχI^φZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>

2.1.11 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In dieser Arbeit werden die Hersteller der verwendeten Geräte mit den jeweiligen Herstellerangaben in den betreffenden Kapiteln bzw. bei der Beschreibung der einzelnen Methoden angegeben. Falls nicht anders beschrieben, sind diese auf die folgenden Firmen zurückzuführen: B. Braun AG (Melsungen), Biometra (Gottingen), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark), PEQLAP (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Thermo-Fisher (Dreieich) und VWR (Darmstadt).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

Kultivierung der Säugerzellen

Ausschließlich HeLa-S3- und U3A-Zellen kamen in den folgenden Experimenten zum Einsatz. Alle Arbeitsvorgänge erfolgten unter streng aseptischen Bedingungen und unter mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken (Herasafe K2, Thermo Scientific, Dreieich). In einem Brutschrank (Heraeus, Thermo Scientific) mit einer Wasserdampf-gesättigten, 5%igen CO₂-Atmosphäre und einer Temperatur von 37°C fand die Zellkultivierung in 75cm²-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) statt. Als Vollmedium für die U3A-Zellen kam Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium

(DMEM, Biochrom, Berlin) zum Einsatz, welches mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Österreich) und 0,04 µg/mL Puromycin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) supplementiert wurde. Für die Kultivierung von HeLa-S3-Zellen wurde Quantum 101 HeLa-Medium (PAA) mit 1 %Penicillin/Streptomycin (PAA) verwendet.

Passagierung der Zellen

Für die Erhaltungskultur erfolgte die Passagierung der konfluenten Zellen alle 2-3 Tage. Die Zellen wurden einmalig mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS, Gibco, Karlsruhe) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,2 g/L EDTA, 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. Um die Zellkultur weiterführen zu können, fand die Ausplattierung in einem Verdünnungsverhältnis von 1:4 bis 1:6 statt.

Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden bei einer 70-prozentigen Konfluenz eingefroren. Hierbei erfolgte zunächst die Waschung der adhärenenten Zellen mit DPBS, danach die Trypsinierung und anschließend ihre Aufnahme in PBS. Später wurden die Zellen bei 20°C und 1000 rpm für 10 min zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Zu dem daraus entstandenem Pellet der 75cm²-Zellkulturflasche wurden 1 ml Einfriermedium (20% FCS, 10% Dimethylsulfoxid in DMEM) zugegeben. Diese Zellresuspension wurde bei -80°C über Nacht in einem Gefrierkontainer eingefroren (Nalgene, Heidelberg), der mit Isopropanol (Carl Roth) gefüllt war. Da zum einen die Temperatur im Gefrierkontainer stündlich nur sehr langsam (um ca. 1-3°C) gesenkt und zum anderen DMSO verwendet wurde, konnte die Bildung von intrazellularen Eiskristallen verhindert werden. Auch die weitere Lagerung fand bei -80°C statt.

Zellauftau

Zum Wiederauftauen wurden die bei -80°C eingefrorenen Zellen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gelagert. Daran anschließend fand eine Resuspension dieser Zellen in ihrem passenden Vollmedium statt. Nachdem sie dann für 5 min und bei 1000 rpm und 20°C zentrifugiert wurden, konnte der Überstand ver-

worfen werden. Das Pellet wurde daraufhin erneut in das jeweilige Vollmedium resuspendiert und konnte in Kultur genommen werden.

2.2.2 Transfektion der Säugerzellen

Bei den Experimenten dieser Arbeit erfolgte die Transfektion der humanen Zellen mit Plasmid-DNA unter Gebrauch des Transfektionsreagenzes MegaTran1.0 (Origen, Rockville, USA). Bei der Transfektion wurden die Herstellerangaben eingehalten, wobei man für eine 6-Lochplatte je Loch 1,6 µg Plasmid-DNA, bei einer 48-Lochplatte je Loch 0,25 µg DNA und bei einem 8-Kammer-Objektträger je Kammer 0,1 µg Plasmid-DNA verwendete. Die Transfektion erfolgte in folgender Reihenfolge: zunächst verdünnte man die DNA in einer 150 mM NaCl-Lösung. Danach wurde sie mit dem Transfektionsreagenz MegaTran 1.0 komplementiert und das Gemisch für 10 sec gevortext. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach direkt zu dem Vollmedium, in welchem sich die Zellen befanden, hinzugegeben. Etwa 16-20 h nach erfolgter Transfektion wurden die STAT1-exprimierenden Zellen weiter verarbeitet.

2.2.3 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren und Zytokinen

Zytokine und Inhibitoren wurden in den Experimenten immer in einem, den jeweiligen Zellen entsprechendem Vollmedium verdünnt und danach in der benötigten Menge auf die Zellen, die sich ebenfalls im Vollmedium befanden, hinzugegeben. Für die Stimulation kam 10 ng/mL humanes, rekombinantes IFN γ (Biomol) zum Einsatz und die Kinase-Inhibition erfolgte mit 1 µM Staurosporin (Sigma Aldrich).

2.2.4 Mutagenese

Das Einfügen von Punktmutationen in STAT1-kodierenden Plasmiden geschah nach Herstellerangaben mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Der Ansatz für die PCR setzte sich aus je 125 ng komplementäre Primer, 5 µL 10x Reaktionspuffer, 50 ng Matrizen-DNA, 5 Einheiten PfuTurbo-DNA-Polymerase sowie 1 µL dNTP-Mix zusammen. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von H $_2$ O zum Ansatz, um diesen auf 50 µL aufzufüllen. Nach einer initialen Denaturierungsphase von 30 sec bei 95°C erfolgten weitere 16 Zyklen, die aus einer 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 bestanden. Der PCR folgte ein *DpnI*-Verdau bei 37°C für eine Stunde. Hierfür

wurden zum PCR-Amplifikat 10 Einheiten *DpnI*-Restriktionsenzym hinzugegeben und der Ansatz auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Der Verdau diente der Entfernung der parentalen, methylierten DNA-Matrize.

2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA

Die Transformation der Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien bzw. in superkompetente XL1-Blue *E. coli*-Bakterien basierte auf der Hitzeschock-Methode (**Cohen et al. 1972**), indem 100 μ L der DH5 α - bzw. 50 μ L der XL1-Blue-Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA (entspricht 1 μ L des Mutageneseproduktes) versetzt wurden. Anschließend erfolgte für 30 min ihre Inkubation auf Eis, gefolgt von einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für jeweils 30 sec (DH5 α -Bakterien) bzw. 45 sec (XL1-blue-Bakterien). Anschließend fand eine erneute Inkubation der Zellen für 2 min auf Eis statt, um diese nachfolgend in 500-1000 μ L vorgewärmtes SOC-Medium aufzunehmen. Nachdem dieser Ansatz bei 225 rpm und 37°C für 1 h inkubiert wurde, wurden ihm 250 μ L der Bakterienkultur entnommen und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker (Kanamycin bzw. Ampicillin) ausgestrichen. Die Lagerung dieser Agarplatten fand anschließend bei 37°C über Nacht im Schüttler statt.

2.2.6 Plasmid-DNA-Gewinnung aus Bakterien

Um eine analytische Präparation der Plasmid-DNA durchführen zu können, wurde eine einzelne transformierte Bakterienkolonie gepickt und in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker aufgenommen. Diese gepickte Kolonie wurde über Nacht bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des gesamten Inhaltes in einem 2 ml-Reaktionsgefäß für 5 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Die Sequenzierung der mutierten Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte mithilfe des QIAGEN Plasmid Mini-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Für die Isolation großer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde ein präparativer Ansatz verwendet, indem 150 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie angeimpft wurden. Auch hier wurde über Nacht bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 6000 g und RT zentrifugiert und die Plasmid-DNA mithilfe des QIAGEN Plasmid Maxi-Kits (Qiagen) isoliert. Schließlich fanden eine Eluierung der isolierten DNA mit H₂O, eine Konzentrationsbestimmung der DNA

und eine Verdünnung mit H₂O auf 1 µg/µL statt. Die verdünnte DNA wurde stets bei -20° C gelagert.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung isolierter Plasmid-DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA fand in einer 70µL-UV-Küvette (Brand, Wertheim) unter Zuhilfenahme des Photometers BioPhotometer Plus (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm statt. Zur Berechnung der Konzentration wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

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

2.2.8 Sequenzierung

Da die Sequenzierung der Plasmid-DNA essentiell war, um die eingefügten Punktmutationen bestätigen zu können, fand bei allen vorgenommenen Punktmutationen in dieser Arbeit eine Sequenzierung der Plasmid-DNA statt. Dafür wurden 700 ng Plasmid-DNA und 20 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers zu einem Ansatz vermischt und anschließend mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt. Diese Proben wurden dann zur Sequenzierung zu SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen) geschickt und dort weiter verarbeitet.

2.2.9 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Für Dephosphorylierungs-Assays, Western-Blot-Experimente und Gelshift-Versuche wurden Gesamtzellextrakte benötigt. Zu erwähnen ist, dass die komplette Zellaufarbeitung auf Eis erfolgte. Dafür wurden zunächst die Zellen, die auf 6-Lochplatten kultiviert vorlagen, entsprechend vorbehandelt und anschließend zweimal mit PBS (Gibco) gewaschen, um sie dann pro Loch für 5 min in 50 µL eiskaltem zytosolischen Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 10 mM KCl, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na₃VO₄) zu lysieren. Dieser Puffer wurde kurz vor der Verwendung mit 0,1% IGEPAL-CA-360, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren angesetzt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Lösung der Zellen mit einem Zellschaber, wobei der gesamte Inhalt der jeweiligen Löcher in 1,5

mL Reaktionsgefäße pipettiert wurde, um weiterverarbeitet werden zu können. Alsdann wurden diese Ansätze für 15 sec bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und erneut für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurden je 40 µl dieser neuen Überstände (zytosolische Zellextrakte) in eine neue Generation von 1,5 mL-Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis gelagert, um sie später weiterverarbeiten zu können. Die Zellpellets aus dem ersten Schritt befanden sich währenddessen auf Eis und wurden alsdann mit je 50 µL des nukleären Extraktionspuffers (20 mM Hepes, pH 7,4, 420 mM KCl, 20% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na₃VO₄), welcher ebenfalls erst kurz vor der Benutzung angesetzt wurde (3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren) resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach den 30-minütigen Inkubationsphasen wurden die Ansätze für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurden 40 µl dieser nukleären Extrakte zu den oben erwähnten zytosolischen Extrakten hinzugegeben. Im Falle der Weiterverarbeitung für Western-Blot-Experimente wurden diese Gesamtzellextrakte im Verhältnis 1:5 mit 350 mM Tris-HCl, pH 6,8, 8% SDS, 30% Glycerin, 10% β-Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenolblau versetzt, bei 95°C denaturiert und anschließend bei -20°C gelagert. Für Gelshift-Experimente erfolgte die Lagerung der Proben bei einer Temperatur von -80°C; es wurde kein 6x SDS-Probenpuffer hinzugegeben.

2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der STAT-Proteine erfolgte mithilfe SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dazu wurden die oben gewonnenen Gesamtzellextrakte für 3 min bei 95°C aufgeheizt, um anschließend auf Polyacrylamidgelen aufgetragen zu werden. Diese Gele bestanden aus zwei Anteilen, dem Trenngel und dem Sammelgel. Das Trenngel setzte sich aus 4x Trenngelpuffer bestehend aus 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8 und 0,03% APS, 0,16% TEMED und 10% (v/v) Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37 im Verhältnis 5:1) zusammen. Das Sammelgel hatte die folgende Zusammensetzung aus 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8), 0,06% APS, 0,2% TEMED, 5% Rotiphorese Gel 30. Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurden zunächst zwei Glasplatten mithilfe eines Gummibandes und zwei Klemmen dicht zusammengebaut. Das Trenngel wurde angemischt und in die Aussparung zwischen diesen beiden Glasplatten gegossen. Um einen blasenfreien Übergang zwischen dem Trenn- und Sammelgel zu bekommen, wurde das Trenngel

mit Isopropanol beschichtet und der etwa 20-minütige Polymerisations-vorgang abgewartet. Danach wurde das Sammelgel angemischt und, nachdem das Isopropanol abgegossen wurde, auf das polymerisierte Trenngel gegeben. Um die Bildung der Geltaschen, die die Extrakte enthalten sollten, zu gewährleisten, wurde ein Sammelkamm in das Sammelgel eingelegt und die Polymerisation abgewartet. Danach wurden die nun fertigen Gele in einem vertikalen Elektrophoresesystem (Minigel-Twin, Biometra, Göttingen) eingespannt. Wie oben erwähnt, wurden schließlich die eingefrorenen Proben für 3 min bei 95°C denaturiert, bevor ihre Auftragung in einer Menge zwischen 10 und 20 µL in die Geltaschen stattfand. Im SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,6) und bei einer konstanten Spannung von 11 mA pro Gel erfolgte schließlich für 2 bis 2,5 Stunden die Auftrennung der STAT-Proteine.

2.2.11 Analyse mittels Western-Blot

Nach dem Elektrophoreselauf wurden die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Schwalbach/Ts.) übertragen. Alle Western-Blots dieser Arbeit wurden nach dem elektrischen Transferverfahren der Semi-Dry-Methode mit dem Fastblot B44 (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Da die PVDF-Membran hydrophob ist, musste sie zunächst 5 min in Methanol (Carl Roth) aktiviert werden. Daran schloss sich eine Inkubation der Membran unter Schütteln für 30 min in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10% Methanol, pH 8) an. Die Transferdauer betrug 90 min und erfolgte bei 80 mA pro Blot. Danach wurde die Membran für 1 h in 4% BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth) in TBS-T blockiert. Das Blockierungsreagenz hatte die Aufgabe, freie, unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach dem Blocken wurde die Membran mit 5 ml des Primärantikörpers bedeckt und unter Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran jeweils fünfmal 5 min mit 5 ml TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 5 ml des 1:10000 in 4% BSA/TBS-T-verdünnten IRDye-gekoppelten Sekundärantikörpers bedeckt und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Der nächste Schritt bestand aus der Detektion der STAT-Proteine. Dies erfolgte im LICOR Odyssey Sa Imaging System (Biosciences, Bad Homburg). Nach dem Einlesen der Membranen erfolgte ihre Weiterverarbeitung mit dem Ablösepuffer (2% SDS, 0,7% β-Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) für 1 h im 60°C warmen

Wasserbad, um sie für eine weitere Behandlung mit einem Erstantikörper vorzubereiten. Der Ablösepuffer diene hierbei dazu, gebundene Immunglobulin-komplexe von der Membran zu entfernen. Nach einstündiger Inkubationszeit wurde die Membran viermal 15 min in TBS-T gewaschen und wie am ersten Tag erneut für 1 h mit 4% BSA in TBS-T blockiert, um sie anschließend mit 5 ml einer Zweit-Antikörper-enthaltenden Lösung zu bedecken. Die Inkubation fand ebenfalls über Nacht bei 4°C und unter Schütteln statt. Am dritten und letzten Tag wurde der Erstantikörper entfernt und die Membran wieder fünfmal jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie zum letzten Mal im LI-COR Odyssey-Sa-Imaging-System eingelesen wurde.

2.2.12 Dephosphorylierungs-Assay

Der *In-vitro*-Dephosphorylierungs-Assay erfolgte mit Gesamtzellextrakten aus rekonstituierten U3A-Zellen. Nachdem der Dephosphorylierungspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mg/mL BSA, 50 mM KCl, 5 mM EDTA) kurz vor dem Gebrauch mit 20 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 2 Einheiten T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TC-PTP, Biomol International, Plymouth, USA) komplementiert wurde, wurden 10 µL der Extrakte mit 10 µL des Dephosphorylierungspuffers versetzt. Nachdem die Proben mit der angegebenen Reaktionszeit bei 30°C inkubiert worden waren, erfolgte ein Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 6x SDS-Probenpuffer. Die Proben wurden alsdann für 3 min bei 95°C denaturiert und zur Ermittlung der Dephosphorylierung mittels Western-Blot weiterverarbeitet.

2.2.13 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von STAT1-GFP-exprimierenden Zellen wurden HeLa-Zellen in 8-Kammer-Objektträgern (Lab-Tek Chamber Slides, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) kultiviert und am Folgetag mit pSTAT1-GFP-Derivaten transfiziert. Anschließend erfolgte ihre Stimulation für die angegebenen Zeiten mit 10 ng/mL IFN γ bzw. nachfolgend mit 1 µM Staurosporin. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert und anschließend die Zellkerne mit 5 µg/mL Hoechst 33258 (Sigma Aldrich) in PBS für 10 min unter Schütteln und bei RT gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckt. Die Lagerung der

Objektträger erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Mithilfe des Mikroskops Axiovert 200M (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) konnten die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Dazu wurden sie mit einer CCD-Kamera (Intas, Science Imaging Instruments, Göttingen) unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfilter fotografiert. Dabei wurden die GFP-Fusionsproteine bei einer Wellenlänge von $\lambda = 480$ nm und die mit Hoechst 33258 angefärbten Zellkerne bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit Corel Draw (Corel Cooperation, Unterschleißheim) und dem Softwareprogrammen Image-Pro MDA 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, USA) bearbeitet.

2.2.14 Reporteragen-Assay

Der Reporteragen-Assay diente der Bestimmung der transkriptionellen Aktivität der beiden STAT1-Mutanten. Bei der Untersuchung der Genaktivierung standen unterschiedliche IFN γ -sensitive Luciferase-Reporteragenkonstrukte, wie z.B. das 3xLy6E-Gen mit einer dreifachen GAS-Bindestelle im Promotorbereich (**Wen et al. 1995**), zur Verfügung. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass bei der Promotoraktivierung durch Phospho-STAT1 das Enzym Luciferase transkribiert wird, das die Umsetzung von α -Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Bei dieser Reaktion werden Lichtquanten emittiert, deren Anzahl proportional zur gebildeten Luciferasemenge und damit indirekt zu der Menge an phosphorylierten STAT1-Proteinen ist. Ein weiteres Konstrukt für die Anwendung im Reporteragen-Assay war pIC-339, welches ein natives Promotorfragment mit singulärer GAS-Bindestelle aus dem humanen *icam1*-Gen enthielt. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde ein konstitutiv exprimierter β -Galaktosidase-Reporter benutzt. Im Rahmen des Experiments wurden U3A-Zellen verwendet, die in einer 48-Lochplatte kultiviert wurden. Die Transfektion dieser Zellen erfolgte pro Well mit 250 ng STAT1-Plasmid, 200 ng β -Gal-Reporteragen und 70 ng des 3xLy6E- bzw. pIC-339-Plasmids. Es wurde eine Sechsfach-Bestimmung je Konstrukt und Behandlungsmodus vorgenommen. Am Folgetag fand die Stimulation einiger Zellen für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ statt, während die restlichen Zellen zum Vergleich unstimuliert gelassen wurden. Nach Ablauf der Stimulationszeit erfolgte das Waschen der Zellen mit PBS, um sie anschließend für 15 min bei RT mit 100 μ L eines komplementierten Triton-Glycylglycin-Lysepuffers (25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 1% Triton X-100, 15 mM MgSO $_4$, 4 mM EGTA, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren) zu inkubieren. Danach wurden diese Lysate in

1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 20 µL des Überstandes in eine weiße 96-Lochplatte (Nunclon Surface, Taufkirchen) pipettiert und unter Zuhilfenahme des Luminometers Centro XS3 LB960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) pro Loch mit 50 µL des Luciferase-Reagenzgemisches injiziert. Nach der Messung fand die Auswertung der Ergebnisse mit dem Softwareprogramm MikroWin in der Version 4.41 statt.

2.2.15 Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay (EMSA)

Der elektrophoretische Mobilitätsshift-Assay (EMSA) diente in dieser Arbeit dem Nachweis spezifischer DNA-Bindung von STAT1 (**Begitt et al. 2000**). Es ist bekannt, dass STAT1-Proteine mit GAS-enhaltenden Doppelstrang-Oligonukleotid-Sonden eine nicht-kovalente, transiente Verbindung eingehen. Diese Eigenschaft verursacht eine Retardierung ihrer elektrophoretischen Mobilität im Gel. Zur autoradiographischen Detektion der Banden dienten radioaktiv markierte Doppelstrang-Oligonukleotide mit degenerierten oder kanonischen GAS-Sequenzen. Für solche Experimente wurden U3A-Zellen in 6-Lochplatten in Vollmedium kultiviert und von diesen nach entsprechender Vorbehandlung, wie oben beschrieben, Gesamtzell-extrakte hergestellt. Um die Interaktion zwischen STAT-Proteinen und der DNA zu analysieren, verwendete man Sonden aus hybridisierten Doppelstrang-Oligonukleotiden, die jeweils eine singuläre (M67), zwei degenerierte (2xnonGAS), eine zweifache (2xGAS) oder eine degenerierte und eine kanonische GAS-Bindestelle (GASnonGAS) aufwiesen. Die radioaktive Markierung erfolgte an ihren überhängenden Enden. Für die Herstellung der Sonden wurden zunächst 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. Danach wurde dieser Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lagerung der Nukleotide erfolgte bei -20°C. Anschließend fand die radioaktive Markierung der DNA-Sonden mit α³³P]-markierten Desoxynukleotiden an ihren nicht komplementären 5'-überhängenden Enden statt. Hierzu diente ein Ansatz, der sich aus 8 µL der radioaktiv markierten dNTPs, 0,1 ng der Oligonukleotide, 5 Einheiten des Klenow-Enzyms (ein Fragment der *E.coli*-DNA-Polymerase I) und 5 µL 10x Eco-Pol-Puffer (New England Biolabs) zusammensetzte. Dieser wurde 25 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min mit einem Überschuss an unmarkierten dNTPs versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit

konnte die Reaktion mit 1 μ L einer 0,5 mM EDTA-Lösung beendet werden. Zuletzt wurde dieser Ansatz für 3 min und bei 700 g zentrifugiert und die freien Nukleotide mittels Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen (GE Healthcare, München) chromatographisch entfernt. Zur Untersuchung der STAT1-DNA-Interaktion wurden STAT1-DNA-Komplexe hergestellt, indem 4,5 μ L Gesamtzellextrakte 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) für 15 min bei RT inkubiert wurden. Im Falle, dass weniger als 4,5 μ L Extrakte eingesetzt wurden, ergänzte man das fehlende Volumen durch die Zugabe von 1xPBS. Die Identifikation der DNA-gebundenen STAT1-Proteine erfolgte im Rahmen einer Supershift-Reaktion durch Inkubation mit 1,3 μ L polyklonalem STAT1 α -p91-Antikörper bzw. als Kontrolle STAT3-Antikörper (beide von Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien). Die 4,8%-igen TBE-Polyacrylamidgele setzten sich aus 2,4 mL 10x TBE, 84 mL H₂O, 12 mL Rotiphorese (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1), 2 mL 10% APS und 100 μ L TEMED zusammen und wurden nach der Anmischung zur Polymerisierung in die Aussparung zwischen zwei zusammengebauten Glasplatten gegossen. Die Gele mussten vor Gebrauch für 2 h bei 400 Volt prääquilibriert werden. Anschließend wurden die Proben für ca. 2,5 h in 0,25-fachem TBE-Laufpuffer bei 4°C und 400 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele auf Whatman-Papier (Albet Lab Science, Dassel) übertragen und vakuumgetrocknet. Zuletzt erfolgte ihre Exponierung auf eine Phospho-Imager-Folie. Am nächsten Tag wurden die Platten mithilfe eines Fujifilm FLA-5100 Scanner (Fuji, Düsseldorf) eingescannt und mit der Software Aida Image Analyzer v. 4.06 (Raytest) und Corel Draw weiter bearbeitet.

2.2.16 Isolation von RNA

Für die Extraktion von mRNA wurden U3A-Zellen benötigt, die auf 6-Lochplatten in Vollmedium kultiviert wurden. Nach 24 h fand ein Mediumwechsel auf Dulbecco's-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), supplementiert mit 1% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin, statt. Sofort im Anschluss wurden die Zellen mit pcDNA3.1-Konstrukten transfiziert. Am Folgetag wurden einige dieser Zellen für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert, Kontrollen hingegen wurden unstimuliert gelassen.

Nach Ablauf der Stimulationszeit erfolgte die RNA-Isolierung mithilfe des peqGold-Total-RNA-Kits (PEQLAB) nach Herstellerangaben und ihre Eluierung mit 50 μL RNase-freiem H_2O . Die fertiggestellten Proben konnten nun entweder sofort zu cDNA weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden.

2.2.17 Herstellung der cDNA

Mithilfe des Verso-cDNA-Kits (Thermo Fisher Scientific) erfolgte die Herstellung der komplementären DNA (cDNA) aus der isolierten mRNA. Es wurde ein Ansatz von 20 μL nach den Angaben des Herstellers pipetiert, welcher 8 μL RNA enthielt. Das Protokoll der reversen Transkription beinhaltete zwei Zyklen: nach einem ersten Zyklus, indem eine 30-minütige cDNA-Synthese bei 42°C stattfand, wurden die Proben in einem zweiten Zyklus für 2 min auf 95°C erhitzt. Anschließend konnte die cDNA bei -20°C gelagert werden.

2.2.18 Real-time-PCR

Die Real-time-PCR dient der Analyse der Genexpression von STAT1-WT und den generierten Punktmutanten. Die Herstellung des 19 μL Reaktionsansatzes erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green Mix (Thermo Scientific). Für den Ansatz wurden komplementäre Primer (Tib MolBiol, Berlin) verwendet. Zu diesem Ansatz wurde 1 μL cDNA hinzugefügt. Für die Untersuchung der Genexpression wurden literaturbekannte endogene Zielgene von STAT1 in Betracht gezogen.

2.2.19 Statistik

Die statistische Auswertung aller Genexpressionsanalysen wurde im Rahmen eines t -Tests, in manchen Fällen auch mithilfe eines Rang-Summen-Tests vorgenommen. Die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Für die Analyse wurden die Programme SigmaPlot und Microsoft Office-Excel verwendet. Ein p -Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Einführung von Punktmutationen in der Linker- bzw. SH2-Domäne von STAT1 zwei Mutanten generiert und im Weiteren hinsichtlich ihrer phänotypischen Eigenschaften im Interferon-abhängigen Signalweg charakterisiert. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf eventuelle Veränderungen der Tyrosinphosphorylierung und der transkriptionellen Aktivierung gelegt. Hergestellt wurden die beiden Punktmutanten durch Austausch zweier konservierter Aminosäurereste in der Linker- bzw. SH2-Domäne, welche zuvor durch Sequenzvergleiche innerhalb der sieben Mitglieder der humanen STAT-Familie als vergleichsweise konserviert identifiziert worden waren. Untersuchungen der Kristallstruktur stellten sicher, dass sich diese beiden Aminosäurereste an der Proteinoberfläche befinden.

3.1 Sequenzhomologie von STAT1-E524

Bei dem ersten hier untersuchten Aminosäurerest handelt es sich um einen Glutaminsäurerest in Position 524 von STAT1, der durch Sequenzvergleich aller humanen STAT-Proteine als relativ konserviert eingestuft wurde (**Abb. 2**). Die humanen Familienmitglieder STAT1, STAT3 und STAT4 sowie STAT92E aus *Drosophila melanogaster* besitzen an homologer Stelle einen entsprechenden Glutaminsäurerest, der carboxyterminal bei allen aufgeführten STAT-Mitgliedern von einem Lysinrest gefolgt wird. Der Glutaminsäurerest 524 im STAT1-Molekül wurde im Rahmen einer sequenzspezifischen Mutagenese durch Alanin ausgetauscht und die erhaltene Punktmutante STAT1-E524A in späteren Experimenten eingehend charakterisiert.

STAT1	D	Q	L	N	M	L	G	E	K	L	L	G	P	N
STAT2	D	Q	L	S	M	L	R	N	K	L	F	G	Q	N
STAT3	E	Q	L	T	T	L	A	E	K	L	L	G	P	G
STAT4	D	Q	L	H	M	L	A	E	K	L	T	V	Q	S
STAT5a	E	N	L	V	F	L	A	Q	K	L	F	N	N	S
STAT5b	E	N	L	V	F	L	A	Q	K	L	F	N	N	S
STAT6	E	H	F	L	F	L	A	Q	K	I	F	N	D	N
92E	D	N	L	D	F	L	Y	E	K	L	Q	R	E	E
Dicty	R	P	L	S	S	Y	D	L	K	Y	I	Q	T	H

Abb. 2: Sequenzvergleich einer Region aus der Linker-Domäne verschiedener STAT-Proteine. Im Sequenzvergleich zwischen den angegebenen STAT-Proteinen wird deutlich, dass der Glutaminsäurerest in Position 524 von STAT1 (rot) vergleichsweise gut in der Familie der STAT-Proteine konserviert ist.

3.2 Homologie von STAT1-E585

Ein zweiter Glutaminsäurerest, der in Position 585 in der SH2-Domäne des STAT1-Moleküls lokalisiert ist, wurde ebenfalls unter Zuhilfenahme der Kristallstruktur und durch Sequenzvergleich aller humanen STAT-Proteine bestimmt; er ist bei den ersten vier humanen Familienmitgliedern in gleicher Weise vorhanden (**Abb. 3**). Im Rahmen einer sequenzspezifischen Mutagenese erfolgte auch hier der Austausch dieses Glutaminsäurerestes gegen Alanin; die Mutante STAT1-E585A wurde ebenfalls nach Expression in humanen Zellen charakterisiert und hinsichtlich ihrer Eigenschaften mit STAT1-WT verglichen.

STAT1	G	F	I	S	K	E	R	E	R	A	L	L	K	D
STAT2	G	F	V	S	R	S	Q	E	R	R	L	L	K	K
STAT3	G	F	I	S	K	E	R	E	R	A	I	L	S	T
STAT4	G	F	V	S	K	E	K	E	R	L	L	L	K	D
STAT5a	G	F	V	N	K	Q	Q	A	H	D	L	L	I	N
STAT5b	G	F	V	N	K	Q	Q	A	H	D	L	L	I	N
STAT6	G	F	I	S	K	Q	Y	V	T	S	L	L	L	N
92E	G	F	I	N	K	T	K	A	Q	T	D	L	L	R
Dicty	G	Y	M	G	R	Q	E	V	N	D	A	L	Q	N

Abb. 3: Sequenzvergleich humaner und nicht-humaner STAT-Proteine aus einem Bereich der SH2-Domäne unter Einschluss von E585. Der Sequenzvergleich zwischen den aufgeführten STAT-Proteinen macht deutlich, dass der Glutaminsäurerest in Position 585 von STAT1 (rot) in der Familie der STAT-Proteine relativ konserviert ist.

3.3 STAT1-E585A zeigt ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau

Da Tyrosinphosphorylierung, Dimerisierung und DNA-Bindung notwendige Voraussetzungen der Zytokin-induzierten Kernakkumulation der STATs darstellen (**Shuai et al. 1992; Darnell et al. 1994; Mowen und David 1998; Herrington et al. 1999**), wurde zunächst untersucht, ob die Alaninsubstitutionen an den Positionen 524 und

585 die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung beeinflussen. Das Phosphorylierungsniveau der beiden Mutanten STAT1-E524A und -E585A wurde im Rahmen von Western-Blot-Analysen überprüft. Dazu erfolgte zunächst die transiente Transfektion der HeLa-S3-Zellen mit den Vektoren pSTAT1-WT-GFP, pSTAT-E524A bzw. pSTAT-E585A und am Folgetag die Stimulation der Zellen mit IFN γ . Zusätzlich konnte durch die Zugabe von Staurosporin, einem Proteinkinase-Inhibitor, die zeitabhängige Abnahme der Phosphorylierung dargestellt werden. Dazu wurden die Zellen nach einer 45-minütigen Stimulation mit IFN- γ unterschiedlich lang mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Nach der Herstellung von Gesamtzellextrakten und ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung konnten anschließend mithilfe eines Phospho-STAT1-Antikörpers im Immunoblot die Phosphorylierungsbanden detektiert werden. Um die Gesamtmenge von STAT1 zu bestimmen, wurden die Blot-Membranen anschließend gestrippt, um sie nach mehrmaligem Waschen mit einem Pan-STAT1-Antikörper exponieren zu können.

Wie man der **Abb. 4** entnehmen kann, ist nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation in den Extrakten von STAT1-WT-exprimierenden Zellen und in STAT1-E524A-enthaltenden Extrakten eine vergleichbare Tyrosinphosphorylierung zu beobachten. Zusätzlich kann bei denjenigen Zellen, die einer Staurosporin-Inkubation unterzogen wurden, bereits nach 15 min eine abgeschwächte Phosphorylierungsbande beobachtet werden. Diese Abnahme des Phosphorylierungsniveaus wird bei Zellen, die für 30 min mit Staurosporin behandelt wurden, noch deutlicher, bis das Phosphorylierungssignal nach 45-minütiger Inkubation mit Staurosporin kaum noch detektiert werden kann. Die Abbildung demonstriert zudem, dass die STAT1-E585A-Mutante im Vergleich zum STAT1-WT nach 45-minütiger Stimulation mit IFN γ eine signifikante Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus aufweist. Während bei STAT1-WT mit zunehmender Dauer der Staurosporin-Behandlung die bereits beschriebene kontinuierliche Abnahme des Phosphorylierungssignals registriert wurde, wies diese Punktmutante im Vergleich dazu eine signifikant erhöhte Phosphorylierungsrate nach 30-minütiger Staurosporin-Inkubation auf, erkennbar am stärkeren Phospho-STAT1-Signal. Das Experiment legt nahe, dass sich die Mutante STAT-E524A weder in ihrer Kinetik der Dephosphorylierung nach Staurosporin-Behandlung noch im Phosphorylierungsniveau nach IFN γ -Stimulation vom WT-STAT1 unterscheidet. Zum anderen konnte demonstriert werden, dass die Mutante STAT1-E585A im Vergleich zum STAT1-WT diskret, aber signifikant hyperphosphoryliert ist.

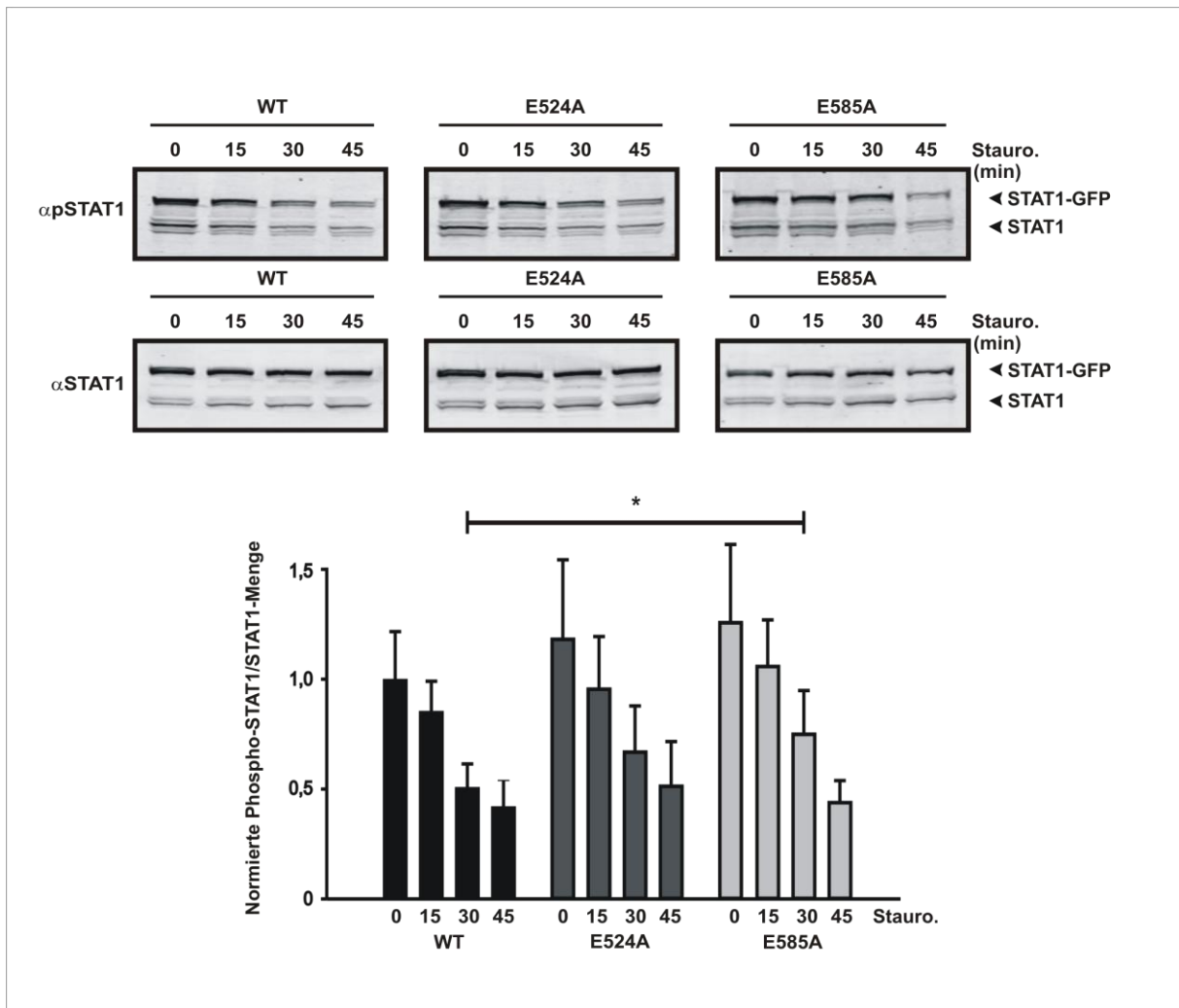


Abb. 4: STAT1-E524A und STAT1-WT haben nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation eine ähnliche *In-vivo*-Phosphorylierungskinetik, während STAT1-E585A hyperphosphoryliert ist. Nach transients Transfektion von HeLa-Zellen mit pSTAT1-WT-, pSTAT-E524A- bzw. pSTAT-E585A-GFP und ihrer 45-minütigen Stimulation mit 10 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ am Folgetag erfolgte unmittelbar anschließend eine Inkubation mit 1 μM Staurosporin für die angegebenen Zeiten. Das obere Bild der Abbildung stellt das Ergebnis repräsentativer Western-Blot-Analysen nach Inkubation mit einem Phospho-STAT1-Antikörper dar und unten eine Reinkubation der Membranen mit einem STAT1-spezifischen Antikörper. Um eine statistische Signifikanz berechnen zu können, wurden die Ergebnisse aus mindestens drei unterschiedlichen Versuchen quantifiziert und in der Graphik im positiven Fall mithilfe eines Balkens dargestellt (unteres Bild, $p=0,024$).

3.4 Normale Kinetik der IFN γ -induzierten Kernakkumulation von STAT1-E524A und -E585A

Mithilfe von STAT1-GFP-Fusionsproteinen wurde die Kinetik der IFN γ -induzierten Kernakkumulation fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dazu wurden im Rahmen dieses Experiment zunächst HeLa-S3-Zellen transient mit pSTAT1-WT-GFP, STAT1-E524A-GFP oder pSTAT1-E585A-GFP transfiziert und am Folgetag entweder unbehandelt belassen oder 45 min mit IFN γ stimuliert bzw. alternativ nach IFN γ -Stimulation zusätzlich mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 3,7% Formaldehyd/PBS und die Färbung der Kerne mit Hoechst 33258. Die entstandenen Objektträger wurden im Fluoreszenzmikroskop beurteilt und von den fixierten Zellen typische Aufnahmen angefertigt, wie sie in **Abb. 5** dargestellt sind. Diese verdeutlichen, dass WT-STAT1 und beide Mutanten ohne IFN γ -Stimulation zunächst eine panzelluläre Verteilung des STAT-Proteins aufweisen, nach IFN γ -Stimulation jedoch eine komplette Translokation in den Zellkern beobachtet wird.

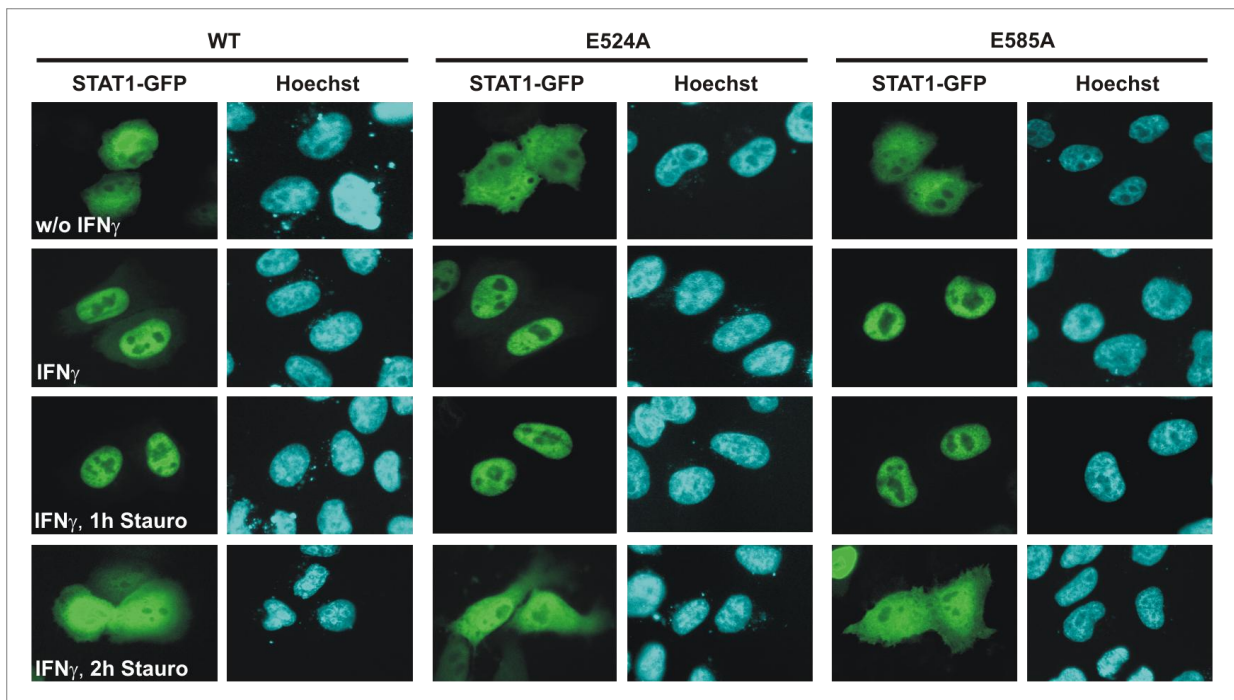


Abb. 5: Vergleichbare Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-WT, -E585A und -E524A. Nach Transfektion von HeLa-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-E524A-GFP oder pSTAT1-E585A-GFP wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen (obere Reihe) oder 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert (zweite Reihe) bzw. nach vorangegangener 45-

minütiger IFN γ -Stimulation für 1 h (dritte Reihe) bzw. 2 h (vierte Reihe) mit 1 μ M Staurosporin inkubiert. Die Zellkerne der Formalin-fixierten Zellen wurden mit Hoechst 33258 angefärbt.

Bereits nach einer einstündigen Inkubation der Zellen mit Staurosporin konnte die anfänglich beobachtete panzelluläre Ruheverteilung der STAT-Proteine wiederhergestellt werden, da JAK-Kinasen durch Staurosporin inhibiert wurden und folglich keine Tyrosinphosphorylierung mehr stattfinden konnte. Ein zusätzliches Experiment wurde mit unmarkiertem STAT1 unter Einsatz von pcDNA3.1-STAT1-Plasmiden durchgeführt, um auszuschließen, dass die Präsenz des GFP-Fusionsproteins, welches im Vergleich zu endogenem STAT1 eine verringerte Exportrate besitzt (**Köster und Hauser 1999; Begitt et al. 2000; Meyer et al. 2007**), die subzelluläre Verteilung von STAT1 beeinflussen könnte. Hierfür erfolgte in gleicher Weise die Transfektion von U3A-Zellen mit den pcDNA3.1-Expressionsvektoren der jeweiligen STAT1-Moleküle. Im Anschluss daran fand die Stimulation der Zellen mit IFN γ und ihre zusätzliche Inkubation mit Staurosporin statt. Nach Immunfärbung mit STAT1-spezifischem Antikörper wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Wie man der **Abb. 6** entnehmen kann, erfolgte nach 45-minütiger Stimulation mit IFN γ eine Kernakkumulation sowohl beim STAT1-WT als auch bei beiden Punktmutanten. Die 60-minütige Inkubation der Zellen mit Staurosporin führte zu einer panzellulären Verteilung der STAT1-Moleküle. Durch diese beiden Experimente konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Punktmutanten in ihrer Kinetik der Kernakkumulation nicht von STAT1-WT unterscheiden.

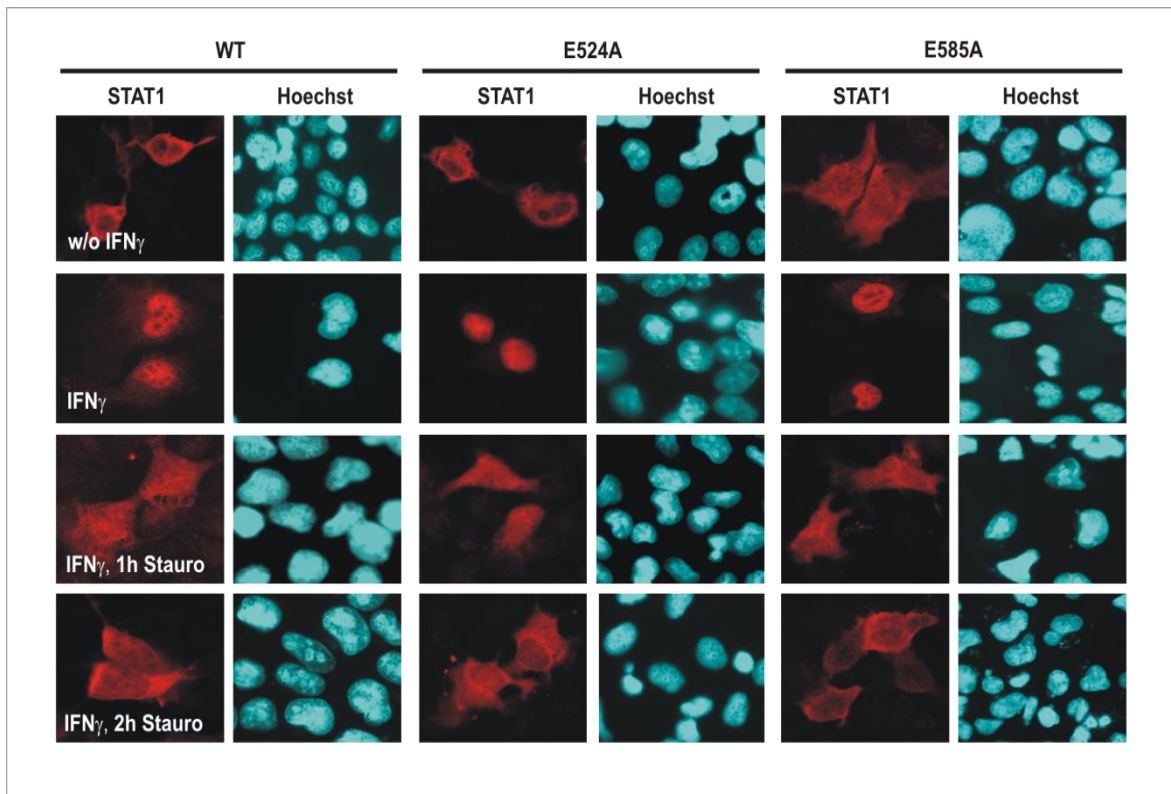


Abb. 6: Die immunzytochemische Untersuchung weist keinen Unterschied in der Kinetik der Kernakkumulation von STAT1-WT und den beiden Punktmutanten auf. STAT1-WT-, STAT1-E524A- und STAT1-E585A-exprimierende U3A-Zellen wurden für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M Staurosporin behandelt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit Methanol. Die STAT1-Lokalisation wurde immunzytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper und Cy3-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege detektiert und die Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt.

3.5 Die Hyperphosphorylierung führt bei STAT1-E585A zu einer verstärkten DNA-Bindung

Ein weiterer Nachweis für die verstärkte Phosphorylierung von STAT1-E585A geschah mittels Gelshift-Assays (EMSA). Dazu erfolgte nach transienter Transfektion von U3A-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-E524A-GFP bzw. pSTAT1-E585A-GFP eine 45-minütige Stimulation der Zellen mit 10 ng/mL IFN γ und eine anschließende Inkubation mit 1 μ M Staurosporin für die angegebenen Zeiten. Nach Herstellung von nukleären Zellextrakten wurden diese für 15 min mit radioaktiver M67-Sonde inkubiert, die über eine einfache GAS-Bindestelle verfügte. In allen

EMSA-Experimenten wurden gleiche Extraktmengen aufgetragen. Die Analyse der Bindung von phosphorylierten STAT1-Proteinen an die [³³P]-markierte Sonde erfolgte autoradiographisch (**Abb. 7**). Zusätzlich konnte im Rahmen einer Supershift-Reaktion durch den Einsatz von Anti-STAT1 α -Antikörper (α S1) und als Kontrolle Anti-STAT3-Antikörper (α S3) gezeigt werden, dass es sich bei den detektierten Banden um STAT1-DNA-Komplexe handelte. Die Zugabe von spezifischen α S1-Antikörpern, die gegen den STAT1-DNA-Komplex gerichtet waren, führte dazu, dass es zu einer Größenzunahme des Molekülkomplexes durch Bindung von Immunglobulin und folglich zu einer retardierten Laufgeschwindigkeit kommt. Dieses zeigte sich in einer Verschiebung bzw. einem partiellen Verlust der STAT1-DNA-Bande. Eine Negativkontrolle erfolgte durch die Zugabe von unspezifischem α S3-Antikörper zu den Zellextrakten, die bei einer vergleichbaren Extraktmenge keine Änderung der Laufgeschwindigkeit der Komplexe, wie sie bei einem positiven Supershift vorkommen würde, zur Folge hatte.

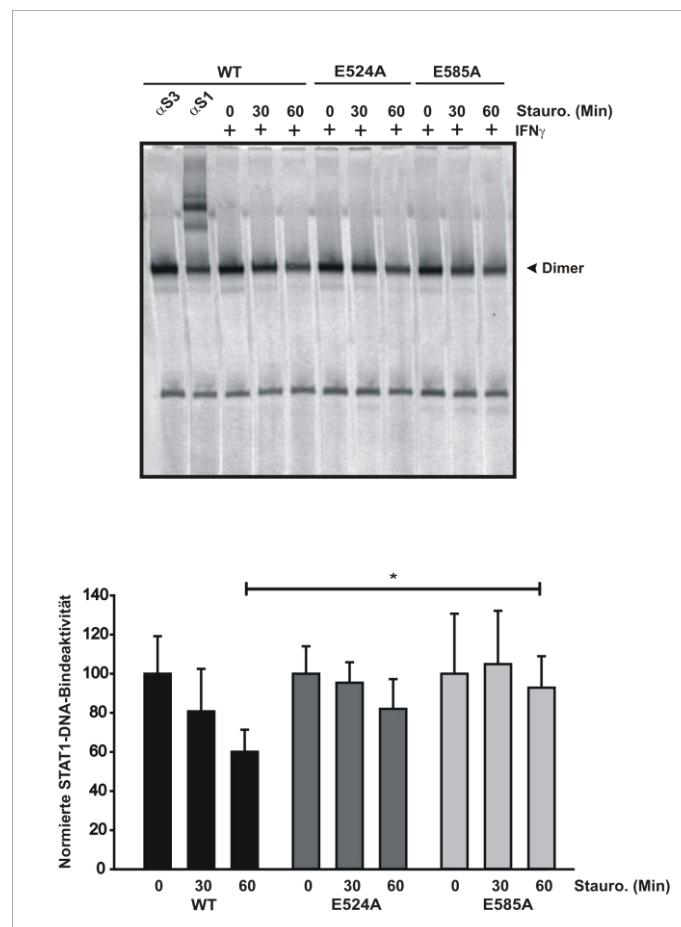


Abb. 7: Verbesserte Bindung von STAT1-E585A an M67-DNA. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Gelshift-Assays. Nachdem U3A-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP,

pSTAT1-E524A-GFP bzw. pSTAT1-E585A-GFP transfiziert und am Folgetag zunächst mit 10 ng/mL IFN γ und nachfolgend mit 1 μ M Staurosporin für die angegebenen Zeiten behandelt wurden, erfolgte die Herstellung nukleärer Extrakte, die zunächst 15 min lang mit einer [33 P]-markierten M67-Sonde inkubiert wurden. Daran schlossen sich eine gelelektrophoretische Auftrennung, die Gel Trocknung im Vakuum und abschließend eine autoradiographische Detektion an. Im Rahmen der Supershift-Reaktion wurden Anti-STAT1 α -Antikörper (α S1) und Anti-STAT3-Antikörper (α S3) benutzt. Das obere Bild der Abbildung stellt das Ergebnis nach Inkubation mit markierter M67-Sonde dar. Die mit dem Pfeil markierten Banden zeigen detektierte STAT1-DNA-Komplexe. Für Signifikanzberechnungen wurden die Ergebnisse aus mindestens drei unterschiedlichen Versuchen quantifiziert (unteres Bild, $p=0,044$).

3.6 STAT1-E5245A und -E585A besitzen eine normale Dissoziationsrate von DNA

Kompetitions-Gelshifts sollten die Hypothese belegen, dass die Hyperphosphorylierung eine Folge einer verminderten Off-Rate von DNA darstellt. Dazu wurden erneut Gesamtzellextrakte aus IFN γ -stimulierten STAT1-WT-GFP-, -E524A-GFP- bzw. -E585A-GFP-exprimierenden U3A-Zellen hergestellt, die anschließend für 15 min mit [33 P]-markierter M67-Sonde und danach für die angegebenen Zeiten mit einem 750-fachem molaren Überschuss an nicht-radioaktiv markierter M67-DNA inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellextrakte in gleicher Weise mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen. Wie in **Abb. 8** demonstriert wird, konnte in Bezug auf die Dissoziationskinetik kein Unterschied zum STAT1-WT festgestellt werden. Das Experiment konnte beweisen, dass eine veränderte Dissoziationskinetik der Mutante STAT1-E585A nicht der Grund für deren in den früheren Experimenten dokumentierte Hyperphosphorylierung ist.

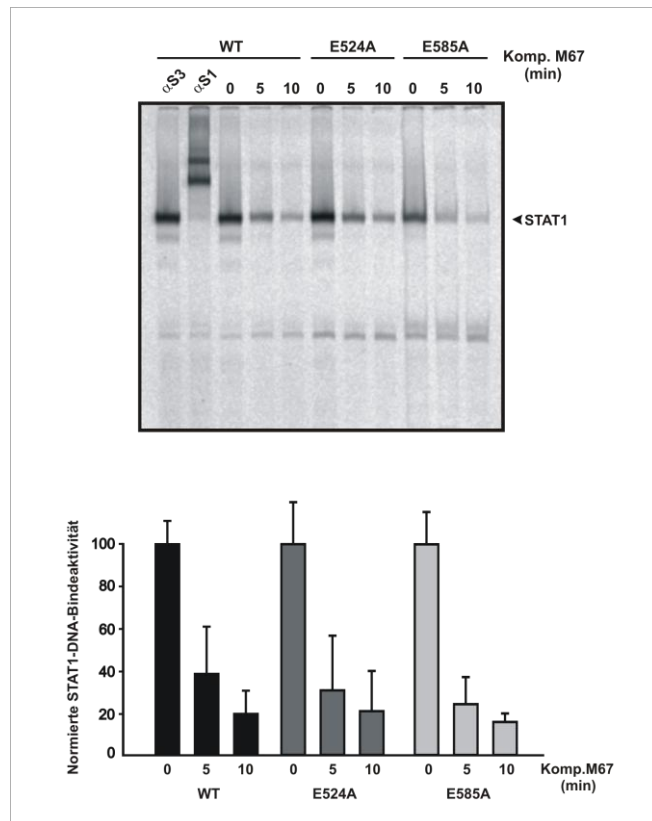


Abb. 8: Normale Dissoziationskinetik der STAT1-Varianten E585A und E524A von DNA. Nachdem U3A-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-E585A bzw. pSTAT1-E524A transfiziert und am Folgetag mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert wurden, erfolgte die Herstellung von Zell-extrakten und deren anschließende Inkubation für 15 min mit radioaktiv markierter M67-Sonde, die eine einfache GAS-Bindestelle besitzt. Anschließend wurden die Reaktionen mit unmarkierter M67-DNA im 750-fachen molaren Überschuss für die angegebenen Zeiten inkubiert und sofort danach auf ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die STAT1-DNA-Banden (Pfeil) autoradiographisch im Vakuum-getrockneten Gel detektiert. Das obere Bild der Abbildung stellt das autoradiographische Ergebnis der Konkurrenz mit der M67-DNA dar. Die mit dem Pfeil markierten Banden zeigen die detektierten STAT1-DNA-Komplexe. Für die Quantifizierung wurden die Ergebnisse aus mindestens drei verschiedenen Versuchen gemittelt und als Mittelwerte sowie Standardabweichungen graphisch dargestellt (unteres Bild).

3.7 STAT1-E524A und -E585A haben eine normale Affinität zu DNA

Um die Affinität der DNA-Bindung beider Punktmutanten genauer analysieren zu können, wurden weitere Gelshift-Versuche durchgeführt. Dazu wurden zunächst nach 45-minütiger $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation zelluläre Extrakten aus STAT1-WT-GFP-, STAT1-E524A-GFP-, und STAT-E585A-GFP-exprimierenden U3A-Zellen hergestellt

und anschließend mit radioaktiv-markierten DNA-Sonden inkubiert. Als DNA-Proben kamen eine Sonde mit doppelter GAS-Bindestelle (2xGAS), eine Sonde mit einfacher, gefolgt von einer degenerierten GAS-Bindestelle (GASnonGAS) sowie eine zweifache Nicht-GAS-Sonde (2xnonGAS) zum Einsatz.

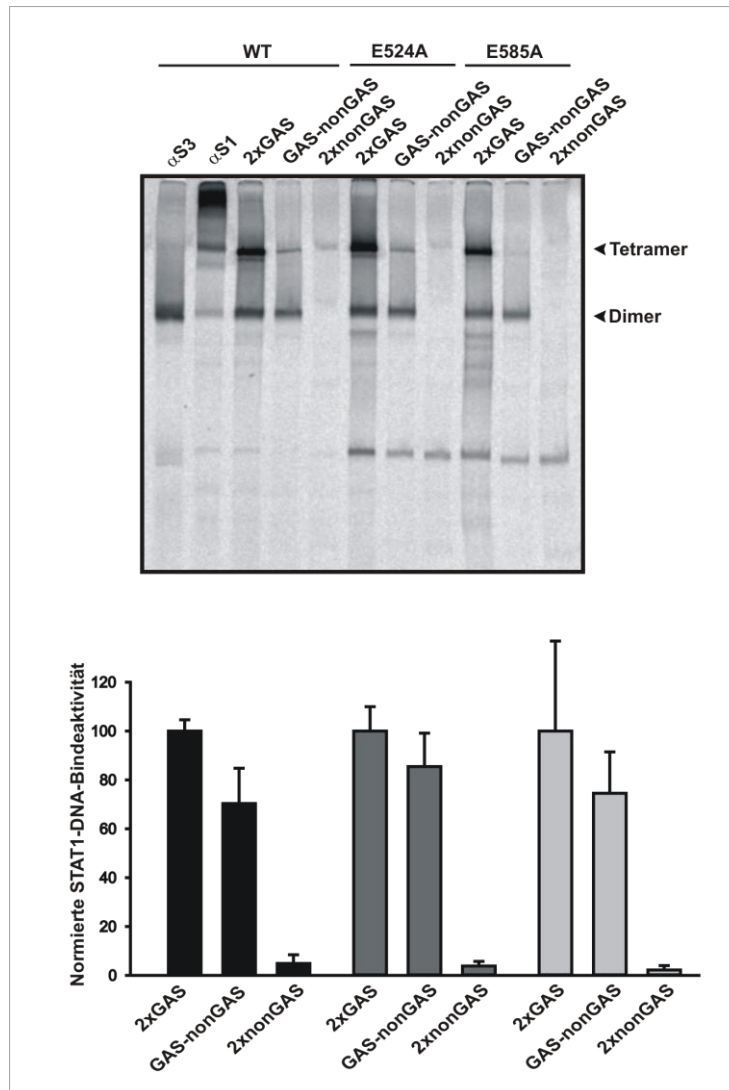


Abb. 9: Regelrechte DNA-Bindeaffinität von STAT1-E524A und STAT1-E585A im Vergleich zum Wildtyp-Molekül. Nachdem U3A-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-E585A-GFP bzw. pSTAT1-E524A-GFP transfiziert und für 45 min mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert wurden, erfolgte die Herstellung nukleärer Extrakte. In Gelshift-Assay wurden diese mit den angegebenen [33 P]-markierten Sonden inkubiert. Die autoradiographische Auswertung fand nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Vakuum-getrockneten Gelen statt. Der Pfeil verweist auf die detektierten dimeren und tetrameren STAT1-DNA-Komplexe.

In **Abb. 9** ist ein typisches Ergebnis der autoradiographischen Detektion mit quantitativer Auswertung dargestellt. Unter Verwendung aller Sonden kann man keinen signifikanten Unterschied der DNA-Bindeaffinität von STAT1-WT im Vergleich zu den beiden Punktmutanten beobachten.

3.8 Kein Unterschied in der Dephosphorylierungskinetik zwischen STAT1-WT und STAT1-E585A

In den bisherigen Versuchen wurde kein Unterschied zwischen STAT1-E524A und STAT1-WT festgestellt. Deshalb konzentrierte ich mich in den folgenden Experimenten nur noch auf STAT1-E585A. In den vorigen Western-Blot-Versuchen konnte demonstriert werden, dass die letztgenannte Mutante nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation ein diskret, aber signifikant erhöhtes Phosphorylierungsniveau aufweist. Basierend auf der Hypothese, dass sich die beobachtete Hyperphosphorylierung (**Abb. 4 und Abb. 7**) auf eine verminderte Dephosphorylierung zurückzuführen lässt, erfolgte bei STAT1-E585A die Durchführung eines *In-vitro*-Dephosphorylierungs-Assays. Hierfür wurden von STAT1-WT-GFP- und STAT1-E585A-GFP-exprimierenden U3A-Zellen nach 45-minütiger Stimulation mit 10 ng/mL IFN γ Gesamtzellextrakte hergestellt. Anschließend wurden diese Extrakte für die angegebenen Zeiten bei 30°C mit Tc45-Protein-Tyrosin-Phosphatase inkubiert, um eine Dephosphorylierung zu induzieren. Der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese schloss sich eine Western-Blot-Analyse an. Durch die Behandlung der Blot-Membranen mit einem Phospho-STAT1-Antikörper erfolgte im Immunoblot die Detektion der Tyrosin-Phosphorylierungsbanden. Zur Bestimmung der STAT1-Menge wurden nach stringentem Waschen die Membranen mit einem pan-STAT1-Antikörper reinkubiert. **Abb. 10** demonstriert das Ergebnis der *In-vitro*-Dephosphorylierung. Das Phosphorylierungssignal der Punktmutante ist mit zunehmender Tc45-PTP-Inkubationsdauer mit dem des STAT1-WT vergleichbar. Durch dieses Experiment konnte bewiesen werden, dass die Hyperphosphorylierung bei STAT1-E585A nicht auf eine kompromittierte Dephosphorylierungskinetik zurückzuführen ist. Somit ist STAT1-E585A keine Dephosphorylierungsmutante.

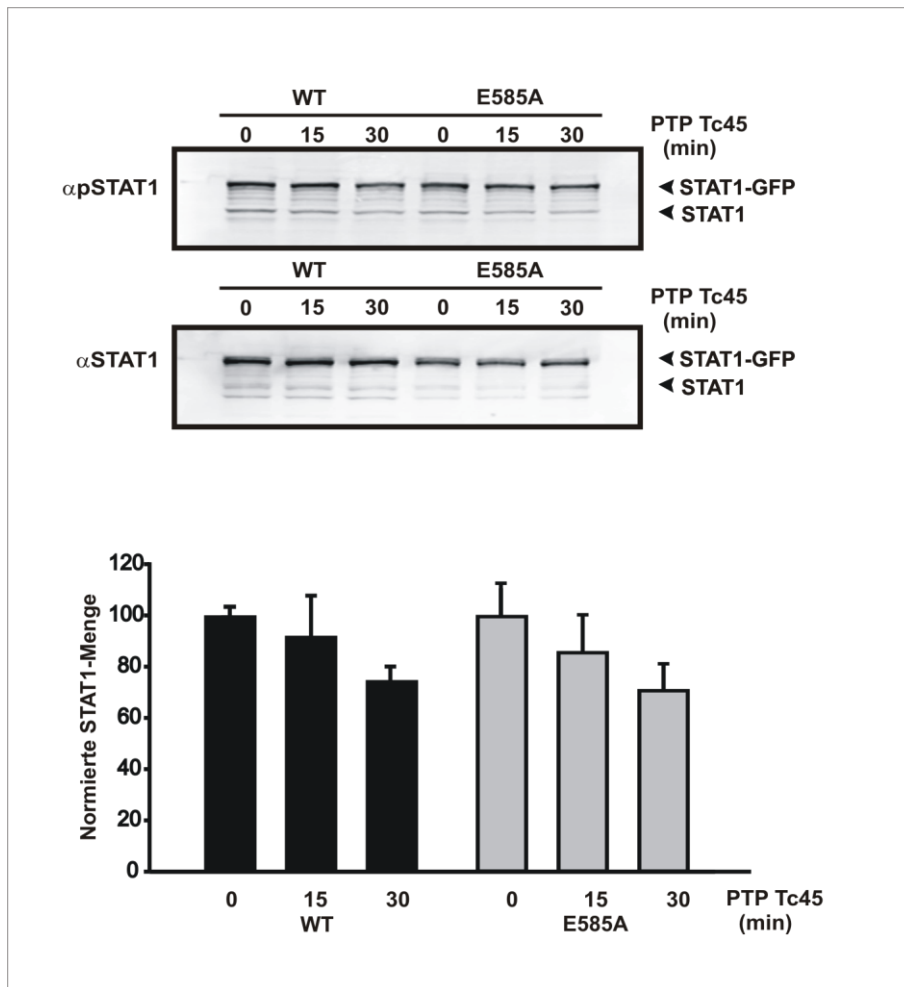


Abb. 10: Gleiche Dephosphorylierungskinetik der STAT1-Varianten E585A und -WT. Nach der Transfektion von U3A-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-E585A-GFP fand am Folgetag eine 45-minütige Stimulation mit 10 ng/mL IFN γ statt, um Gesamtzellextrakte zu gewinnen. Nach erfolgter Inkubation mit der Tyrosin-Phosphatase Tc45-PTP bei 30°C für die angegebenen Zeiten wurden die Dephosphorylierungsreaktionen mittels Western-Blot-Analysen überprüft. Die obere Abbildung stellt das Ergebnis nach Inkubation mit einem Phospho-STAT1-Antikörper dar, die Mittlere eine Reinkubation derselben Membran mit einem STAT1-spezifischen Antikörper und die Untere die entsprechende Quantifizierung aus mindestens drei unterschiedlichen Versuchen nach gleichem Protokoll.

3.9 Die Hyperphosphorylierung führt zu einer geänderten Reportergen-Aktivität von STAT1-E585A

Um mögliche Folgen der Mutation auf die IFN γ -induzierte Genaktivierung feststellen zu können, erfolgte ein Reportergen-Assay. Hierzu fand zunächst die Transfektion von U3A-Zellen mit pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-E585A-GFP, pGAS3xLy6E sowie p β Gal statt. Bei dem verwendeten Luciferase-Reportergenkonstrukt handelt es

sich um einen synthetischen Promotor mit drei hintereinander liegenden GAS-Bindestellen (3xLy6E) in einem Abstand von 10 bp. Die Zellen wurden am Folgetag entweder unstimuliert gelassen oder 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert. Anschließend fand eine spektrometrische Messung der Luciferase-Aktivität im Photometer statt und die gemessene Aktivität der Luciferase wurde auf die β -Galactosidaseaktivität normiert. Wie in **Abb. 11** demonstriert wird, hat die Mutation an Position 585 einen signifikanten Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität: STAT1-E585A zeigt im Vergleich zum STAT1-WT eine verbesserte transkriptionelle Aktivität. Anhand dieses Experiments kann somit ein zweiter phänotypischer Unterschied zum STAT1-WT nachgewiesen werden.

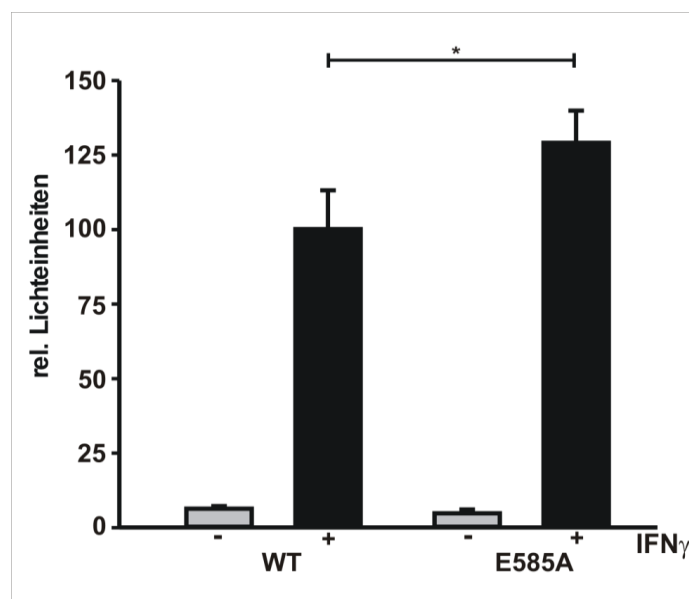


Abb. 11: Dargestellt ist das Ergebnis eines Reporteragen-Assays mit verbesserter IFN γ -abhängiger Genaktivierung durch die STAT1-Mutation E585A. Nach der Transfektion von U3A-Zellen mit den Vektoren pSTAT1-WT bzw. pSTAT1-E585A sowie den Reporteragen-Konstrukten p3xLy6E und p β Gal wurden diese 16-24 h danach entweder unbehandelt belassen (graue Balken) oder für 6 h mit 5 ng/mL IFN γ stimuliert (schwarze Balken). Nach der Herstellung von Zellextrakten erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Proben von gleich großer Zellzahl. Dabei erfolgte die Normierung der Luciferase-Aktivität auf die spektrometrisch gemessene β -Galactosidase-Aktivität der jeweiligen Proben. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet (p=0,001).

Um die verbesserte transkriptionelle Aktivität zu bestätigen, erfolgte die Untersuchung von STAT1-E585A in weiteren Reporteragen-Assays unter Verwendung eines nativen Promotors mit singulärer GAS-Bindestelle. Hierbei kam das Reporter-

gen pIC-339 mit einem trunkierten Promotor des *icam1*-Gens zum Einsatz. Wie oben beschrieben, erfolgte die Transfektion von U3A-Zellen mit den Vektoren pSTAT1-WT-GFP, pSTAT1-E585A-GFP, pIC-339 und p β Gal. Es fand eine Sechsfach-Bestimmung statt, bei der die Zellen entweder für 6 h mit 10 ng/mL IFN γ stimuliert oder unbehandelt gelassen wurden.

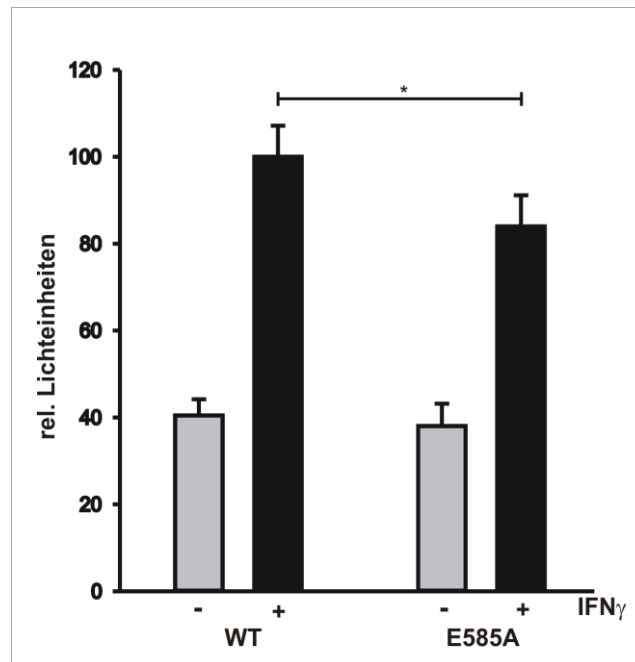


Abb. 12: Eine verbesserte transkriptionelle Aktivität der Mutante konnte unter Verwendung von nativen Promotorelementen nicht bestätigt werden. Nach der Transfektion von U3A-Zellen mit den Vektoren pSTAT1-WT und pSTAT1-E585A, dem Vektor pIC-339 und p β Gal erfolgte 16–24 h danach die Stimulation der Zellen mit 10 ng/mL IFN γ für 6 h (schwarzer Balken) oder sie blieben unbehandelt (grauer Balken). Nach Lyse der Zellen wurde die Luciferase-Induktion auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert. Es erfolgte eine Sechsfach-Bestimmung. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf sechs unabhängige Transfektionen. Der Stern markiert statistisch signifikante Unterschiede.

Die β -Galaktosidase-Aktivität diente dabei der Normierung der spektrometrisch erfassten Luciferase-Aktivität der Zellextrakte. **Abb. 12** demonstriert, dass nach IFN γ -Stimulation unter Verwendung von nativen Promotoren keine verbesserte Genaktivierung der Punktmutante STAT1-E585A beobachtet wird. Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-E585A ist in diesem Fall mit dem STAT1-WT vergleichbar.

3.10 Erhöhte Expression des *mcp1*-Gens durch STAT1-E585A

Um die Induktion von nativen STAT1-Zielgenen *in vivo* analysieren zu können, wurden Real-time-PCR-Experimente durchgeführt. Die Untersuchungen fanden dabei mithilfe einer Doppelbestimmung an sechs literaturbekannten endogenen Zielgenen von STAT1 statt, die durch IFN γ -Stimulation aktiviert werden. In den durchgeführten Experimenten gelang es, über die Messung der emittierten Fluoreszenzsignale eine direkte Aussage über die Menge an Transkript-mRNA zu treffen, da die Zunahme der Fluoreszenz proportional zur Genexpression verlaufen muss.

Für die Quantifizierung wurden die Expressionsdaten der jeweiligen STAT1-Zielgene auf das Expressionsniveau des Haushaltsgens *gapdh* normiert. Im Verlauf des Experiments erfolgte die transiente Transfektion von U3A-Zellen mit den pcDNA-Konstrukten pSTAT1-WT oder pSTAT1-E585A. Anschließend wurden die transfizierten Zellen im serumarmen Kulturmedium mit 1% FCS kultiviert, um sie am darauffolgenden Tag für 0 h oder 6 h mit 10 ng/mL IFN γ zu stimulieren. Im nächsten Schritt erfolgte die Isolierung der RNA aus den STAT1-exprimierenden U3A-Zellen und ihre Umschreibung in cDNA, um aus ihr die Genexpression mittels RT-PCR quantitativ bestimmen zu können.

In der **Abb. 13** wird der Vergleich zwischen STAT1-WT und STAT1-E585A dargestellt. Es wird deutlich, dass die Mutante im Vergleich zum STAT1-WT nach IFN γ -Stimulation vor allem eine signifikante Zunahme der Induktion der beiden STAT1-Zielgene *mcp1* und *cxcl10* aufweist.

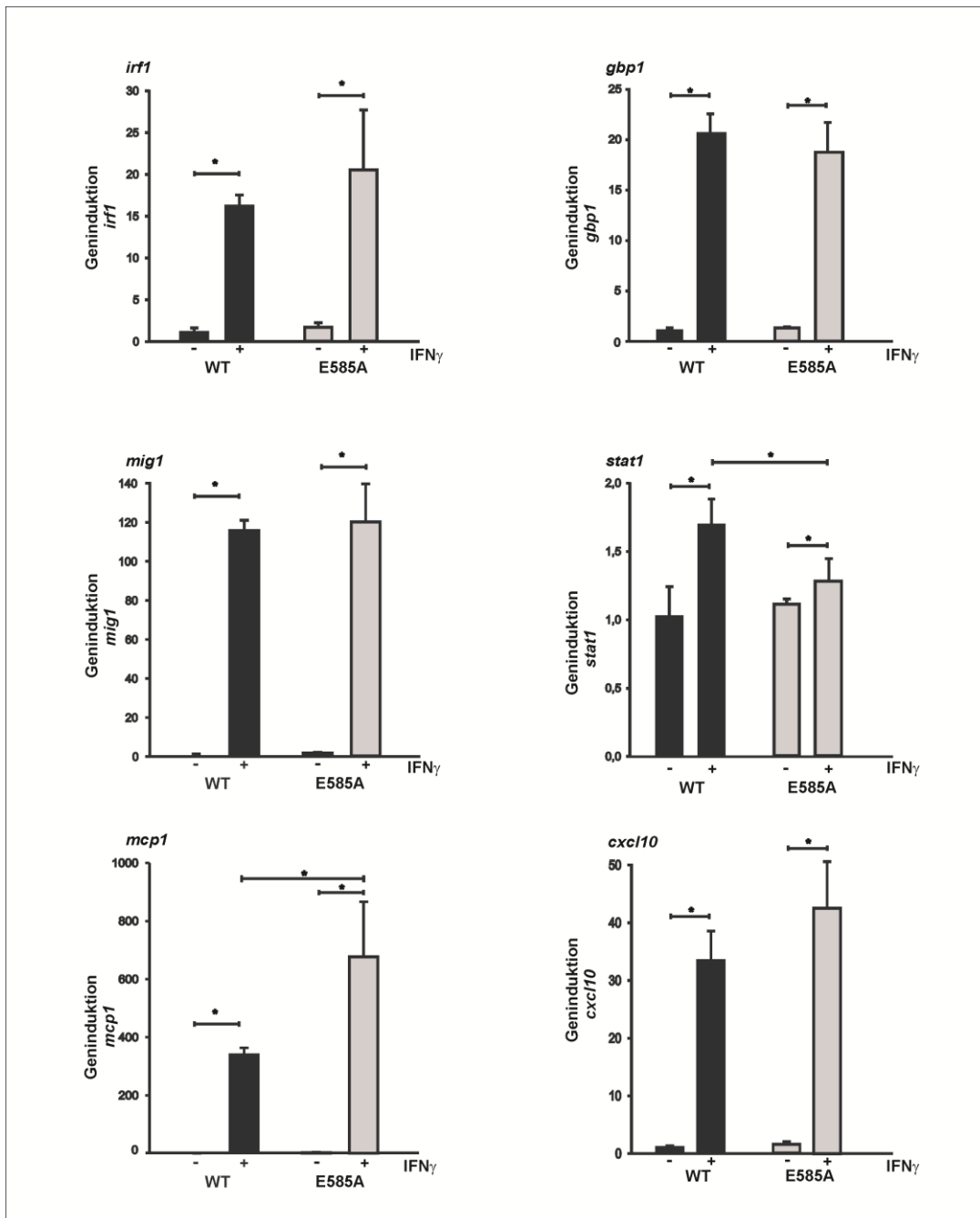


Abb. 13: Die Punktmutanten zeigen eine verminderte *In-vivo*-Genaktivierung. Nach der Transfektion der U3A-Zellen mit pSTAT1-WT oder pSTAT1-E585A erfolgte ihre Kultivierung im Nährmedium mit 1% FCS. Am Folgetag wurden sie für 6 h mit 10 ng/mL Interferon- γ (schwarzer Balken) stimuliert oder unstimuliert gelassen (grauer Balken). Anschließend wurde nach Extraktion der RNA aus den lysierten Zellen cDNA hergestellt. Im Zuge der Real-time-PCR wurde die Genexpression von STAT1-Zielgenen ermittelt. Ihre Normierung fand dabei auf die Induktion des Haushaltsgenes *gapdh* statt. Im Rahmen einer Doppelbestimmung wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Der Stern markiert statistisch signifikante Unterschiede.

4 Diskussion

Die STAT1-vermittelte Signalverarbeitung ist von allen STAT-Proteinen wohl am besten, obgleich immer noch lückenhaft verstanden. Gut belegt ist, dass nach IFN γ -Stimulation die intrazelluläre Signalweiterleitung über die Ausbildung von STAT1/STAT1-Homodimeren ausgelöst wird. Aktivierte Janus-Kinasen phosphorylieren daraufhin die STAT-Moleküle an einem kritischen Tyrosinrest, woraufhin diese mithilfe von Transportmechanismen in den Zellkern gelangen. Dort erfolgt ihre Bindung an die DNA, um die Transkription IFN γ -induzierter Gene herbeizuführen. Die Tyrosin-Phosphorylierung stellt somit die wichtigste Voraussetzung für die Akkumulation der Proteine im Nukleus, die Bindung an DNA sowie die Zytokin-abhängige Zielgenaktivierung dar.

Bevor sich der Linker- und SH2-Domäne bei der Steuerung der Interferon-Antwort zugewandt wird, soll hier zunächst ein kurzer Überblick über die verschiedenen Domänen des STAT1-Moleküls gegeben werden. Bei der aminoterminalen Domäne des Proteins handelt es sich um eine stark konservierte Sequenz, die bei STAT1 aus 135 AS besteht und *in vitro* proteolytisch vom sogenannten Kernfragment abspaltbar ist (**Vinkemeier et al. 1996; Murphy et al. 2000**). Die N-Domäne weist innerhalb der STAT-Familie einen ähnlichen strukturellen Aufbau auf; allerdings kann sie innerhalb der Mitglieder der STAT-Protein-Familie nicht beliebig ausgetauscht werden (**Strehlow und Schindler 1998; Murphy et al. 2000**). Wie Analysen der Kristallstruktur von STAT4 zeigen, bilden jeweils acht kurze α -Helices einen hakenförmigen Ring aus (**Schindler und Darnell 1995; Strehlow und Schindler 1998; Vinkemeier et al. 1998**). Mutationsexperimente machten deutlich, dass der Amino-terminus an vielen bedeutenden Funktionen der STAT-Proteine teilnimmt. Eine zentrale Rolle kommt ihm bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen benachbarten Dimeren zu, die eine kooperative DNA-Bindung der Dimere an Gamma-aktivierten Sequenzen (GAS) ermöglicht. Durch diese Oligomerisierung bzw. Tetramerisierung kann eine Stabilisierung der DNA-Bindungsaktivität an schwachen Promotoren erfolgen (**Vinkemeier et al. 1996; Xu et al. 1996; Stark et al. 1998; John et al. 1999**). Zusätzlich ist die aminoternale Domäne des STAT1-Proteins für den Transport des phosphorylierten Proteins in den Nukleus notwendig (**Meissner et al. 2004**). Darüber hinaus wurden im Bereich des aminoterminalen

Endes des STAT1-Proteins spezifische Oberflächen entdeckt, die mit dem CREB-bindenden Protein (CBP/p300) (**Liao et al. 2000**), dem Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT 1 (PIAS1) (**Horvath 2000**) und Zytokin-Rezeptoren (**Leung 1996; Murphy 2000**) interagieren. Zuletzt scheint der Aminoterminus bei der Dephosphorylierung einen bedeutsamen Part zu übernehmen. Hierfür wurde mithilfe von Mutationsexperimenten ein konservierter Phenylalaninrest in Position 77 von STAT1 (Position 81 von STAT5), der für die Oligomerisierung und Tyrosindephosphorylierung von STAT-Molekülen essentiell ist, zu Alanin mutiert. Dadurch war die Möglichkeit zur Bildung von Tetrameren und damit verbunden die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung erschwert (**Meyer et al. 2004a**). Die Vermutung lag darin, dass die erzeugten Mutanten nicht mehr dazu fähig waren, den Wechsel zwischen paralleler und antiparalleler Konformation durchzuführen, welcher jedoch für die Rekrutierung der TC45-Phosphatase unentbehrlich ist. Diese Mutanten zeigten im Versuch folglich kaum eine Abnahme des Phosphorylierungsniveaus (**Shuai et al. 1996; Strehlow und Schindler 1998; Meyer et al. 2004; Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006**). Des Weiteren konnte anhand von Deletionsexperimenten mit STAT1- und STAT4-Mutanten, die um 88 bzw. 44 Aminosäurereste am Aminoterminus trunziert waren, gezeigt werden, dass der Aminoterminus die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung von STAT-Dimeren beeinflusst (**Xu et al. 1996**).

Auf den Aminoterminus folgt im STAT1-Molekül die Coiled-coil-Domäne, die mit diesem über eine flexible Region von 20 AS verbunden ist und die die Aminosäuren 136 bis 316 enthält (**Mertens et al. 2006**). Den strukturellen Aufbau der Coiled-coil-Domäne bilden vier antiparallele α -Helices (**Chen et al. 1998; Levy und Darnell 2002**). Ihre Funktion erfüllt die Coiled-coil-Domäne im Rahmen von Protein-Protein-Interaktionen, indem sie die zweite Interaktionsfläche für die Bindung des einen Monomers mit der DNA-Bindedomäne des zweiten Monomers herstellt. Somit trägt sie zur Stabilisierung der antiparallelen Konformation des Proteins bei. Durch Mutation der Reste, die an dieser Interaktion beteiligt sind (Q340, L383, G384, T385, H406, Q408 in der DBD und besonders F172 in der CCD), kam es zu einer Verringerung der Stabilität der antiparallelen Form, mit der Folge, dass das Molekül hyperphosphoryliert blieb (**Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006**). Zusätzlich besitzt die Vier-Helix-Struktur eine leucinreiche helikale Region, die als nukleäres Exportsignal (NES) dient (**Begitt et al. 2000**). Zuletzt kann die Coiled-coil-Domäne

als potentielle Kontaktstelle für andere Transkriptionsfaktoren dienen. So kann zum Beispiel die Mutation eines Lysinrestes zu Alanin an Stelle 161 der Coiled-coil-Domäne dazu führen, dass das Protein nicht mehr an p48 binden kann. Diese Bindung ist jedoch für die Ausbildung des ISGF3-Transkriptionskomplexes essentiell (**Bromberg und Darnell 2000; Shuai 2000**).

Die DNA-Bindedomäne liegt carboxyterminal der Coiled-coil-Domäne und gehört wie diese zum Kerngerüst des STAT1-Proteins. Sie hat eine Länge von annähernd 170 Aminosäuren (317-487) und weist eine Immunglobulin-ähnliche Struktur auf, die sich aus β -Faltblattstrukturen und Schleifen zusammensetzt (**Chen et al. 1998; Levy und Darnell 2002**). Sie beinhaltet eine Region, die palindromische GAS-Sequenzen erkennt und über diese mit der DNA-Doppelhelix interagiert. Hierbei findet jeweils eine Wechselwirkung eines phosphorylierten STAT-Monomers mit einer halben palindromischen Sequenz statt (**Chen et al. 1998; Decker et al. 1997**). Dabei findet die Bindung an die DNA sowohl mit der kleinen als auch mit der großen Furche statt. Hierbei interagiert die Aminosäure E421 mit der kleinen, während die Aminosäuren N460 und K336 mit der großen Furche interagieren (**Chen et al. 1998**). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Bereich eine Verringerung der Affinität des Proteins zur DNA zur Folge haben (**Darnell 1997; Decker et al. 1997; Stark et al. 1998; Williams et al. 2000**). Beispiele für solche Mutationen sind die DNA-Minus-Mutante (V426D, T427D) sowie die DNA-Plus-Mutante (T327R, V426H und T427H, **Meyer et al. 2003**). Bei der DNA-Minus-Mutante konnte weder eine Bindung an GAS-Stellen noch an Nicht-GAS-Stellen der DNA beobachtet werden; daraus folgend fand bei dieser Mutante auch keine Kernakkumulation statt. Im Vergleich dazu beobachtete man bei der DNA-Plus-Mutante eine verlängerte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung sowie eine verlängerte Dauer der Kernakkumulation in den durch IFN γ -Stimulation behandelten Zellen. Außerdem zeigt sich bei dieser Mutante zusätzlich eine unspezifische Bindung an Nicht-GAS-Elemente im Vergleich zum WT. Trotz der Tatsache, dass diese Mutante im Vergleich zum WT eine höhere Affinität zu unspezifischen DNA-Sequenzen hatte, konnte keine transkriptionelle Aktivität der STAT1-Zielgene beobachtet werden (**Meyer et al. 2003**). Eine weitere Funktion der DBD ist die Vermittlung der Bindung an Importin- $\alpha 5$. Der Kernimport geschieht dabei mittels eines Dimer-spezifischen nukleären Lokalisationssignals (ds-NLS) (**Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al. 2002**).

Die Linker-Domäne beinhaltet helikale Strukturen und verbindet die DBD mit der SH2-Domäne. Sie reicht beim STAT1-Protein von der Aminosäure 488 bis 575 und umfasst folglich 88 AS-Reste (**Chen et al. 1998, Levy und Darnell 2002**). Ihre Funktion ist noch weitestgehend unbekannt, doch scheint ihre Hauptaufgabe darin zu liegen, die DNA-Bindung durch Auslösung von strukturellen Änderungen in der SH2-Domäne zu modulieren. Folglich hat sie auch einen Einfluss auf die Regulation der transkriptionellen Aktivität (**Chen et al. 1998; Yang et al. 1999**). Mutationen in diesem Bereich des Proteins haben oft eine Veränderung der transkriptionellen Aktivität sowie eine veränderte Dissoziationsrate von der DNA zur Folge (**Yang et al. 1999; Yang et al. 2002**). Die Linker-Domäne scheint auch bei der nukleozytoplasmatischen Translokation des STAT-Proteins eine Rolle zu spielen, da sie die Bindung des STAT1 an den Kernporen-Komplex beeinflusst (**Marg et al. 2004**).

Auf die Linker-Domäne folgt im STAT1-Protein die SH2-Domäne. Der namensgebende Domäentyp wurde ursprünglich als nichtkatalytische, konservierte Domäne mit einer Länge von ca. 100 Aminosäureresten in der zytoplasmatischen Tyrosinkinase des Fujinami-Sarkoma-Virus (*v-fps*) und später auch in der Sequenz der Tyrosinkinase Src aminoterminal der Kinase-Domäne (SH1-Domäne) identifiziert. Daher wird sie auch als Src-Homologie-2-Domäne (SH2) bezeichnet (**Sadowski et al. 1986; Pawson 1988; Koch et al. 1991**). Sie liegt im STAT1-Protein carboxyterminal der Linker-Domäne und umfasst die Aminosäurereste 576 bis 682. In allen STAT-Proteinen ist sie die am stärksten konservierte Domäne. Im Rahmen kristallographischer Analysen konnte ein struktureller Unterschied der SH2-Domäne von STAT-Proteinen mit anderen Proteinen festgestellt werden (**Gao et al. 2004**). Die Grundstruktur der SH2-Domäne ($\alpha\beta\beta\alpha$) besteht aus zwei α -Helices (αA und αB), die ein zentrales antiparalleles β -Faltblattmotiv ($\beta B-\beta D$) erfassen (**Waksman et al. 1992; Chen et al. 1998, Gao et al. 2004**). Im Unterschied zur Kristallstruktur der Src-SH2-Domäne (*v-src*) besitzt die STAT-SH2-Domäne ein anderes β -Motiv und fünf α -Helices, die der Linker-Domäne entsprechen (**Gao et al. 2004**). Bei der Signalweiterleitung kommt ihr im Rahmen der Homo- und Heterodimerisierung sowie der Rekrutierung von STAT1-Monomeren an die phosphorylierten Abschnitte von membranständigen Rezeptoren oder intrazellulären Tyrosinkinasen eine bedeutende Funktion zu (**Shuai et al. 1994; Becker et al. 1998**). Die SH2-Interaktion wird fast ausschließlich durch die Aminosäurereste 701-708 vermittelt (**Shuai et al. 1994**).

Auch Sequenzen carboxyterminal des phosphorylierten Tyrosinrestes können von der SH2-Domäne erkannt werden, woraus ein unterschiedliches Bindeverhalten resultiert, das sich in der Spezifität der unterschiedlichen SH2-Domänen deutlich macht (**Koch et al. 1991; Songyang et al. 1993; Pawson et al. 2001**). Die Dimerisierung basiert auf der reziproken Interaktion eines invarianten phosphorylierten Tyrosinrestes des einen Monomers mit der SH2-Domäne des zweiten Monomers (**Shuai et al. 1993; Chen et al. 1998**). Dabei wird ein Phosphotyrosinrest in Position 701 des kontralateralen Monomers vom konservierten Argininrest in Position 602 erkannt. Die Interaktion wird durch einen Lysinrest in der SH2-Domäne an der Position 584 sowie von den Aminosäuren in der Nähe des Phosphotyrosins an den Positionen zwischen 701 und 708 vermittelt. Durch die Wechselwirkung der SH2-Domänen beider Monomere mit dem Tyrosinphosphat kommt es zur Bildung stabiler Homodimere in paralleler Konfiguration (**Wenta et al. 2008**). STAT-1-Proteine, bei denen eine Mutation am Argininrest in Position 602 stattgefunden hat, verlieren die Fähigkeit zur Dimerisierung (**Shuai et al. 1994; Chen et al. 1998**). Eine weitere Funktion der SH2-Domäne liegt in der Regulierung katalytischer Domänen von Tyrosinkinase. Ein Beispiel hierfür ist die Tyrosinkinase v-fps. Nachdem Phosphotyrosinpeptide an die Kinase gebunden haben, wirkt die SH2-Domäne als positiver Effektor der Reaktion, indem sie die enzymatische Aktivität der Kinase-Domäne steigert (**Koch et al. 1989**). Nicht nur Enzyme, sondern auch viele regulatorische Proteine verfügen über eine SH2-Domäne, mit deren Hilfe es dem Adapterprotein ermöglicht wird, tyrosinphosphorylierte Substrate zu erkennen und zu ubiquitilieren. Ein Beispiel für solch ein regulatorisch wirkendes Protein ist das c-Cbl (*casitas b-lineage lymphoma proto-oncogene*) (**Joazeiro et al. 1999; Pawson et al. 2001**).

Im STAT-Molekül folgt auf die SH-2-Domäne die carboxyterminal liegende Transaktivierungsdomäne (TAD), die mit dieser flexibel in Verbindung steht und innerhalb des STAT-Moleküls die geringste Konservierung aufweist. Im Bezug auf ihre Länge, die sich auf 40-200 Aminosäuren beläuft, herrscht eine große Variabilität. Wahrscheinlich ist diese Tatsache mit verantwortlich für die Zielgenspezifität von STAT-Proteinen (**Paulson et al. 1999**). Im STAT1 α -Protein weist die TAD eine Länge von 68 Aminosäuren auf. In der Transaktivierungsdomäne von STAT1 ist ein konservierter Serinrest in Position 727 lokalisiert, der nicht, wie früher angenommen, für die veränderte DNA-Bindeaffinität, sondern für eine maximale transkriptionelle Aktivität bedeutsam ist (**Wen und Darnell 1997; Wen et al. 1995**). Außerdem beinhaltet die

TAD den kritischen Tyrosinrest in Position 701, der durch Rezeptor-Kinasen phosphoryliert wird und somit einen großen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität ausübt (**Schindler et al. 1992; Shuai et al. 1992**). Zu den weiteren Funktionen der TAD gehören zum einen die Regulierung des Stress-induzierten Zelltodes (**Janjua et al. 2002; Stephanou und Latchman 2003**), zum anderen die Protein-Protein-Interaktionen mit MCM5 (**Zhang et al. 1998**), NCoA1 (**Litterst und Pfitzner 2001**), CBP/p300 (**Zhang et al. 1996**) und BRCA1 (**Ouchi et al. 2000**).

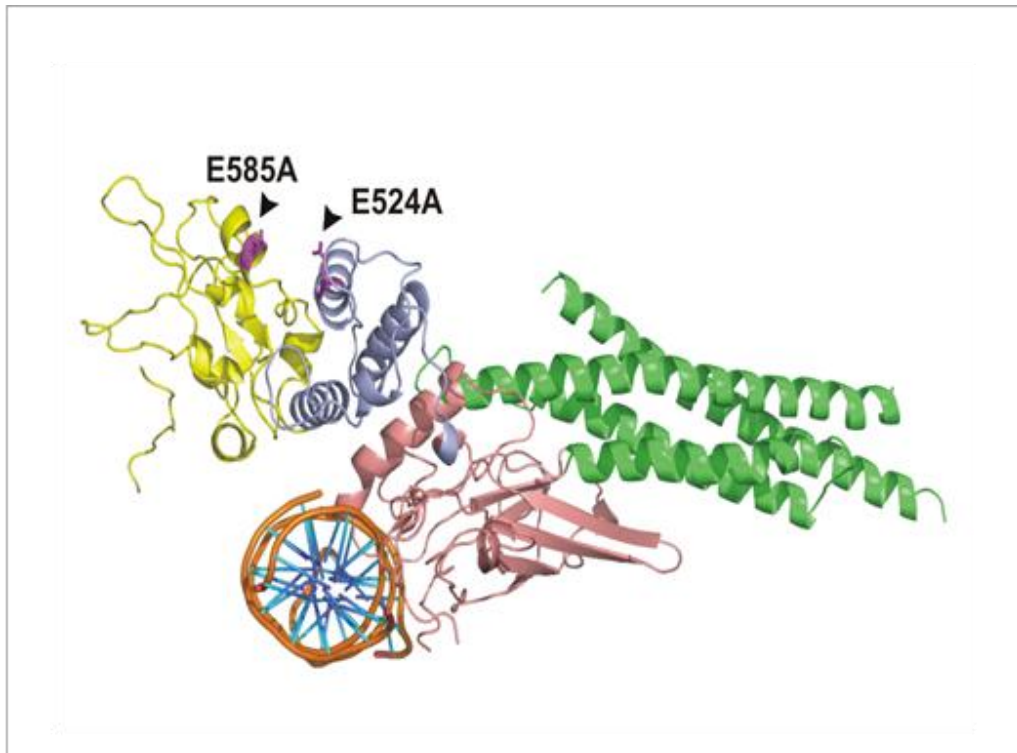


Abb. 14: Kristallstruktur eines DNA-gebundenen STAT1-Monomers mit den in dieser Arbeit eingeführten Punktmutationen. Es werden die vier Domänen des Kernfragments von STAT1 α dargestellt. Die Coiled-coil-Domäne ist in grün, die DNA-Bindedomäne in lachs, die Linker-Domäne in grau und die SH2-Domäne in gelb hervorgehoben.

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden durch Austausch zweier Glutaminsäurereste in Position 524 und 585 Punktmutanten generiert, von denen eine im Vergleich zum STAT1-WT ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau aufweist. Um beide Mutanten bezüglich dieser Eigenschaften analysieren zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt. Die Seitenketten der mutierten Aminosäurereste sind in den kristallographischen Darstellungen des DNA-gebundenen STAT1 in den **Abb. 14-16** hervorgehoben.

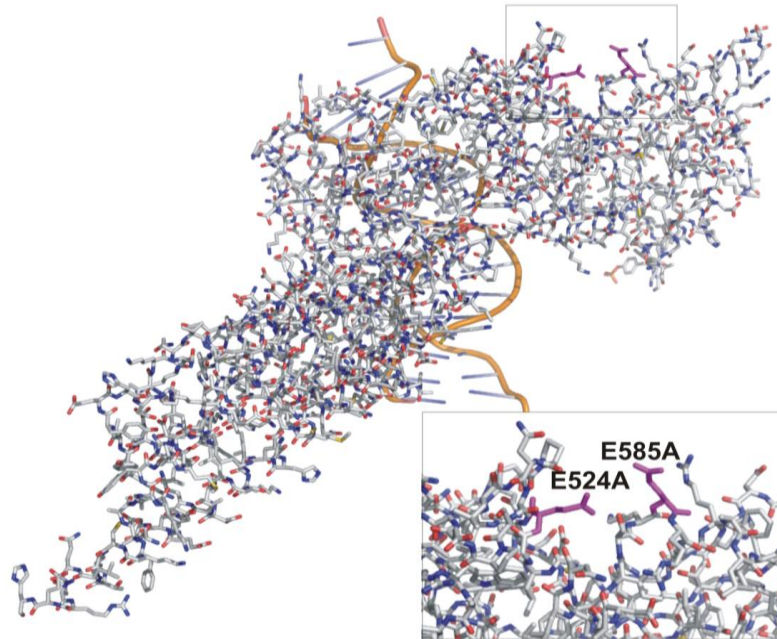


Abb. 15: Darstellung der Kristallstruktur eines STAT1-Monomers mit Seitenketten und den beiden in dieser Arbeit untersuchten Punktmutanten. Die beiden Glutamatreste sind in Magenta dargestellt.

Zunächst nahm man an, die Hyperphosphorylierung sei die Folge einer veränderten Kinetik der Kernakkumulation, hervorgerufen durch einen Import-Defekt im Rahmen des STAT1-Transports in den Nukleus. Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, ist STAT1 im unstimulierten Zustand überwiegend panzellulär verteilt. Nach Zytokinstimulation jedoch kommt es zur Translokation des größten Teils des STAT1 in den Nukleus. Da STAT-Moleküle aufgrund ihrer Molekülgröße nicht dazu in der Lage sind, die Kernmembran mittels freier Diffusion zu durchqueren, werden zu diesem Zweck bestimmte Transportmechanismen benötigt (**Paine und Feldherr 1972; Weis 1998**). Die auf dieser Weise in den Zellkern transportierten Tyrosin-phosphorylierten STAT1-Dimere können dann über Rezeptoren, die als Importine (Importrezeptoren) bezeichnet werden, mit dem Porenkomplex interagieren und so in den Zellkern transportiert werden. Da die Mutante STAT1-E585A hyperphosphoryliert ist, liegt der Gedanke nahe, dass ein Import-Defekt dazu führen könnte, ihren Transport in den Zellkern im Vergleich zum Wildtyp-Molekül zu verringern bzw. ganz aufzuheben. Diese Annahme beruht auf der Kenntnis, dass sich der Aminosäurerest E425 in einer Region befindet, die das nukleäre Lokalisationssignal (dsNLS) enthält. Dieses Signal ermöglicht die Bindung von STAT1-Dimeren an Importin $\alpha 5$ und ist somit essentiell für die Kernakkumulation (**Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al.**

2002; Nardozi et al. 2010). STAT1-Mutanten, deren nukleärer Import beeinträchtigt ist, haben dementsprechend eine erhöhte zytosolische Anwesenheit und sind dort weniger der Phosphatase-Aktivität ausgesetzt. Folglich käme es in diesem Fall zu einer höheren Anzahl von STAT1-Dimeren im Zytoplasma, wo sie vermehrt zu einem Substrat der Kinasen werden. Die Phosphorylierung von STAT1-Dimeren schreitet immer weiter voran und führt letztendlich zu einer Hyperphosphorylierung der Punktmutante. Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen, wurden in dieser Forschungsprojekt Experimente mit GFP-Fusionsproteinen durchgeführt, die die Kinetik der Kernakkumulation analysieren.

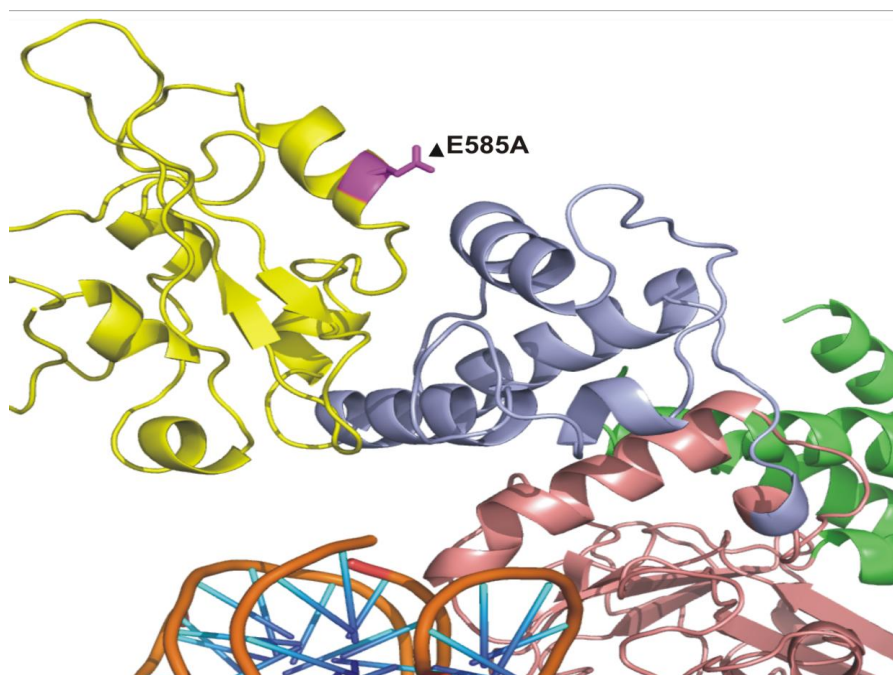


Abb. 16: Ausschnitt der STAT1-Kristallstruktur mit der in dieser Arbeit untersuchten Punktmutante STAT1-E585A. In der DNA-gebundenen Form mit Darstellung nur eines STAT1-Monomers sind der AS-Rest E585 (magenta), die SH2-Domäne (gelb), die Linker-Domäne (blaugrau), die Coiled-coil-Domäne (grün) und die DNA-Bindedomäne (lachs) farblich hervorgehoben.

Eine fluoreszenzmikroskopisch beobachtete verlängerte Kernakkumulation von STAT1 nach IFN γ -Stimulation konnte weder bei STAT1-E585A noch bei STAT1-E524A detektiert werden (**Abb. 5**). Somit kann ein Import-Defekt beider Mutanten und eine damit verbundene Hyperphosphorylierung als Ursache einer erniedrigten Kernakkumulation bzw. einer Retention im Zytoplasma ausgeschlossen werden.

Im STAT1-Molekül ist eine Änderung in der Dissoziationsrate von DNA mit einem abnormalen DNA-Bindevverhalten, einer geänderten Tyrosin-Dephosphorylierung sowie einer üblicherweise gestörten transkriptionellen Aktivität verbunden. In Anbetracht dieser Tatsache könnte eine weitere Erklärung für die beobachtete Hyperphosphorylierung bei STAT1-E585A die Möglichkeit einer veränderten Dissoziationskinetik im Sinne einer erniedrigten Dissoziationsrate von der DNA sein. Zudem bestand die Annahme, dass ein Austausch von einem negativ geladenen zu einem positiv geladenen Aminosäurerest, die elektrostatische Anziehungskraft des STAT-Proteins zu der aufgrund des Phosphatrückgrats negativ geladenen DNA verstärken könnte. Um diese Behauptung auf ihrer Richtigkeit zu untersuchen, wurden weitere Gelshift-Experimente durchgeführt. Dort zeigte sich, dass STAT1-E585A und STAT1-E524A weder eine Veränderung der Dissoziationskinetik von der DNA, noch eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität aufweisen. Schon nach 5-minütiger Kompetition mit unmarkierter Sonde war in den Gelshift-Assays kaum noch eine Bindung an DNA-Sonden vorhanden (**Abb. 8 und 9**). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Hyperphosphorylierung auf eine verlängerte DNA-Bindung bzw. eine erhöhte Affinität zur DNA-Bindung zurückzuführen ist, und dass es sich weder bei STAT1-E585A noch bei STAT1-E524A um DNA-Bindemutanten handelt.

Wie frühere Arbeiten unabhängig voneinander demonstrierten, schützt die DNA-Bindung vor Dephosphorylierung (**Meyer et al. 2003; Meyer et al. 2004**). Generell unterscheidet man zwei verschiedene Konformationen der tyrosinphosphorylierten STAT-Dimere, die parallele und die antiparallele Konformation. In der parallelen Konfiguration zeigen die SH2-Domänen in dieselbe Richtung. Die antiparallele Form hat jedoch unterschiedlich ausgerichtete SH2-Domänen. Während die antiparallele Konformation bei der Dephosphorylierung eine Rolle spielt, ist die parallele Form essentiell für die Bindung an die DNA (**Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006**). Nach Lösung tyrosinphosphorylierter STAT1-Dimere von der DNA wird das antiparallele Konformer von der TC45-Phosphatase erkannt und dephosphoryliert. Nur im Tyrosin-dephosphorylierten Zustand sind die STAT1-Proteine in der Lage, die Kernmembran zu überwinden (**Meyer et al. 2003**). Daraus resultiert eine weitere Hypothese für die Klärung der Hyperphosphorylierung von STAT1-E585A, nämlich dass die beobachtete Hyperphosphorylierung die Folge einer Erniedrigung des Dephosphorylierungsniveaus dieser Mutante sein könnte. Um beide Mutanten im Bezug auf ihr Dephos-

phorylierungsverhalten zu charakterisieren, erfolgten in dieser Arbeit Dephosphorylierungsexperimente. Bei der Reaktion von Extrakten STAT1-E585A-exprimierender, IFN γ -prästimulierter Zellen *in vitro* mit der aktiven Phosphatase TC-PTP wurde offensichtlich, dass die Dephosphorylierung von STAT1-E585A in gleicher Geschwindigkeit stattfindet wie beim STAT1-WT (**Abb. 10**). Somit bestätigt sich das Ergebnis aus den Gelshift-Experimenten: das WT-ähnliche DNA-Bindevverhalten äußert sich in einer WT-ähnlichen Dephosphorylierungskinetik. Daraus resultierend kann vermutet werden, dass STAT1-E585A wohl keine Dephosphorylierungsmutante ist.

Allerdings besteht für den Phänotyp der Mutante STAT1-E585A eine weitaus plausible Erklärung. Durch eine mutmaßliche Stabilisierung der parallelen Konformation, die mit der Einführung der Punktmutation an Position 585 verbunden sein könnte, käme es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von der antiparallelen zur parallelen Dimer-Konformation. Dadurch wäre die Menge von STAT1-Dimeren, die für die Phosphatase zugänglich ist, erniedrigt, wodurch im Verhältnis eine geringere Dephosphorylierung dieser Moleküle stattfinden würde. Wie man in den durchgeführten Experimenten beobachten kann, würde diese Verschiebung bei der Dephosphorylierung nicht zum Tragen kommen, da sie kompensiert wird. Allerdings würde sie sich wahrscheinlich in einer Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus widerspiegeln, wie man dies auch bei STAT1-E585A beobachten kann. Die Seitenkette von E585 wäre damit an der Stabilisierung der parallelen Dimer-Konformation oder umgekehrt an der Destabilisierung des antiparallelen Dimers beteiligt.

Wie oben bereits erwähnt, geht eine Änderung im Phosphorylierungsniveau von STAT1 mit einer Änderung der transkriptionellen Aktivität einher. Die erhöhte transkriptionelle Leistung der E585A-Mutante gegenüber STAT1-WT konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten durch *In-vitro*-Versuche partiell belegt werden. Mithilfe von Reportergen-Konstrukten konnte dargelegt werden, dass die Verwendung eines synthetischen Promoters (3xLy6E) nach 6-stündiger Stimulation transfizierter Zellen mit IFN γ bei der Mutante STAT1-E585A eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zur Folge hat. Diese Erhöhung der transkriptionellen Aktivität konnte allerdings bei Verwendung eines nativen Promoters nicht belegt werden (**Abb. 11 und 12**). Interessant war in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass im Rahmen von Genexpressionsuntersuchungen von endogenen Zielgenen *in vivo*

ebenso eine veränderte transkriptionelle Aktivität durch STAT1-E585A nach Exposition der Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ erfolgte (**Abb. 13**). Während die Expression der Zielgene *irf1*, *gpb1*, und *mig1* mit einer klassischen singulären Gamma-aktivierten Stelle (GAS) durch die Mutation weitgehend unverändert blieb, wurden das Zielgen *mcp1* signifikant vermehrt exprimiert. Insgesamt war die transkriptionelle Antwort auf $\text{IFN}\gamma$ bei der Mutante also differentiell unterschiedlich zum Wildtyp-Molekül, wenn auch nicht für alle Gene gleichartig, sondern in einem Gen-spezifischen Muster.

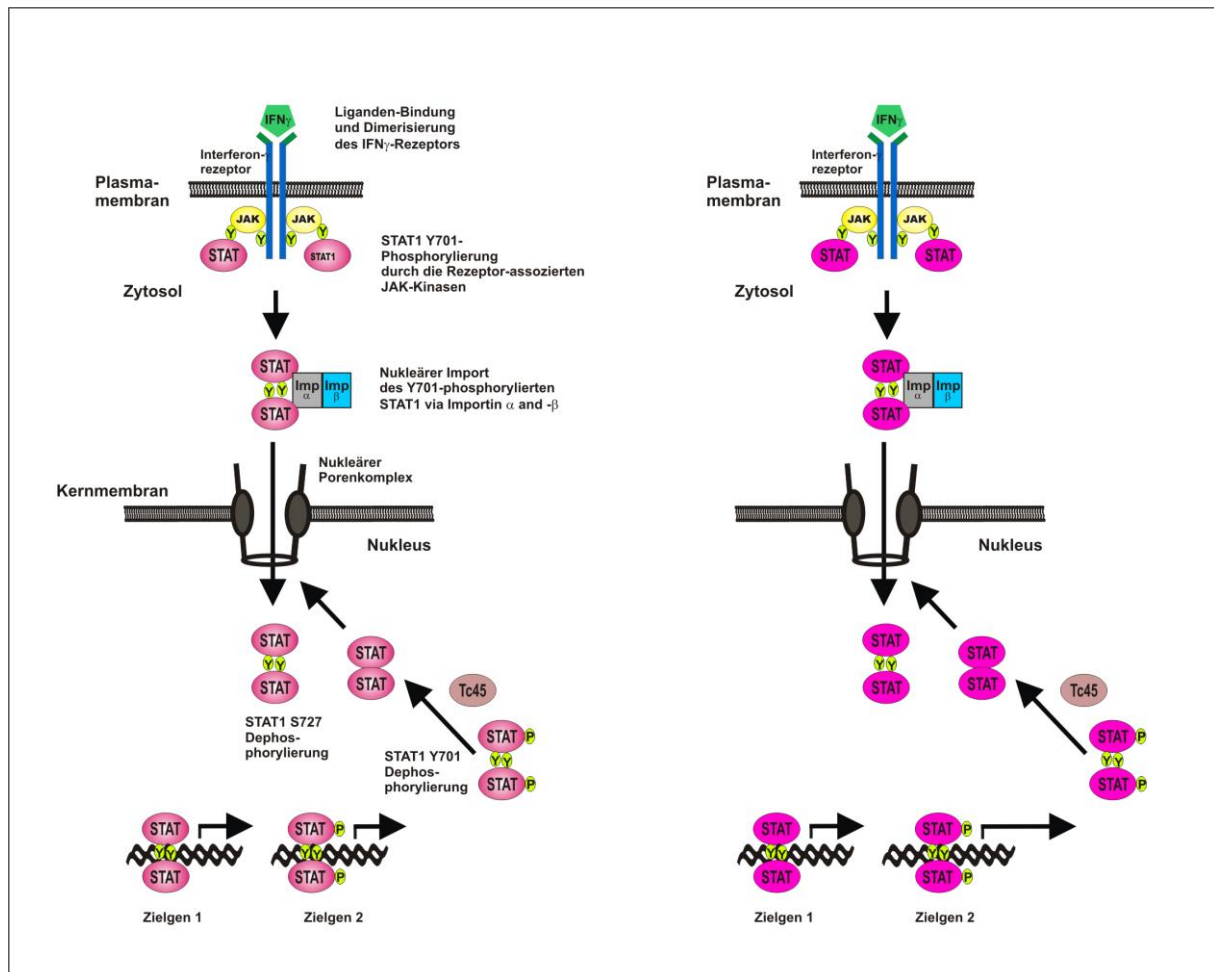


Abb. 17: Schematische Darstellung des $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten JAK-STAT-Signalwegs durch STAT1-WT (linke Seite) und die Mutante STAT1-E585A (rechte Seite). Die Bindung von $\text{IFN}\gamma$ an seinen Rezeptor führt zur Rezeptor-Dimerisierung, wodurch die Auto- und Transphosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen ausgelöst wird. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors führt zur Entstehung von Andockstellen für STAT1-Moleküle. Nach Rezeptorlösung bilden sich Tyrosin-phosphorylierte Homodimere aus, die in den Nucleus transportiert werden. Dort erfolgt die Bindung an spezifische Zielsequenzen, die sogenannten Gamma-aktivierten Sequenzen (GAS), und die Transkription wird induziert. Die

beobachtete Hyperphosphorylierung führt bei der E585A-Mutante (rechtes Schema) zu einer promotorspezifisch veränderten transkriptionellen Aktivierung der beiden Zielgene 1 und 2 gegenüber dem Wildtyp-Molekül (linkes Schema).

Eine STAT1-Mutante, die eine verbesserte transkriptionelle Leistung besitzt, kann für die Forschung von großer Bedeutung sein, z.B. um neue Wirkstoffe oder Zytokine im Rahmen der Immunsuppression effektiv testen zu können. Ein Nachteil der erhöhten transkriptionellen Aktivität allerdings könnte darin liegen, dass das Signal für die Transkription länger vorhanden wäre. Dadurch reagiert das System weniger flexibel auf Veränderungen der extrazellulären IFN γ -Konzentration.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass Veränderungen in der flexiblen Domänenarchitektur der SH2-Domäne zwangsläufig Alterationen in der IFN γ -vermittelten Signaltransduktion zur Folge haben können. Durch den Austausch eines Glutaminsäurerestes wurde eine Punktmutante generiert, die eine Veränderung im Phänotyp des STAT-Moleküls hervorruft. Anhand dieser Mutante konnte unterstrichen werden, dass die SH2-Domäne von STAT1 an der Regulation der Phosphorylierung und der differentiellen Zielgenerkennung beteiligt ist, die über die unmittelbare Erkennung des kritischen Tyrosinrestes 701 hinausgeht. Die Mutation in Position 585 der SH2-Domäne zu Alanin resultierte in einer Hyperphosphorylierung von STAT1 und einer erhöhten Induktion des *mcp1*-Gens nach Stimulation der Zellen mit IFN γ . Die Mutante kann somit als zumindest partielle Gain-of-function-Mutante attribuiert werden und könnte sich als interessantes Werkzeug für die Erforschung der Wirkungsweise von Interferonen erweisen.

Dem molekularen Mechanismus könnte eine Stabilisierung der SH2-Phosphotyrosin-Interaktion mit einer Verlagerung des Gleichgewichtes der Dimer-Konformere zu Gunsten der parallelen Dimerausrichtung zugrunde liegen. Die hier vorgestellten Resultate weisen darauf hin, dass stabile Phosphotyrosin-SH2-Bindungen eine optimale STAT1-induzierte Genexpression nicht erzwingen können. Die Weiterleitung der Signalstärke könnte demnach vielmehr von der Flexibilität bei der Bildung und Lösung von transkriptionell aktiven Dimeren profitieren und weniger von einer strengen Molekülstruktur der dimeren STAT1-Moleküle. Ein dynamischer Wechsel zwischen antiparalleler und paralleler Dimer-Konfiguration scheint somit essentiell für eine effiziente STAT1-vermittelte Signaltransduktion zu sein. Welcher molekulare

Mechanismus jedoch der Konformationsänderung von phosphorylierten STAT1-Dimeren zu Grunde liegt, konnte bis dato nicht im Detail erklärt werden. Um den Vorgang des Konformationswechsels im Detail analysieren zu können, müssten sich weitere Experimente unter Beachtung des Volle-Länge-Proteins anschließen. Andere Mutationsexperimente könnten eventuell andere Aminosäurereste identifizieren, die eine unterschiedliche Wirkung auf die Stabilität der SH2-Phosphotyrosin-Interaktion haben. Das hier vorgeschlagene Modell, welches der SH2-Domäne eine essentielle Funktion beim Wechsel zwischen zwei Dimer-Konfigurationen und gegebenenfalls auch einem Monomeren austausch zuweist, könnte möglicherweise durch die Identifizierung einer Punktmutante in der SH2-Domäne mit entgegengesetztem Phänotyp, nämlich einer Destabilisierung der SH2-pTyr-Interaktion, bestätigt werden. Die Destabilisierung der antiparallelen Konformation würde bei dieser Mutante ein verringertes Phosphorylierungsniveau aufweisen, besäße wahrscheinlich eine verkürzte Phase der Kernakkumulation nach IFN-Stimulation und hätte eine insgesamt erhöhte Sensitivität gegenüber Staurosporin zur Folge, was eine verringerte Bindung an GAS-Elemente mit sich bringen würde. Erwartet wird, dass eine solche Mutante mit einer reduzierten Genexpression verbunden wäre.

5 Literaturverzeichnis

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 in the liver. *Mol Cell Biol* 21(5), 1621-1632.

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

Baden HA, Sarma P, Kapust RB, Byrd RA, Waugh DS (1998): The amino-terminal domain of human STAT4. Overproduction, purification, and biophysical characterization. *J Biol Chem* 273(27), 17109-17114.

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(4), 959-967.

Becker S, Groner B, Müller CW (1998): Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394(6689), 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 USA* 97(19), 10418-10423.

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

Bromberg JF, Fan Z, Brown C, Mendelsohn J, Darnell JE Jr. (1998): Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth Differ* 9(7), 505-512.

Bromberg J, Darnell JE Jr. (2000): The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19(21), 2468-2473.

Chang CH, Hammer J, Loh JE, Fodor WL, Flavell RA (1992): The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* 35(6), 378-384.

Chapgier A, Wynn RF, Jouanguy E, Filipe-Santos O, Zhang S, Feinberg J, Hawkins K, Casanova JL, Arkwright PD (2006): Human complete Stat-1 deficiency is associated with defective type I and II IFN responses in vitro but immunity to some low virulence viruses in vivo. *J Immunol* 176(8), 5078-83.

Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr., Kuriyan J (1998): Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93(5), 827-839.

Chen X, Bhandari R, Vinkemeier U, van Den Akker F, Darnell JE Jr., Kuriyan J (2003): A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal domains of STATs. *Protein Sci* 12(2), 361-365.

Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY (1996): Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1:CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272(5262), 719-722.

Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY (1997): Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 17(9), 5328-5337.

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(5344), 1803-1805.

Clemens MJ (2003): Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 23(6), 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 USA* 69(8), 2110-2114.

Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. (1995): Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29(1), 225-228.

Darnell JE Jr. (1997): STATs and gene regulation. *Science* 277(5332), 1630-1635.

Darnell JE Jr., Kerr IM, Stark GR (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164), 1415-1421.

Decker T, Kovarik P (2000): Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19(21), 2628-2637.

Decker T, Lew DJ, Mirkovitch J, Darnell JE Jr. (1991): Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J* 10(4), 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(3), 121-134.

Djeu JY, Heinbaugh JA, Holden HT, Herberman RB (1979): Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon induces. *J Immunol* 122(1), 175-181.

Duncan SA, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. (1997): STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev Dyn* 208(2), 190-198.

Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland M, Schreiber RD, Casanova JL (2001): Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293(5528), 300-303.

Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chagnier A, Eidenschenk C, Eid P (2003): Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* 33(3), 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(3), 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(5006), 698-702.

Evinger M, Rubinstein M, Pestka S (1981): Antiproliferative and antiviral activities of human leukocyte interferons. *Arch Biochem Biophys* 210(1), 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(33), 30072-30078.

Fahrenkrog B, Köser J, Aebi U (2004): The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem Sci* 29(4), 175-182.

Farrar MA, Schreiber RD (1993): The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11, 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(2), 323-335.

Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell JE Jr. (1990): ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(21), 8555-8559.

Fu XY, Schindler C, Improta T, Aebersold R, Darnell JE Jr. (1992): The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(16), 7840-7843.

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(7), 704-714.

Gidlund M, Orn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I (1978): Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 273(5665), 759-761.

Görlich D, Kutay U (1999): Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-660.

Greenlund AC, Schreiber RD, Goeddel DV, Pennica D (1993): Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J Biol Chem* 268(24), 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(7), 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(6), 677-687.

Haspel RL, Darnell JE Jr. (1999): A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(18), 10188-10193.

Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE Jr. (1996): The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 15(22), 6262-6268.

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(1), 160-167.

Herrington J, Rui L, Luo G, Yu-Lee LY, Carter-Su C (1999): A functional DNA binding domain is required for growth hormone-induced nuclear accumulation of Stat5B. *J Biol Chem* 274(8), 5138-5145.

Horvath CM (2000): STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signal *Trends Biochem Sci* 25(10), 496-502.

Horvath CM, Darnell JE Jr. (1996): The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *J Virol* 70(1), 647-650.

Hou XS, Perrimon N (1997): The JAK-STAT pathway in Drosophila. *Trends Genet* 13(3), 105-110.

Isaacs A, Lindenmann J (1987): Virus interference. I. The interferon. *J Interferon Res* 7(5), 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(10), 1140-1146.

Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Lerson JD, Hunter T, Liu YC (1999): The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286(5438), 309-312.

John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell JE. Jr, Leonard WJ (1999): The significance of tetramerization in promoter recruitment by STAT5. *Mol Cell Biol* 19(3), 1910-1918.

Kalab P, Weis K, Heald R (2002): Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295(5564), 2452-2456.

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(3), 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(6587), 174-177.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe A, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD (1998): Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(13), 7556-7561.

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(6), 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(13), 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(7), 4301-4304.

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(10), 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(5006), 668-674.

Körner C, Guan T, Gerace L, Cingolani G (2003): Synergy of silent and hot spot mutations in importin β reveals a dynamic mechanism for recognition of a nuclear localization signal. *J Biol Chem* 278(18), 16216-16221.

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(1), 69-77.

Köster M, Hauser H (1999): Dynamic redistribution of STAT1 protein in IFN signaling visualized by GFP fusion proteins. *Eur J Biochem* 260(1), 137-144.

Krebs DL, Hilton DJ (2001): SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19(5), 378-387.

Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. (1997): Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278(5343), 1630-1632.

Langer JA, Pestka S (1988): Interferon receptors. *Immunol Today* 9(12), 393-400.

Lee CK, Rao DT, Gertner R, Gimeno R, Frey AB, Levy DE (2000b): Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* 165(7), 3571-3577.

Lee CK, Smith E, Gimeno R, Gertner R, Levy DE (2000a): STAT1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN- γ . *J Immunol* 164(3), 1286-1292.

Lefèvre F, Boulay V (1993): A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J Biol Chem* 268(26), 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(8-9) 779-788.

Leung S, Li X, Stark GR (1996): STATs find that hanging together can be stimulating. *Science* 273(5276), 750-751.

Levy DE, Darnell JE Jr. (2002): Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9), 651–662.

Levy DE, Kessler DS, Pine R, Reich N, Darnell JE Jr. (1988): Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev* 2(4), 383-393.

Levy DE, Kessler DS, Pine R, Darnell JE Jr. (1989): Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes Dev* 3(9), 1362-1371.

Liao J, Fu Y, Shuai K (2000): Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT1) (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10), 5267-5272.

Lim, CP, Cao, X (2006): Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2(11), 536-550.

Litterst, CM, Pfitzner, E (2001): Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. *J Biol Chem* 276(49), 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 USA* 95(18), 10626-10631.

Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulácsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, Grimaldo RM, Blancas-Galicia L, Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle,

C, **Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamante J, Bué M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE, Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Maródi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL** (2011): Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 208(8), 1635-1648.

Liu X, Quinn AM, Chin YE, Fu XY (1999): STAT genes found in *C. elegans*. *Science* 285(5425), 167a.

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(12), 179-186.

Lödige I, Marg A, Wiesner B, Malecova B, Oelschläger T, Vinkemeier U (2005): Nuclear export determines the cytokine sensitivity of STAT transcription factors. *J Biol Chem* 280(52), 43087-43099.

Loppnow, H. (2001): Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Internist* 42, 13-27.

Macara IG (2001): Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(4), 570-594.

Mach B, Steimle V, Martinez-Soria EW (1996): Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14, 301-331.

Mao X, Ren Z, Parker GN, Sonderrmann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray, JS, Demeler B, Darnell JE Jr., Chen X (2005): Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* 17(6), 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(6), 823-833.

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

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(7), 1754-1763.

Meissner T, Krause E, Lödige I, Vinkemeier U (2004): Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* 119(5), 587-589.

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(19), 16447-16455.

Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD (1996): Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84(3), 431-442.

Mertens C, Zhong M, Krishnaraj R, Zou W, Chen X, Darnell JE Jr. (2006): Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev* 20(24), 3372-3381.

Meyer T, Vinkemeier U (2004): Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem* 271(23-24), 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(3), 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(16), 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(18), 18998-19007.

Meyer T, Begitt A, Vinkemeier U (2007): Green fluorescent protein-tagging reduces the nucleocytoplasmic shuttling specifically of unphosphorylated STAT1. *FEBS J* 274(3), 815-826.

Mowen K, David M (1998): Role of the STAT1-SH2 domain and STAT2 in the activation and nuclear translocation of STAT1. *J Biol Chem* 273(46), 30073-30076.

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(6), 1166-1175.

Müller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur, AG, Barbieri G, Witthuhn BA, Schindler C, Pellegrini S, Wilks AF, Ihle JN, Stark GR, Kerr LM (1993): The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* 366(6451), 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(19), 7121-7131.

Nardozi J, Wenta N, Yashuhara N, Vinkemeier U, Cingolani G (2010): Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin α 5. *J Mol Biol* 402(1), 83-100.

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(5589), 2063-2066.

Nicola NA (1994): Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells* 12, Suppl 1:3-12; discussion 12-4.

Novick D, Cohen B, Rubinstein M (1994): The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77(3), 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(4), 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(4), 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 monocyte. *Int. J Cancer* 31(3), 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 USA* 97(10), 5208-5213.

Paine PL, Feldherr CM (1972): Nucleocytoplasmic exchange of macromolecules. *Exp Cell Res* 74(1), 81-98.

Park C, Li S, Cha E, Schindler C (2000): Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13(6), 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(1-2), 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(36), 25343-25349.

Pawson T (1988): Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction. *Oncogene* 3(5), 491-495.

Pawson T, Gish GD, Nash P (2001): SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* 11(12), 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(1), 1-37.

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

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

Platanias LC. (2005): Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev Immunol* 5(5), 375-386.

Rane SG, Reddy EP (2000): Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19(79), 5662-5679.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117(pt 8), 1281-1283.

Ribbeck K, Görlich D (2001): Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* 20(6), 1320-1330.

Roberts RM, Cross JC, Leaman DW (1991): Unique features of the trophoblast interferons. *Pharmacol Ther* 51(3), 329-345.

Rout MP, Aitchison JD, Magnasco MO, Chait BT (2003): Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol* 13(12), 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(12), 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(5), 3021-3026.

Sampaio EP, Bax HI, Hsu AP, Kristosturyan E, Pechacek J, Chandrasekaran P, Paulson ML, Dias DL, Spalding C, Uzel G (2012): A novel STAT1 mutation associated with disseminated mycobacterial disease. *J Clin Immunol* 32(4), 681-689.

Schaefer T, Sanders L, Nathans D (1995): Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 β , a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(20), 9097-9101.

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

Schindler C, Plumlee C (2008): Interferons use the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19(4), 311–318.

Schindler C, Fu XY, Imbrota T, Aebersold R, Darnell JE Jr. (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 USA* 89(16), 7836-7839.

Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr. (1992b): Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 257(5071), 809-813.

Schootink H, Rose-John S (2002): Cytokines as therapeutic drugs. *J. Interferon Cytokine Res* 22(5), 505-516.

Seger R, Krebs EG (1995): The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9(9), 726-735.

Sekimoto T, Imamoto N, Nakajima K, Hirano T, Yoneda Y (1997): Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* 16(23), 7067-7077.

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(9), 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(6832), 1107-1111.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4(1), 63-68.

Shuai K (2000): Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19(21), 2638-2644.

Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE Jr. (1992): Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258(5089), 1808-1812.

Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE Jr. (1993a): A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 261(5129), 1744-1746.

Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE Jr. (1993b): Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 366(6455), 580-583.

Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE Jr. (1994): Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76(5), 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(9), 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(6), 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 (2011): STAT1 hyperphosphorylation and defective IL12R/IL23R signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *PLoS One* 6(12), e29248.

Snapper CM, Paul, WE (1987): Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236(4804), 944-947.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, Neel BG, Birge RB, Fajardo, JE, Chou

MM, **Hanafusa H, Schaffhausen B, Cantley LC** (1993): SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72(5), 767-778.

Stancato LF, Sakatsume M, David M, Dent P, Dong F, Petricoin EF, Krolewski JJ, Silvennoinen O, Saharinen P, Pierce J, Marshall CJ, Sturgill T, Finbloom DS, Larner AC (1997): Beta interferon and oncostatin M activate Raf-1 and mitogen-activated protein kinase through a JAK1-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 17(7), 3833-3840.

Stark GR, Darnell JE Jr. (2012): The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36(4), 503-514.

Starr R, Hilton DJ (1999): Negative regulation of the Jak/STAT-Pathway. *Bioessays* 21(1), 47-51.

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

Stephanou A, Latchman DS (2003): STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int J Exp Patho* 84(6), 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(43), 28049-28056.

Sung SC, Fan TJ, Chou CM, Leu JH, Hsu YL, Chen T, Hsieh YC, Huang CJ (2003): Genomic structure, expression and characterization of a STAT5 homologue from pufferfish (*Tetraodon fluviatilis*). *Eur J Biochem* 270(2), 239-252.

Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakaniishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1996): Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380(6575), 627-630.

Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997): Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8), 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(9), 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(3), 1521-1526.

ten Hoeve J, 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(16), 5662–5668.

Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN (1996): Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382(6587), 171-174.

Thomson A. (1998): *The cytokine handbook*, 3rd Ed. Academic Press, San Diego.

Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A (2012): Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Hum Mutat* 33(9), 1377-1387

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, Kullberg BJ, van der Meer JW, Lilic D, Veltman JA, Netea MG (2011): STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 365(1), 54-61.

Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S (1992): A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70(11), 313-322.

Vinkemeier U, Cohen L, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE Jr. (1996): DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: Interaction

between NH₂-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 15(20), 5616-5626.

Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE Jr., Kuriyan J (1998): Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279(5353), 1048-1052.

Waksman G, Kominos D, Robertson SC, Pant N, Baltimore D, Birge RB, Cowburn D, Hanafusa H, Mayer BJ, Overduin M, Resh MD, Rios CB, Silverman L, Kuriyan J (1992): Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH₂ of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358(6388), 646-653.

Wang D, Stravopodis D, Teglund S, Kitazawa J, Ihle JN (1996): Naturally occurring dominant negative variants of Stat5. *Mol Cell Biol* 16(11), 6141-6148.

Watling D, Guschin D, Müller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN, Kerr LM (1993): Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* 366(6451), 166-170.

Weis K (1998): Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci* 23(5), 185-189.

Wen Z, Darnell JE Jr. (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(11), 2062-2067.

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. (1995): Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82(2), 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 USA* 105(27), 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(4), 2057-2065.

Williams JG (2000): STAT signalling in cell proliferation and development. *Curr Opin Gen Dev* 10(5), 503-507.

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(49), 47572-47580.

Xu X, Sun YL, Hoey T (1996): Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273(5276), 794-797.

Yan R, Small S, Desplan C, Dearolf CR, Darnell JE Jr. (1996): Identification of a Stat gene that functions in Drosophila development. *Cell* 84(3), 421–430.

Yang E, Wen Z, Haspel RL, Zhang JJ, Darnell JE Jr. (1999): The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol* 19(7), 5106-5112.

Yang E, Henriksen MA, Schaefer O, Zakharova N, Darnell JE Jr. (2002): Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J Biol Chem* 277(16), 13455-13462.

Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE Jr. (1996): Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(26), 15092-15096.

Zhang JJ, Zhao Y, Chait BT, Lathem WW, Ritzi M, Knippers R, Darnell JE Jr. (1998): Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *EMBO J* 17(23), 6963-6971.

Zhang X, Blenis J, Li H.C, Schindler C, Chen-Kiang S (1995): Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 267(5206), 1990-1994.

Zhao W, Cha EN, Lee C, Park CY, Schindler C (2007): Stat2-dependent regulation of MHC class II expression. *J Immunol* 179(1), 463-471.

Zhong M, Henriksen MA, Takeuchi K, Schaefer O, Liu B, Hoeve J ten, Ren Z, Mao X, Chen X, Shuai K, Darnell JE Jr. (2005): Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(11), 3966-3971.

Zimmermann A, Trilling M, Wagner M, Wilborn M, Bubic I, Jonjic S, Koszinowski U, Hengel H (2005): A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J Exp Med* 201(10), 1543-1553.

Zusammenfassung

Der durch Interferone induzierbare Transkriptionsfaktor STAT1 (Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription 1) spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von viralen, bakteriellen und Parasiteninfektionen. Gut beschrieben ist die durch Zytokin-Stimulation ausgelöste Phosphorylierung eines singulären Tyrosinrestes (Y701) im Carboxyterminus von STAT1, die zur Ausbildung von transkriptionell aktiven, parallelen STAT1-Dimerkomplexen führt. In dieser Arbeit wurde durch gezielte Mutagenese eine bei den Familienmitgliedern STAT1 bis STAT4 konservierte Aminosäure (E585) nach Alanin ausgetauscht und die Punktmutante in verschiedenen Transfektionsexperimenten funktionell charakterisiert. Anders als das Wildtyp-Protein oder eine weitere, hier ebenfalls generierte STAT1-Mutante (E524A) zeigte STAT1-E585A ein nach Interferon- γ (IFN γ)-Stimulation der Zellen nachweisbares verstärktes und verlängertes Phosphorylierungsniveau. Dabei hatte die Substitution des oberflächenexponierten Glutaminsäurerestes 585 in der SH2-Domäne von STAT1 unerwartet eine differenzielle Änderung im Transkriptionsverhalten dieser Mutante zur Folge. Während eine Reihe bekannter endogener STAT1-Zielgene (*irf1*, *gbp1* und *mig1*) durch die Einführung der Punktmutation in ihrem Expressionsverhalten nicht signifikant anders als durch das Wildtyp-Molekül aktiviert wurden, konnte in Real-Time-PCR-Messungen für das *mcp1*-Gen eine deutlich erhöhte Expressionsrate durch die E585-Mutante dokumentiert werden. Deshalb lässt sich die von mir in dieser Arbeit untersuchte Mutante als eine partielle Gain-of-Funktion-Mutante beschreiben; dieses gilt aber strenggenommen nicht für das *stat1*-Gen selbst. Als mögliche molekulare Ursache für die beobachtete Hyperphosphorylierung der E585A-Mutante wird eine verminderte Rate einer Konformationsänderung von einer parallelen in eine antiparallele Dimerkonfiguration vermutet, wobei Letztere für die Tyrosin-Dephosphorylierung benötigt wird. Zusammenfassend konnten meine Ergebnisse also den Einfluss eines kritischen Aminosäurerestes in der SH2-Domäne auf transkriptionelle Antworten im IFN γ -Signalweg aufzeigen, wodurch die zentrale Bedeutung der Tyrosin-Phosphorylierung moduliert wird.

Summary

The interferon-inducible transcription factor STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) plays an important role in the defense against viral, bacterial and parasitic infections. Well studied is the phosphorylation of a signature tyrosine residue (Y701) in the carboxy-terminus of STAT1 upon stimulation of cells with cytokines, leading to the formation of transcriptionally active, parallel STAT1 dimers. In this thesis, a residue in the STAT1 molecule conserved among the family members STAT1 to STAT4 was replaced with alanine by site-directed mutagenesis, and the corresponding point mutant (E585A) was functionally characterized in various experimental approaches. Other than the wild-type protein or an additionally generated point mutant (E524A), STAT1-E585A was hyperphosphorylated upon stimulation of cells with interferon ($\text{IFN}\gamma$). The exchange of the surface-exposed glutamic acid residue 585 in the SH2 domain of STAT1 unexpectedly resulted in a differential transcriptional behavior. While numerous known endogenous STAT1 target genes (*irf1*, *gbp1*, and *mig1*) were activated normally by the point mutant, real-time PCR measurements showed a significantly higher expression rate for the *mcp1* gene. Therefore, STAT1-E585A characterized in this study can be regarded as a partial gain-of-function mutant, although the *stat1* gene itself was not over-expressed. The molecular basis underlying the observed hyperphosphorylation of the E585A mutant possibly results from a reduced rate of conformational exchange between a DNA-bound parallel and an anti-parallel dimer configuration, with the latter being required for tyrosine dephosphorylation. In summary, my data demonstrate the role of a critical amino acid residue in the STAT1 SH2 domain in transcriptional responses in $\text{IFN}\gamma$ signaling, thereby modifying the central impact of tyrosine phosphorylation on gene activation.

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.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Julia Staab für ihre verständnisvolle und ermutigende Unterstützung bei der RT-PCR und den vielen fachlichen Hilfestellungen.

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, Neuroimmunologie/IMSF und Neurophysiologie bedanke ich mich ganz herzlich für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und die Nutzung ihrer Laborgeräte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich in der Zeit meines Studiums und meiner Promotion immerwährend unterstützte und motivierte und damit wesentlich zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen haben.

Lebenslauf

Ich, Talayeh Giveh Chian Zadeh, wurde am 15.09.1984 in Teheran als erstes von zwei Kindern der Eheleute Shohreh Hamzehloo und Morteza Giveh Chian Zadeh geboren.

Die Allgemeine Hochschulreife erlangte ich im Juni 2006 an der UNESCO-Schule in Essen. Zum Sommersemester 2007 nahm ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf und legte am März 2010 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“ ab. Mein Staatsexamen legte ich am 07.Dezember 2012 mit der Note „gut“ ab.

Im Februar 2012 begann ich mit meiner experimentellen Doktorarbeit in der DFG-geförderten Forschergruppe von Prof. Dr. Dr. Dr. Meyer im Labor für molekulare Psychokardiologie der Abteilung Psychosomatische Medizin und Psychotherapie der Georg-August-Universität Göttingen.