

Aus der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie
(Prof. Dr. med. C. Herrmann-Lingen)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Molekulare Determinanten zur sequenzspezifischen DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors STAT1

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

vorgelegt von
Bettina Hüntelmann
aus
Lippstadt

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in: Prof. Dr. med. Dr. phil. Dr. rer. nat. T. Meyer
Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. D. Kube

Datum der mündlichen Prüfung: 09.01.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Molekulare Determinanten zur sequenzspezifischen DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors STAT1“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 03.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Chemikalien.....	13
2.1.2 Radiochemikalien	15
2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien.....	15
2.1.4 Reaktions-Kits	15
2.1.5 Humane Zelllinien.....	15
2.1.6 Plasmide, Enzyme und Zytokine	16
2.1.7 Primer und Oligonukleotide	17
2.1.8 Bakterienstämme und Medien	18
2.1.9 Antikörper	19
2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellkulturmethoden	20
2.2.2 Einführen von Punktmutationen in Plasmide.....	21
2.2.3 Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien ..	21
2.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien	22
2.2.5 Sequenzierung	22
2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA	22
2.2.7 Transfektion von Säugerzellen	23
2.2.8 Behandlung der Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren.....	23
2.2.9 Gesamtzellextraktion	23
2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.2.11 Western Blotting	25

2.2.12	<i>In-vitro</i> -Dephosphorylierungs-Assay	25
2.2.13	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)	26
2.2.14	Pull-down-Assay mit biotinylierten Oligonukleotiden	28
2.2.15	Reportergen-Assay.....	28
2.2.16	Fluoreszenzmikroskopie und Immunocytochemie	30
2.2.17	Digitonisierung.....	31
2.2.18	RNA-Isolation	32
2.2.19	cDNA-Synthese	32
2.2.20	Real-time PCR.....	32
2.2.21	Darstellung der STAT1-Kristallstruktur	33
2.2.22	Statistische Auswertung	33
3.	Ergebnis	35
3.1	Sequenzhomologien der DNA-Bindedomäne und Charakterisierung von STAT1-K350.....	35
3.1.1	Phosphorylierungskinetik von STAT1-K350A im Vergleich zu STAT1-WT	37
3.1.2	Vergleichbare Kernakkumulation zwischen der K350A-Mutante und dem WT-Molekül.....	39
3.2	Sequenzhomologien in der Linker-Domäne und Charakterisierung von E559, E563 und K567	40
3.2.1	Unterschiede im Phosphorylierungsniveau zwischen den Glutaminsäureresten und dem Lysinrest der Linker-Domäne.....	43
3.2.2	Anhaltende Tyrosin-Phosphorylierung der STAT1-Mutanten E559A und E563A ohne Inhibition durch Staurosporin.....	45
3.2.3	Verlängerte Zytokin-induzierte Kernakkumulation von STAT1-E559A und -E563A.....	47
3.2.4	Erhöhte DNA-Bindungsaktivität der beiden Glutaminsäure-zu-Alanin-Mutanten	50

3.2.5	Differentielle DNA-Bindung nach Substitutionen in der Linker-Domäne	54
3.2.6	Hoch-affine DNA-Bindungsaktivität führt zum verminderten Kernexport in STAT1-NES-GFP-Konstrukten.....	62
3.2.7	Verminderte <i>In-vitro</i> -Dephosphorylierung der Substitutionsmutanten E559A, E563A und K567A.....	64
3.2.8	Erhöhte unspezifische DNA-Bindungsaktivität von STAT1-E559A und -K567A.....	65
3.2.8	Verminderte Reporterogenaktivierung von STAT1-K567A	67
3.2.9	Gen-spezifisches Transaktivierungspotential der DNA-Bindemutanten E559A und E563A.....	68
4.	Diskussion	72
5.	Zusammenfassung	82
	Summary	83
6.	Literaturverzeichnis	85

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Alanin, Ampere, Absorption
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel
CBP	CREB-bindendes Protein
CCD	Coiled-coil-Domäne
CCL2	CC-Chemokin-Ligand 2
cDNA	Komplementäre DNA
CIS	<i>cytokine inducible SH2-containing protein</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay
F	Phenylalanin

FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, auch: Gramm
G	Glycin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma-aktivierte Stelle
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
IL	Interleukin
IRF1	IFN-regulatorischer Faktor 1
JAK	Janus-Kinase
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
L	Leucin
LB	Luria-Broth
LD	Linker-Domäne
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
MIG	<i>monokine-induced by IFNγ</i>
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
n	Nano

N-Terminus	Aminoterminaler Terminus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
ND	Aminoterminaler Domäne
NES	Nukleäres Exportsignal
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPC	Nukleärer Porenkomplex (<i>nuclear pore complex</i>)
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
p	Pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT (<i>protein inhibitors of activated STATs</i>)
Poly-dIdC	<i>poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)acid</i>
pSTAT1	STAT1-kodierendes pcDNA3.1-Plasmid
pSTAT1-GFP	STAT1-kodierendes pEGFP-N1-Plasmid
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
pTyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR

S	Serin
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunde(n)
SH2	Src-Homologie-2
SHP-1	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1 mit SH2-Domänen
SHP-2	Protein-Tyrosin-Phosphatase 2 mit SH2-Domänen
SOCS	Suppressor des Zytokin-Signalwegs <i>(suppressor of the cytokine signalling)</i>
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
Stauro	Staurosporin
T	Threonin
T-Zelle	T-Lymphozyt
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween
TC-PTP/TC45	T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

1. Einleitung

Im Rahmen der Evolution hat sich ein komplexes Kommunikationssystem zwischen einzelligen und mehrzelligen Organismen entwickelt, bei dem die Signaltransduktion zur Aufrechterhaltung physiologischer Zellfunktionen einen entscheidenden Beitrag leistet. Einer der phylogenetisch ältesten und am besten untersuchten Signaltransduktionswege ist der JAK(Janus-Kinase)-STAT-Signalweg (Levy und Darnell 2002). **S**ignaltransduktoren und **A**ktivatoren der **T**ranskription (STATs) stellen als eine bekannte Klasse von Transkriptionsfaktoren, die mit der Signalweiterleitung und Transaktivierung eine duale Funktion aufweisen, eine zentrale Komponente dieses Signalweges dar (Darnell 1997; Ihle 2001; Levy und Darnell 2002). Sie wurden erstmals bei der Untersuchung der humanen Interferon(IFN)-abhängigen Genaktivierung entdeckt (Fu et al. 1992; Schindler et al. 1992a) und seitdem in zahlreichen Organismen, wie dem Schleimpilz *Dictyostelium*, Nematoden und Insekten wie auch Vertebraten, nachgewiesen (Yan et al. 1996; Kawata et al. 1997; Liu et al. 1999; Barillas-Mury et al. 1999; Oates et al. 1999; Pascal et al. 2001; Sung et al. 2003).

Die evolutionäre hochkonservierte STAT-Proteinfamilie stellt eine zentrale Komponente im Signaltransduktionsweg dar, indem sie zwischen Liganden-gebundenen Zytokin-Rezeptoren an der Plasmamembran und der Gentranskription im Zellkern vermittelt und somit eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen, wie Wachstumskontrolle, Proliferation und Immunaktivierung, spielt. Identifiziert wurden bisher sieben Mitglieder der humanen STAT-Familie (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6), die eine Länge von 750-850 Aminosäureresten aufweisen und dabei in den ersten 700 Aminosäuren (AS) eine Sequenzhomologie von 28 - 40 % besitzen (Levy und Darnell 2002; Schindler und Darnell 1995). Die genetische Information von STAT1 und STAT4 liegt im menschlichen Genom auf Chromosom 2 und die von STAT2 und STAT6 auf Chromosom 12, während Gene auf Chromosom 17 für STAT3, STAT5a und -5b kodieren (Copeland et al. 1995; Darnell 1997). Die sieben STAT-Mitglieder bestehen funktionell aus einem proteolytisch abspaltbaren, konservierten Aminoterminus, einem Kernfragment bestehend aus einem Vier-Helix-Bündel, einer DNA-Bindedomäne und Linker-Domäne sowie einer klassischen SH2-Domäne (Abb. 1) (Darnell 1997; Levy und Darnell 2002; Lim und Cao 2006). An das Kernfragment schließt sich die letzte, für die Transaktivierung essentielle carboxyterminale Domäne an, in der sich beim STAT1-, STAT2-, STAT3, STAT5a-, STAT5b- und STAT6-Protein ein hochkonservierter Tyrosinrest an Position 701 befindetet, der

von JAK-Kinasen phosphoryliert wird (Shuai et al. 1993a; Vinkemeier et al. 1998). Für kooperative DNA-Bindung zwischen verschiedenen STAT1-Dimeren sind die ersten ~100 AS notwendig (Vinkemeier et al. 1996; Vinkemeier et al. 1998). Durch alternative Spleißvorgänge oder proteolytischen Abbau wird die Variation der STAT-Proteine (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6) weiter erhöht, indem funktionell unterschiedliche STAT-Isoformen gebildet werden (Horvath 2000; Schaefer et al. 1995; Schindler et al. 1992a; Wang et al. 1996). Aus den gleichen DNA-Sequenzen beispielsweise von STAT1 und STAT3 entstehen anhand des Spleißvorganges jeweils zwei STAT-Isoformen (STAT1 α bzw. STAT3 α sowie STAT1 β bzw. STAT3 β) von unterschiedlicher Länge, von der die β -Isoform am carboxyterminalen Ende trunziert vorliegt. Bei STAT1 ist das carboxyterminale Ende der β -Isoform nach dem Spleißvorgang um 38 AS kürzer als die α -Isoform (Darnell 1997; Horvath 2000; Schindler et al. 1992a). Dies hat Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität von STAT1, STAT3, STAT5a und STAT5b, denn durch das Spleißen wird die Transaktivierungsdomäne mitsamt eines konservierten Serinrests, der von Serin-Threonin-Kinasen phosphoryliert wird, entfernt. Die Phosphorylierung dieses Serinrests in Position 727 der Transaktivierungsdomäne ist für eine maximale transkriptionelle Aktivität notwendig (Decker und Kovarik 2000; Horvath 2000; Lödige et al. 2005; Wen et al. 1995).

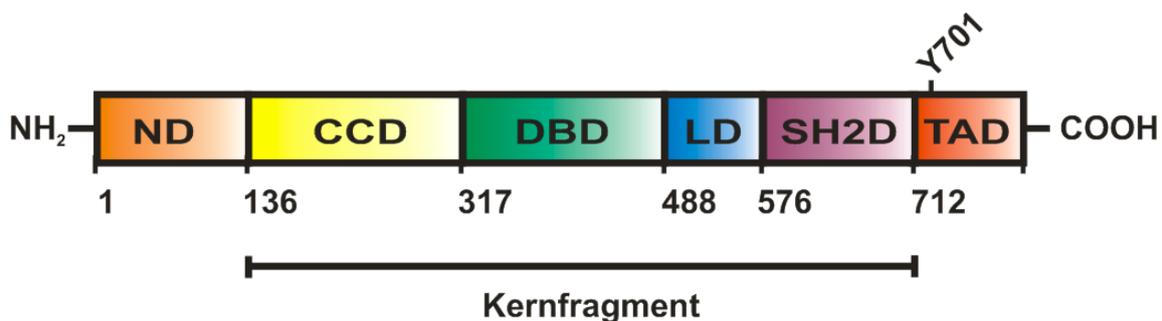


Abb. 1: Charakteristischer Aufbau der STAT1-Proteine aus sechs funktionellen Domänen. Dargestellt ist die Domänenstruktur der STAT-Proteine am Beispiel von STAT1 α : N- bzw. aminoternale-Domäne (ND), Coiled-coil-Domäne (CCD) bzw. 4-Helix-Bündel, DNA-Bindedomäne (DBD), Linker-Domäne (LD), Src-Homologie-2-Domäne (SH2D) sowie Transaktivierungsdomäne (TAD). Das Kernfragment mit seinen vier funktionellen Domänen wird vom Aminoterninus und der carboxyterminalen Domäne eingerahmt. Durch die JAK-Kinase wird das STAT1 α -Protein am Rest Y701 phosphoryliert.

Das Gründungsmitglied STAT1 ist wahrscheinlich das am besten untersuchte Mitglied der humanen STAT-Familie, welches im JAK-STAT-Signaltransduktionsweg IFN-Signale zur Veränderung der Genexpression übermittelt. Eine Vielzahl von Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimulieren diesen Signalweg und gewährleisten somit, dass eintreffende Informationen an membranständigen Rezeptoren bis in den Nukleus weitergeleitet werden (Darnell 1997; Levy und Darnell 2002; Williams 1999).

Zytokine sind ~ 15-25 kDa große Glykoproteine mit einer Länge von 100-200 AS, die im Rahmen der Zellkommunikation als extrazelluläre Botenstoffe dem Informationsaustausch dienen. Sie lösen mit ihrer Bindung an ihre spezifischen extrazellulären Transmembranrezeptoren eine Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungsreaktionen aus, die von Kinasen der Janus-Familie (JAKs) katalysiert werden und zur Aktivierung der STAT-Moleküle führen (Levy und Darnell 2002). Derzeit sind mehr als 50 Zytokine bekannt. Für den JAK-STAT-Signalweg relevante Zytokine sind unter anderem Interferone, Interleukine, Erythropoetin, Somatotropin, Prolaktin und Thrombopoetin, die als Liganden an JAK-assoziierte Rezeptoren binden. Aufgrund einer intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität einiger Rezeptoren können STAT-Proteine auch direkt phosphoryliert werden. Dazu zählt der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und der Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden Faktor 1 (CSF-1) (Darnell 1997; Levy und Darnell 2002). Des Weiteren zeigte sich auch, dass sie durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Transmembran-Rezeptoren, wie den T-Zell-, CD40-, Serotonin-5HTA2A- und Angiotensin-II-Rezeptorkomplex, phosphoryliert werden.

Eine für diese Arbeit wichtige und für die STAT-Aktivierung relevante Zytokingruppe ist die der Interferone, und davon findet das IFN γ besondere Beachtung. Interferone werden in drei Hauptklassen eingeteilt, wobei IFN γ als einziges Mitglied der Gruppe dem Typ-II-Interferon angehört. Isaacs und Lindemann beschrieben erstmals 1957 Interferone im Zusammenhang mit Virusinfektionen als Befähigung zur Interferenz (Isaacs und Lindenmann 1957). Anhand kristallographischer Darstellungen konnte ihre Vier-Helix-Struktur identifiziert und ebenfalls in über 50 weiteren Zytokinen experimentell dargestellt werden (Ealick et al. 1991; Schindler und Plumlee 2008; Senda et al. 1992). Interferone weisen eine vielfältige biologische Wirksamkeit auf, indem sie Einfluss auf immunologische Prozesse nehmen und antiproliferative sowie antivirale Eigenschaften besitzen. Die große Gruppe der Typ-I-Interferone, von denen die Subtypen IFN α sowie IFN β , IFN ϵ , IFN κ und IFN ω in humanem Gewebe nachgewiesen

wurden (Lefèvre und Boulay 1993; Pestka et al. 2004; Roberts et al. 1991; Steppard et al. 2003), zeigen ihre antivirale Eigenschaft, indem sie die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), T-Zellen und Monozyten induzieren (Clemens 2003; Evinger et al. 1981; Herberman et al. 1982; Pestka et al. 2004), wohingegen $\text{IFN}\gamma$ (Typ-II-Interferon) von NK-Zellen und aktivierten T-Zellen freigesetzt wird und daraufhin weitere immunkompetente Zellen aktiviert (Boehm et al. 1997). Interferone sind im Rahmen der Immunabwehr über einen Interferon-regulatorischen Faktor (IRF-1, *interferon-regulatory factor 1*)-abhängigen Weg zur Hochregulierung der Haupthistokompatibilitätskomplexe I (MHC-I, *major histocompatibility complex I*) an der Oberfläche kernhaltiger Zellen befähigt (Chang et al. 1992). Die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen kann allerdings allein durch $\text{IFN}\gamma$ gesteuert werden, wobei CIITA (*MHC class II transactivator*) der Hauptregulator der MHC-II-Transkription ist (Boehm et al. 1997; Drozina et al. 2005; Mach et al. 1996; Schroder et al. 2004). Dieser Transaktivator wird in reifen B-Zellen wie auch in dendritischen Zellen konstitutiv exprimiert.

Die IFN-vermittelte Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges erfolgt durch deren Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren, wie beispielsweise für $\text{IFN}\gamma$ mit dem Interferon- γ -Rezeptor (IFNGR), einem Klasse-II-Zytokinrezeptor, der an der Zelloberfläche sämtlicher kernhaltiger Zellen exprimiert wird (Langer und Pestka 1988). Dieser setzt sich aus je zwei Untereinheiten, IFNGR1 und IFNGR2 oder synonym α -Kette ($\text{IFN}\gamma\text{R}\alpha$) und β -Kette ($\text{IFN}\gamma\text{R}\beta$), zusammen und besteht, wie alle Zytokinrezeptoren, jeweils aus drei Domänen: einer Liganden-bindenden extrazellulären Domäne, einer die Zellmembran durchquerenden Transmembran-Domäne und einer intrazellulären carboxy-terminalen Domäne (Bach et al. 1997; Boehm et al. 1997; Greenlund et al. 1995). Da der Rezeptor keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzt, sind zur Autophosphorylierung des Rezeptors und somit zur Aktivierung der STAT-Proteine Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen (JAK1, JAK2) notwendig, die auf zytoplasmatischer Seite der Zellmembran nicht-kovalent an den Rezeptor gebunden sind (Bach et al. 1997; Darnell et al. 1994; Müller et al. 1993; Schindler und Darnell 1995).

Die Familie der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen umfasst bei Säugetieren nach heutigem Wissensstand vier Mitglieder (JAK1, JAK2 und JAK3 sowie TYK2), denen allen vier gemein ist, dass sie über eine carboxyterminale Kinase-Domäne sowie eine in Nachbarschaft lokalisierte, funktionell inaktive homologe Domäne verfügen (Boehm

et al. 1997; Levy und Darnell 2002; Schindler und Darnell 1995). JAK1 und JAK2 initiieren die Auto- bzw. Transphosphorylierung nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation sowie JAK1 und TYK2 im $\text{IFN}\alpha/\beta$ -vermittelten JAK-STAT-Signalweg (Darnell et al. 1994; Müller et al. 1993).

Funktionell aktives $\text{IFN}\gamma$ induziert durch Bindung an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche eine Oligomerisierung der jeweils zwei Rezeptor-Untereinheiten IFNGR1/IFNGR2, woraufhin die Janus-Kinasen 1 und 2 durch Phosphorylierung aktiviert werden (Abb. 2). Die aktivierten JAKs transphosphorylieren Tyrosinreste in Position 440 der intrazellulären Domäne des IFNGR1, wodurch Phosphotyrosin-Andockstellen entstehen, die eine Rekrutierung von STAT1-Proteinen über einen spezifischen Argininrest in Position 602 ihrer SH2-Domäne an das carboxyterminale Rezeptorende ermöglichen (Darnell et al. 1994; Greenlund et al. 1995). Anschließend führt die Phosphorylierung der STATs an einem invarianten Tyrosinrest des STAT1-Carboxyterminus (Y701) durch die JAKs zur Ausbildung von Phospho-STAT1-Homodimeren, die innerhalb weniger Minuten im Zellkern akkumulieren (Schindler et al. 1992b; Shuai et al. 1992; Shuai et al. 1993a; Shuai et al. 1994). Durch reziproke SH2-Phosphotyrosin-Wechselwirkungen werden die STAT1-Monomere in einer parallelen Dimer-Konformation stabilisiert (Shuai et al. 1994). Im Zellkern binden die STAT1-Homodimere an palindrome Gamma-aktivierte Stellen (GAS) mit einer Konsensussequenz 5'-TTC(N)₃₋₄GAA-3' in den Promotorregionen und induzieren als Zytokin-vermittelte Transkriptionsfaktoren die Expression von $\text{IFN}\gamma$ -abhängigen Genen (Darnell et al. 1994; Decker et al. 1997; Ehret et al. 2001; Horvath et al. 1995).

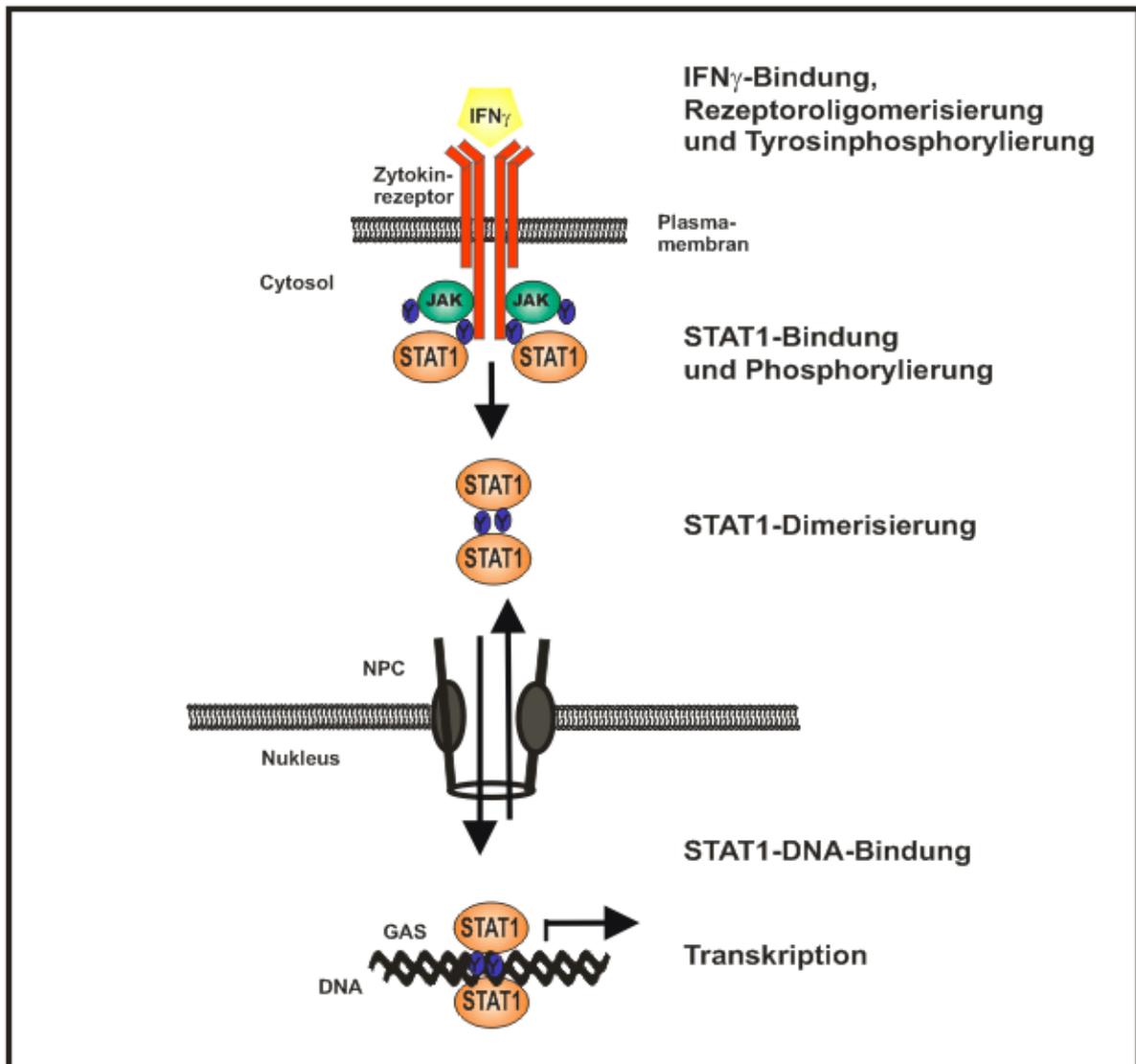


Abb. 2: Kanonischer JAK-STAT-Signalweg der STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung durch IFN γ -Stimulation. Die Bindung von IFN γ führt zur Oligomerisierung der spezifischen Rezeptoruntereinheiten, zur Autophosphorylierung der Janus-Kinasen 1/2 sowie zur Phosphorylierung der intrazellulären IFNGR1-Domäne, wodurch Andockstellen für STAT1-Moleküle generiert werden. Nach Phosphorylierung der STAT1-Monomere lösen sich diese vom Rezeptor, bilden STAT1/STAT1-Homodimere aus und gelangen in den Zellkern, wo sie durch Bindung an spezifische Zielsequenzen, den sog. Gamma-aktivierten Stellen (GAS), die Genexpression induzieren. NPC steht für nukleärer Porenkomplex.

Nach ihrer Dissoziation von der DNA werden die STAT1-Dimere durch nukleäre Phosphatasen, wie die T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TC45), dephosphoryliert (Haspel und Darnell 1999; Haspel et al. 1996; ten Hoeve et al. 2002). Die Tyrosin-Phos-

phatase SHP-2 (*SH2-containing phosphatase 2*) weist ebenso eine nukleär dephosphorylierende Aktivität auf, jedoch besitzt sie eine dual-spezifische Funktion, indem sie STAT1 sowohl am Tyrosin- als auch am Serinrest deaktiviert (Wu et al. 2002).

Neben diesen, den JAK-STAT-Signalweg negativ regulierenden Phosphatasen, greifen weitere regulatorische Proteine auf unterschiedlichen Ebenen des Signalweges ein, um anhaltende Zielgenaktivierung oder deren Fehlregulation zu verhindern, die zu Krebs oder durch überschießende Immunreaktionen zu Erkrankungen des Immunsystems führen können (Shuai 2000; Shuai und Liu 2005; Wormald und Hilton 2004). Die konstitutiv exprimierte Tyrosin-Phosphatase SHP-2 agiert nicht nur im Zellkern, sondern ist neben SHP-1 (*SH2-containing phosphatase 1*) und PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) maßgeblich an der Tyrosin-Dephosphorylierung im Zytoplasma beteiligt (Levy und Darnell 2002; Rawlings et al. 2004; Starr und Hilton 1999; Wormald und Hilton 2004; Wu et al. 2002). Mit ihrer Bindung an phosphorylierte Janus-Kinasen oder aktivierte Rezeptoren verhindern sie die weitere Phosphorylierung der STAT-Proteine.

Des Weiteren kontrollieren SOCS-Proteine 1-7 (*suppressors of cytokine signalling*), denen auch CIS (*cytokine-inducible SH2-domain-containing protein*) angehört, die Signalweiterleitung im Zytoplasma. SOCS1-7 inhibieren die STAT-Aktivierung am Rezeptor durch Bindung an der katalytischen Region der JAKs, wohingegen CIS die Inaktivierung durch Bindung an den phosphorylierten Rezeptor durchführt (Levy und Darnell 2002; Rawlings et al. 2004; Starr und Hilton 1999). Im Nukleus kann die Zytokin-induzierte Genaktivierung außerdem durch PIAS-Proteine (*protein inhibitors of activated STATs*) moduliert werden (Shuai und Liu 2005). Es zeigte sich, dass PIAS1 ein spezifischer STAT1-Inhibitor ist sowie PIAS3 spezifisch mit STAT3 interagiert (Chung et al. 1997; Liu et al. 1998; Starr und Hilton 1999). Die hier genannten Proteine, die für die Inhibition des JAK-STAT-Signalweges notwendig sind, werden häufig selber durch STATs transkriptionell reguliert (Levy und Darnell 2002; Starr und Hilton 1999) und unterliegen somit einem negativen Feedback-Mechanismus.

Der Transport von phosphorylierten STAT-Proteinen aus dem Zytoplasma in den Zellkern geschieht über einen nukleären Porenkomplex (NPC), da STAT1-Dimere mit einem Molekulargewicht von ~ 180 kDa die Kernmembran nicht durch freie Diffusion passieren können (Mattaj und Engelmeier 1998; Meyer und Vinkemeier 2004; Weis

1998). Dieser NPC, der wie eine Art Tunnel aufgebaut ist, interagiert mit seinen Nukleoporinen über hydrophobe Phenylalanin-/Glycin-reiche Sequenzen mit löslichen Transportfaktoren (Fahrenkrog et al. 2004; Nigg 1997; Wente und Rout 2010), wie den Importinen und Exportinen, die zur Familie der Karyopherine zählen (Macara 2001; Rout et al. 2003). Importine erkennen die zu transportierenden Cargo-Proteine über die sogenannte NLS-Sequenz (*nuclear localization signal*), eine spezielle Abfolge basischer Aminosäuren (Fahrenkrog et al. 2004; Koerner et al. 2003; Weis 1998), binden diese an Nukleoporine und importieren sie in den Zellkern. Bei STAT1 konnte kein klassisches NLS, sondern nur ein Dimer-spezifisches NLS (dsNLS) im Bereich der DNA-Bindedomäne nachgewiesen werden (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al. 2002). Dieses konservierte NLS ist den Importinen nur in paralleler Dimerkonformation zugänglich, welches eine vorherige Phosphorylierung der STAT-Proteine voraussetzt. Importine können weder mit STAT-Monomeren noch mit unphosphorylierten STAT-Dimeren interagieren. Der Import der phosphorylierten STAT1-Dimere als Cargo-Proteine erfolgt über einen Importin- α/β -Komplex, bestehend aus zwei Importin- $\alpha 5$ -Molekülen sowie gebundenem Importin- β , wobei STAT1 mithilfe des NLS an Importin- $\alpha 5$ bindet (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Nardozzi et al. 2010; Sekimoto et al. 1997). Importin- β wiederum interagiert mit den Nukleoporinen sowie mit der Ran-abhängigen GTPase, welche die Energie für den aktiven nukleozytoplasmatischen Transport liefert (Mattaj und Engelmeier 1998; Görlich und Kutay 1999). Ran-GTP ist im Zellkern für die Trennung des Importin-Cargo-Komplexes, als auch für die Bindung des Cargo-Proteins an Exportin (Weis 1998), wie CRM1 (*chromosome region maintenance 1*), verantwortlich. STAT1 interagiert mit CRM1 über ein spezifisches leucinreiches nukleäres Exportsignal (NES), das in der Coiled-coil-Domäne identifiziert wurde, und wird somit über den NPC zurück ins Zytoplasma geschleust (Begitt et al. 2000; Mattaj und Engelmeier 1998; Meyer et al. 2003). STAT-Moleküle werden nur im dephosphorylierten Zustand über den nukleären Export aus dem Zellkern transportiert, somit hängt die Dauer der Kernakkumulation der STAT-Proteine von der DNA-Bindung ab, denn nur ungebundene STAT-Dimere werden von den nukleären Phosphatasen, wie die TC45, erkannt und dephosphoryliert (Haspel und Darnell 1999; Meyer et al. 2003; ten Hoeve et al. 2002).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass unphosphorylierte STAT1-Moleküle auch unabhängig von Zytokin-Stimulation stetig zwischen dem Zytoplasma und

der Zellmembran in beide Richtungen translozieren und dass dieser Transportmechanismus ohne metabolische Energie abläuft (Marg et al. 2004; Meyer et al. 2002). Dabei interagieren STAT1-Aminosäurereste der Linker-Domäne mit Phenylalanin-/Glycinreichen Sequenzen (FG-Motive) der Nukleoporene Nup153 sowie Nup214 (Marg et al. 2004). Diese sind zum einen auf der nukleären Seite des NPCs (Nup153) und zum anderen auf der zytoplasmatischen Seite (Nup214) lokalisiert (Paulillo et al. 2005).

Kristallographische Analysen DNA-gebundener STAT1- sowie STAT3-Homodimere in phosphorylierter Form (Becker et al. 1998; Chen et al. 1998) und STAT α aus *Dictyostelium discoideum* ohne DNA-Bindung (Soler-Lopez et al. 2004) ergaben erste Hinweise auf eine dreidimensionale Struktur der STAT-Proteine. Diese Darstellungen wiesen ebenso auf unterschiedliche Konformationen der DNA-gebundenen STAT1- und STAT3-Dimere im Vergleich zu den ungebundenen D-STAT-Dimeren hin (Soler-Lopez et al. 2004), was durch weitere Vervollständigung der kristallographischen Auswertungen mittels dreidimensionaler Darstellung von unphosphorylierten STAT1-Monomeren bestätigt werden konnte. STAT1-Dimere können eine parallele sowie eine antiparallele Konformation einnehmen, wobei die SH2-Domänen des Dimers in der parallelen Konformation in die gleiche Richtung zeigen, während sie antiparallel die entgegengesetzte Ausrichtung einnehmen (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008; Zhong et al. 2005). Ebenso wurde eine flexible Region zwischen dem N-Terminus und der Coiled-coil-Domäne nachgewiesen, die eine Umlagerung der zwei Konformationszustände ermöglichen soll (Mertens et al. 2006). Reziproke SH2-Phosphotyrosin-Wechselwirkungen stabilisieren die Dimere in der parallelen Konformation, während die antiparallele Konformation dagegen über aminoterminalen Wechselwirkungen und Interaktionen der Coiled-coil-Domäne mit der DNA-Bindedomäne stabilisiert wird. Die zwei verschiedenen Konformationen der STAT-Dimere unterscheiden sich funktionell voneinander. Demnach muss STAT1 die parallele Form einnehmen, um an die DNA zu binden, und in der antiparallelen Form vorliegen, um von der Phosphatase TC45 dephosphoryliert sowie aus dem Nukleus exportiert werden zu können (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008; Zhong et al. 2005).

Eine der wichtigsten Funktionen der aminoterminalen Domäne (ND) ist die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen, die eine Voraussetzung für die Tetramerisierung von STAT-Dimeren, was auch als sogenannte kooperative DNA-Bindung bezeichnet wird, darstellt (John et al. 1999; Xu et al. 1996). Im Rahmen von Mutationsexperimen-

ten wurde ein konservierter Phenylalaninrest in Position 77 der aminoterminalen Domäne von STAT1 (Position 81 von STAT5) nach Alanin mutiert und dessen anschließender Verlust zur Oligomerisierung nachgewiesen (Meyer et al. 2004). Ebenso konnte festgestellt werden, dass der Konformationsshift maßgeblich durch die aminoterminalen Domäne beeinflusst wird (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006; Meyer et al. 2004).

Auch die Coiled-coil-Domäne, oder Vier-Helix-Bündel genannt, bestehend aus vier antiparallelen α -Helices, dient der Protein-Protein-Wechselwirkung, die beispielsweise eine Bindung über die DBD zwischen den zwei STAT-Monomeren herstellt und zur Stabilisierung der antiparallelen Konformation beiträgt (Mertens et al. 2006; Zhong et al. 2005). Des Weiteren interagiert sie mit Transkriptionsfaktoren und enthält eine leucinreiche, helikale Region als nukleäres Exportsignal (NES) (Begitt et al. 2000).

Die DNA-Bindedomäne (DBD) von STAT1 setzt sich aus den Aminosäuren 317 - 487 zusammen und weist eine mit der DBD der Transkriptionsfaktoren NF κ B und p53 vergleichbare Immunglobulin-ähnliche Struktur auf, die in mehreren β -Faltblättern und Schleifen angeordnet ist (Chen et al. 1998). Neben dem bereits oben beschriebenen NLS, das in der DBD nachgewiesen werden konnte und den Kernimport von STAT1 durch Bindung an Importin- α 5 gewährleistet (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al. 2002), stellt die Interaktion mit palindromischen DNA-Sequenzen die Hauptfunktion dieser Domäne dar. Jedes STAT1-Monomer interagiert dabei mit einer halben palindromischen (GAS-)Sequenz der DNA-Doppelhelix (Chen et al. 1998; Decker et al. 1997). Ein konservierter Bereich innerhalb der Aminosäurereste 400-500 der DBD ist für die DNA-Bindung maßgeblich und wies nach Mutationen in diesem Bereich eine reduzierte DNA-Affinität auf (Darnell 1997; Horvath et al. 1995; Yang et al. 2002).

Mit ihren AS-Resten ~ 577 - 683 ist die SH2-Domäne die am höchsten konservierte Domäne der STAT-Proteine (Chen et al. 1998; Schindler und Darnell 1995). Allgemein sind SH2-Domänen durch spezifische Erkennung sowie Bindung von Phosphotyrosinmotiven für die Signalweiterleitung von Bedeutung (Mayer und Hanafusa 1990; Mayer et al. 1991). Speziell in den STAT-Proteinen vermitteln sie auf der einen Seite die Rekrutierung von STAT-Molekülen an phosphorylierte, membranständige Rezeptoren oder intrazelluläre Tyrosinkinase (Becker et al. 1998; Greenlund et al. 1994; Shuai et al. 1994), und auf der anderen Seite sind sie für die Homo- und Heterodimerisierung

von phosphorylierten STAT-Monomeren essentiell (Chen et al. 1998; Shuai et al. 1993b, 1994). Diese erfolgt über reziproke Wechselwirkungen der STAT-Protomere und wird über einen konservierten Argininrest in Position 602 der SH2-Domäne von STAT1 initiiert, indem dieser einen Phosphotyrosinrest in Position 701 des kontralateralen STAT-Monomers erkennt. Durch die reziproken SH2-Phosphotyrosin-Wechselwirkungen kommt es zur Ausbildung stabiler STAT1-Homodimere in paralleler Konfiguration (Wenta et al. 2008). Der Argininrest in Position 602 der Phosphotyrosin-Bindetasche der SH2-Domäne ist für die Rezeptorbindung und Dimer-Bildung essentiell. Wird dieser Rest mutiert, verliert STAT1 die Fähigkeit zur Dimerisierung (Chen et al. 1998; Shuai et al. 1993b, 1994).

An die SH2-Domäne schließt sich die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne (TAD) an. In dieser Domäne ist der für den weiteren Signalverlauf entscheidende kritische Tyrosinrest 701 (Schindler et al. 1992a; Shuai et al. 1993a) sowie der für die maximale transkriptionelle Aktivität bedeutsame konservierte Serinrest 727 lokalisiert (Darnell 1997; Wen et al. 1995). Dieser befindet sich allerdings nur in der α -Isoform des STAT1, denn mit dem Spießvorgang des carboxyterminalen Endes wurde der Serinrest in der β -Isoform entfernt (Darnell 1997; Horvath 2000). Diese carboxyterminal verkürzte STAT1-Variante (STAT1 β) kann zwar nach Tyrosin-Phosphorylierung dimerisieren und DNA binden, jedoch keine Zielgene aktivieren. Darüber hinaus ist die TAD neben der aminoterminalen Domäne an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt und bindet wichtige transkriptionelle Koaktivatoren, wie das CREB-bindende Protein (CBP) und p300 (Darnell 1997; Korzus et al. 1998; Zhang et al. 1996). Ebenso wurden Interaktionen mit den Proteinen NCoA1, BRCA1 und MCM5 nachgewiesen (Litterst und Pfitzner 2001; Ouchi et al. 2000; Zhang et al. 1998). Als weitere Funktion induziert die TAD den Stress-vermittelten Zelltod (Janjua et al. 2002; Stephanou und Latchman 2003).

Besondere Beachtung findet in dieser Arbeit die Linker-Domäne der STAT1-Proteine. Diese umfasst ~ 87 AS-Reste (488 - 575), besteht aus mehreren α -Helices und ist zwischen der DBD und der SH2-Domäne lokalisiert (Chen et al. 1998). Sie gehört neben der Coiled-coil-, der DNA-Binde- und der SH2-Domäne zum Kernfragment der STAT-Proteine und ist an einem Zytokin-unabhängigen, nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt, indem Aminosäurereste der Linker-Domäne mit Nukleoporinen des NPC interagieren und somit einen energiearmen Shuttle zwischen Zytoplasma und Zellkern ermöglichen (Marg et al. 2004). In Mutationsexperimenten konnte bereits

nachgewiesen werden, dass aufgrund einer veränderten Dissoziationsrate der STAT1-Linker-Mutanten die transkriptionelle Aktivität des Proteins herabgesetzt ist (Yang et al. 1999; Yang et al. 2002). Diese Ergebnisse zeigen einen Einfluss der LD auf die DNA-Bindung und damit indirekt auf die transkriptionelle Aktivität, allerdings konnte in weiteren Austauschversuchen keine generelle Einschränkung der DNA-Bindung bestätigt werden. Abgesehen von diesen Erkenntnissen ist die LD funktionell noch weitestgehend unbekannt.

Daher ist das Ziel dieser Arbeit, durch Substitutionsexperimente der Linker-Domäne weiterführende Erkenntnisse im Hinblick auf die veränderten Eigenschaften der mutierten STAT1-Proteine sowie die Auswirkungen der einzelnen Punktmutanten auf den JAK-STAT-Signalweg und ihren Phänotyp zu gewinnen. Neben der Rolle und Funktion der Linker-Domäne des STAT1 im JAK-STAT-Signaltransduktionsweg wird zudem die DNA-Bindedomäne durch Generierung einer Punktmutante genauer untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind im Folgenden aufgelistet.

2.1.1 Chemikalien

Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich
Digitonin	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EDTA)	Acros Organics, Geel, Belgien
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Ficoll-Paque Plus	Amersham Bioscience, Freiburg
Formaldehyd 37% in H ₂ O	Sigma-Aldrich
Glucose	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycylglycin	Sigma-Aldrich
N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
IGEPAL-CA-360	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck

Kaliumhydroxid	Carl Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Leptomycin B	LC Laboratories, Woburn, USA
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	Carl Roth
MegaTran 1.0	Origene, Rockville, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Natriumcarbonat	Carl Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich
Pefabloc SC	Carl Roth
2-Propanol	Carl Roth
Puromycin	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth
Rotiphorese Gel 30, -Gel 40	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
Staurosporin	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (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

2.1.2 Radiochemikalien

Das eingesetzte α -[^{33}P]-markierte Desoxynukleotid dTTP mit einer spezifischen Aktivität von 111 TBq/mmol wurde bei Hartmann Analytic (Braunschweig) erworben.

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Mit entionisiertem Wasser aus der Millipore-Anlage PURELAB Plus (ELGA, Celle) wurden alle Puffer, Lösungen und Medien hergestellt. Über einen Molekulfiter mit einer Porengröße von 0,22 μm filtrierte die Anlage das Wasser. Einzelne Lösungen wurden über einen 0,2- μm -Filter steril filtrierte und der pH-Wert mit einem pH-Meter (Sartorius, Göttingen) eingestellt.

2.1.4 Reaktions-Kits

Die nachfolgend aufgelisteten Reaktions-Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet:

Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher 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 Fisher Scientific

2.1.5 Humane Zelllinien

In dieser Arbeit wurden humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) sowie humane Fibrosarkom-Zellen (U3A-Zellen) eingesetzt, die freundlicherweise von Prof. Dr. U. Vinkemeier (University of Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt wurden. Die U3A-Zellen sind eine aus 2fTGH entstandene STAT1-defiziente Zelllinie.

2.1.6 Plasmide, Enzyme und Zytokine

Plasmide

Die im Folgenden angegebenen Plasmide wurden in dieser Arbeit verwandt. Das Plasmid pEGFP-N1 zur Expression von N-terminalen GFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen wurde von Clontech (Mountain View, USA) bezogen. Beim Vektor pSTAT1 α -GFP wurde humane STAT1 α -cDNA (AS 1-746) in pEGFP-N1 kloniert (Begitt et al. 2000). Das Plasmid pSTAT1 α -NES-GFP, das für ein Fusionsprotein aus Volle-Länge-STAT1, einem transferierbaren NES von STAT1 (AS 367-427) sowie dem carboxyterminal lokalisierten GFP (grünfluoreszierendes Protein) kodiert, stammt von Prof. U. Vinke-meier (Lödige et al. 2005). Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde von Invitrogen erworben, und bei pcDNA3.1-STAT1 α ist die humane STAT1 α -cDNA in diesen Vektor kloniert (Prof. James E. Darnell, New York, USA). Der β -Galaktosidase-Expressionsvektor p β Gal wurde von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Zudem kam pGAS3xLy6E, ein IFN γ -abhängiges Reportergenkonstrukt mit drei GAS-Bindestellen, zur Anwendung (Wen et al. 1995).

In dieser Arbeit wird pSTAT1 α im Weiteren durch die Bezeichnung pSTAT1 ersetzt, da nur Plasmide eingesetzt wurden, die für STAT1 α kodieren. Das Akronym pSTAT1 steht für das pcDNA3.1-STAT1 α -Plasmid. Ferner zeigt der Zusatz -GFP die Verwendung des pSTAT1 α -GFP-Plasmids an.

Enzyme

AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase wurde bei Applied Biosystems (Darmstadt), Complete-Mini-Protease-Inhibitoren von Roche (Grenzach) und DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym) von New England Biolabs (Schwalbach) erworben. *DpnI*-Endonuklease und *PfuTurbo*-DNA-Polymerase stammten von Stratagene. peqGold-DNase I wurde von PEQLAB Biotechnologie (Erlangen), T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (TC-PTP/TC45) (human, rekombinant, C-terminale 11 kDa-Deletion (TC Δ C11, Reste 1-317), exprimiert in *E. coli*) von Biomol International (Plymouth, USA) und Trypsin /Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)-Lösung von PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

Zytokine

Die Zellen wurden ausschließlich mit Interferon- γ (IFN γ) der Firma Biomol (Hamburg) stimuliert. IFN γ wurde in dem jeweiligen Zellkulturmedium 1:1000 verdünnt und direkt auf die Zellen pipettiert, falls nicht anders angegeben.

2.1.7 Primer und Oligonukleotide*Primer für sequenzspezifische Mutagenese*

Name	Sequenz
K350A F	5'-ggt gag act gtt ggt ggc att gca aga gct gaa tta taa ttt g-3'
K350A R	5'-caa att ata att cag ctc ttg caa tgc cac caa cag tct caa c-3'
E559A F	5'-ccc ttc tgg ctt tgg att <u>gca</u> agc atc cta gaa ctc att aaa aaa c-3'
E559A R	5'-ggt ttt taa tga gtt cta gga tgc ttg caa tcc aaa gcc aga agg g-3'
E563A F	5'-gga ttg aaa gca tcc tag <u>cac</u> tca tta aaa aac acc tgc-3'
E563A R	5'-gca ggt gtt ttt taa tga gtg cta gga tgc ttt caa tcc-3'
K567A F	5'-cat cct aga act cat taa <u>agc</u> <u>aca</u> cct gct ccc tct ctg g-3'
K567A R	5'-cca gag agg gag cag gtg tgc ttt aat gag ttc tag gat g-3'

Primer für die Sequenzierung

Name	Sequenz
312f	5'-ttc aga gct cgt ttg tgg tg-3'
611r	5'-ctc cac cca tgt gaa tgt ga-3'

Primer für die Real-time PCR

Name	Sequenz
hGAPDH F	5'-gaa ggt gaa ggt cgg agt c-3'
hGAPDH R	5'-gaa gat ggt gat ggg att tc-3'
hGBP1 F	5'-ggt cca gtt gct gaa aga gc-3'
hGBP1 R	5'-tga cag gaa ggc tct ggt ct-3'
hIRF1 F	5'-agc tca gct gtg cga gtg ta-3'
hIRF1 R	5'-tag ctg ctg tgg tca tca gg-3'
hSTAT1 F	5'-ccg ttt tca tga cct cct gt-3'

hSTAT1 R	5'-tga ata ttc ccc gac tga gc-3'
hCCL2 F	5'-cca gtc acc tgc tgt tat aac-3'
hCCL2 R	5'-tgg aat cct gaa ccc act tct-3'
hMIG1 F	5'-cca ccg aga tcc tta tcg aa-3'
hMIG1 R	5'-cta acc gac ttg gct gct tc-3'

Oligonukleotid-Sonden für EMSA

Name	Sequenz
M67 F	5'-ttt tcg aca ttt ccc gta aat ctg-3'
M67 R	5'-ttt tca gat tta cgg gaa atg tcg-3'
2xGAS F	5'-ttt ttg ttt ccc cga aat tga cgg att tcc ccg aaa c-3'
2xGAS R	5'-ttt ttg ttt cgg gga aat ccg tca att tcg ggg aaa c-3'
GAS-nonGAS F	5'-ttt tcg ttt ccc cga aat tga cgg att tac ccc aac-3'
GAS-nonGAS R	5'-ttt tgt tgg ggt aaa tcc gtc aat ttc ggg gaa acg-3'
2xnonGAS F	5'-ttt tcg ttt acc cca aat tga cgg att tac ccc aac-3'
2xnonGAS R	5'-ttt tgt tgg ggt aaa tcc gtc aat ttg ggg taa acg-3'
CCL2 nat F	5'-ttt tct gct tcc ctt tcc tac ttc ctg gaa atc ca-3'
CCL2 nat R	5'-ttt ttg gat ttc cag gaa gta gga aag gga agc ag-3'
CCL2 nonGAS F	5'-ttt tct gct tcc ctt tcc tac tag ctg gaa atc ca-3'
CCL2 nonGAS R	5'-ttt ttg gat ttc cag cta gta gga aag gga agc ag-3'

2.1.8 Bakterienstämme und Medien

E. coli DH5 α -Zellen mit dem Genotyp *F- ϕ 80dlacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1* und *E. coli* XL1 blue-Zellen mit dem Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]* stammten von Stratagene.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB- oder SOC-Medium und auf LB-Agarplatten. Für die Herstellung des LB-Mediums wurde 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl und NaOH für die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 benötigt. Die Zusammensetzung der LB-Agarplatten bestand aus dem LB-Medium und zusätzlich 1,5 %-igem Agar. Nach 30-minütiger Autoklavierung bei 121 °C und 1,5 bar wurde dem LB- und dem LB-

Agar-Medium Kanamycin (50 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml), je nach verwendeter Plasmid-DNA, als Selektionsmarker zugegeben. Das SOC-Medium setzte sich aus 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄, bei einem pH-Wert von 7,4, zusammen. Anschließend wurde das Medium für 20 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert und 20 mM steril filtrierte Glucose zugegeben.

2.1.9 Antikörper

Der polyklonale STAT1 α p91 (C-24) Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) wurde in Western-Blot-Experimenten 1:2000 mit 4 % Rinderserumalbumin (BSA) (Albumin Fraktion V, Carl Roth) in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS: 137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) plus 0,05 % Tween-20 (TBS-T) verdünnt und als Sekundärantikörper eingesetzt. Ebenfalls wurde dieser Antikörper in immunzytochemischen Versuchen in einer 1:1000 Verdünnung mit 25 % fetalem Kälberserum (FCS) in Dulbecco's Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Gibco, Karlsruhe) und in EMSA-Experimenten (*electrophoretic mobility shift assays*) für die Supershift-Reaktion verwandt. Als Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen kam zusätzlich der Phospho-STAT1 (Tyr701) Antikörper (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 mit 4 % BSA in TBS-T zum Einsatz. Der polyklonale IRDye 800 CW Anti-Kaninchen-IgG Antikörper aus der Ziege (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) wurde als Sekundärantikörper in Western-Blot-Experimenten (1:10.000 mit 4 % BSA in TBS-T) eingesetzt. Als Sekundärantikörper für die immunzytochemischen Versuche wurde Cy3-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) 1:500 in 25 % FCS verdünnt. Der polyklonale Anti-STAT3 Antikörper H-190 (Santa Cruz Biotechnology) wurde in EMSA-Experimenten für Supershift-Reaktionen verwandt.

2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien in dieser Arbeit sind jeweils in der Beschreibung der einzelnen Methoden aufgeführt worden. Alle nicht angegebenen Verbrauchsmaterialien stammen von B. Braun AG (Melsungen), Biometra (Göttingen), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark), PEQLAB Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und VWR (Darmstadt).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

Behandlung und Kultivierung von Säugerzellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen an mikrobiologischen Sicherheitsbänken (HERAsafe, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) durchgeführt. Die Kultivierung der HeLa- und U3A-Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten, 5 %-igen CO₂-Atmosphäre in 75-cm²-Zellkulturflaschen (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen) im Brutschrank (Heraeus, Thermo Fisher Scientific). Für die HeLa-Zellen bestand das Vollmedium aus Quantum 101 HeLa-Medium (PAA, Pasching, Österreich) versetzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA). Als Vollmedium für die U3A-Zellen wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM; Biochrom, Berlin) mit 10 % FCS (Biochrom), 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,04 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) supplementiert.

Zellpassage

Die Umsetzung der adhärennten Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Zellen wurden einmal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,2 g/l EDTA; Biochrom) für etwa 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von serumhaltigem Vollmedium gestoppt, so dass die zuvor adhärennten Zellen nun als Zellsuspension vorlagen. Zur Weiterführung wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 verdünnt ausplattiert.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 70 % mit PBS gewaschen, trypsiniert, in PBS aufgenommen und für 10 min bei 1000 rpm (Umdrehungen pro Minute) und 20 °C zentrifugiert (Cebtrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg). Das entstandene Zellpellet in einer 75-cm²-Zellkulturflasche wurde in 1 ml Einfriermedium (20 % FCS, 10 % Dimethylsulfoxid in DMEM (DMSO)) aufgenommen, resuspendiert und über Nacht in einer mit Isopropanol (Carl Roth) gefüllten Gefrierbox (Nalgene, Heidelberg) gelagert. Durch langsame Senkung der Temperatur von -1 °C bis -3 °C pro Stunde unter Verwendung von DMSO wurden die Zellen bis auf die Lagerungstemperatur von -80 °C abgekühlt. Im Wasserbad bei 37 °C erfolgte zügig das Auftauen der eingefro-

renen Zellen. Mit Vorsicht wurden die Zellen in dem jeweiligen Vollmedium resuspendiert und für 5 min bei 1000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Zellpellet erneut in Vollmedium resuspendiert und die Zellen in Kultur genommen.

2.2.2 Einführen von Punktmutationen in Plasmide

Mithilfe des QuickChange Site-Directed-Mutagenesis-Kits wurden, nach Herstellerangaben, Punktmutationen in STAT1-kodierende Plasmide eingeführt. Die Reaktion verlief in 50 µl Ansätzen. Je nach Ansatz wurde 25 ng der Matrizen-DNA und 125 ng der beiden komplementären Mutagenese-Primer vorgelegt. Hinzu kam 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat)-Mix, bestehend aus den vier natürlich vorkommenden Desoxynukleotiden, und für die Katalyse 2,5 Einheiten (U) *PfuTurbo*-DNA-Polymerase. Mit H₂O wurden die Ansätze auf 50 µl aufgefüllt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte im T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) nach folgendem Protokoll: einem initialen Denaturierungsschritt über 30 sec bei 95 °C folgten 16 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung für 30 sec bei 95 °C, einem Hybridisierungsschritt für 1 min bei 55 °C und einer Synthesephase über 14 min bei 68 °C. Während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C in Gegenwart von 10 U *DpnI*-Endonuklease wurde die methylierte DNA-Matrize degradiert.

2.2.3 Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*-Zellen des Stammes DH5 α bzw. in superkompetente XL1-blue *E.coli*-Zellen erfolgte mithilfe der Hitzeschock-Behandlung (Cohen et al. 1972). Dazu wurden 100 µl der DH5 α - bzw. 50 µl der XL1-blue Zellen langsam auf Eis aufgetaut, 10 ng der Plasmid-DNA (entspricht 1 µl des Mutageneseansatzes) zugegeben und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Die Hitzeschock-Behandlung der DH5 α -Zellen erfolgte über 30 sec bzw. der XL1-blue-Zellen über 45 sec in einem 42 °C heißen Wasserbad. Darauf folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis sowie eine einstündige Kultivierung der Bakteriensuspension in 500 µl vorgewärmten SOC-Medium im Schüttelinkubator (Innova 42) bei 225 rpm und 37 °C. Nach der Inkubation wurden 250 µl der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten mit Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gehalten.

2.2.4 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Um Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen isolieren zu können, wurden zunächst 5 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie beimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Für die Mini-Präparationen von Plasmid-DNA wurden 2 ml der Übernachtskultur in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Aus dem entstandenen Zellpellet wurde die Plasmid-DNA mithilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) nach Herstellerangaben isoliert und zur Sequenzierung verwendet. Für Maxi-Präparationen einer größeren Menge an reiner Plasmid-DNA wurden 2 ml der transformierten Bakteriensuspension einer Übertagkultur in 100 ml Antibiotikum-haltigen LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur in Zentrifugen-Gefäße überführt und für 15 min bei 6000 g (Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Entsprechend den Herstellerangaben des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA. Die mit H₂O eluierte DNA wurde nach Konzentrationsbestimmung auf 1 µg/µl verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte durch SEQLAB Sequence Laboratories (Göttingen). Mithilfe der Sequenzierung wurden alle in dieser Arbeit eingefügten Punktmutationen bestätigt. Für den Ansatz der Sequenzierreaktion wurden 700 ng Plasmid-DNA mit 20 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers gemischt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 7 µl gebracht.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA wurde mithilfe des Photometers BioPhotometer Plus (Eppendorf) vorgenommen. Die Messungen erfolgten mit einer 70 µl-UV-Küvette (Brand, Wertheim) bei einer Wellenlänge von 260 nm und die Konzentration wurde mit folgender Formel bestimmt:

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

Verunreinigungen der Proben konnten durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und Bildung des Quotienten A_{260}/A_{280} ausgeschlossen oder nachgewiesen werden. Eine nicht kontaminierte DNA-Lösung hatte einen Wert von ~ 1,8.

2.2.7 Transfektion von Säugerzellen

In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz MegaTran 1.0 (Origene, Rockville, USA) für den Transfer von Plasmid-DNA in die humanen Zelllinien verwendet. Bei Transfektionen in 6-Lochplatten wurde je Loch 1,6 µg Plasmid-DNA, bei 48-Lochplatten je Loch 0,25 µg DNA und bei 8-Kammer-Objektträgern je Kammer 0,1 µg DNA eingesetzt. Pro 1 µg DNA wurden 100 µL einer 150 mM NaCl-Lösung zu der Plasmid-DNA hinzugegeben und mit der dreifachen Konzentration an MegaTran, im Verhältnis zur DNA, komplementiert. Der Ansatz wurde für 10 sec gevortext und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurde der Ansatz direkt auf die Zellen gegeben und 16 bis 24 h nach erfolgter Transfektion konnten die STAT1-exprimierenden Zellen analysiert und weiterverwendet werden.

2.2.8 Behandlung der Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren

Falls nicht anders angegeben, wurde für die Stimulation der Zellen 5 ng/ml humanes, rekombinantes IFN γ (Biomol, Hamburg) und für die Kinase-Inhibition 500 nM Stauroporin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingesetzt. Die Hemmung der Tyrosin-Phosphatasen erfolgte durch die Behandlung der Zellen mit einer Kombination aus 0,8 mM Natriumorthovanadat (Sigma-Aldrich) und 0,2 mM H $_2$ O $_2$. Die Herstellung einer wässrigen Natriumorthovanadat-Stammlösung fand dabei nach den Angaben von Kypta et al. (1988) statt und wurde auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Leptomycin-B-Behandlung (LMB) (LC Laboratories, Woburn, USA) erfolgte mit einer Konzentration von 10 ng/ml.

2.2.9 Gesamtzellextraktion

Die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde für Western-Blot-Analysen, *In-vitro*-Dephosphorylierungsversuche und EMSA-Experimente benötigt. Die auf 6-Lochplatten kultivierten HeLa- oder U3A-Zellen wurden 16-24 h nach Transfektion wie jeweils angegeben stimuliert, mit PBS gewaschen und anschließend je Loch für 5 min mit zytoplasmatischem Extraktionspuffer (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na $_3$ VO $_4$, pH 7,4) auf Eis lysiert. Die weitere Aufarbeitung der Zellen fand auf Eis statt. Unmittelbar vor dem Gebrauch des eiskalten Puffers wurden Complete-Mini-Protease-Inhibitoren, 3 mM Dithiothreitol (DTT, AppliChem, Darmstadt) 0,4 mM Pefabloc (Carl Roth) und 0,1 % IGEPAL-CA-360 (Sigma-Aldrich) zugesetzt. Nach der 5-minütigen Inkubation wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber

gelöst, die Lysate zur Weiterbehandlung in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 sec bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße pipettiert, für weitere 5 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert und 40 µl des entstandenen zytosolischen Extraktes in weitere Reaktionsgefäße überführt und zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten.

Das nach dem ersten Zentrifugationsschritt entstandene Zellpellet wurde mit je 50 µl nukleärem Extraktionspuffer (20 mM HEPES, 420 mM KCl, 20 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na₃VO₄, pH 7,4) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Auch der nukleäre Extraktionspuffer wurde kurz vor der Verwendung mit Complete-Mini-Protease-Inhibitoren, 3 mM DTT und 0,4 mM Pefabloc komplementiert. Nach der 30-minütigen Inkubation folgte eine Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 15 min. Die entstandenen nukleären Zellextrakte wurden 1:1 mit den zytoplasmatischen Extrakten zu Gesamtzellextrakten vereint.

Die Gesamtzellextrakte wurden für Western-Blot-Analysen mit 6x SDS-Probenpuffer (350 mM Tris-HCl, 30 % Glycerin, 10 % β-Mercaptoethanol, 8 % SDS, 0,04 % Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt, für 3 min bei 95 °C denaturiert und die Proben bei -20 °C gelagert. Für EMSA und Dephosphorylierungs-Assays wurden die Gesamtzellextrakte ohne Zugabe von Probenpuffer bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung von STAT1-Proteinen aus den Gesamtzellextrakten. Die Detektion der Proteine sowie das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 wurden im nachfolgenden Western-Blot-Verfahren durchgeführt und untersucht. Die für die Gelelektrophorese verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Für das Trenngel wurde 10 % (v/v) Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1, Carl Roth) mit 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8) verdünnt und kurz vor dem Gießen 0,03 % APS (Ammoniumperoxodisulfat, Carl Roth) sowie 0,16 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Carl Roth) zugegeben. Bis zur vollständigen Polymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol bedeckt. Anschließend wurde das Sammelgel, bestehend aus 5 % Rotiphorese Gel 30, 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8), 0,06 % APS und 0,2 % TEMED, direkt auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Zur Konstruktion der Geltaschen wurde ein Plattkamm zwischen die zwei Glasplatten in das Sammelgel eingesetzt.

Die bei -20 °C gelagerten Gesamtzellextrakte wurden erneut für 3 min bei 95 °C erhitzt und anschließend 10-20 µl der Extrakte je Geltasche aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,6) bei einer konstanten Spannung von 11 mA pro Gel in einem vertikalen Elektrophorese System (Minigel-Twin, Biometra, Göttingen).

2.2.11 Western Blotting

Der anschließende 90-minütige Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten STAT1-Proteine auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (Milipore, Schwalbach/Ts) erfolgte bei 80 mA pro Gel nach der Semi-Dry-Methode in der Transfer-Apparatur Fast-blot B44 von Biometra (Göttingen). Die hydrophobe PVDF-Membran wurde für 5 min in Methanol (Carl Roth) aktiviert, anschließend zweimal für je 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,0) auf dem Schüttler inkubiert und für 1 h mit 4 % BSA in TBS-T unter Schütteln bei RT blockiert, um freie unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C auf dem Schüttler über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran fünfmal für je 5 min in TBS-T gewaschen und im Anschluss für 1 h unter Schütteln bei RT mit dem IRDye-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten weitere fünf Waschprozeduren für je 5 min in TBS-T und zuletzt in TBS. Mithilfe des LI-COR Odyssey Sa Imaging Systems (Biosciences, Bad Homburg) wurden die Proteine auf der Membran detektiert. Zur Bestimmung des STAT1-Expressionsniveaus wurden die in der ersten Reaktion gebundenen Antikörper für 60 min bei 60 °C in Ablösepuffer (2 % SDS, 0,7 % β -Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCL, pH 6,8) im Wasserbad entfernt. Nach viermaligem Waschen der Blot-Membran in TBS-T für je 15 min wurde die Membran ein weiteres Mal für 1 h mit 4 % BSA in TBS-T blockiert. Die Blot-Membran konnte erneut mit einem STAT1-spezifischen polyclonalen Primärantikörper, wie auch mit einem Sekundärantikörper, inkubiert und die STAT1-Proteine detektiert werden.

2.2.12 *In-vitro*-Dephosphorylierungs-Assay

Die *In-vitro*-Dephosphorylierungsreaktion erfolgte bei einer Inkubationszeit von 30 min und 30 °C mit 10 µl entsprechend vorbehandelter U3A-Gesamtzellextrakte und der gleichen Menge an Dephosphorylierungspuffer. Dieser setzte sich aus 25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 0,5 mg/ml BSA bei einem pH von 7,5 zusammen und

wurde kurz vor seiner Verwendung mit 4 mM DTT, Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 2 U TC45 Phosphatase komplementiert. Die Reaktionsansätze enthielten keine DNA oder doppelsträngige, zuvor hybridisierte Oligonukleotid-Sonden (2xGAS oder GAS-nonGAS) in einer Endkonzentration von 25 nM. Durch Zugabe von 6x SDS-Probenpuffer und einer dreiminütigen Erhitzung auf 95 °C wurde die Reaktion gestoppt. Die Menge an nach abgeschlossener Reaktion noch vorliegender Tyrosin-Phosphorylierung und Gesamt-STAT1 je Probe wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot analysiert.

2.2.13 Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Mithilfe Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) wurde die spezifische DNA-Bindungsaktivität von STAT1 nachgewiesen (Begitt et al. 2000). Dazu wurden radioaktiv markierte, doppelsträngige Oligonukleotid-Sonden mit kanonischen oder degenerierten GAS-Bindestellen zusammen mit Gesamtzellextrakten aus IFN γ -stimulierten, transient mit den entsprechenden STAT1-Derivaten transfizierten HeLa- oder U3A-Zellen inkubiert.

Die folgenden sechs verschiedenen Oligonukleotid-Sonden wurden eingesetzt (ohne Abbildung des komplementären Oligonukleotid-Strangs und des Poly-dT-Überhangs, GAS-Stellen unterstrichen):

M67: 5'-CGACATTTCCCGTAAATCTG-3',
 2xGAS: 5'-CGTTTCCCCGAAATTGACGGATTTCCCCGAAAC-3',
 GAS-nonGAS: 5'-CGTTTCCCCGAAATTGACGGATTTACCCCAAC-3',
 2xnonGAS: 5'-CGTTTTACCCCAAATTGACGGATTTACCCCAAC-3',
 CCL2 native: 5'-CTGCTTCCCTTTCTACTTTCTGGAAATCCA-3' und
 CCL2 mutant: 5'-CTGCTTCCCTTTCTACTAGCTGGAAATCCA-3'.

Die Herstellung der Sonden umfasste als ersten Schritt die Hybridisierung. Dazu wurden je 50 pmol/ml komplementäre Oligonukleotide in Oligo-Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) aufgenommen, 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend langsam bis auf RT abgekühlt. Bis zur Verwendung der hybridisierten Oligonukleotide wurden diese bei -20 °C gelagert.

Als weiterer Schritt erfolgte die radioaktive Markierung der DNA-Sonden durch Auffüllen der nicht-komplementären, 5'-überhängenden Enden der hybridisierten Oligonukleotide mit radioaktiven [³³P]-Nukleotiden in einer durch Klenow-Polymerase katalysierten Reaktion. Dazu wurde ein Ansatz aus 0,1 ng doppelsträngiger Oligonukleotide und 6 µl des [³³P]-markierten Desoxythymidintriphosphat (dTTP) mit 5 U des Klenow-Fragments in 5 µl 10x Eco-Pol-Puffer (New England, Biolabs, Frankfurt am Main) für 25 min bei RT inkubiert. Das Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I verfügt über 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität, nicht aber über 5'-3'-Exonukleaseaktivität. 1 µl einer nicht-radioaktiven dATP-Lösung (6,5 mM dATP) wurde anschließend zugegeben und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 1 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt und freie Nukleotide von der markierten DNA-Sonde durch 3-minütige Zentrifugation über Illustra MicroSpin G-25-Säulen (GE Healthcare, München) bei 700 g und RT chromatographisch entfernt.

Jede Shift- bzw. STAT1-DNA-Bindungsreaktion enthielt 0,2 µl radioaktiv markierte DNA-Sonde, 0,5 µl des synthetischen Copolymers Poly(dIdC) zusammengesetzt aus alternierenden Inosin-Cytosin-Nukleotiden (2 mg/ml), 1,3 µl DTT (100 mM), 4 µl H₂O und 2,5 µl 5x Shift-Puffer (100 mM HEPES, pH 7,9, 20 % Ficoll, 5 mM MgCl₂, 200 mM KCl, 0,5 mM Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 2,5 mM EDTA) mit 4,5 µl Gesamtzellextrakt. Bei geringeren Extraktmengen wurden die Proben mit 1x PBS oder mit Gesamtzellextrakten von untransfizierten Zellen aufgefüllt, so dass immer ein Gesamtvolumen von 13 µl vorlag, und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Je nach Versuch wurden Kompetitionen mit nicht-radioaktiv markierter M67-DNA durchgeführt. Dazu wurden unmarkierte Oligonukleotide in 750-fachen molaren Überschuss zu dem jeweiligen Ansatz dazugegeben und für die angegebenen Zeiten auf Eis inkubiert (Meyer und Vinkemeier 2010). Durch Supershift-Reaktionen mit je 20 ng polyklonalem Anti-STAT1 (C-24) oder alternativ zur Kontrolle Anti-STAT3 (H-190) Antikörper konnte die Identifikation der DNA-gebundenen STAT1-Proteine verifiziert werden.

Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurden in einem nativen, präequilibrierten 4,8%-igen TBE (Tris-Borsäure-EDTA)-Polyacrylamidgel bei 400 V und 4 °C mit 0,25x TBE-Laufpuffer über 2,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung von zwei Gelen wurden 12 ml Rotiphorese Gel 40, bestehend aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 29:1, mit 4,8 ml 5x TBE und 82 ml H₂O vermischt und durch Zugabe von

2 ml 10 % APS und 100 μ l TEMED die Polymerisation gestartet. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde das Gel bei 80 °C auf Whatman-Papier (Albet Lab Science, Dassel) vakuumgetrocknet, über Nacht auf eine Phospho-Imager-Folie bei RT exponiert und anschließend mittels Fujifilm FLA-5100 Scanner (Fuji, Düsseldorf) eingescannt. Mithilfe des Auslese-Programms TINA v. 2.0 (Raytest, Straubenhart) wurden die Imager-Platten ausgelesen und mit den Software-Programmen Aida Image Analyzer v. 4.06 (Raytest) und Corel Draw (Corel, Corel Cooperation, Unterschleißheim) bearbeitet.

2.2.14 Pull-down-Assay mit biotinylierten Oligonukleotiden

Diese Methode wurde zum Nachweis von DNA-Protein-Wechselwirkungen, insbesondere unspezifischer DNA-Bindung, angewandt. Für die Bindung von STAT1-Proteinen wurden mit Biotin markierte Oligonukleotide, die zuvor an Streptavidin-Agarose gekoppelt wurden, als Sonden eingesetzt. Die doppelsträngigen Oligonukleotide (0,5 ml, 25 pmol/ μ l) wiesen entweder zwei Konsensus-GAS-Stellen (2xGAS) oder eine mutierte Sequenz ohne GAS-Bindestellen (2xnonGAS) auf. Die zwei verschiedenen Sonden wurden jeweils für 1 h bei 4 °C an 0,5 ml gepackte Streptavidin-Agarose (Sigma-Aldrich) gekoppelt.

Konfluente U3A-Zellen von einer 10-cm-Petri-Schale, die rekombinante STAT1-Proteine exprimierten, wurden entweder unbehandelt belassen oder für 30 min mit IFN γ und weitere 15 min mit Vanadat/H₂O₂ stimuliert. In einem nächsten Schritt wurden die Zellen durch Zugabe von 400 μ l Extraktionspuffer wie oben beschrieben lysiert. Nach einer Präinkubation mit ungebundener Streptavidin-Agarose wurden 320 μ l des Überstandes der jeweiligen Zellextrakte mit 50 μ l der DNA-gebundenen Streptavidin-Agarose (gepacktes Volumen) für 2 h bei 4 °C in einem Rotor inkubiert. Anschließend wurden die Agarose-Kügelchen mit 400 μ l zytoplasmatischem Extraktionspuffer gewaschen, bevor die gebundenen Proteine durch Erhitzen mit SDS-Probenpuffer denaturiert wurden. Mithilfe des Western Blottings erfolgte die Detektion des DNA-gebundenen STAT1.

2.2.15 Reporteragen-Assay

Die transkriptionelle Aktivität von STAT1-WT und den STAT1-Mutanten wurde anhand von verschiedenen Reporteragen-Assays analysiert. Zur Bestimmung der Genaktivie-

rung wurde unter anderem ein IFN γ -sensitives Luciferase-kodierendes Reportergenkonstrukt des Ly6E-Gens eingesetzt, welches eine dreifache STAT1-Bindestelle in seiner Promotorregion (bezeichnet als 3xLy6E) (Wen et al. 1995) aufweist. Das nach Aktivierung des Promotors durch Phospho-STAT1 gebildete Enzym Luciferase katalysiert die Umsetzung von α -Luciferin zu Oxyluciferin. Mithilfe dieser enzymatischen Reaktion ließ sich die emittierte Anzahl von Lichtquanten bestimmen, welche proportional zur gebildeten Luciferasemenge war. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein konstitutiv exprimierter β -Galaktosidase-Reporter in die Zellen kotransfiziert und die β -Galaktosidaseaktivität der gleichen Extrakte spektrophotometrisch gemessen.

U3A-Zellen wurden in 48-Lochplatten kultiviert und je Loch mit den folgenden drei verschiedenen DNA-Konstrukten transfiziert: 250 ng des entsprechenden STAT1-kodierenden Expressionsplasmids, 200 ng des β -Galaktosidase-Reporters und 70 ng des 3xLy6E-Plasmids. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit 5 ng/ml IFN γ in Vollmedium stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor sie je Loch mit 100 μ l des Triton-Glycylglycin-Lysepuffers (25 mM Glycylglycin, 1 % Triton X-100, 15 mM MgSO $_4$, 4 mM EGTA, pH 7,8) für 15 min bei RT inkubiert wurden. Unmittelbar vor der Zelllyse wurde der bei 4 °C gelagerte Puffer mit 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren vervollständigt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurden 20 μ l des Überstands in eine weiße 96-Lochplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) pipettiert. Durch Zugabe von 50 μ l Substratlösung des Luciferase-Assay-Systems (Promega, Mannheim) mithilfe des Luminometers Centro XS 3 LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) wurde die Luciferase-Aktivität gemessen und anschließend die Ergebnisse mit dem Software-Programm MikroWin, Version 4.41, ausgewertet.

Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz mittels der β -Galaktosidaseaktivität wurden 20 μ l des Lysats mit 280 μ l einer Substratlösung versetzt. Diese enthielt 211 μ l Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,2), 66 μ l ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG, 4 mg/ml in 10 mM Natriumphosphat-Puffer) und 3 μ l einer 100x Magnesium-Lösung (100 mM MgCl $_2$, 4,5 mM β -Mercaptoethanol). Nach ca. 20 min wurde die enzymatische Farbreaktion beobachtet und daraufhin durch Zugabe von 500 μ l einer 0,5 M Natriumcarbonat-Lösung (Na $_2$ CO $_3$) gestoppt. Die β -Galaktosidaseaktivität

wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm durch Messen des Reaktionsproduktes der ONPG-Umsetzung mit dem Lesegerät Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Pro STAT1-Konstrukt und Stimulationszeitraum wurden jeweils sechs Messungen durchgeführt. Zur Normierung wurde der Quotient aus Luciferase-Aktivität und β -Galaktosidase-Expression gebildet und Standardabweichungen und Mittelwerte mit den Software-Programmen Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) und SigmaStat (Systat Software, Erkrath) berechnet.

2.2.16 Fluoreszenzmikroskopie und Immunocytochemie

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte die Kinetik IFN γ -indizierter Kernakkumulation von Phospho-STAT1-WT-GFP und Phospho-STAT1-GFP-Derivaten beurteilt werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen auf 8-Kammer-Objektträger (Lab-Tek Chamber Slides, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) kultiviert und mit dem Vektor pEGFP-N1-STAT1 bzw. einem seiner Derivate transfiziert. 16-24 h nach der Transfektion wurden die STAT1-GFP exprimierenden Zellen, wie jeweils angegeben, mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert und nachfolgend für unterschiedliche Zeiten mit 500 nM Staurosporin behandelt. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehyd (Sigma-Aldrich) in PBS für 15 min bei RT. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und einer mit destilliertem H₂O, bevor die Zellkerne mit 5 μ g/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) in PBS für 10 min bei RT unter Schütteln gefärbt wurden. Nach erneutem Waschen mit PBS und H₂O wurden die Zellen mit Fluoromount-G-Eindeckmedium (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckt sowie lichtgeschützt und gekühlt bei 4 °C aufbewahrt.

Die Detektion der Kernakkumulation von unmarkierten STAT1-Proteinen wurde mittels Immunocytochemie durchgeführt. Die adhärenenten U3A-Zellen wurden wie auch für die Fluoreszenzmikroskopie auf 8-Kammer-Objektträgern kultiviert und mit 5 ng/ml IFN γ für 45 min stimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die mit IFN γ stimulierten Zellen in Anwesenheit von 500 nM Staurosporin für 0, 30 oder 60 min inkubiert und nachfolgend für 20 min bei -20 °C mit Methanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die 20-minütige Permeabilisation der Zellen mit 1,0 % Triton X-100 in PBS. Danach wurden die Zellen wiederholt mit PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 45 min mit 25 % FCS in PBS bei RT behandelt. Im Anschluss erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Erstantikörper Anti-STAT1 C-24 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in einer 1:1000-

Verdünnung mit 25 % FCS in PBS bei RT unter Schütteln, gefolgt von einem dreifachen Waschschrift mit PBS. Nach erneuter 45-minütiger Inkubation mit dem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (Dianova) in 500-facher Verdünnung (25 % FCS in PBS) bei RT unter Schütteln wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen, die Zellkerne mit Hoechst 33258 gefärbt und anschließend mit Fluoromount-G-Eindeckmedium eingedeckt.

Die Analyse der fluoreszenzmikroskopischen und immunzytochemischen Verfahren erfolgte mithilfe des Mikroskops Axiovert 200M (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) und die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (Intas, Science Imaging Instruments, Göttingen) unter der Verwendung verschiedener Fluoreszenzfilter angefertigt. Fluoreszenzsignale von GFP-markierten Fusionsproteine wurden bei einer Wellenlänge von 480 nm, Cy3-gekoppelte Antikörper bei 550 nm und Hoechst-gefärbten Zellkernen bei 280 nm aufgenommen und mittels der Software-Programme Image-Pro MDA 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, USA) und Corel Draw bearbeitet. Für jede Stichprobe wurden die Fluoreszenzintensitäten im Zytoplasma und Kern getrennt bestimmt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen für das Zytoplasma-Kern-Verhältnis berechnet und in Histogrammen dargestellt.

2.2.17 Digitonisierung

Die nukleäre Exportrate der STAT1-Mutanten konnte mit Digitonin-behandelten Zellen beurteilt werden (Adam et al. 1990). Wie schon in der Fluoreszenzmikroskopie und Immunzytochemie wurden auch für dieses Experiment HeLa- und U3A-Zellen auf 8-Kammer-Objektträger kultiviert und mit dem pSTAT1-GFP-Expressionsplasmid, im Fall der HeLa-Zellen bzw. mit dem pSTAT1-Expressionsplasmid im Fall der U3A-Zellen, transfiziert. Um die Kernakkumulation von rekombinantem STAT1 zu initiieren, erfolgte 16-24 h nach der Transfektion eine 45-minütige Stimulation der Zellen mit IFN γ . Anschließend wurden die Zellen unbehandelt gelassen oder in Anwesenheit von 50 μ g/ml Digitonin (Sigma-Aldrich) in Transportpuffer (0,2 % Triton X-100, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl $_2$, 10 mM HEPES, pH 7,4; 1 mM DTT und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn dazugegeben) für 6 min auf Eis permeabilisiert. Nach Beendigung der sechsminütigen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 15 min mit 4 %-Formaldehyd in PBS bei RT fixiert und einer Hoechst-Färbung unterworfen. Die Anwesenheit von STAT1-GFP im Zellkern der

HeLa-Zellen wurde mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie ermittelt, während die Lokalisation von unmarkiertem STAT1 mittels Immunzytochemie detektiert wurde.

2.2.18 RNA-Isolation

Für die Extraktion von mRNA wurden U3A-Zellen auf 6-Lochplatten kultiviert und mit den pcDNA3.1-Konstrukten transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Kultivierung der Zellen in DMEM supplementiert mit 1 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 6 h mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Isolation der RNA erfolgte anschließend mithilfe des peqGold Total RNA Kits (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) nach Herstellerangaben. Zur Elution der RNA wurde 50 μ l RNase-freies Wasser verwendet. Die fertigen Proben wurden entweder direkt zur cDNA-Synthese weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

2.2.19 cDNA-Synthese

Mithilfe des Verso cDNA Kits (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) wurde aus der isolierten mRNA die komplementäre DNA (cDNA) durch reverse Transkription hergestellt. Nach Herstellerangaben wurden pro 20 μ l Ansatz 8 μ l RNA eingesetzt. Der erste Zyklus der reversen Transkription umfasste eine 30-minütige cDNA-Synthese bei 42 °C, während die Proben in dem zweiten Zyklus für 2 min auf 95 °C erhitzt wurden. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.20 Real-time PCR

Die Genexpression der Punktmutanten des STAT1-Moleküls und des STAT1-WT wurde anhand der Real-time PCR analysiert. Der Reaktionsansatz von 20 μ l beinhaltete 25 ng cDNA, 70 nmol/l des jeweils spezifischen Primer-Paares und 10 μ l des Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (Thermo Fisher Scientific). Hierzu wurden die folgenden komplementären Primer von der Firma Sigma-Aldrich verwendet:

hGAPDH F:	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3',
hGAPDH R:	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3',
hGBP1 F:	5'-GGT CCA GTT GCT GAA AGA GC-3',
hGBP1 R:	5'-TGA CAG GAA GGC TCT GGT CT-3',
hIRF1 F:	5'-AGC TCA GCT GTG CGA GTG TA-3',
hIRF1 R:	5'-TAG CTG CTG TGG TCA TCA GG-3',

hSTAT1 F:	5'-CCG TTT TCA TGA CCT CCT GT-'3,
hSTAT1 R:	5'-TGA ATA TTC CCC GAC TGA GC-'3,
hCCL2 F:	5'-CCA GTC ACC TGC TGT TAT AAC-'3,
hCCL2 R:	5'-TGG AAT CCT GAA CCC ACT TCT-'3,
hMIG1 F:	5'-CCA CCG AGA TCC TTA TCG AA-'3,
hMIG1 R:	5'-CTA ACC GAC TTG GCT GCT TC-'3.

Die Reaktion erfolgte im Eppendorf-Cycler nach folgendem PCR-Protokoll: ein Denaturierungsschritt bei 95 °C für 15 min gefolgt von 40 repetitiven Zyklen einer Denaturierung bei 95°C für 15 sek, einer Primerhybridisierung bei 55 °C für 30 sek und einer Polymerisation bei 72 °C für 30 sek. Nach dem letzten Amplifikationsschritt erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Fragmentlängen und damit der Spezifität der PCR-Produkte. Dabei wurde die DNA durch kontinuierlich langsame Erhöhung der Temperatur in 0,5 °C Schritten von 60 °C auf 95 °C aufgeschmolzen und eine Änderung der Fluoreszenz während jeder Temperaturerhöhung für 10 sek registriert. In allen Reaktionen wurden mindestens Dreifachbestimmungen pro Ansatz durchgeführt. Die relative Genexpression eines Transkripts wurde anhand der Genexpression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert und je Ansatz bestimmt. Mithilfe der Formel $2^{-(\Delta\Delta Ct \text{ Ziel} - \Delta Ct \text{ Referenzprobe})}$ der $\Delta\Delta Ct$ -Methode wurde das relative Expressionsniveau miteinander verglichen. Zur Untersuchung der Genexpression wurden literaturbekannte Zielgene von STAT1 verwendet.

2.2.21 Darstellung der STAT1-Kristallstruktur

Mithilfe des Software-Programms PyMol von DeLano Scientific, San Francisco, USA, in der Version v.0.99 und der in der Protein-Data-Bank (PDB) niedergelegten Strukturdaten ließ sich das an DNA-gebundene STAT1-Protein mit seinen funktionell wichtigen Aminosäureresten graphisch darstellen.

2.2.22 Statistische Auswertung

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse wurden von mindestens drei unterschiedlichen Versuchen für jede Variante der STAT1-Proteine und dem jeweiligen Stimulationszeitpunkt berechnet. Unterschiede der STAT1-Bindungsaktivität, der Genexpression und der nukleozytoplasmatischen Lokalisation zwischen den

STAT1-Varianten wurden mithilfe des Student-t-Tests bzw. des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests ermittelt. Die Auswertung der Reporteragen-Assay-Ergebnisse wurde durch ANOVA mit dem Tukey's Post-hoc-Test durchgeführt. Die Auswertung aller Daten erfolgte mithilfe der Software-Programme Microsoft Excel und SigmaPlot. In allen Tests wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnis

Ziel dieser Arbeit war es, Punktmutanten in unterschiedlichen Domänen, wie der DNA-Bindedomäne und der Linker-Domäne, des STAT1-Moleküls zu generieren und diese hinsichtlich ihres Phänotyps zu charakterisieren. Besonderes Interesse lag darin, Erkenntnisse über die bisher wenig bekannten molekularen Mechanismen, wie die Assoziation zur DNA und der Erkennung der GAS-Sequenz, von STAT1 zu erlangen. Zunächst konnten anhand von Sequenzanalysen der humanen STAT-Familie konservierte Aminosäurereste identifiziert und unter Hinzunahme der Kristallstruktur ihre Position und Ausrichtung im STAT1-Protein beschrieben werden.

3.1 Sequenzhomologien der DNA-Bindedomäne und Charakterisierung von STAT1-K350

Im Bereich der DNA-Bindedomäne liegen zahlreiche Sequenzhomologien vor, wie man einem Ausschnitt der Abb. 3 entnehmen kann. Anhand des tabellarisch aufgeführten Ausschnitts ist ein Sequenzvergleich der humanen STAT-Proteine im Bereich der DNA-Bindedomäne gezeigt, in dem ein Lysinrest in Position 350 identifiziert werden konnte.

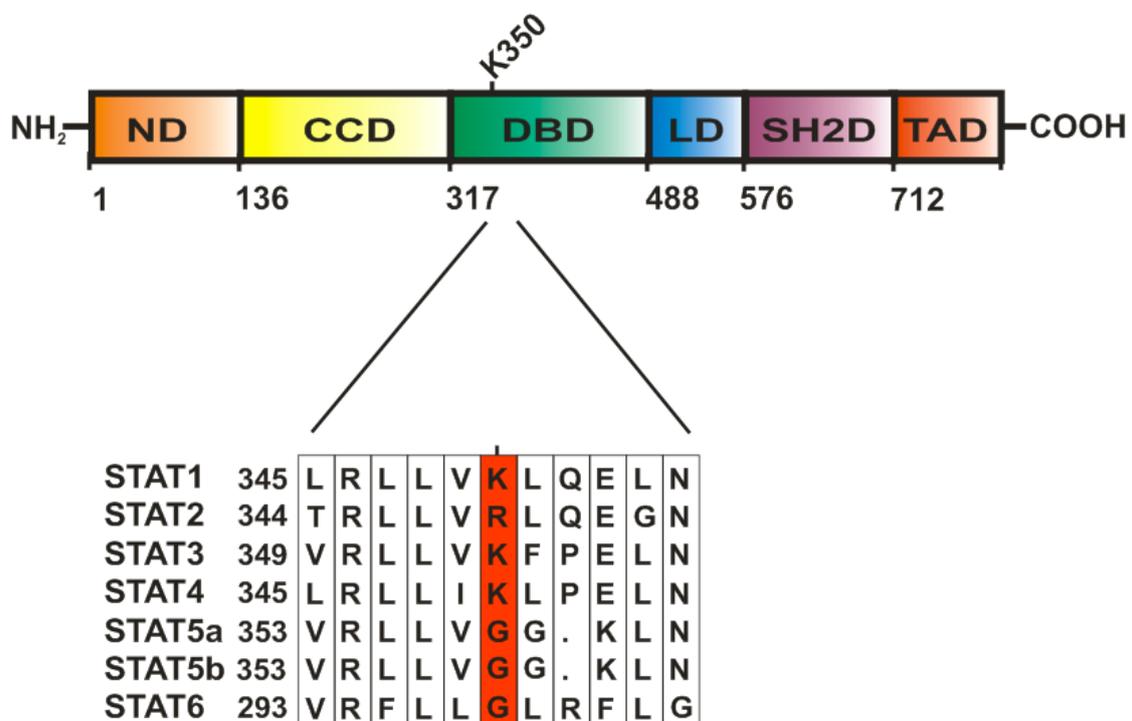


Abb. 3: Domänenstruktur des STAT1 α und Sequenzhomologie von K350. Oben in der Abbildung ist die Domänenstruktur des STAT1-Proteins mit der hier charakterisierten Position K350 in der DNA-Bindedomäne markiert. Darunter ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs der humanen STAT-Proteine im Bereich der DNA-Bindedomäne mit den ausschließlich positiv geladenen Aminosäuren an der von STAT1 homologen Position K350 in den Mitgliedern STAT2, STAT3 und STAT4 dieser Proteinfamilie.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass der Lysinrest im STAT1, STAT3 und STAT4 der humanen STAT-Familie an homologer Position konserviert vorliegt. Dagegen weisen STAT5a, STAT5b und STAT6 an gleicher Stelle einen Glycinrest auf, während im STAT2 ein Argininrest vorzufinden ist. Demnach befinden sich an Position 350 der DNA-Bindedomäne bei STAT1-STAT4 ausschließlich positiv geladene Aminosäurereste. Mithilfe von sequenzspezifischer Mutagenese wurde die Aminosäure Lysin in Position 350 des STAT1-Moleküls durch Alanin substituiert und die entstandene Punktmutante im Weiteren charakterisiert.

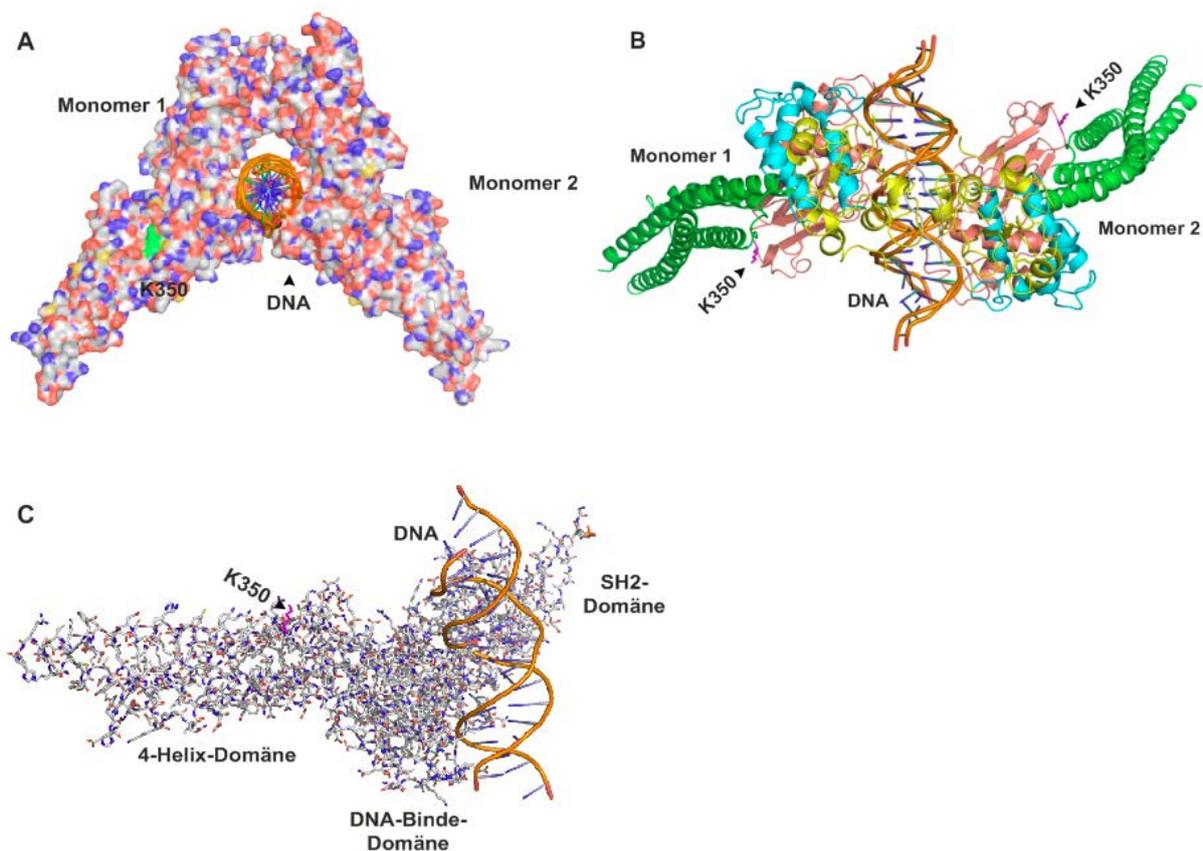


Abb. 4: Kristallstruktur des DNA-gebundenen STAT1-Dimers bzw. -Monomers mit Lokalisation eines konservierten Lysinrestes in der DNA-Bindedomäne von STAT1. In Abb. 4 A ist die Kristallstruktur als Oberflächendarstellung eines an die DNA-Doppelhelix gebundenen STAT1-Dimers dargestellt. Dabei ist der Lysinrest an Position 350 in Grün

hervorgehoben. Daneben ist in Abb. 4 B ein STAT1-Dimer in topographischem Bezug zur DNA abgebildet. Zu sehen ist eine Ribbon-Darstellung des STAT1-Dimers mit den vier Domänen des Kernfragments eines jeden STAT1-Monomers und der axial gelegenen DNA-Doppelhelix. Die Coiled-coil-Domäne (CCD) ist in Grün, die DNA-Bindedomäne (DBD) in Lachs, die Linker-Domäne (LD) in Hellblau und die SH2-Domäne in Gelb gekennzeichnet. Die Position der Punktmutante ist in Violett hervorgehoben. In Abb. 4 C ist ein STAT1-Protomer mit gebundener DNA und in Magenta hervorgehobenem Aminosäurerest K350 dargestellt.

3.1.1 Phosphorylierungskinetik von STAT1-K350A im Vergleich zu STAT1-WT

Die Stimulation mit IFN γ initiiert den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg, indem es die Phosphorylierung von Tyrosin an Position 701 von STAT1 und anschließend den nukleären Import des dimerisierten Transkriptionsfaktors bewirkt. Um das Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT1-Mutante K350A im Vergleich zum STAT1-WT zu überprüfen, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. STAT1-GFP-kodierende Plasmide wurden entsprechend mutiert und das rekombinante Protein nach Transfektion in humane HeLa-Zellen exprimiert. Die Stimulation dieser transient mit pSTAT1-WT-GFP bzw. pSTAT1-K350A-GFP transfizierten Zellen erfolgte mit IFN γ für jeweils 45 min und einer zeitabhängigen Inkubation mit 500 nM Staurosporin. Durch die Zugabe von Staurosporin, einem potenten Kinase-Inhibitor (Shuai et al. 1992), konnte die *In-vivo*-Dephosphorylierung festgestellt werden. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, und unter Verwendung eines Phospho-STAT1 Antikörpers wurden die entstandenen Phosphorylierungsbanden im Immunoblot detektiert und analysiert. Zur Sicherstellung des gleichen Mengenverhältnisses an STAT1 in den jeweiligen Extrakten wurde der Erstantikörper durch Strippen mithilfe eines Ablösepuffers von den Proteinen auf der Membran gelöst und diese nach mehrmaligem Waschen erneut mit dem STAT1-spezifischen Antikörper C-24 reexponiert.

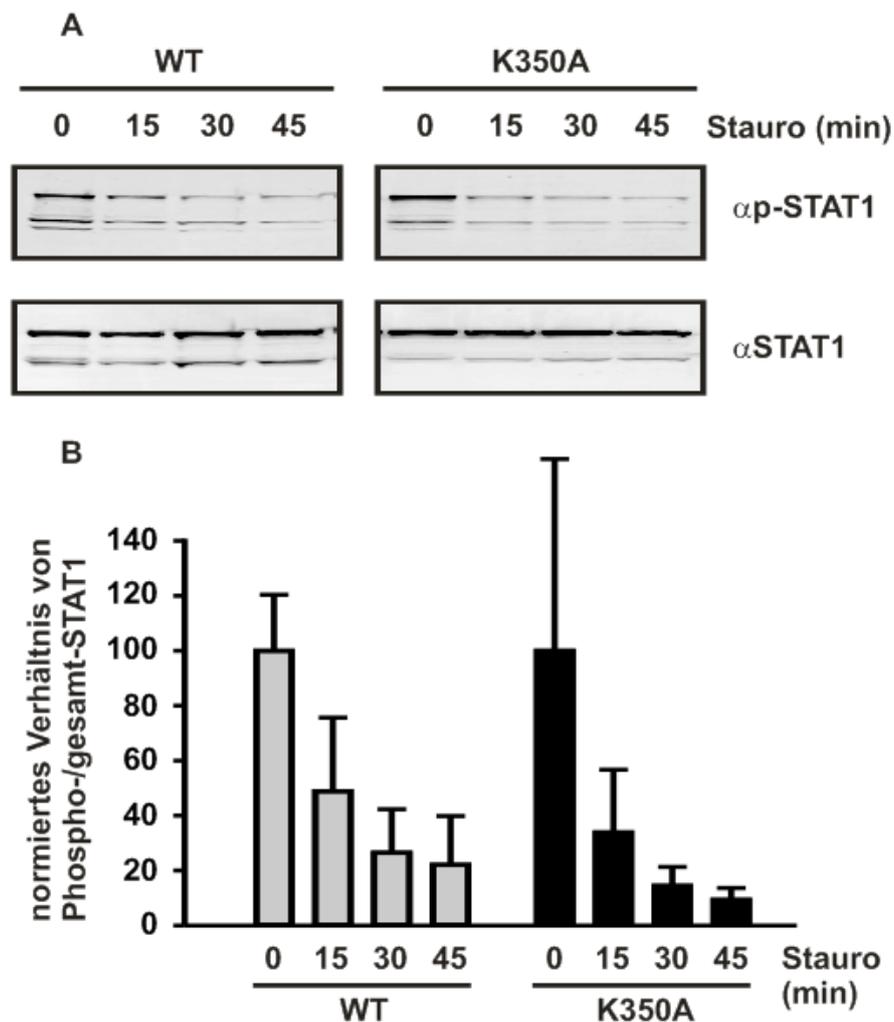


Abb. 5: Vergleichbares Phosphorylierungsniveau von STAT1-K350A und STAT1-WT. (A) HeLa-Zellen wurden mit pSTAT1-WT-GFP oder pSTAT1-K350A-GFP transfiziert, am Folgetag für 45 min mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert und anschließend mit 500 nM Staurosporin für die angegebenen Zeiten inkubiert. Mithilfe von Western Blotting erfolgte die Untersuchung des Ausmaßes der Tyrosin-Phosphorylierung durch Inkubation mit Phospho-STAT1 Antikörper (siehe obere Reihe) sowie die Expression von STAT1 nach erneuter Exposition mit dem STAT1-spezifischen Antikörper C-24 (siehe untere Reihe). (B) Dem Säulendiagramm ist zu entnehmen, dass keine signifikanten Unterschiede im Phosphorylierungsniveau zwischen dem STAT1-WT und seiner K350A-Punktmutante zu verzeichnen sind.

Das STAT1-WT-Molekül zeigte nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation ein deutliches Phosphorylierungsniveau. Nach bereits 15-minütiger Inkubation mit Staurosporin konnte ein schwächeres Phosphorylierungssignal der STAT1-WT-exprimierenden Extrakte detektiert werden. Je länger die Inkubation mit Staurosporin erfolgte, desto mehr zeigte sich eine progrediente Abschwächung der Phosphorylierungsbande von STAT1, bis sich nach 45 min kaum noch ein Phosphorylierungssignal nachweisen ließ.

Die Mutante STAT1-K350A zeigte im Vergleich zu STAT1-WT weder einen Unterschied in ihrem Phosphorylierungsniveau nach IFN γ -Stimulation noch in ihrer Dephosphorylierungskinetik nach Staurosporin-Inkubation (Abb. 5 A). Nach Quantifizierung der Tyrosin-Phosphorylierung und der Menge an gesamten STAT1 ließ sich zudem mittels statistischer Auswertung und Darstellung von Säulendiagrammen belegen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp-STAT1 und der Punktmutante K350A hinsichtlich der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungskinetik besteht (Abb. 5 B).

3.1.2 Vergleichbare Kernakkumulation zwischen der K350A-Mutante und dem WT-Molekül

Zur Analyse der IFN γ -induzierten Kernanreicherung erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Detektion von STAT1-GFP-Fusionsproteinen. Hierzu wurden erneut Punktmutationen in STAT1-GFP-kodierende Plasmide eingeführt und die Plasmid-DNA in humane HeLa-Zellen transfiziert. Die STAT1-WT-GFP- bzw. STAT1-K350A-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen, für 45 min mit IFN γ stimuliert oder nach der Stimulation mit IFN γ für 1 bzw. 2 h mit Staurosporin in einer Konzentration von 500 nM inkubiert. Anschließend erfolgten eine Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehyd/PBS und eine Färbung der Kerne mit Hoechst 33258. Die in Abb. 6 dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine panzelluläre Verteilung von STAT1-WT-GFP sowie von der Punktmutante STAT1-K350A-GFP in unstimuliertem Zustand. Nach 45-minütiger Stimulation mittels IFN γ ließ sich bei beiden STAT1-GFP-Fusionsproteinen eine vollständige Kernakkumulation beobachten. Hemmte man die Rezeptor-assoziierten Kinasen durch Staurosporin, war eine Abnahme des Phosphorylierungsniveaus und eine daraufhin folgende Auflösung der Kernlokalisierung bereits nach 1 h zu verzeichnen. Nach 2-stündiger Behandlung mit Staurosporin zeigte sich schließlich ein vollständiger Zusammenbruch der Kernakkumulation. Dieses Experiment bestätigte die bisher erlangten Ergebnisse, dass sich die Substitutionsmutante K350A weder in ihrem Phosphorylierungsniveau nach IFN γ -Stimulation noch in ihrer Dephosphorylierungskinetik nach Staurosporin-Behandlung sowie der Zytokin-abhängigen Kernakkumulation signifikant vom Wildtyp-Molekül unterscheidet.

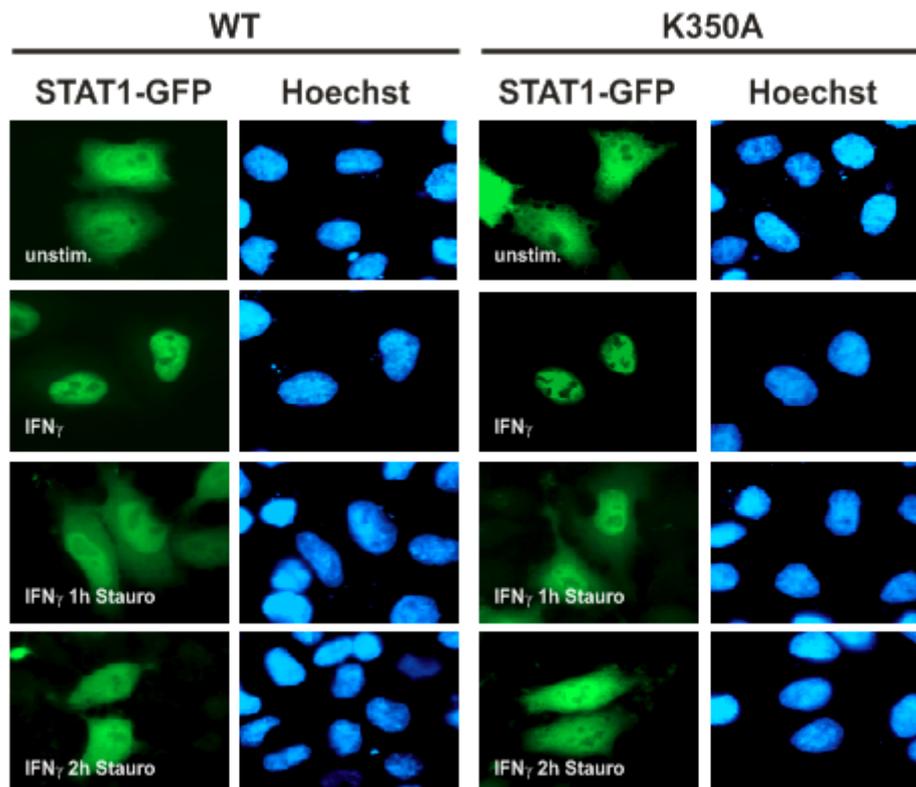


Abb. 6: STAT1-WT und STAT1-K350A weisen eine gleiche Kinetik der Kernakkumulation auf. STAT1-WT-GFP- bzw. STAT1-K350A-GFP-exprimierende HeLa-Zellen wurden unbehandelt belassen (1. Reihe), 45 min mit 5 ng/ml IFN_γ stimuliert (2. Reihe) oder anschließend für 1 h (3. Reihe) bzw. 2 h (4. Reihe) mit Staurosporin inkubiert. Zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Zellen mit 4 % Formalin fixiert und eine Hoechst-Färbung der Kerne durchgeführt. Anhand der Hoechst-Färbung lassen sich die entsprechenden Zellkerne lokalisieren. Es zeigt sich eine gleiche Kernakkumulationskinetik zwischen den GFP-markierten WT-Proteinen und denen der Punktmutante K350A nach IFN_γ-Stimulation (2. Reihe) sowie die Aufhebung der Kernakkumulation nach Staurosporin-Inkubation (3. und 4. Reihe).

3.2 Sequenzhomologien in der Linker-Domäne und Charakterisierung von E559, E563 und K567

Die Linker-Domäne ist im Sequenzvergleich der einzelnen Mitglieder der STAT-Familie vergleichsweise gut konserviert. Um die biologische Rolle dieser Domäne besser verstehen zu können, wurden drei konservierte Aminosäuren der Linker-Domäne identifiziert und analysiert. Mithilfe einer Sequenzanalyse der Linker-Domäne aller sieben humanen STAT-Proteine wurde eine hochkonservierte Sequenz mit elf Aminosäureresten identifiziert (Abb. 7). Innerhalb dieser konservierten Sequenz befindet sich an 3. und 7. Stelle, entsprechend den Positionen 559 und 563 im STAT1-Molekül, bei

allen Mitgliedern der humanen STAT-Familie ein Aspartat- oder Glutaminsäurerest. Dagegen ist an Position 11, entsprechend 567 im STAT1-Molekül, entweder ein Lysin oder Arginin in allen humanen STAT-Proteinen außer STAT2 lokalisiert. Nur STAT2 weist an entsprechender Position ein Aspartat auf.

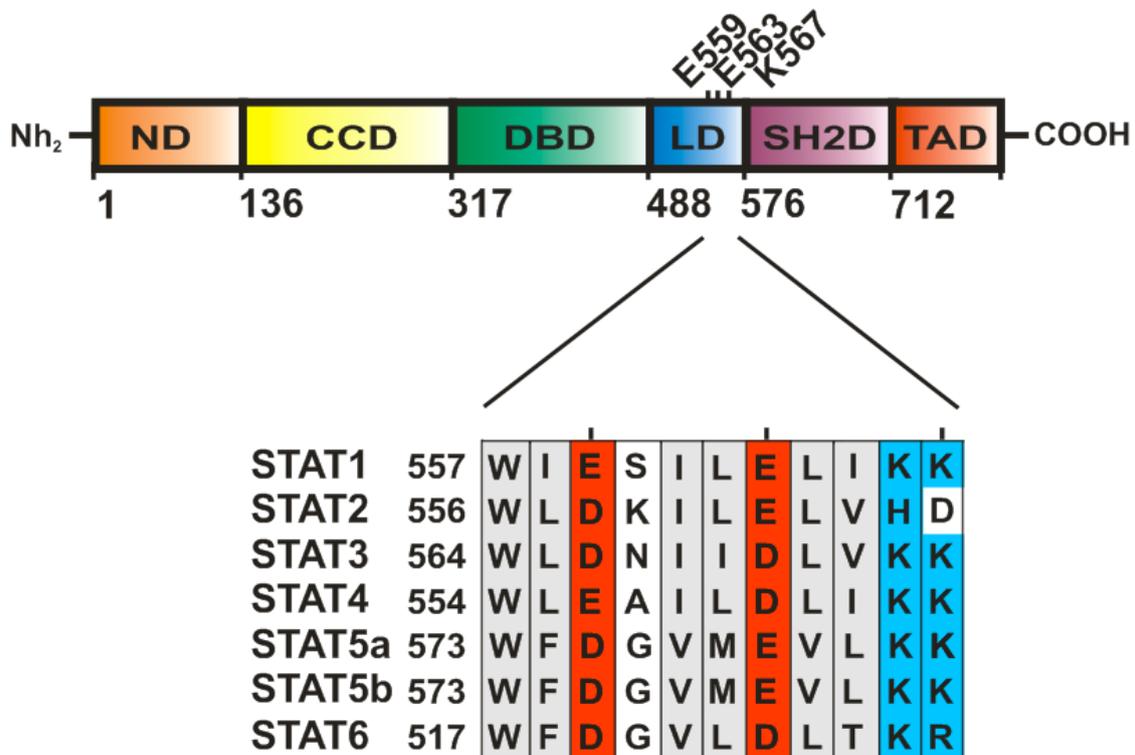


Abb. 7: Domänenstruktur des STAT1 α und Sequenzhomologie von E559, E563 und K567. Die schematische Darstellung zeigt oben die Anordnung der bereits in Abb. 1 beschriebenen funktionellen Domänen des STAT1-Proteins und die Positionen der in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren der Linker-Domäne. Darunter ein tabellarisch aufgeführter Ausschnitt des Sequenzvergleichs der humanen STAT-Proteine im Bereich der Linker-Domäne. An den Positionen 559 und 563 befindet sich bei allen bekannten Mitgliedern der STAT-Familie eine negativ geladene Aminosäure, während an Position 567 mit Ausnahme des STAT2-Proteins ausschließlich positiv geladene Aminosäuren vorzufinden sind.

Anhand kristallographischer Darstellungen des DNA-gebundenen trunkierten STAT1-Dimers konnte die räumliche Orientierung der drei konservierten Aminosäurereste genauer betrachtet werden. Die drei Punktmutanten befinden sich an der Oberfläche eines STAT1-Monomers immer parallel zur longitudinalen Achse des DNA-Moleküls ausgerichtet. Ihre Seitenketten sind in direkter Nähe zur DNA-Doppelhelix positioniert (Abb. 8).

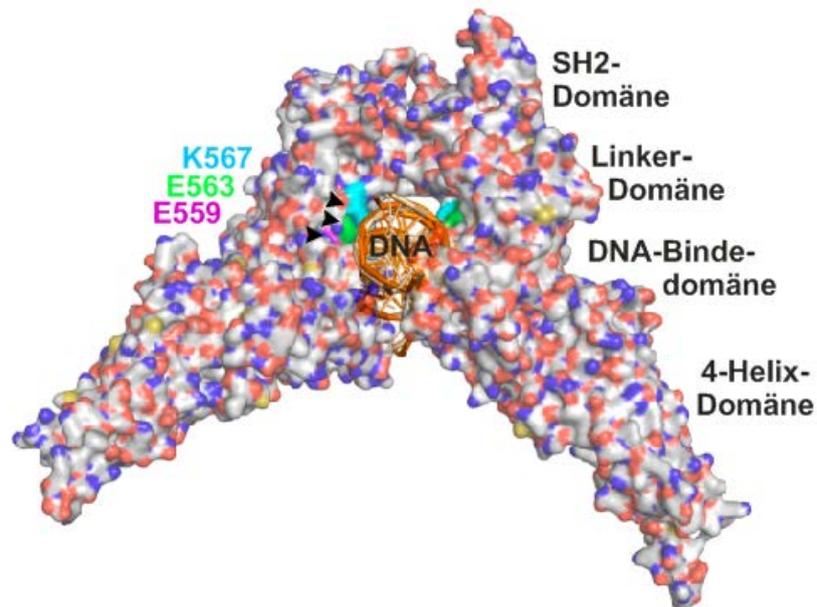


Abb. 8: Lokalisation der zwei Glutaminsäurereste 559 und 563 sowie des Lysinrests 567 in der Linker-Domäne von STAT1. Kristallstruktur als Oberflächendarstellung eines DNA-gebundenen trunktierten STAT1-Dimers mit den farblich unterschiedlich gekennzeichneten konservierten Aminosäureresten: E559 (Magenta), E563 (Grün) und K567 (Türkis). Anhand dieser Abbildung zeigt sich die räumliche Ausrichtung der Seitenketten parallel zwischen der STAT1-Linker-Domäne und der DNA wie eine Art Rinne.

Die DNA bildet vorne eine Art ringartige Furche, während die beiden STAT1-Protonere hinten durch reziproke SH2-Phosphotyrosin-Wechselwirkungen direkt miteinander interagieren, wobei das aminoternale Ende von K567 mittig in dieser ringartigen Struktur lokalisiert ist (Abb. 9).

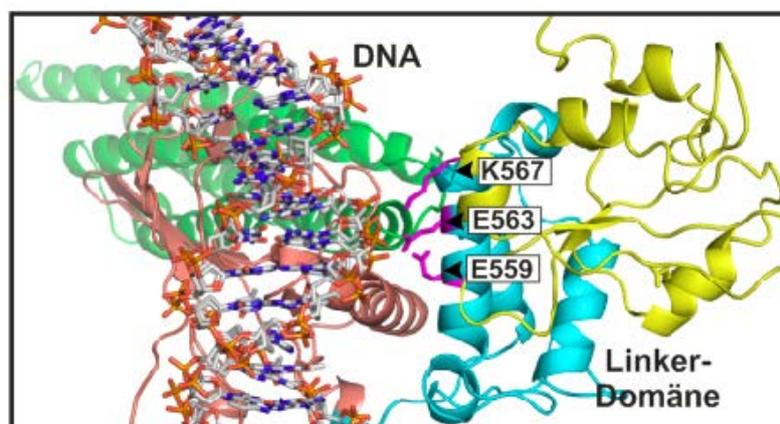


Abb. 9: Ausschnitt der STAT1-Kristallstruktur mit den Aminosäureresten E559, E563 und K567. Nahaufnahme des DNA-gebundenen STAT1-Monomers als Ribbon-Darstel-

lung mit den in Magenta markierten, kritischen Aminosäureresten und der in Hellblau abgebildeten Linker-Domäne. Hierdurch wird der freie Zugang der drei konservierten Aminosäurereste zur DNA-Doppelhelix deutlich. Die Abbildungen 4, 8 und 9 wurden mithilfe des Software-Programms PyMOL (DeLano Scientific) erstellt.

3.2.1 Unterschiede im Phosphorylierungsniveau zwischen den Glutaminsäureresten und dem Lysinrest der Linker-Domäne

In dem Versuch die Rolle eines hochkonservierten Bereichs der α -Helix des STAT1-Proteins in angrenzender Nachbarschaft zur DNA zu entschlüsseln, wurden geladene Seitenketten, wie die Glutaminsäurereste an Position 559 und 563 sowie ein Lysinrest an Position 567, in einem sequenzspezifischen Mutationsverfahren durch Alaninreste ersetzt und anschließend phänotypisiert. Wie bereits beschrieben, stellt unter anderem die Tyrosin-Phosphorylierung des STAT1-Moleküls eine wichtige Voraussetzung für die Zytokin-induzierte Kernakkumulation von STAT-Proteinen dar (Shuai et al. 1992; Darnell et al. 1994), so dass zunächst die Auswirkungen der Substitutionsmutationen auf die Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung untersucht wurden. Dies erfolgte mithilfe von Western-Blot-Analysen in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen (Abb. 10). Hierfür wurden pSTAT1-GFP-kodierende Plasmide spezifisch mutiert und in HeLa-Zellen transfiziert. Im gleichen Versuch konnte die *In-vivo*-Dephosphorylierung durch die Verwendung des Kinase-Inhibitors Staurosporin analysiert werden. Die Gesamtzellextrakte wurden mithilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und das Phosphorylierungsniveau durch spezifische Phospho-STAT1 Antikörper im Immunoblot detektiert. Zur Sicherstellung vergleichbarer STAT1-Mengen wurde nach stringentem Abwaschen der Phospho-STAT1 Antikörper die gleiche Membran mit STAT1-spezifischem Antikörper C-24 reinkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass das Verhältnis von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 zum gesamten intrazellulären STAT1 - nicht-phosphoryliertes STAT1 mit inbegriffen - für die Mutanten E559A und E563A im Vergleich zum WT-Protein sowie der Mutante K567A nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation erhöht ist. Zudem führte im Gegensatz zu STAT1-WT und -K567A die Behandlung der Zellen mit Staurosporin zu keiner Abnahme des Phosphorylierungsniveaus der beiden Varianten mit den mutierten Glutaminsäureresten E559A und E563A.

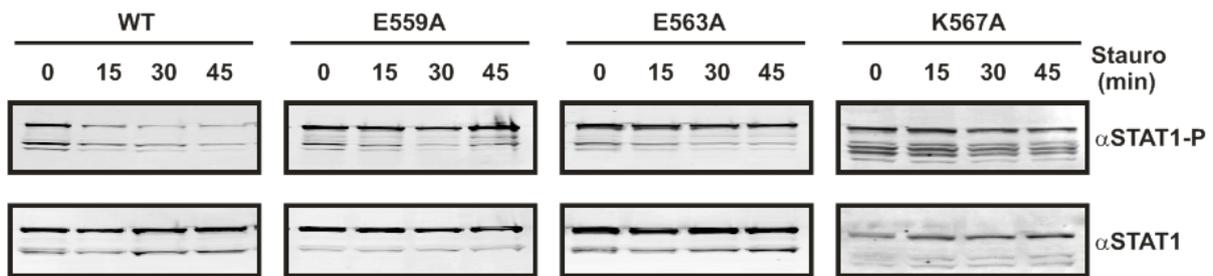


Abb. 10: Tyrosin-Phosphorylierung und *In-vivo*-Dephosphorylierung von STAT1-E559A, -E563A, und -K567A. Die Substitutionsmutanten E559A und E563A weisen im Gegensatz zu K567A nach Zellstimulation mit IFN γ eine Hyperphosphorylierung auf. HeLa-Zellen, die entweder STAT1-WT-GFP oder eine der angegebenen GFP-gekoppelten STAT1-Mutanten exprimierten, wurden für 45 min mit IFN γ stimuliert und anschließend mit dem Kinase Inhibitor Staurosporin über zunehmende Zeiträume inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung der Zelllysate. Dargestellt sind die Membranen eines Western-Blot-Experiments mit dem spezifischen Phospho-STAT1 (Tyr701) Antikörper (obere Felder) und den entsprechenden Re-Blots nach Strippen der gebundenen Immunoreaktivität und erneuter Inkubation mit einem polyklonalen Anti-STAT1 (C-24) Antikörper (untere Felder). Die obere Bande auf jedem Feld repräsentiert rekombinantes STAT1-GFP, während die untere Bande dem endogenen STAT1 entspricht.

Um die Ergebnisse zu untermauern, wurde der gleiche Versuch mit Extrakten von STAT1-rekonstituierten U3A-Zellen unter Verwendung der beschriebenen STAT1-GFP-Expressionsplasmide durchgeführt (Abb. 11 A, B). Wie bereits mithilfe der Western Blots von HeLa-Zellextrakten gezeigt werden konnte, wiesen die STAT1-Punktmutanten E559A und E563A auch in den rekonstituierten U3A-Zellen ähnliche Ergebnisse einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung auf. Trotz der Inkubation mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin zeigen die Glutaminsäure-zu-Alanin-Punktmutanten in Abb. 11 A nach IFN γ -Stimulation eine Hyperphosphorylierung im Gegensatz zum STAT1-WT sowie zur Lysin-zu-Alanin-Punktmutante K567A. Die Ergebnisse wurden nach Quantifizierung der Phosphorylierungsniveaus mit Bestimmung des Verhältnisses von Phospho-STAT1 zur Gesamtmenge an STAT1 in den Säulendiagrammen der Abb. 11 B graphisch dargestellt.

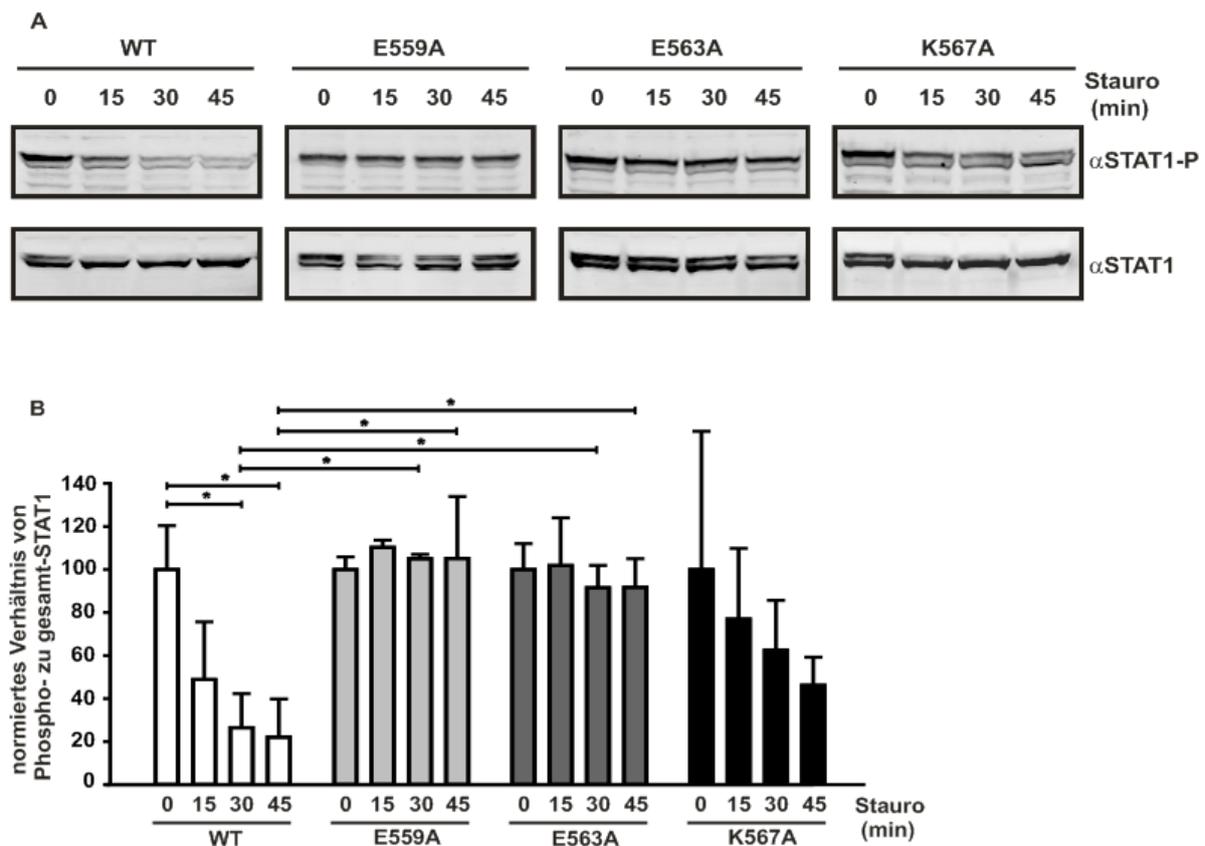


Abb. 11: (A, B) Supprimierte *In-vivo*-Dephosphorylierung der E559A- und E563A-Mutanten in STAT1-rekonstituierten, IFN γ -vorbehandelten U3A-Zellen nach Staurosporin-Exposition. Gleiches Experiment wie in Abb. 10, jedoch wurden hier U3A-Zellen mit dem jeweiligen, zuvor transfizierten pSTAT1-GFP-Expressionsplasmid eingesetzt. (A) Die Behandlung mit Staurosporin führte zur schnellen Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1-WT und der K567A-Mutante, während die beiden Glutaminsäure-Mutanten die inaktivierende Wirkung des Kinase-Inhibitors überwiegend widerstanden und ein nahezu stabiles Phosphorylierungsniveau aufwiesen. (B) Quantifizierung der Expression von Phospho-STAT1 zur Gesamtmenge an STAT1 in den mit IFN γ -prästimulierten und mit Staurosporin behandelten U3A-Zellen, normiert auf den jeweiligen Wert der allein mit IFN γ -stimulierten Probe der gleichen Variante. Wie auch bei den weiteren Experimenten wurden zur Berechnung der statistischen Signifikanz jeweils drei Ergebnisse aus unterschiedlichen Versuchen herangezogen. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit Balken und Sternchen (*) gekennzeichnet.

3.2.2 Anhaltende Tyrosin-Phosphorylierung der STAT1-Mutanten E559A und E563A ohne Inhibition durch Staurosporin

Mithilfe von weiteren Western-Blot-Experimenten wurde die Tyrosin-Phosphorylierung der Substitutionsmutanten ohne Exposition des Kinase-Inhibitors Staurosporin miteinander verglichen. STAT1-GFP-kodierende Plasmide wurden spezifisch mutiert und

nach Transfektion in U3A-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden entweder vollständig unbehandelt belassen oder für 45 min mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten unbehandelt inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der gewonnenen Gesamtzellextrakte wurde die Phosphorylierung mittels Phospho-STAT1 Antikörper als Primärantikörper detektiert, bevor der Auftrag gleicher Zellextraktmengen nach Strippen und Waschen der Membranen durch die Reinkubation mit dem Sekundärantikörper C-24 sichergestellt werden konnte.

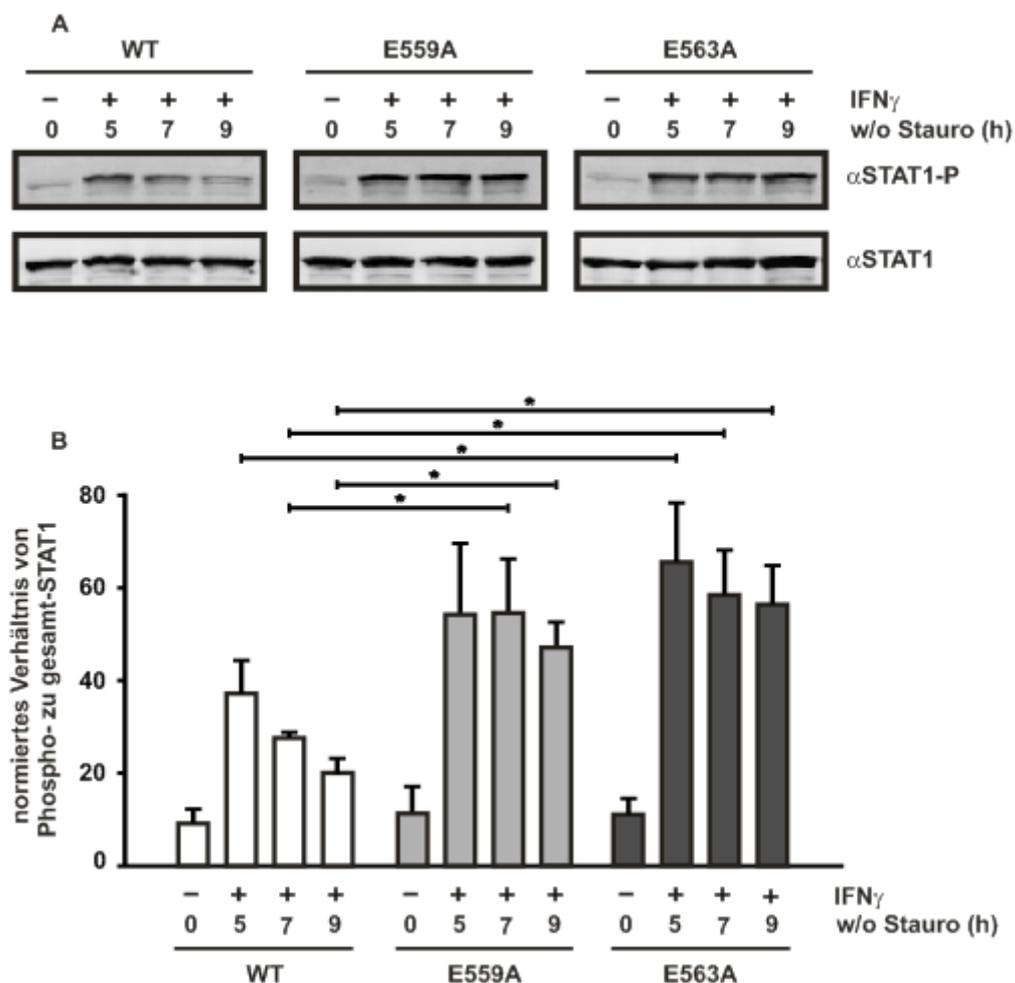


Abb. 12: Verlängertes Phosphorylierungsniveau der Glutaminsäure-Substitutionsmutanten nach IFN γ -Stimulation. (A) Klassisches Western-Blot-Experiment mit gleichen Mengen an STAT1-WT-GFP-, STAT1-E559A-GFP- oder STAT1-E563A-GFP-exprimierenden U3A-Zellen, die entweder vollständig unbehandelt belassen oder für 45 min mit IFN γ stimuliert wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen ohne Exposition mit Staurosporin für die angegebenen Zeiträume. (B) Diagramm der Quantifizierung des Phosphorylierungsniveaus aus dem Verhältnis von Phospho-STAT1 zum gesamten STAT1-

Pool, aus dem eine signifikant verlängerte Phosphorylierungskinetik der beiden Substitutionsmutanten E559A und E563A hervorgeht. Statisch signifikante Unterschiede sind durch Balken und Sternchen (*) gekennzeichnet.

Abb. 12 A demonstriert auf der einen Seite eine Hyperphosphorylierung der STAT1-Substitutionsmutanten und auf der anderen Seite ein relativ stabiles Phosphorylierungsniveau vor Behandlung mit Staurosporin. STAT1-E563A zeigte nach 7-stündiger Inkubation eine Abnahme des Signals, wohingegen E559A erst nach 9-stündiger Inkubation einen beginnenden Zusammenbruch der Phosphorylierung aufwies. Demgegenüber konnte beim WT-Molekül mit zunehmender Dauer der Inkubation eine kontinuierliche Reduktion des Phosphorylierungsniveaus beobachtet werden. Dieses Experiment bestätigt die bisher erlangten Ergebnisse, dass sich die Mutanten STAT1-E559A und STAT1-E563A in ihrem Phosphorylierungsniveau nach IFN γ -Stimulation signifikant in ihrer *In-vivo*-Dephosphorylierungskinetik nach Staurosporin-Behandlung bzw. auch ohne Exposition mit Staurosporin vom STAT1-WT unterscheiden.

3.2.3 Verlängerte Zytokin-induzierte Kernakkumulation von STAT1-E559A und -E563A

Nach Analyse des Niveaus der Tyrosin-Phosphorylierung wurde der Einfluss der genannten Punktmutationen auf die Dauer der Kernakkumulation hin untersucht. Phosphorylierte STAT1-Proteine bilden Dimere, die in den Zellkern gelangen und dort spezifisch an sogenannte GAS-Bindestellen binden. Die Kinetik der Kernakkumulation nach IFN γ -Stimulation wurde wie für die Substitutionsmutante K350A unter Verwendung von STAT1-GFP-kodierenden Plasmiden fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Zur Generierung der Mutanten wurde ein pEGFP-N1-Plasmid mit Insertion humaner STAT1-cDNA eingesetzt, in welches die zu charakterisierende Missensemutation mittels sequenzspezifischer Mutagenese eingefügt wurde. Die entstandenen Konstrukte wurden transient in humane HeLa-Zellen transfiziert, so dass das zelluläre Verteilungsmuster des STAT1-GFP-Moleküls nach 45-minütiger Stimulation mit IFN γ und zeitabhängiger Staurosporin-Behandlung beurteilt werden konnte.

Im unstimulierten Zustand wiesen die drei Substitutionsmutanten eine annähernd panzelluläre Verteilung ähnlich dem WT-Protein auf (Abb. 13 A, B). Nach einer 45-minütigen Stimulation mit IFN γ zeigte sich bei allen STAT1-Derivaten eine nahezu vollständige Kernakkumulation, ohne dass sich die eingeführten Mutationen auf die strukturelle Stabilität auswirkten. Die Exposition der mit IFN γ vorbehandelten Zellen durch

den potenten Kinase-Inhibitor Staurosporin in einer Konzentration von 500 nM führte zu einem detektierbaren Unterschied in der zellulären Verteilung zwischen STAT1-WT und den beiden Glutaminsäure-zu-Alanin-Mutanten. Beide Mutanten wiesen nach 60-minütiger Behandlung mit Staurosporin eine noch überwiegende Kernlokalisierung auf, während STAT1-WT-GFP wieder die panzelluläre Ruheverteilung einnahm und nicht mehr im kernakkumulierten Zustand vorlag. Überdies lieferten die zwei Mutanten nach zweistündiger Staurosporin-Exposition Hinweise auf einen verminderten Kernexport mit verlängerter Kernakkumulationsphase. Die Kernakkumulation nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation sowie die Auswirkung der zusätzlichen Staurosporin-Behandlung auf die Kernakkumulation der Lysin-zu-Alanin-Mutante 567 verglichen mit dem Wildtyp-Molekül ergab keinen signifikanten Unterschied (Abb. 13 A, B).

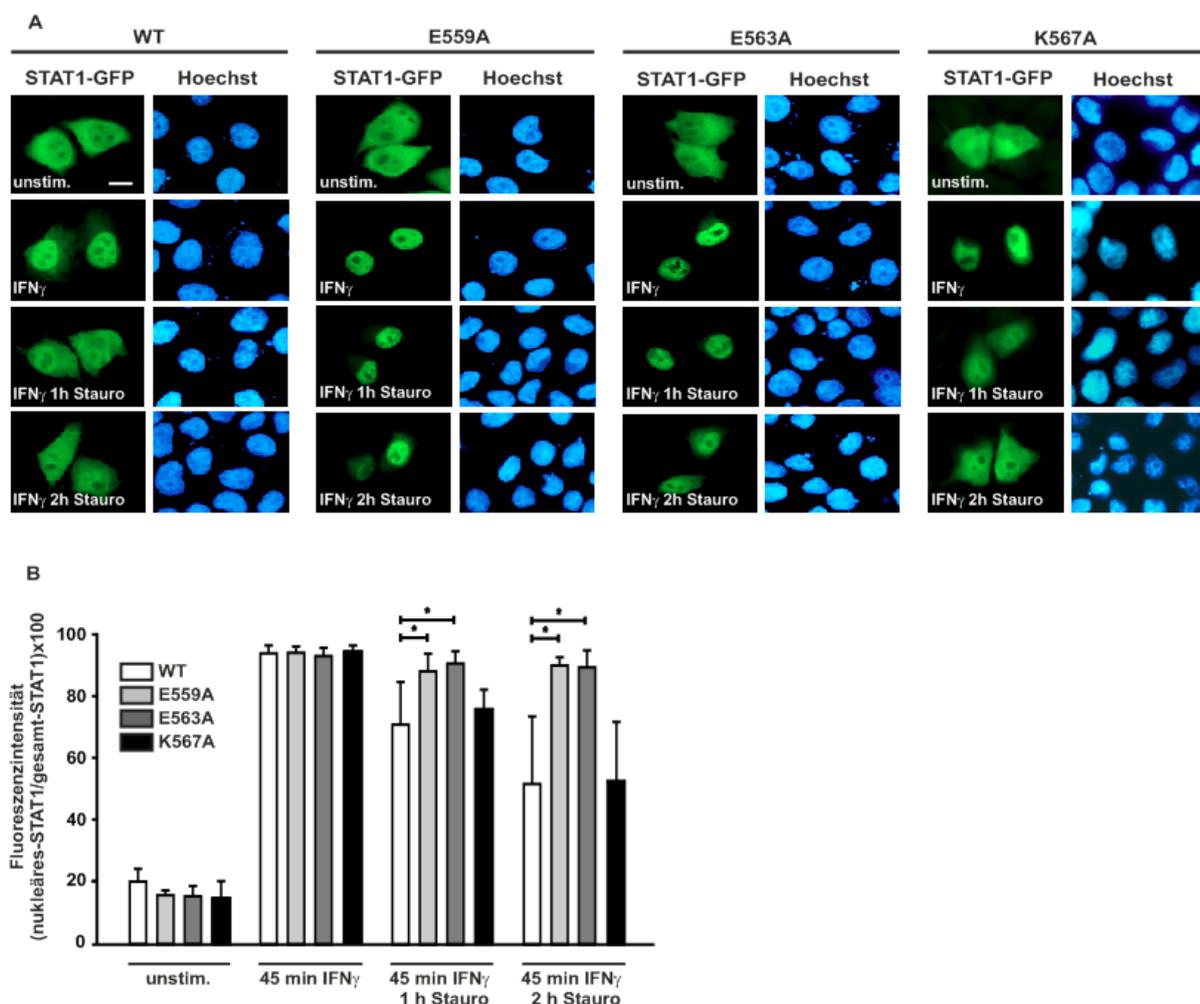


Abb. 13: Anhaltende nukleäre Akkumulationsphase der STAT1-Mutanten E559A und E563A nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und anschließender Staurosporin-Exposition. (A, B) Transfizierte HeLa-Zellen mit GFP-Fusionsproteinen wurden entweder unbehandelt belassen oder für 45 min mit 5 ng/ml humanem $\text{IFN}\gamma$ stimuliert und anschließend für 0 min,

60 min oder 120 min mit Staurosporin (500 nM) behandelt. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS und Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33258 wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt, die die intrazelluläre Verteilung der GFP-markierten Fusionsproteine und die Lokalisation der Hoechst-gefärbten Zellkerne (Maßstab des Balkens 10 μm) wiedergeben. (B) Quantifizierung der im Experiment (A) untersuchten nukleozytoplasmatischen Verteilung durch Fluoreszenzintensitätsmessungen der STAT1-GFP-Moleküle mit Darstellung des Verhältnisses von nukleärem zu gesamtem STAT1 je Stimulationsmodus und Variante.

Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, weisen STAT1-GFP-Fusionsproteine eine im Vergleich zu endogenem STAT1 verringerte nukleäre Exportrate auf (Meyer et al. 2007; Marg et al. 2008). Um eine mögliche Beeinflussung durch den GFP-Anteil des Fusionsproteins der generierten Punktmutanten ausschließen zu können, wurde das Experiment erneut mit Transfektion von pcDNA3.1-STAT1-Plasmiden durchgeführt. Zudem kann dadurch untersucht werden, ob die beobachtete Kinetik der Kernakkumulation auch für unmarkierte STAT1-Proteine gilt. Die Stimulationszeiten mit $\text{IFN}\gamma$ sind identisch zu dem in Abb. 13 dargestellten Experiment; jedoch wurde der Inkubationszeitraum mit Staurosporin auf 30 min und 1 h verkürzt. Die Detektion der exprimierten, nicht-GFP-markierten STAT1-Proteine in U3A-Zellen erfolgte immunzytochemisch über den STAT1-spezifischen Erstantikörper C-24 und Cy3-gekoppelten Zweitantikörper. Wie in dem vorherigen Versuch zeigte sich bei den unstimulierten Zellen eine panzelluläre Verteilung sowohl beim STAT1-WT als auch bei den drei Punktmutanten. Abb. 14 A demonstriert die zugehörigen indirekten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die 45-minütige $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation führt ebenso zu einer präferenziellen Kernakkumulation der vier STAT1-Varianten sowie zu einer anhaltenden Kernakkumulationsphase der beiden Punktmutanten E559A und E563A trotz der Exposition mit Staurosporin. Im Vergleich zu diesem Ergebnis kommt es beim STAT1-WT und der Substitutionsmutante K567A bereits nach einem Inkubationszeitraum von 0,5 h mit Staurosporin zu einem Zusammenbruch der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten Kernakkumulation mit Wiederherstellung des panzellulären Verteilungsmusters wie in ruhenden Zellen. Abb. 14 B demonstriert in einem Säulendiagramm die signifikanten Unterschiede der beiden Glutaminsäure-zu-Alanin-Punktmutanten 559 und 563 gegenüber dem Wildtyp-Molekül.

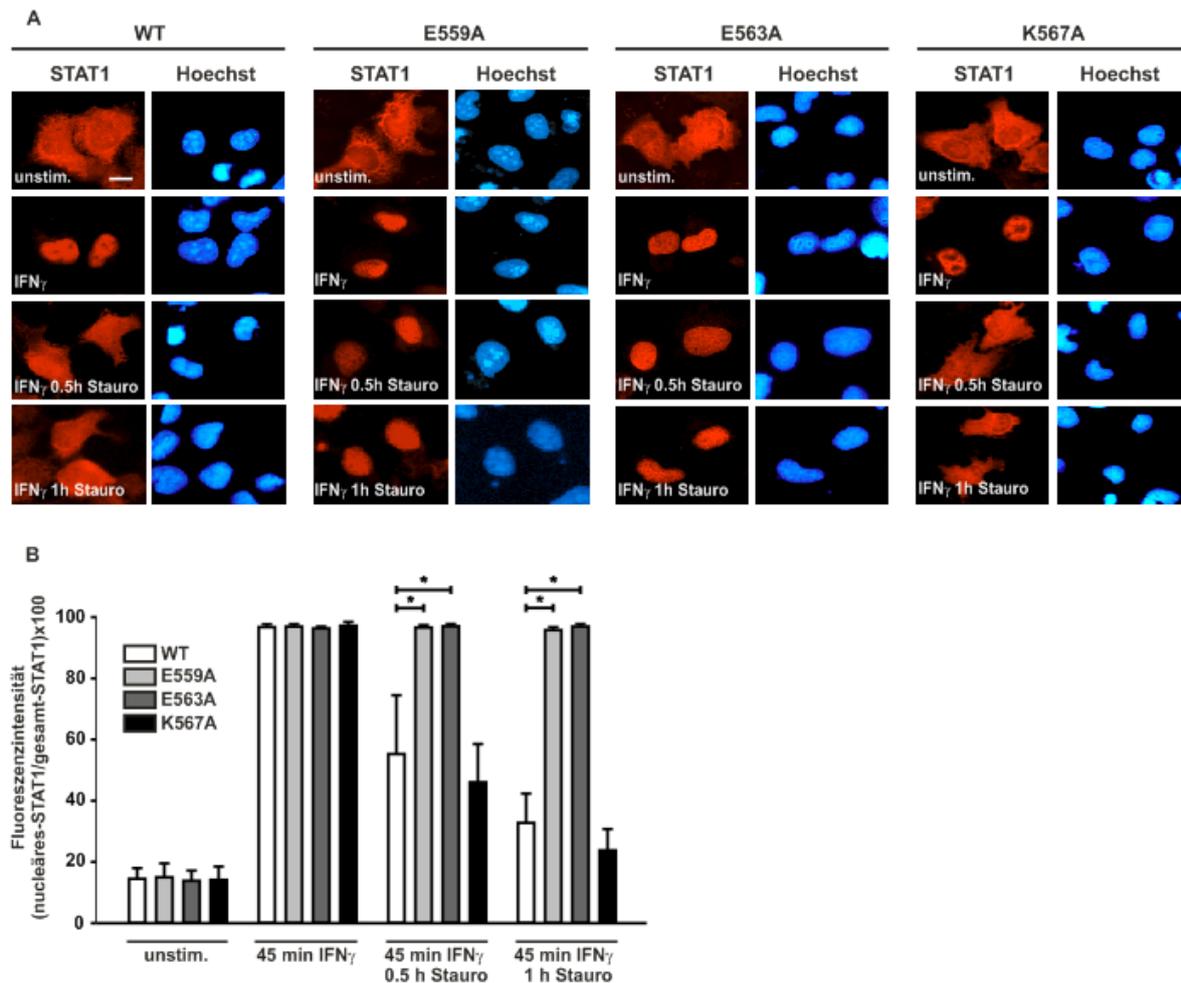


Abb. 14: Immunzytochemie bestätigt die verringerte Kernexportrate von STAT1-E559A und -E563A. (A) STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit Plasmiden, die entweder für unmarkiertes STAT1-WT oder einer der STAT1-Punktmutanten kodieren, transfiziert, anschließend unbehandelt belassen, für 45 min mit IFN γ stimuliert oder nach Stimulation mit IFN γ für die angegebenen Zeiträume mit Staurosporin inkubiert. Nach Fixierung in Methanol und Hoechst-Färbung erfolgte die Detektion der intrazellulären Verteilung von rekombinantem STAT1 immunzytochemisch durch den spezifischen Anti-STAT1 Antikörper C-24 sowie den Cy3-markierten Zweitantikörper (Maßstab 10 μ m). (B) Quantifizierung der nukleozytoplasmatischen Verteilung des STAT1-WT und der STAT1-Derivate aus Abb. 14 A. Die signifikanten Unterschiede zwischen dem WT und der jeweiligen Mutante wurden mittels Balken und Sternchen (*) versehen.

3.2.4 Erhöhte DNA-Bindungsaktivität der beiden Glutaminsäure-zu-Alanin-Mutanten

In Anbetracht der Hyperphosphorylierung bzw. supprimierten *In-vivo*-Dephosphorylierung und der verlängerten Kernakkumulation der beiden Glutaminsäure-zu-Alanin-Mu-

tanten wurde in weiteren Versuchen mittels elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) die spezifische DNA-Bindung der Punktmutanten genauer untersucht. Die Gelretardations-Experimente wurden zunächst mit einer [³³P]-radioaktiv markierten, hoch-affinen DNA-Sonde, bestehend aus einer singulären GAS-Bindestelle (M67), durchgeführt. Hierfür wurden U3A-Zellen transient mit den jeweiligen STAT1-GFP-Expressionsplasmiden transfiziert und am Folgetag für 45 min mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert sowie für die angegebenen Zeiten mit 500 nM Staurosporin inkubiert. Die gewonnenen Gesamtzellextrakte wurden für 15 min mit radioaktiv markierter M67-Sonde inkubiert und im Anschluss vergleichbare Extraktmengen auf das präequilibrierte Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Autoradiographisch wurde das Ausmaß der Bindung von phosphorylierten STAT1-Proteinen an die Erkennungssequenz der [³³P]-radioaktiv markierten Sonde bestimmt.

Der hier durchgeführte Gelretardations-Assay bestätigt die Ergebnisse der Western-Blot-Experimente, indem er über den Nachweis spezifischer DNA-Bindung die indirekte und hochsensitive Tyrosin-Phosphorylierung bestimmt und hierdurch die Hyperphosphorylierung bzw. verlängerte Phosphorylierungsphase nachweist. Abbildung 15 ist zu entnehmen, dass durch die Exposition mit Staurosporin in den IFN γ -vorbehandelten Zellen bereits innerhalb von 15 min eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungsniveaus des STAT1-WT-Proteins zu verzeichnen ist, während die Punktmutanten E559A und E563A ein nahezu unverändertes Phosphorylierungssignal aufweisen. Diese Ergebnisse werden anhand Abb. 15 A durch den Nachweis einer längeren STAT1-DNA-Bindung der beiden nach Alanin substituierten Glutaminsäurereste 559 und 563 bestätigt. Demgegenüber lässt sich in Abb. 15 A und B praktisch keine Bindung der Punktmutante K567A an die radioaktiv markierte GAS-Sonde nachweisen, trotz einer deutlich detektierbaren Expression des phosphorylierten STAT1-K567A-Moleküls in den Immunoblots von Western-Blot-Experimenten unter Verwendung derselben Extrakte (Abb. 15 C).

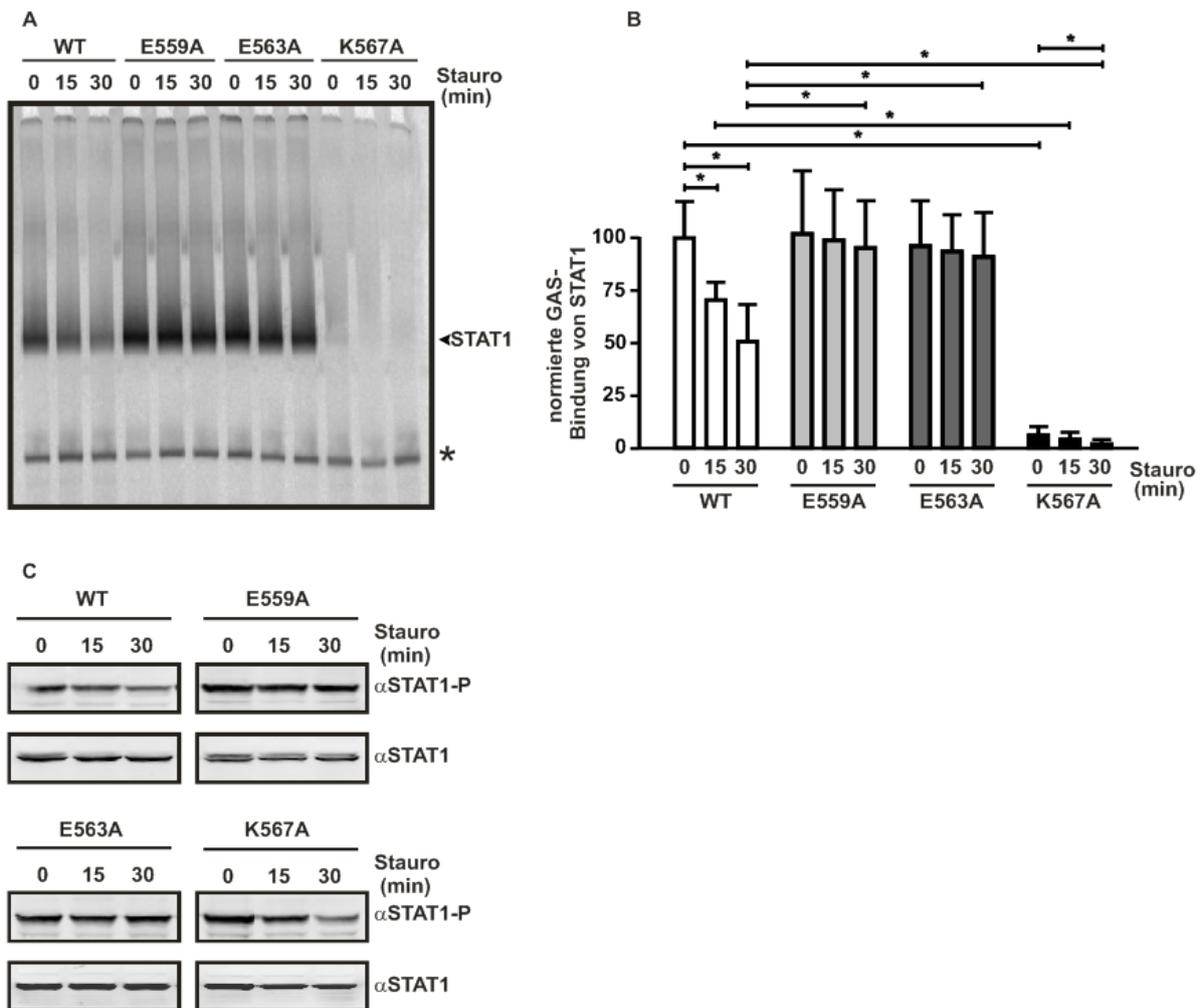


Abb. 15: Nachweis prolongierter GAS-Bindungsaktivität der phosphorylierten E559A- und E563A-Mutante im Gegensatz zur fehlenden Bindung der phosphorylierten Mutante K567A. (A) Gelretardations-Assay mit STAT1-rekombinanten U3A-Zell-extrakten, die für 45 min mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 500 nM Staurosporin inkubiert wurden. Die isolierten Zellysate wurden mit einer radioaktiv markierten hoch-affinen STAT-Bindungssonde M67 equilibriert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ferner erfolgte eine autoradiographische Auswertung der vakuumgetrockneten Gele. Der Pfeil markiert spezifische STAT1-Banden, während das Sternchen (*) unspezifische Banden kennzeichnet. (B) Säulendiagramm der densitometrisch gemessenen GAS-bindenden Aktivität in Extrakten von IFN γ -vorstimulierten und mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin inkubierten U3A-Zellen. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit Balken und Sternchen (*) gekennzeichnet. (C) Anhand der Immunoblots wurde die Anwesenheit von Phospho-STAT1 und Pan-STAT1 in den gleichen Zellextrakten aus dem Gels-hift-Assay von Abb. 15 A bestätigt.

Neben den oben genannten Ergebnissen konnte in einem weiteren elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assay gezeigt werden, dass die erhöhte M67-Bindeaffinität nicht

nur für Homodimere der STAT1-E559A- und -E563A-Punktmutanten besteht, sondern auch für ausgebildete Heterodimere zwischen rekombinanten und endogenen STAT1-Protomeren (Abb. 16). Der Versuch wurde mit Ausnahme der hier eingesetzten STAT1-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen wie oben beschrieben durchgeführt. Zusätzlich konnten die detektierten Banden mithilfe einer Supershift-Reaktion als STAT1-DNA-Komplexe identifiziert werden. Die Zugabe eines STAT1-spezifischen Antikörpers (α S1, Bahn 2) führte aufgrund der Größenzunahme der Proteine zu einer reduzierten Laufgeschwindigkeit und dadurch zu einer Verschiebung der Bande. Die Negativkontrolle erfolgte durch Einsatz eines STAT3-spezifischen Antikörpers (α S3, Bahn 1) und führte zu keiner Änderung im Laufverhalten der STAT1-DNA-Komplexe. Geachtet wurde darauf, vergleichbare Extraktmengen einzusetzen.

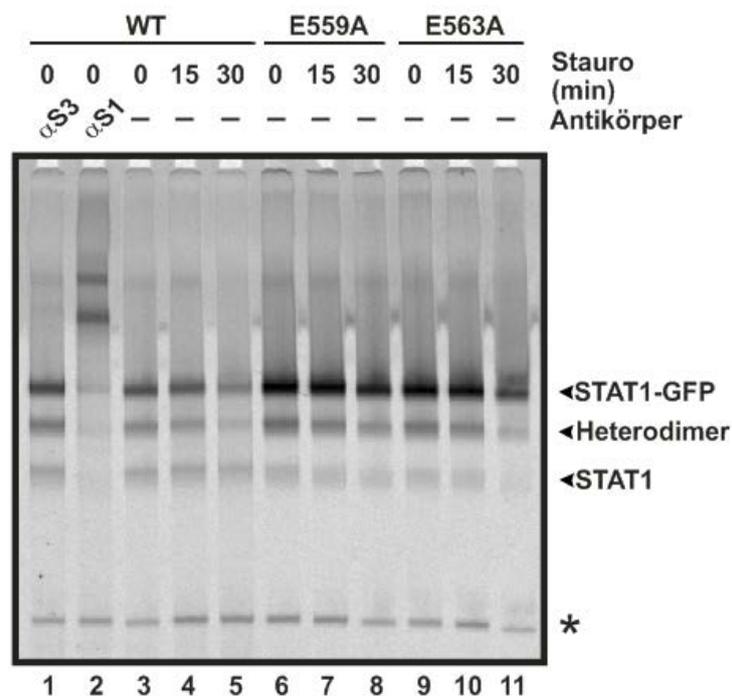


Abb. 16: Erhöhte M67-Bindeaffinität der aus rekombinanten GFP-Fusionsproteinen gebildeten Homo- und Heterodimere von STAT1-E559A und -E563A. Ähnliches Experiment wie in Abb. 15 A dargestellt, jedoch hier mit Einsatz von STAT1-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen und dem Nachweis der STAT1-Identität mittels Supershift-Reaktion. Diese wurde mithilfe eines spezifischen STAT1 Antikörpers (α S1, Bahn 2) und einem Kontroll-Supershift mit unspezifischem STAT3 Antikörper (α S3, Bahn 1) durchgeführt. Am rechten Rand der Abbildung sind die GFP-markierten und unmarkierten STAT1-Homodimere sowie die entsprechenden STAT1-GFP/STAT1-Heterodimere mit Pfeilen markiert. Das Sternchen (*) kennzeichnet unspezifische Banden.

3.2.5 Differentielle DNA-Bindung nach Substitutionen in der Linker-Domäne

In einem nächsten Schritt wurde die Bindung der Mutanten an verschiedene DNA-Sonden analysiert. Eingesetzt wurden Sonden mit zwei klassischen GAS-Stellen in Tandem-Orientierung (genannt 2xGAS) und eine mutierte Sequenz, davon mit nur einer (GAS-nonGAS) oder ohne intakte GAS-Bindestelle (2xnonGAS). Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays wurden wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch ohne die Behandlung der Zellen mit Staurosporin. In allen Versuchen wurden die gleichen Mengen an Zellextrakten eingesetzt. Die Ergebnisse in Abb. 17 A - C zeigen, dass unter den gewählten molaren Verhältnissen die Anzahl der Bindungen von STAT1-Tetrameren an 2xGAS-Sonden des STAT1-WT, der STAT1-E559A- und -E563A-Mutante höher ist als die Anzahl der STAT1-DNA-Komplexe, die mit STAT1-Dimeren besetzt werden. Die Punktmutante K567A weist anhand des Gelretardations-Assay in Abb. 17 A bis auf eine geringe Bindung von tetramerem STAT1 an die 2xGAS-Sonde mit doppelter Bindestelle nahezu keine detektierbare DNA-Bindeaffinität auf. Im Gegensatz dazu liegen für alle getesteten STAT1-Varianten die Bindungen an 2xnonGAS unterhalb der Nachweisschwelle. Zwischen dem STAT1-WT-Molekül und den zwei Varianten mit nach Alanin mutierten Glutaminsäurereste unterscheidet sich jedoch statistisch signifikant das Verhältnis von tetrameren zu dimeren STAT1-Komplexen, die an GAS-nonGAS-Sonden gebunden vorliegen. Abb. 17 A und B demonstriert den geringeren Anteil tetramerer zu dimerer STAT1-WT-Bindungen an GAS-nonGAS-Sonden in den Extrakten von STAT1-GFP-exprimierenden U3A-Zellen, während Abb. 17 C das Ergebnis aus Lysaten von HeLa-Zellen darstellt. Dagegen binden die beiden Glutaminsäure-zu-Alanin-Mutanten häufiger in tetramerer als in dimerer Konformation an die GAS-nonGAS-Sonde. Dieses Ergebnis ist am ehesten auf das erhöhte Niveau der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT1-Punktmutanten im Vergleich zu dem Wildtyp-Protein zurückzuführen.

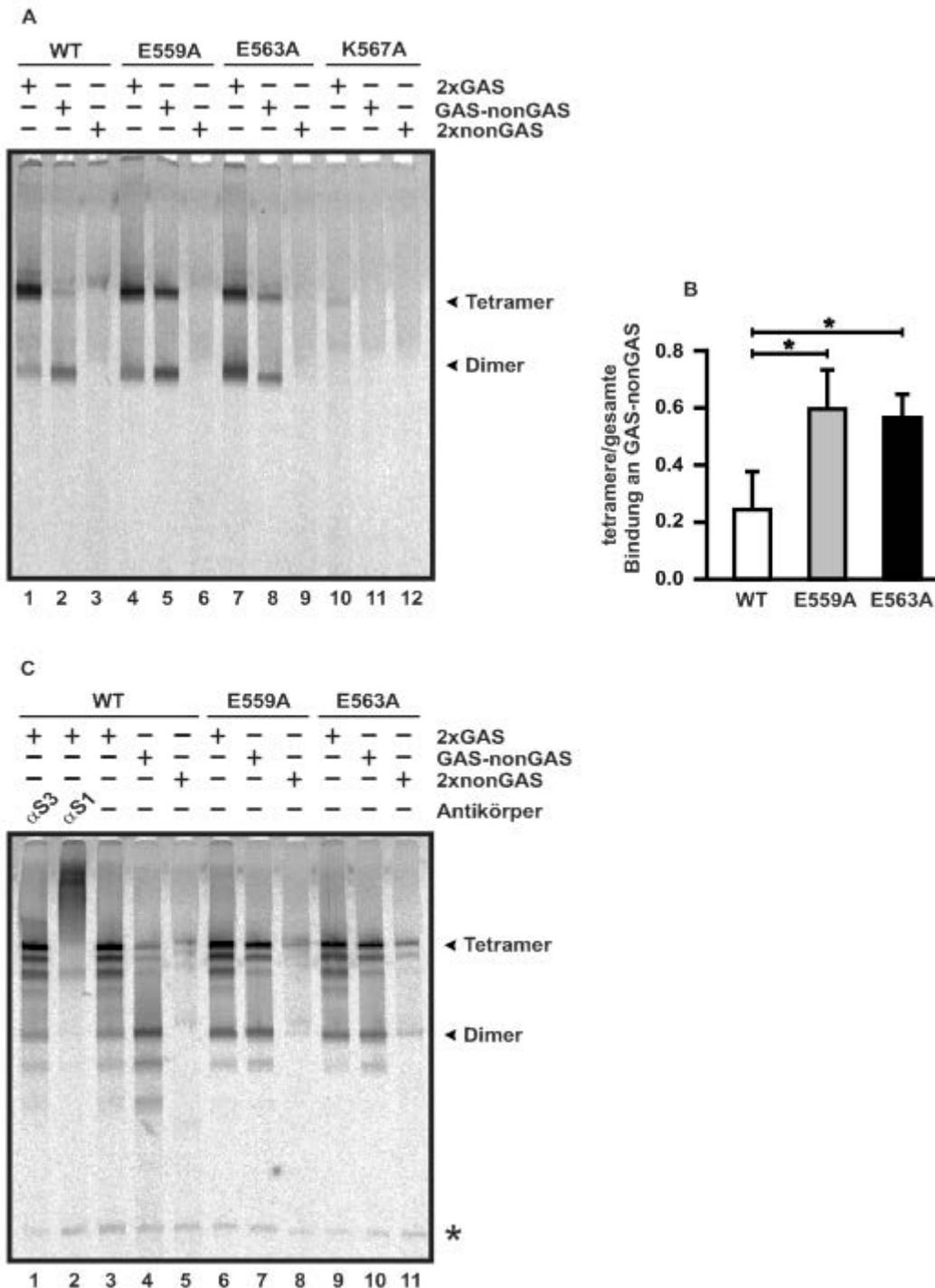


Abb. 17: Unterschiede in der Kinetik der DNA-Bindung zwischen dem Wildtyp und den Punktmutanten E559A und E563A. (A-C) Die Abbildungen zeigen repräsentative EMSA-Ergebnisse der DNA-Bindungsaffinität der angegebenen STAT1-GFP-Fusionsproteine zu drei verschiedenen doppelsträngigen Oligonucleotiden: eine zweifache GAS-Stelle (2xGAS), eine GAS-Stelle mit einer mutierten GAS-Stelle im Tandem (GAS-nonGAS) oder eine solche ohne intakte GAS-Bindestelle (2xnonGAS). Nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/ml IFN γ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-GFP, STAT1-E559A-GFP, STAT1-E563A-GFP und STAT1-K567A-GFP-exprimierenden U3A- (A, B)

und HeLa-Zellen (C) hergestellt und wie angegeben für 15 min mit den jeweiligen [³³P]-markierten Sonden inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im nicht-denaturierenden SDS-Gel erfolgte die autoradiographische Auswertung, nach der sich tetramergebundene (oberer Pfeil) und dimergebundene GFP-gekoppelte STAT1-DNA-Komplexe (unterer Pfeil) unterscheiden lassen. In Abb. 17 C wurde zum Nachweis der STAT1-Identität zusätzlich eine Supershift-Reaktion mit Anti-STAT3- (α S3) und Anti-STAT1 Antikörpern (α S1) durchgeführt. Die insgesamt fünf Banden aus den HeLa-Zellextrakten oberhalb der dimeren Banden entsprechen Homo- bzw. Heterotetrameren von GFP-gekoppeltem STAT1 komplexiert mit nativem STAT1 in den stöchiometrischen Verhältnissen von 4 bis 0. Mit einem Sternchen (*) sind unspezifische Banden gekennzeichnet. (B) Quantifizierung der detektierten STAT1-DNA-Komplexe und den mit Balken und Sternchen (*) markierten statistisch signifikanten Ergebnissen.

Um die Dissoziationsrate der Punktmutanten von hoch-affinen DNA-Bindungsstellen beurteilen zu können, wurden Konkurrenzexperimente (EMSA) in Gegenwart von nicht-radioaktiver M67-Sonde für unterschiedliche Inkubationszeiten nach Vorinkubation mit [³³P]-markierter M67-Sonde durchgeführt (Abb. 18 A-C). STAT1-WT-, STAT1-E559A- und STAT1-E563A-exprimierende U3A-Zellen wurden nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/ml IFN γ für 15 min mit einer [³³P]-markierten M67-Sonde bei RT inkubiert, bevor ein 750-facher molarer Überschuss einer unmarkierten M67-DNA zur Konkurrenz hinzugefügt wurde. Die Inkubation je Ansatz erfolgte bis zu 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Reaktionen auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Bindungsaktivität konnte nach Vakuumtrocknung der Gele autoradiographisch ausgewertet werden. Die Versuche lassen eine deutlich reduzierte Dissoziationsrate von der DNA der beiden Punktmutanten E559A und E563A im Vergleich zum STAT1-Wildtyp erkennen. Die Ablösung der STAT1-Mutanten von einer radioaktiv markierten optimalen GAS-Stelle zeigt sich stark vermindert und resultiert in einer deutlich längeren Halbwertszeit von GAS-gebundenen Dimeren. Abb. 18 A und B ist zu entnehmen, dass sich die durch Vorinkubation entstandene Stabilität der STAT1-DNA-Komplexe der beiden Punktmutanten statistisch signifikant von der weitaus geringeren Stabilität der Protein-DNA-Komplexe des Wildtyps unterscheidet. Während bereits 5 min nach Zugabe der unmarkierten M67-DNA die Bindung der STAT1-WT-Proteine an die radioaktiv markierte Sonde kaum noch detektierbar ist, widerstehen die zwei mutierten STAT1-Proteine der Verdrängung durch den hohen molaren Überschuss an unmarkierten M67-Sonden. Schlussfolgernd führt der Austausch einer der beiden Glutaminsäurereste in Position

559 bzw. 563 des STAT1-Moleküls zu Substitutionsmutanten, die eine verzögerte Dissoziationskinetik von GAS-Bindestellen aufweisen. Zudem wird anhand Abb. 18 C deutlich, dass neben STAT1-GFP-Homodimeren auch Heterodimere aus rekombinanten und endogenem STAT1 teilweise vor der Konkurrenz geschützt sind und eine supprimierte Dissoziationskinetik zeigen.

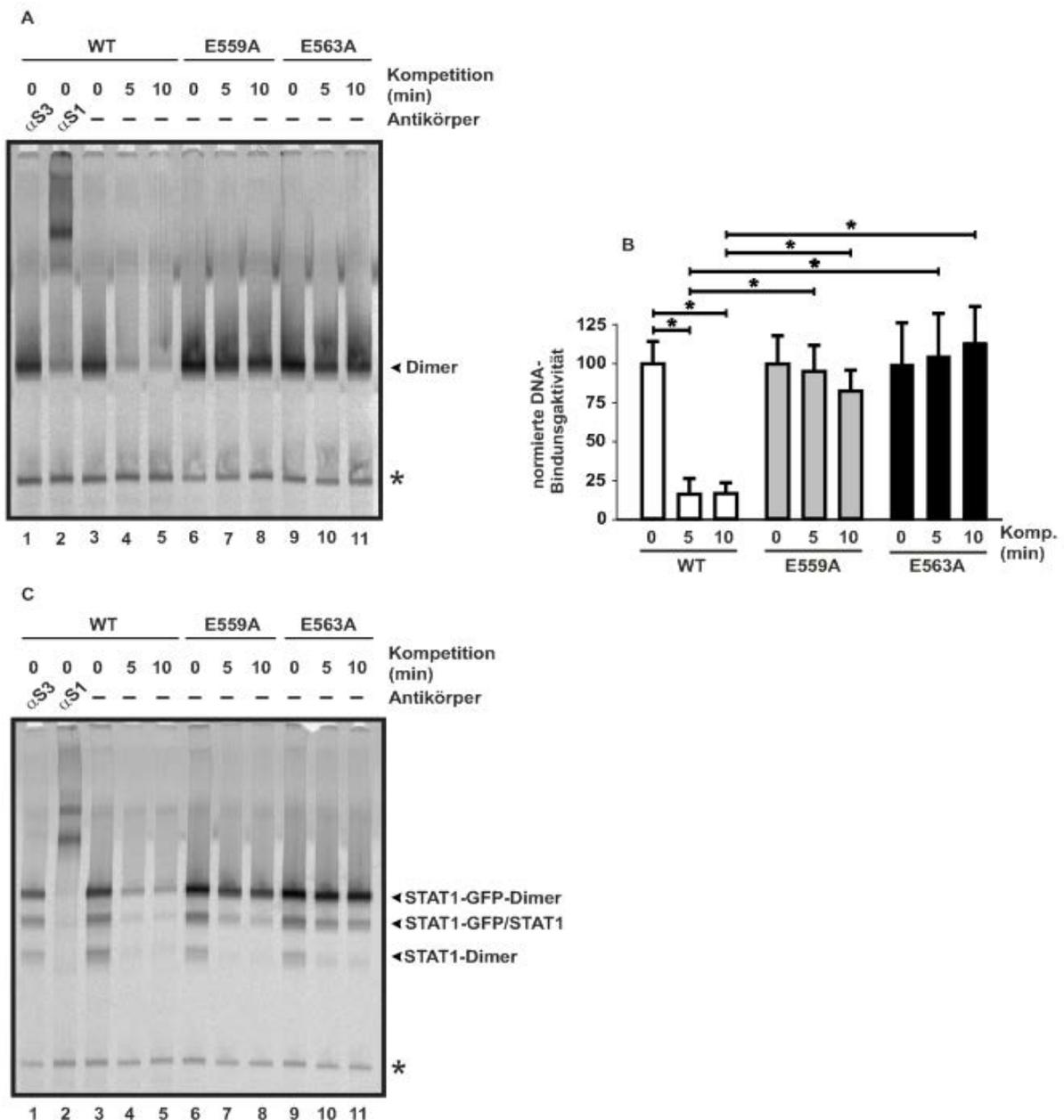


Abb. 18: Reduzierte Dissoziationsrate von DNA und hoch-affine GAS-Bindung der zwei Substitutionsmutanten E559A und E563A. (A) Gesamtzellextrakte von STAT1-rekonstituierten U3A-Zellen wurden nach IFN γ -Stimulation mit einer radioaktiv markierten Sonde bestehend aus einer singulären Bindestelle (M67) für 15 min bei RT inkubiert und

anschließend ein 750-facher molarer Überschuss an unmarkierter DNA für unterschiedliche Zeiten auf Eis hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben auf ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zuletzt erfolgte die autoradiographische Auswertung der Vakuum-getrockneten Gele. Eine Supershift-Reaktion mit einem spezifischen STAT1 Antikörper (α S1) und einem zu Kontrollzwecken eingesetzten STAT3 Antikörper (α S3) bestätigte die Identität von STAT1. (B) Quantifizierung der DNA-Bindeaffinität der STAT1-Mutanten an eine singuläre M67-Bindesequenz aus Abb. 18 A. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit Balken und Sternchen gekennzeichnet. (C) EMSA-Experiment wie in Abb. 18 A mit Einsatz von STAT1-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen. Mit Pfeilen markiert sind STAT1-GFP-Homodimere, Heterodimere aus rekombinantem und nativem STAT1 sowie endogene STAT1-Homodimere. Neben den STAT1-GFP-Homodimeren weisen auch Heterodimere von rekombinantem und nativem STAT1 eine, wenn auch weniger deutlich, verminderte Off-Rate von DNA auf.

Um einen weiteren Nachweis veränderter DNA-Bindungseigenschaften der beiden nach Alanin mutierten Glutaminsäurereste der Linker-Domäne zu liefern, wurde ein Transport-Assay mit permeabilisierten Zellen durchgeführt (Abb. 19). Das in diesem Verfahren eingesetzte Digitonin führt bei einer Konzentration von 50 μ g/ml zu einer selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran mit Solubilisierung zytoplasmatischer Proteine, während die Kernhülle intakt bleibt (Adam et al. 1990). In einem ersten Schritt erfolgte eine 45-minütige IFN γ -Stimulation der STAT1-WT-GFP-, -E559A-GFP- und -E563A-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen zur Erzielung einer Kernakkumulation der rekombinanten GFP-markierten Fusionsproteine. Daraufhin folgte eine sofortige Fixierung der Zellen oder eine 6-minütige Inkubation mit 50 μ g/ml Digitonin in Transportpuffer auf Eis und anschließender Fixierung der permeabilisierten Zellen.

In der Auswertung der direkten Fluoreszenzmikroskopie akkumulieren die drei STAT1-GFP-Varianten wie erwartet nach IFN γ -Stimulation im Zellkern. Die nukleäre Präsenz des Wildtyp-Moleküls wurde nach Permeabilisierung mit Digitonin vollständig aufgehoben, während die beiden STAT1-GFP-Mutanten trotz Digitonin-Einwirkung im Zellkern akkumuliert blieben (Abb. 19 A, untere Felder). Wie Abb. 19 B zu entnehmen ist, wurden ähnliche Ergebnisse auch in immunzytochemischen Färbungen von unmarkierten rekombinanten STAT1-exprimierenden U3A-Zellen beobachtet. Die IFN γ -prästimulierten Zellen wurden ebenso unbehandelt belassen oder dem Digitonin für 6 min ausgesetzt, bevor sie für die indirekte Fluoreszenzmikroskopie gefärbt und unter Verwendung eines STAT1-spezifischen Antikörpers analysiert wurden. Zusammenfas-

send demonstrierten diese Experimente die verminderte nukleare Exportrate der beiden nach Alanin substituierten Glutaminsäurereste in Position 559 und 563 im Vergleich zum STAT1-WT-Protein.

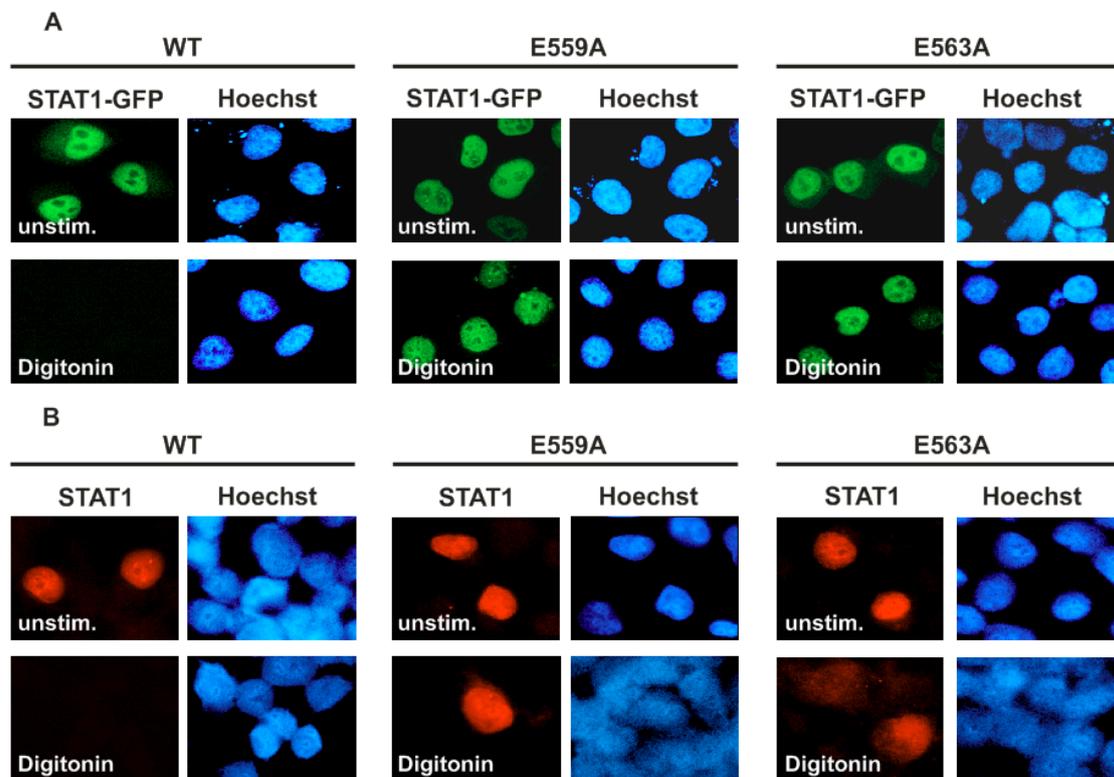


Abb. 19: Substitution zweier Aminosäurereste in der Linker-Domäne resultiert in einer verminderten Rate des Kernexports. (A) GFP-Fusionsproteine von STAT1-WT, -E559A und -E563A exprimierenden HeLa-Zellen oder (B) unmarkierten, rekombinanten U3A-Zellen wurden zur Induktion der Kernakkumulation für 45 min mit $\text{IFN}\gamma$ prästimuliert (obere Felder) und im Anschluss unbehandelt belassen oder für 6 min mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin in Transportpuffer auf Eis inkubiert (untere Felder). Nach Fixierung mit 4 % Formaldehyd in PBS (A) bzw. in Methanol (B) wurden die Zellkerne mit Hoechst gefärbt bzw. zuvor mit den spezifischen Antikörpern inkubiert (B). Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Detektion der Präparate mit den dazugehörigen Hoechst-Färbungen der Zellkerne.

In weiteren Gelretardations-Experimenten erfolgte die detaillierte Beurteilung der GAS- bzw. DNA-Bindeaffinität der nach Alanin mutierten Lysinmutante in Position 567 der Linker-Domäne. Als erstes wurde die Bindungsaktivität an den Promotor des Gens *CCL2* (CC-Chemokin-Ligand 2/Monozyten-Chemoattraktant-Protein 1 (MCP-1)) untersucht, das neben der regulären GAS-Bindestelle ein 10 Basenpaar (bp) vorgeschalte-

tes TCC/GAA-Bindemotiv enthält. Dieses Gen wurde nativ (CCL2 nativ) oder zum Vergleich mit mutiert vorliegendem GAS-Element (CCL2 mutiert) eingesetzt. Für die Untersuchungen wurden Gesamtzellextrakte aus U3A-Zellen, welche STAT1-WT oder eine der STAT1-Punktmutanten exprimierten, nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation mit den jeweiligen Sonden inkubiert. Wie in Abb. 20 A zu sehen, zeigt K567A eine schwache Bindungsaktivität an ein 32 bp-Fragment vom Promotor des Gens *CCL2* (hier CCL2 nativ genannt). Diese Beobachtung bestätigt auf der einen Seite eine reduzierte Affinität zu GAS-Bindestellen des nach Alanin substituierten Lysinrests, jedoch konnte auf der anderen Seite ein vollständiger Verlust der Erkennung von GAS-Sonden durch die Substitution an Position 567 ausgeschlossen werden. Die Mutation der GAS-Bindestelle verhindert die Bindung von STAT1 an diese Sonde.

Der zweite Versuch, ein Kompletions-Gelretardations-Assay, untersuchte die Dissoziationskinetik bzw. Off-Rate von DNA. Nach IFN γ -Stimulation von mit STAT1-WT-, -E559A-, -E563A- und -K567A-GFP transfizierten U3A-Zellen folgte eine Inkubation mit einer [33 P]-markierten M67-Sonde mit Tandem-GAS-Bindestelle. Ferner wurden die Zellen unbehandelt belassen oder mit einem Kompetitor, in diesem Fall mit einem 750-fach molaren Überschuss einer unmarkierten M67-DNA mit singulärer GAS-Bindestelle, inkubiert. Anhand dieses Experiments ließ sich eine schwache Bindung von tetramerem STAT1-K567A an die radioaktiv markierte M67-Sonde mit zwei GAS-Bindestellen beobachten; diese wurde jedoch durch die Kompetition aufgehoben (Abb. 20 B). Die Präferenz der STAT1-Punktmutante K567A, an eine Sonde mit doppelter GAS-Bindestelle, wenn auch mit geringer Affinität, in tetramerer Konformation zu binden, konnte bereits in Abb. 17 A gezeigt werden.

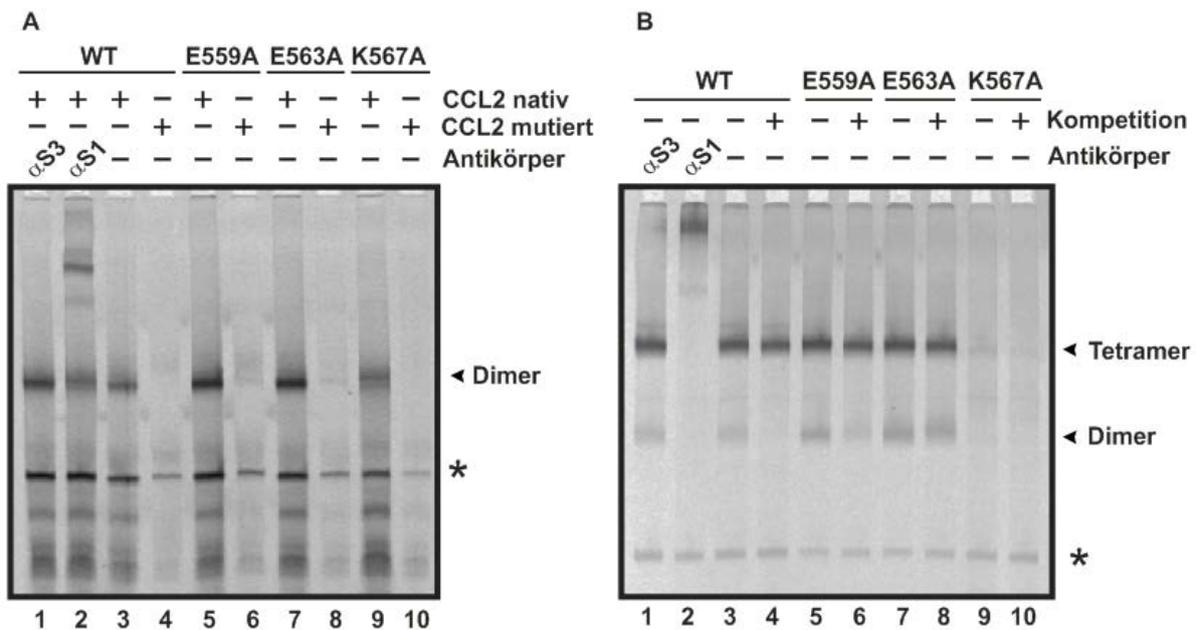


Abb. 20: STAT1-K567A ist eine DNA-Bindemutante. (A) Nach 45-minütiger Stimulation mit 5 ng/ml $\text{IFN}\gamma$ wurden Gesamtzellextrakte von STAT1-WT-, -E559A-, -E563A- und -K567A-exprimierenden U3A-Zellen hergestellt und mit einem [^{33}P]-markierten CCL2 nativen Promotorelement (CCL2 nativ) oder mit einer mutierten Version dieses Promotors (CCL2 mutiert), in der die GAS-Bindestelle mutiert vorliegt, inkubiert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine. Die autoradiographische Auswertung weist eine Bindung von K567A an das native Promotorelement (CCL2 nativ) im Vergleich zum mutierten Promotor nach. Der Pfeil verweist auf die dimeren STA1-DNA-Komplexe. α S3 und α S1 kennzeichnen die spezifischen Antikörper, mit denen die Supershift-Reaktionen zum Nachweis von STAT1 durchgeführt wurden. Die Sterne markieren unspezifische Banden. (B) Kompetitions-Gelretardations-Assay mit Gesamtzellextrakten von STAT1-GFP-rekonstituierten U3A-Zellen wurden nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation mit einer [^{33}P]-markierten DNA bzw. Sonde mit Tandem-GAS-Bindestelle (M67) für 15 min bei RT inkubiert und anschließend entweder unbehandelt belassen (-) oder mit einem 750-fach molaren Überschuss einer unmarkierten M67-DNA (+) als Kompetitor für 20 min auf Eis inkubiert. Diese nicht-radioaktiv markierte DNA weist nur eine singuläre GAS-Bindestelle auf. Es erfolgte der Nachweis einer schwachen Bindung von tetramerem STAT1-K567A an die radioaktiv markierte M67-Sonde mit doppelter GAS-Bindestelle. Am Rand der Abbildung sind die Positionen tetramerer (oberer Pfeil) und dimerer (unterer Pfeil) STAT1-DNA-Komplexe markiert.

3.2.6 Hoch-affine DNA-Bindungsaktivität führt zum verminderten Kernexport in STAT1-NES-GFP-Konstrukten

Die bisher gewonnenen Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen konnten interessante Aufschlüsse zur Charakterisierung der jeweiligen Punktmutanten der Linker-Domäne leisten. Mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen Experimenten unter dem Einsatz von Fusionsproteinen, die ein ektopes hyperaktives nukleäres Exportsignal (NES) aufweisen, sollten die Hinweise auf eine veränderte DNA-Bindungsaffinität der Mutanten untermauert werden. Das Exportsignal verhindert die Akkumulation phosphorylierter STAT-Proteine im Zellkern und hält unter der Bedingung einer $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster aufrecht. Durch die Behandlung der Zellen mit dem Export-Blocker Leptomycin B (LMB) kann dieses hyperaktive Exportsignal allerdings inhibiert werden (Abb. 21).

Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen mit folgenden GFP-NES-Fusionsproteinen exprimierenden Konstrukten transfiziert: STAT1-WT, -E559A, -E563A oder -K567A. Das Expressionsplasmid STAT1-NES-GFP kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem Volle-Länge STAT1-Molekül mit einem carboxyterminal lokalisierten, STAT1-spezifischen, transferierbaren Exportsignal (NES), gefolgt von grünfluoreszierendem Protein (GFP). Nach der Transfektion wurden die Zellen unbehandelt belassen (1. Reihe), für 45 min mit LMB inkubiert (2. Reihe), für 45 min mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert (3. Reihe) oder simultan für 45 min mit $\text{IFN}\gamma$ und LMB behandelt (4. Reihe). Die Analyse der nukleozytoplasmatischen Verteilung zeigte, dass die Zellkerne aller STAT1-NES-Derivate aufgrund des künstlich erhöhten Kernexports im unstimulierten Zustand praktisch frei von GFP-Fluoreszenzsignalen sind, während die mit dem Export-Blocker LMB behandelten Zellen eine nahezu physiologische, panzelluläre Ruheverteilung von STAT1-GFP aufwiesen (Abb. 21 A). Die Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ induzierte jedoch eine anhaltende nukleäre Anreicherung der beiden Mutanten mit nach Alanin mutierten Glutaminsäurereste im Vergleich zum WT-Molekül und der K567A-Mutante, bei denen die $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung zu keiner Veränderung der zytoplasmatischen Verteilung führte. Inhibiert man das Exportsignal der Zellen durch Hinzugabe von LMB bei gleichzeitiger $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation, zeigen ebenso der Wildtyp und die Substitutionsmutante K567A eine vollständige Wiederherstellung der Kernanreicherung. Durch die Einführung der Punktmutationen E559A und E563A kam es demnach unter der Bedingung einer Kompetition zwischen der hoch-affinen DNA-Bindung und dem gesteigerten Kernexport zur

Kernretention, da bei erhöhter DNA-Bindungsaffinität das Gleichgewicht in Richtung der Kernanreicherung verschoben war. Mit dieser Beobachtung wurde bestätigt, dass die hohe DNA-Bindungsaffinität der Schlüssel zum Verständnis des Phänotyps der nach Alanin substituierten Glutaminsäurereste an Position 559 und 563 der Linker-Domäne ist.

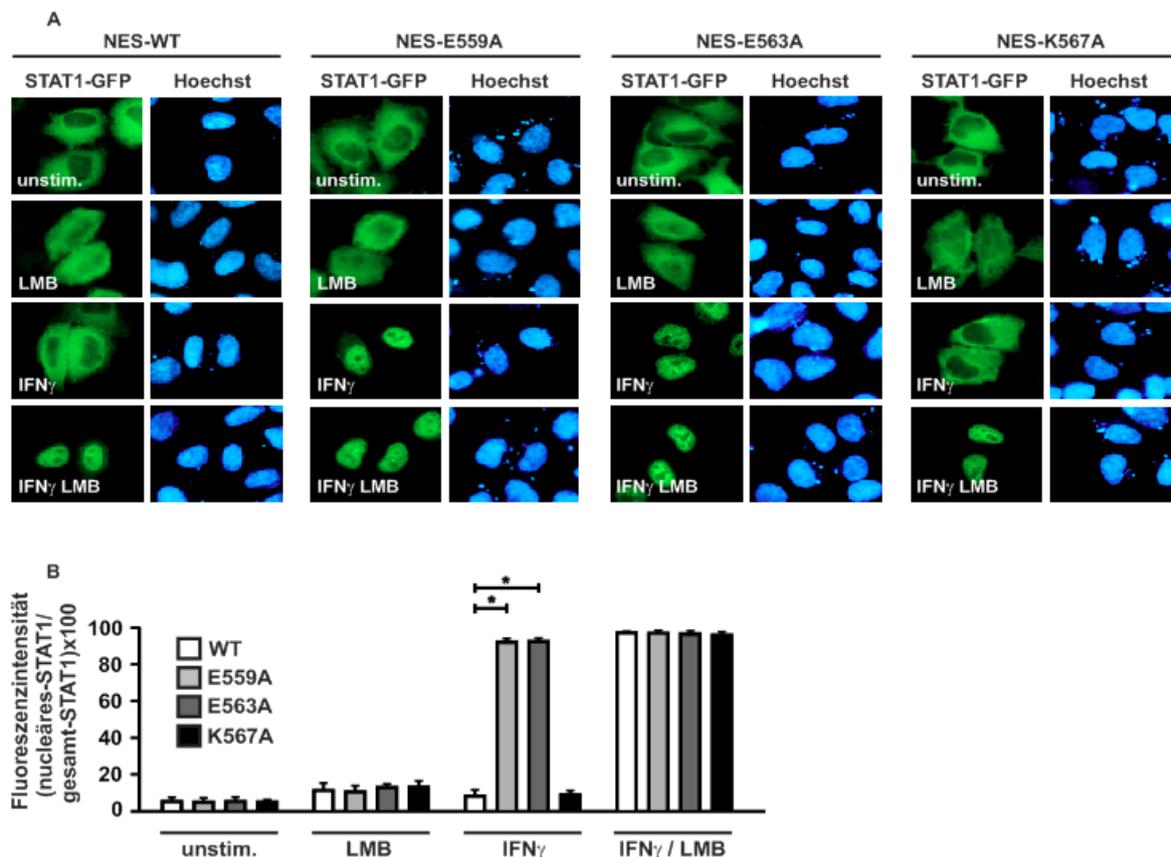


Abb. 21: Die erhöhte DNA-Bindungsaffinität von E559A und E563A führt zur Wiederherstellung der Kernakkumulation von Mutanten mit hyperaktivem Export. (A) HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben mit den Konstrukten pSTAT1-WT-NES-GFP, -E559A-, -E563A- oder -K567A- transfiziert. Anschließend wurden die Zellen unbehandelt belassen (1. Reihe), für 45 min mit dem CRM1 (chromosome region maintenance 1) Export-Inhibitor Leptomycin B (LMB, 10 ng/ml) inkubiert (2. Reihe), für 45 min mit IFN γ (5 ng/ml) (3. Reihe) stimuliert oder mit einer Kombination aus beiden inkubiert (4. Reihe). Im direkten Anschluss erfolgten die Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS und eine Zellkernfärbung mit Hoechst. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die intrazelluläre Verteilung von GFP-gekoppelten STAT1-NES-Fusionsproteinen sowie die Lokalisation der zugehörigen Hoechst-gefärbten Zellkerne. (B) Die Quantifizierung des Verhältnisses von nukleärer zur gesamtzellulären Fluoreszenzintensität bestätigte den Befund einer hyperphysiologischen DNA-Bindung der beiden NES-Mutanten E559A und E563A.

3.2.7 Verminderte *In-vitro*-Dephosphorylierung der Substitutionsmutanten E559A, E563A und K567A

Die Mutanten wurden in weiteren Experimenten einem STAT1-inaktivierenden Enzym, der Protein-Tyrosin-Phosphatase TC45, in Gegenwart verschiedener DNA-Fragmente ausgesetzt. Wie bereits bekannt, ist DNA-gebundenes STAT1 vor Dephosphorylierung durch die STAT1 inaktivierende Protein-Tyrosin-Phosphatase TC45 geschützt (Meyer et al. 2003), so dass die weitere Charakterisierung der Punktmutanten mithilfe von *In-vitro*-Dephosphorylierungs-Assays erfolgte. Hierfür wurden U3A-Zellen mit den jeweiligen pSTAT1-GFP-Derivaten transfiziert, am Folgetag für 45 min mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert und Gesamtzellextrakte hergestellt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 2 U der Phosphatase TC45 bei 30 °C oder aber die Extrakte wurden unbehandelt belassen. Die Auswertung wurde mithilfe eines klassischen Western Blots durchgeführt. In Abb. 22 wird deutlich, dass die hoch-affine Tandem GAS-Bindestelle (2xGAS) alle STAT1-Varianten vor der Inaktivierung der Phosphatase schützt. Eine Ko-Inkubation mit einer weniger affinen GAS-nonGAS-DNA mit singulärer Bindestelle führt allerdings zu einem stärker detektierbaren Phosphorylierungssignal bzw. einer verminderten Dephosphorylierung der Punktmutanten E559A und E563A im Vergleich zum Wildtyp-Molekül. Diese Beobachtung stimmt mit den Sequenzvoraussetzungen für die Bindung an DNA überein, die vorab in den EMSA-Experimenten aus Abb. 17 A-C ermittelt wurden. Die Substitution von zwei Glutaminsäureresten in den Positionen 559 und 563 des STAT1-Proteins beeinflusst die Dephosphorylierungskinetik, und die Punktmutanten waren demnach ein weniger geeignetes Substrat für die TC45-Phosphatase. Bei der Mutante mit dem nach Alanin mutierten Lysinrest in Position 567 war die Dephosphorylierungsrate in Anwesenheit von DNA ebenso vermindert, und dieses unabhängig davon, ob die in der Reaktion vorhandene DNA eine funktionelle GAS-Bindestelle aufwies oder nicht (Abb. 22).

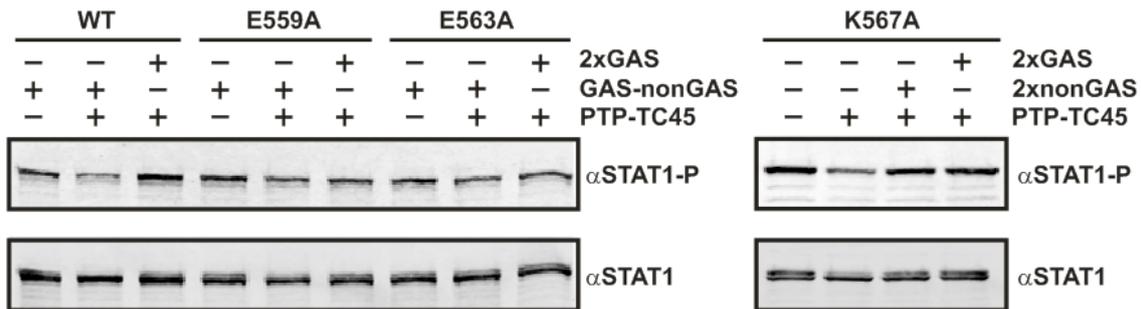


Abb. 22: Die DNA-gebundenen Punktmutanten E559A, E563A und K567A sind vor TC45-katalysierten Inaktivierung geschützt. STAT1-WT-GFP-, -E559A-, E563A- und -K567A-exprimierende U3A-Zellen wurden 45 min mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert und nach Herstellung von Gesamtzellextrakten für 30 min mit oder ohne Tyrosin-Phosphatase TC45 in Ab- oder Anwesenheit von 2xGAS, GAS-nonGAS oder 2xnonGAS inkubiert. Anschließend wurde das Phospho-STAT1-Niveau in Western-Blot-Experimenten untersucht. Die oberen Felder zeigen jeweils den Western Blot mit einem Phospho-STAT1 Antikörper (α STAT1-P), während die unteren Felder den dazugehörigen Re-Blot nach Inkubation mit einem STAT1-spezifischen Antikörper abbilden (α STAT1).

3.2.8 Erhöhte unspezifische DNA-Bindungsaktivität von STAT1-E559A und -K567A

Im nächsten Versuch wurden die Auswirkungen von Punktmutationen an den Positionen 559 und 567 der Linker-Domäne auf die Affinität zu der DNA genauer betrachtet. Mithilfe eines Pull-down-Assays konnten DNA-Protein-Wechselwirkungen, insbesondere unspezifische DNA-Bindungen, untersucht werden. Als Sonden für die STAT1-Bindung wurden mit Biotin markierte Oligonukleotide, die zuvor an Streptavidin-Agarose gekoppelt wurden, eingesetzt. Diese enthielten entweder zwei Konsensus-GAS-Stellen (2xGAS) oder eine mutierte Sequenz ohne GAS-Bindestellen (2xnonGAS). Die zwei verschiedenen Sonden wurden jeweils für 1 h bei 4 °C an 0,5 ml gepackte Streptavidin-Agarose gekoppelt. Konfluente U3A-Zellen, die rekombinante STAT1-Proteine exprimierten, wurden entweder unbehandelt belassen oder für 30 min mit IFN γ und weitere 15 min mit Vanadat/H $_2$ O $_2$ stimuliert. Nach einer Präinkubation mit ungebundener Streptavidin-Agarose wurden 320 μ l des Überstandes der jeweiligen Zellextrakte mit 50 μ l der DNA-gebundenen Streptavidin-Agarose (gepacktes Volumen) für 2 h bei 4 °C in einem Rotor inkubiert. Nach Denaturierung der gebundenen Proteine erfolgte mittels Western Blotting die Detektion des DNA-gebundenen STAT1. Die densitometrischen Analysen der in Abb. 23 dargestellten Präzipitations-Versuche weisen eine

signifikant bessere Bindung von STAT1-E559A an unspezifische DNA ohne GAS-Bindestelle (2xnonGAS) im Vergleich zum Wildtyp-Protein nach. Auch für die Punktmutante K567A ließen sich ähnliche Ergebnisse ermitteln. Des Weiteren zeigt das Säulendiagramm in Abb. 23 B, dass kein statistisch signifikanter Unterschied in ihrer Bindungsaffinität (K567A) zwischen spezifischer und unspezifischer DNA besteht. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die generierten Punktmutanten E559A und E563A mit erhöhter Affinität DNA binden, sowie nach Austausch von Alanin für Lysin die resultierende Mutante K567A in ihrer Diskriminierungsfähigkeit zwischen GAS- und Non-GAS-Bindestellen eingeschränkt ist.

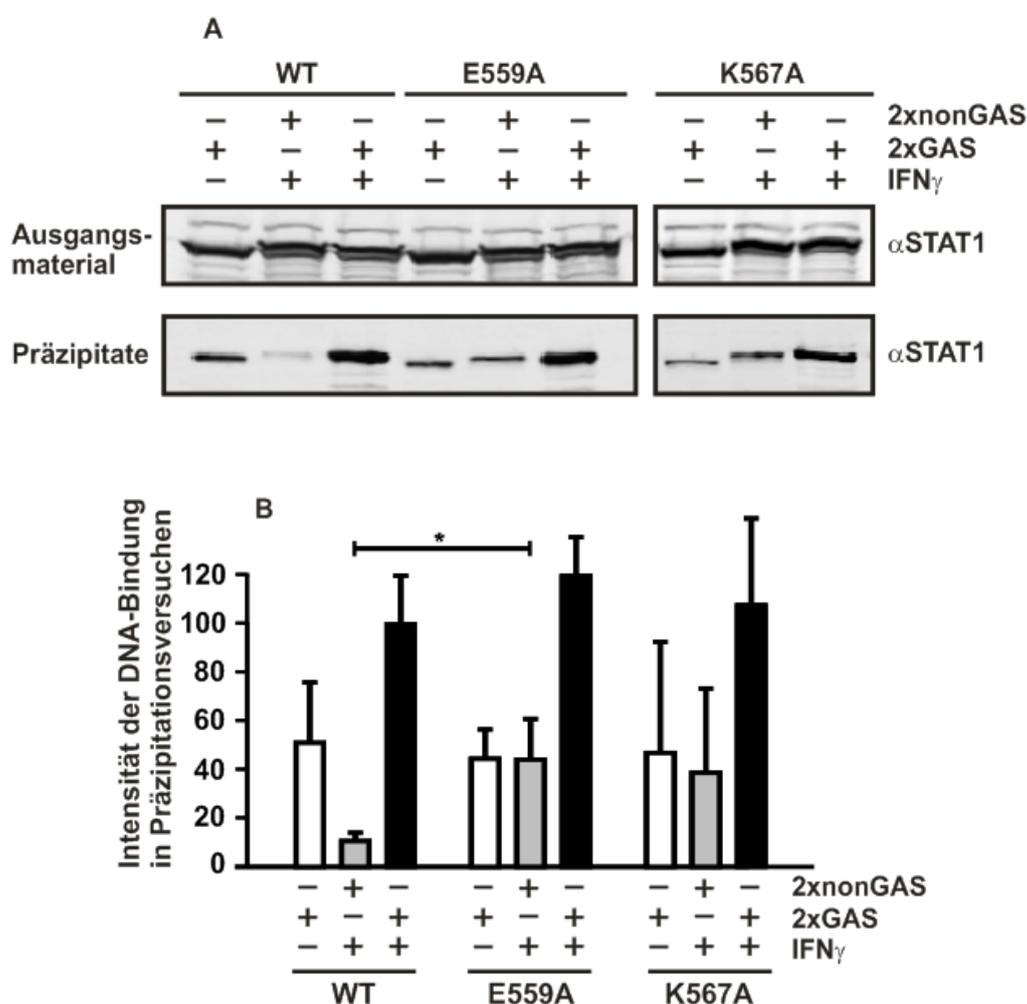


Abb. 23: Verbesserte unspezifische DNA-Bindung von STAT1-E559A und -K567A im Vergleich zum STAT1-WT. (A) Präzipitation von STAT1-WT, -E559A und -K567A mit Agarose-gekoppelten, doppelsträngigen Oligonukleotiden. Eingesetzt wurden Sonden mit zweifacher GAS-Bindestelle (2xGAS) und einer mutierten Sequenz davon ohne GAS-Bindestelle (2xnonGAS). Gesamtzellextrakte transfizierter rekombinanter U3A-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder für 30 min mit IFN γ stimuliert und für weitere 15 min mit Vanadat/H $_2$ O $_2$ behandelt, bevor sie mit den Agarose-gebundenen DNA-Fragmenten

inkubiert wurden. Die Analyse der ausgefällten DNA-Protein-Komplexe erfolgte durch Western Blotting. Gezeigt sind die Blots mit den aufgetrennten Präzipitaten nach Inkubation mit spezifischem Anti-STAT1-Antikörper (α STAT1) sowie der Phospho-STAT1-Gehalt im entsprechenden Ausgangsmaterial vor Präzipitation (α STAT1). (B) Quantifizierung der DNA-Bindungsintensität jedes STAT1-Derivats von drei unabhängigen Pull-down-Experimenten. E559A weist eine viermal bessere Bindung an unspezifische DNA auf, als das WT-Protein. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.

3.2.8 Verminderte Reporteraktivierung von STAT1-K567A

In einem letzten Ansatz von Experimenten lag das Augenmerk auf der transkriptionellen Zielgenaktivierung durch die bis hierher untersuchten Substitutionsmutanten der Linker-Domäne E559A, E563A und K567A. Zur Analysierung der transkriptionellen Aktivität der STAT1-Punktmutanten wurden zunächst Reporterassays durchgeführt. Hierfür wurde ein Luciferase-Reporter (3xLy6E) mit einem synthetischen Promotor bestehend aus drei Konsensus-GAS-Bindestellen im Abstand von je 10 bp eingesetzt. U3A-Zellen wurden mit STAT1-WT-GFP, -E559A-GFP, -E563A-GFP und -K567A-GFP sowie den Plasmiden p β -Galaktosidase (β -Gal) und pGAS3xLy6E transfiziert und 16-24 h später wurden die Zellextrakte für die angegebenen Zeiträume mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert, bevor die Luciferase-Aktivität spektrometrisch bestimmt und auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert werden konnte. Wie erwartet, weist die generierte Punktmutante K567A keine nennenswerte IFN γ -induzierte Genexpression auf (Abb. 24). Dieses Phänomen lässt sich anhand der fehlerhaften GAS-Erkennung von STAT1-K567A erklären, zu der es nach Austausch des Lysinrestes gegen Alanin in Position 567 des STAT1-Proteins kommt. Erstaunlicherweise ist Abb. 24 zu entnehmen, dass die nach Alanin mutierten STAT1-Proteine mit Austausch der Glutaminsäurereste 559 und 563 eine dem Wildtyp-Molekül vergleichbare transkriptionelle Aktivierung des Reportergens 3xLy6E nach IFN γ -Stimulation aufweist.

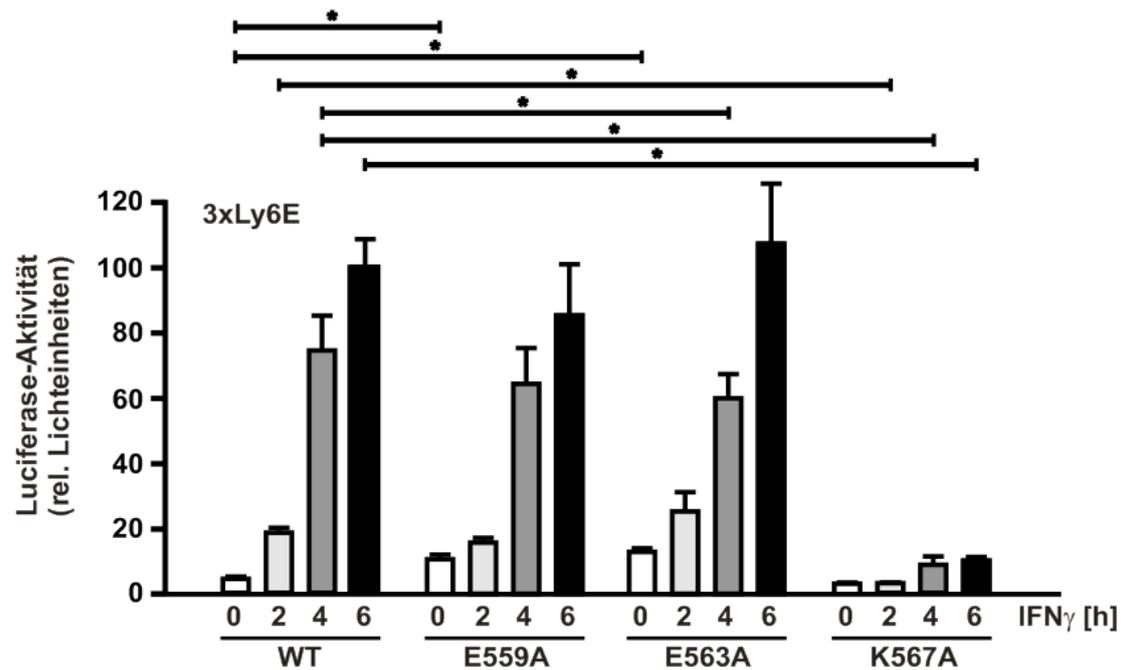


Abb. 24: Vergleichbare transkriptionelle Aktivität im Reporter-gen-Assay zwischen Mutanten mit Glutaminsäure-Austausch und dem Wildtyp-Molekül, während STAT1-K567A eine inhibierte Genexpression aufweist. Luciferase-Reporter-gen-Assay mit U3A-Zellen, die mit GFP-markiertem STAT1-WT, -E559A, -E563A bzw. -K567A sowie den Plasmiden β -Gal und 3xLy6E transfiziert wurden. Nach 16-24 h wurden die Zellextrakte für 0 h (weiße Säulen), 2 h (hellgraue), 4 h (dunkelgraue) oder 6 h (schwarze) mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert, bevor die Luciferase-Aktivität photometrisch gemessen und auf das Expressionsniveau der konstitutiv ko-transfizierten β -Galaktosidase normiert wurde. Das Säulendiagramm repräsentiert die Mittelwerte und Standardabweichungen der vorgenommenen Sechsfachmessung von mindestens drei durchgeführten Untersuchungen. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Sternchen (*) markiert.

3.2.9 Gen-spezifisches Transaktivierungspotential der DNA-Bindemutanten E559A und E563A

Mithilfe von Real-time-PCR-Experimenten erfolgte anschließend die Untersuchung der Zielgenaktivierung an natürlichen Promotoren *in-vivo*. Zur Analyse der Interferon-abhängigen Induktion von STAT1-Zielgenen wurden vier bekannte endogene Zielgene eingesetzt. Dabei handelte es sich um die Zielgene *gbp1* (Guanylat-bindendes Protein), *irf1* (IFN-regulierender Faktor 1), *mig1* (monokine induced by IFN γ) sowie *ccl2*. Als Kontrolle der stattgefundenen Transfektion erfolgte zusätzlich die Geninduktion des *stat1*-Gens. U3A-Zellen wurden mit den entsprechenden STAT1-Expressionsplasmiden im pcDNA3.1-Vektor transient transfiziert. 24 h nach Transfektion erfolgten ein

Mediumwechsel und die Kultivierung der Zellen in DMEM, supplementiert mit 1 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 6 h mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert oder alternativ unstimuliert belassen. Nach Isolation der RNA wurde diese mittels reverser Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die in Abb. 25 abgebildeten Ergebnisse der Real-time PCRs zeigen ein unerwartetes differenzielles, Zytokin-induzierbares Genexpressionsmuster bei den Mutanten mit den Glutaminsäure-Austauschen in den Positionen 559 und 563. Der Austausch dieser beiden Aminosäurereste in der Linker-Domäne hatte keinen Einfluss auf die IFN γ -induzierte Aktivierung der Gene *gbp1* und *irf1*, wohingegen das *mig1*-Gen durch die Punktmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein vermindert exprimiert wurde. Eine ganz andere Beobachtung zeigte sich anhand der Expressionsrate des Gens *ccl2* in den Zellen, die eine der zwei hyperphosphorylierten DNA-Bindemutanten mit erhöhter Affinität zu GAS-Bindestellen exprimierten. Bei beiden Mutanten wurde eine gegenüber dem Wildtyp-Protein statistisch signifikant erhöhte *ccl2*-Expression detektiert. Die Analyse der generierten Punktmutante K567A mittels Real-time PCR erbrachte, wie bereits im Reporteragen-Assay (Abb. 24) mit synthetischen Promotor, trotz Einsatz von nativen Promotoren den Nachweis einer fehlenden Induktion endogener Zielgene. Unter den Derivaten lag eine vergleichbare Transgen-Expression von *stat1* vor.

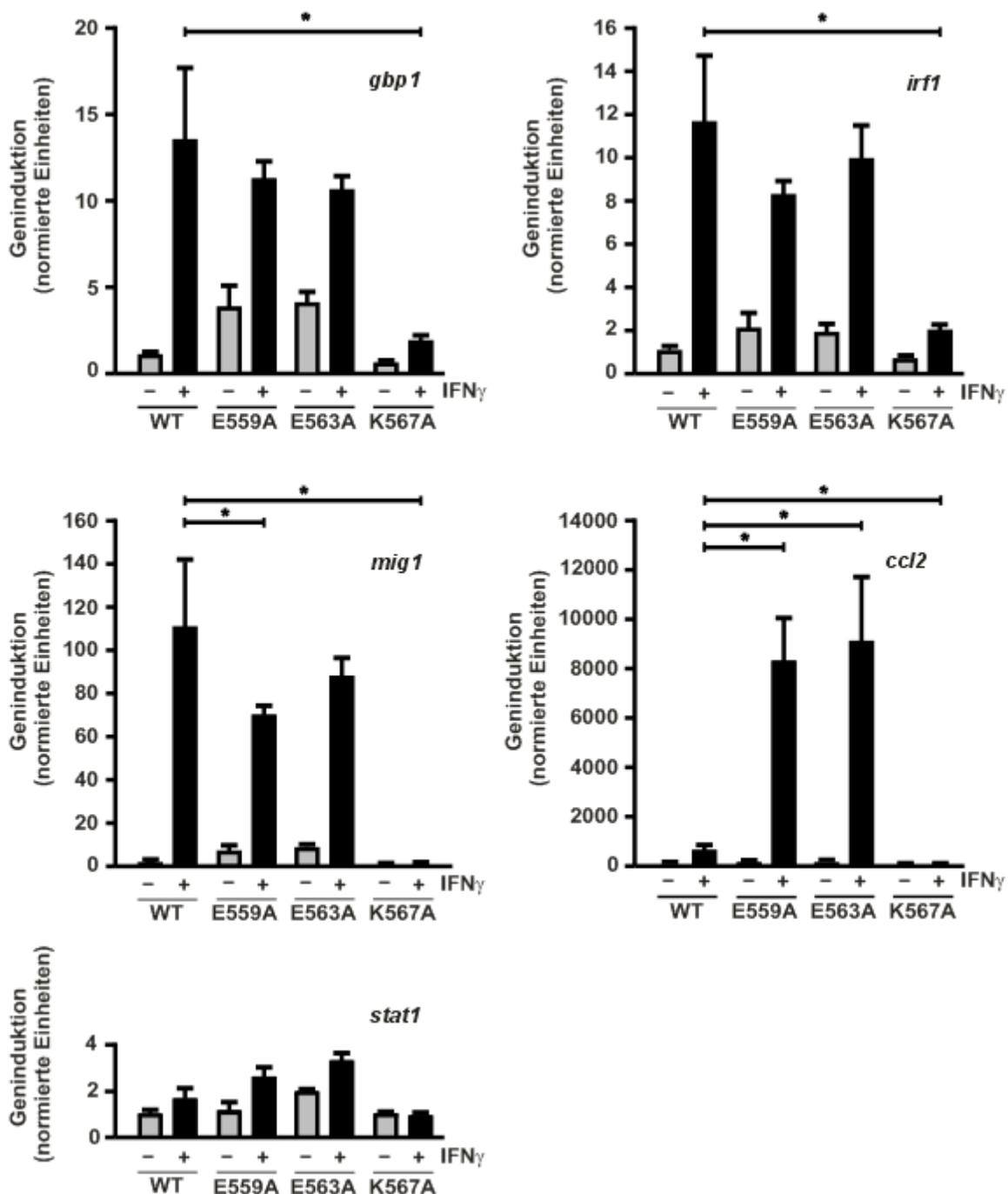


Abb. 25: Differenzielles Expressionsmuster endogener Zielgene von STAT1 durch die Mutanten E559A sowie E563A sowie mangelndes Transaktivierungspotential der Punktmutante K567A in Real-time PCR. U3A-Zellen wurden mit den entsprechenden pcDNA3.1-STAT1-Plasmiden transfiziert und 24 h später mit einem 1 % FCS-haltigem Medium kultiviert, bevor die Zellen am Folgetag für 6 h mit 5 ng/ml IFN γ stimuliert oder unbehandelt belassen wurden. Die Säulendiagramme spiegeln das Expressionsniveau des *gbp1*-, *irf1*-, *mig1*-, *ccl2*-Gens und als Kontrolle des *stat1*-Gens vor (graue Säulen) sowie nach IFN γ -Stimulation (schwarze Säulen) wider. Die spezifische Genaktivierung der oben

genannten Zielgene wurde auf das Expressionsniveau des „house-keeping“-Gens *gapdh* normiert. Aus Dreifachmessungen wurden Standardabweichungen und Mittelwerte berechnet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden drei Punktmutationen in der Linker-Domäne sowie eine Punktmutante in der DNA-Bindedomäne generiert und deren Auswirkungen auf die physiologischen Eigenschaften des STAT1-Proteins im Kontext des IFN γ -Signaltransduktionsweges untersucht. Ausgewählte, hochkonservierte Aminosäurereste in der Sequenz des STAT1-Proteins wurden hierfür nach Alanin mutiert und anschließend die IFN γ -induzierte Signalantwort hinsichtlich des Phosphorylierungsniveaus, der Kernakkumulation, der DNA-Bindung, der Dissoziationskinetik sowie der Zielgenaktivierung der STAT1-Punktmutanten im Vergleich zum STAT1-WT betrachtet.

Die Beteiligung von STAT1 an der Ausführung IFN γ -vermittelter Signalaktivierung ist in der Literatur gut dokumentiert (Brivanlou und Darnell 2002; Darnell et al. 1994; Sehgal 2008), jedoch sind die genauen molekularen Mechanismen wie die der DNA-Bindung und Rekrutierung an GAS-Bindestellen weitestgehend unbekannt. In Bezug auf Auswirkungen von Punktmutationen in der Linker-Domäne auf die Aktivität des STAT1-Moleküls hatten Yang et al. in den Jahren 1999 und 2002 Arbeiten zur Charakterisierung einer STAT1-Doppelmutante (KE544-545AA) veröffentlicht und diese als DNA-Bindemutante identifiziert. Des Weiteren hat sich unsere Arbeitsgruppe intensiv mit dem Einfluss von Substitutionsmutanten des STAT1-Proteins im Bereich der Linker-Domäne sowie der DNA-Bindedomäne auseinandergesetzt und diesbezüglich Ergebnisse im Rahmen von publizierten Dissertationsschriften (Bolten 2013; Koch 2010; Staab 2011) dargelegt. Unter anderem konnten Substitutionsmutanten der Linker-Domäne (STAT1-E500A, -K525A, -K550A) generiert werden, die mit einer erhöhten Dephosphorylierungsrate oder einer veränderten transkriptionellen Aktivität einhergehen (Bolten 2013; Staab 2011). Die Modulation von konservierten Aminosäureresten der DNA-Bindedomäne (E411A/K, E421K) wiederum führte zur verstärkten DNA-Bindung, erhöhten Kernpräsenz sowie deutlich schwächeren transkriptionellen Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Protein (Koch 2010). Mit dieser Arbeit sollen weitere Erkenntnisse über den genauen Mechanismus der signalabhängigen Zielgenerkennung und DNA-Bindung erlangt werden.

Im Sequenzvergleich aller humanen STAT-Mitglieder zeigt sich die Linker-Domäne vergleichsweise gut konserviert, so dass konservierte Aminosäurereste an den Positionen 559, 563 und 567 der Linker-Domäne identifiziert und für die Phänotypisierung nach Alanin mutiert wurden. Die hier erstmals beschriebenen Substitutionsmutanten

E559A und E563A zeigten in ersten Untersuchungen hinsichtlich ihres Aktivierungsniveaus signifikant erhöhte und über die Zeit verlängerte Spiegel an Tyrosin-Phosphorylierung (Abb. 10, 11 A, B und 12 A, B). Des Weiteren konnte in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine verlängerte Anreicherung der beiden STAT1-Mutanten im Zellkern sowie folglich ein beeinträchtigter Kernexport registriert werden (Abb. 13 A, B und 14 A, B). Demgegenüber zeigt ein an Position 350 identifizierter Aminosäurerest der DNA-Bindedomäne nach Substitution des Lysinrestes gegen Alanin eine im Vergleich zum STAT1-Wildtyp Protein unveränderte Phosphorylierungskinetik sowie Kernakkumulationsphase.

Die Ergebnisse der Hyperphosphorylierung sowie verlängerten Kernanreicherung der nach Alanin mutierten Glutaminsäurereste 559 und 563 sind insofern interessant, als dass phosphorylierte STAT-Dimere als Cargo-Proteine über einen Importin- α/β -Komplex in den Zellkern transferiert (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Nardozi et al. 2010; Sekimoto et al. 1997) und nur im dephosphorylierten Zustand über ein spezifisches, leucinreiches nukleäres Exportsignal (NES) aus dem Zellkern transportiert werden (Begitt et al. 2000; Haspel und Darnell 1999; Mattaj und Engelmeier 1998; Meyer et al. 2003; ten Hoeve et al. 2002). Die Dauer der Kernakkumulation der STAT-Moleküle hängt demnach von der Affinität der DNA-Bindung ab. Daher lag das Augenmerk in einem weiteren Schritt auf der Untersuchung der DNA-Bindeaffinität der Substitutionsmutanten. Nur ungebundene STAT-Moleküle werden von den nukleären Phosphatasen erkannt und dephosphoryliert, so dass sie anschließend aus dem Zellkern geschleust werden können (Haspel und Darnell 1999; Meyer et al. 2003; ten Hoeve et al. 2002).

Die in Western Blots ermittelte statistisch signifikante Hyperphosphorylierung der mutierten Varianten mit den beiden Glutaminsäure-Austauschen konnte in EMSA-Experimenten durch den Nachweis einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität bestätigt werden. Während in Abb. 15 eine prolongierte DNA-Bindung der beiden Punktmutanten E559A und E563A nachgewiesen werden konnte, zeigt Abb. 16 neben einer verlängerten DNA-Bindung der STAT1-Homodimere auch eine erhöhte M67-Bindeaffinität im Vergleich zwischen den rekombinanten und endogenen STAT1-Monomeren. Des Weiteren widerstehen die GAS-gebundenen STAT1-Dimer-Mutanten E559A und E563A in Kompetitions-Gelretardations-Experimenten dem molaren Überschuss an nicht-radioaktiv markierter M67-DNA, während das STAT1-Wildtyp-Protein die bekanntermaßen hohe Dissoziationskinetik von einer singulären GAS-Bindestelle aufweist (Abb. 18, 20).

Die bisher gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität der zugrundeliegende Phänotyp dieser Substitutionsmutanten ist. Eine mögliche Ursache für eine verbesserte DNA-Bindungsaffinität wäre eine vermehrte Stabilität der DNA-gebundenen STAT1-Dimere. Diese Hypothese lässt sich in EMSA-Experimenten aufgrund der allgemein hohen Off-Rate der STAT-Proteine von einzelnen GAS-Bindestellen nicht demonstrieren. Mithilfe der direkten Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von Fusionsproteinen mit einem hyperaktiven nukleären Exportsignal (NES) in GFP-markiertem STAT1 (Lödige et al. 2005) konnten die bisher beobachteten Eigenschaften der Mutanten als Konsequenz ihrer veränderten DNA-Bindungsaffinität bestätigt werden. Obwohl das Exportsignal die Akkumulation phosphorylierter STAT-Proteine im Zellkern trotz IFN γ -Stimulation verhindern soll, weisen die Deletionsmutanten E559A und E563A einen verminderten Kernexport auf.

Yang und Kollegen (2002) haben die Doppelmutante KE544-545AA der Linker-Domäne beschrieben, die einen im Vergleich zu den hier charakterisierten Mutanten E559A und E563A gegensätzlichen Phänotyp aufweist. Die Autoren postulierten für diese Doppelmutante eine unveränderte Phosphorylierung, Kernakkumulation sowie DNA-Bindung, jedoch eine erhöhte Dissoziationsrate von DNA (Yang et al. 1999, 2002). Es kann also zusammenfassend festgehalten werden, dass die Linker-Domäne maßgeblich an der DNA-Bindung beteiligt ist.

Neben der erhöhten Off-Rate wies die Doppelmutante KE544-545AA eine supprimierte transkriptionelle Genaktivierung auf (Yang et al. 2002). Dieses Ergebnis lässt auf einen Zusammenhang zwischen einer bestimmten, limitierenden Präsenzdauer am Promotor und der Induktion von transkriptionellen Ereignissen schließen. Aufgrund der ausgesprochen hohen Off-Rate von DNA scheint die Genaktivierung durch die Doppelmutante auszubleiben.

Die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität der STAT1-E559A- und -E563A-Punktmutanten in Reporteragen-Assays sowie Real-time-PCR-Experimenten ergab statt einer globalen Expression IFN γ -sensibler Zielgene ein unerwartetes Gen-spezifisches Aktivierungsprofil (Abb. 24, Abb. 25). Im Vergleich zum Wildtyp-Molekül zeigten die Substitutionsmutanten eine annähernd gleiche transkriptionelle Aktivität im Reporteragen-Assay mit dem synthetischen 3xLy6E-Promotor, bestehend aus drei GAS-Bindestellen (Abb. 24). In Real-time-PCR-Experimenten konnte ein vergleichbares Ergebnis mit den nativen Zielgenen *gbp1* und *irf1* dokumentiert werden. Im Gegensatz dazu

fiel das Expressionsniveau von *mig1* durch den Austausch der Aminosäuren leicht vermindert aus, während sich die Substitutionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp als stärkere Aktivatoren am Zielgen *ccl2* erwiesen (Abb. 25).

Dieses komplexe Muster der Genaktivierung wurde in der Literatur bisher für zwei krankheitsassoziierte Mutanten der Coiled-coil-Domäne (F172W) und DNA-Bindedomäne (T385A) beschrieben (Staab 2011; Staab et al. 2013). Beide Substitutionsmutanten scheinen die Konformationsänderung der parallelen in die antiparallele Orientierung entscheidend zu beeinträchtigen (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008; Zhong et al. 2005). An Position 385 der DNA-Bindedomäne befindet sich ein Threoninrest, der nach Alanin konvertiert wurde. Die Substitution an dieser Position führt nach IFN γ -Stimulation zur Hyperphosphorylierung von STAT1 in überexprimierenden Zellen. Mao et al. (2005) konnten anhand der Kristallstruktur zeigen, dass Threonin 385 in einer Tasche der DBD lokalisiert ist und durch Bindung von F172 des kontralateralen Monomers an der Stabilisierung der antiparallelen Dimer-Konformation beteiligt ist. Nachdem in Mutationsexperimenten nachgewiesen werden konnte, dass die Mutation von F172 zu einer anhaltenden STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung führte (Zhong et al. 2005), haben Mertens et al. (2006) die Aminosäurereste Q340, G382 und Q408 in der oben erwähnten Tasche der DBD identifiziert und diese Mutanten ebenfalls in Substitutionsexperimenten charakterisiert. Auch diese STAT1-Varianten zeigten in Western-Blot-Analysen ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau (Mertens et al. 2006). STAT1-F172W weist zudem einen Dephosphorylierungsdefekt auf, der zusammen mit der Hyperphosphorylierung die Folge einer fehlenden Stabilisierung der antiparallelen STAT1-Dimer-Konformation durch die alterierte Bindungsfläche zwischen der DBD und CCD ist. Ist diese Interaktion in den Mutanten gestört, bleiben die phosphorylierten STAT1-Monomere präferentiell in paralleler Orientierung zueinander ausgerichtet und können weniger effektiv von der TC45-Phosphatase dephosphoryliert werden (Zhong et al. 2005). Staab (2011) konnte in weiteren Untersuchungen die Interaktion des Aminosäurerestes Threonin an Position 385 der DBD mit der CCD bestätigen. Eine Mutation nach Alanin führte aufgrund der destabilisierten antiparallelen Konformation des gebundenen STAT1-Dimers zur verlängerten Kernakkumulation durch den eingeschränkten Kernexport bei verminderter Dephosphorylierung.

Neben diesen Ergebnissen zeigte die Aktivierung von endogenen STAT1-Zielgenen im Rahmen von Real-time-Experimenten ein inhomogenes Bild der Genaktivierung

durch die Mutationen von F172 und T385, wie dies auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Mutanten mit den nach Alanin substituierten Glutaminsäureresten an Position 559 und 563 der Linker-Domäne demonstriert werden konnte. Ob die Ursache für eine Resistenz gegenüber der inaktivierenden Phosphatase der gehinderte Konformations-Shift des STAT1-Dimers darstellt, wie bei F172W und T385A, oder eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität ursächlich für eine verminderte Dephosphorylierung ist, in jedem Fall weisen die hyperphosphorylierten Substitutionsmutanten ein gemeinsames Genexpressionsprofil auf.

Bei der Auswertung der Zielgenaktivierung fällt auf, dass die vier Substitutionsmutanten F172W, T385A, E559A, und E563A nach IFN γ -Stimulation eine erhöhte Expressionsrate von *ccl2* aufweisen. Dieses endogene Zielgen scheint auf die intrazelluläre Konzentration an Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 sensitiver zu reagieren als die anderen getesteten Gene wie *gbp1* und *irf1*. Beide zuletzt genannten Gene besitzen je nur eine einfache reguläre GAS-Bindestelle, dahingegen weist der Promotor des *ccl2*-Gens 10 bp vor der klassischen GAS-Bindestelle ein zusätzliches TCC/GAA-Bindemotiv auf. Somit besitzt *ccl2* gewissermaßen eine anderthalbfache GAS-Bindestelle, wodurch das Gen besonders zur kooperativen DNA-Bindung geneigt zu sein scheint. Vinkemeier et al. (1996) und Xu et al. (1996) stellten fest, dass die Voraussetzung für eine effektive transkriptionelle Aktivität eine kooperative Bindung an DNA ist. Dabei binden zwei benachbarte STAT1-Dimere als tetramerer Komplex an DNA und werden über aminoterminal vermittelte Wechselwirkungen stabilisiert. Eine N-terminale Substitutionsmutante an Position 77 mit Verlust der kooperativen DNA-Bindung bzw. aufgehobenen Fähigkeit zur Oligomerisierung zeigt eine weitgehend defiziente IFN γ -vermittelte Genaktivierung (Begitt et al. 2014; Meyer et al. 2004).

Im Rahmen von EMSA-Experimenten zeigten die beiden Substitutionsmutanten E559A und E563A der Linker-Domäne eine Präferenz zur Bindung an weniger spezifische GAS-Sequenzen (Abb. 20 A). Anhand von Kompetitionsversuchen konnte eine verminderte Off-Rate von DNA ermittelt werden (Abb. 18). In Analysen der DNA-Bindung bevorzugten die STAT1-Derivate die tetramere Konformation an DNA (Abb. 17). Zum Nachweis unspezifischer DNA-Bindung erfolgte ein Pull-down-Assay, mit dem festgestellt wurde, dass die beiden Mutanten mit nach Alanin mutierten Glutaminsäurereste gegenüber dem Wildtyp-Molekül in höherem Ausmaß in DNA-gebundener Form vorliegen. Wie in Abb. 23 A und B ersichtlich, bindet E559A deutlich besser an die unspezifische Sonde 2xnonGAS als das Wildtyp-Molekül. Diese Beobachtungen

lassen darauf schließen, dass die Hyperphosphorylierung der beiden Punktmutanten das Verhältnis der STAT1-Dimere, die an transkriptionell inaktiven Stellen binden, zu denen an hoch-affinen GAS-Stellen gebundenen Molekülen erhöht. Denn nur eine begrenzte Anzahl hoch-affiner GAS-Stellen konkurriert mit vielzähligen niedrig-affinen genomischen DNA-Bereichen um die Bindung von STAT1. In der Zusammenschau der Ergebnisse bleibt die IFN γ -induzierte transkriptionelle Aktivierung von Genen mit einer singulären GAS-Bindestelle in ihrem Promotor durch die hier eingeführten Mutationen (E559A und E563A) deshalb weitgehend unbeeinflusst.

Unsere Arbeitsgruppe identifizierte bereits Glutaminsäurereste der DNA-Bindedomäne an Position 411 und 421 mit einem ähnlichen Phänotyp wie die der hier beschriebenen Glutaminsäurereste der Linker-Domäne (E559 und E563). Die Einführung der gezielten Substitutionsmutationen in der DNA-Bindedomäne von STAT1 resultierte mit einer verbesserten Bindung an DNA bei erhaltener GAS-Erkennung (Koch 2010). In der vorliegenden Kristallstruktur (Chen et al. 1998) konnte der Glutaminsäurerest 421 als Interaktionspartner der kleinen Furche der DNA ermittelt werden. Die funktionelle Gruppe von E421 steht dabei sterisch in engem Kontakt mit der Doppelhelix der DNA. Dieses mündet in die Hypothese, dass durch einen Ladungsaustausch des negativ geladenen Glutaminsäurerestes die elektrostatische Bindung zum negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA verstärkt wird. Koch et al. (2012) beschreiben die Funktion der beiden Glutaminsäurereste als eine Art internen Schalter, der mit seiner negativen Ladung im unmutierten Zustand für die schnelle Freisetzung des STAT1-Dimers von DNA fungiert. Dieses Modell lässt sich durch eine elektrostatische Abstoßungsreaktion zwischen zwei negativ geladenen Interaktionspartnern erklären. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen stützen diese Theorie, denn wie die nach Alanin substituierten Glutaminsäurereste der Linker-Domäne weisen E411A/K und E421K aufgrund einer verlängerten DNA-Bindung ein erhöhtes Phosphorylierungsniveau, eine verstärkte Kernpräsenz und eine inhibierte Dephosphorylierung auf. Zudem konnte der abstoßende Effekt als sequenzunspezifisch bewertet werden, denn die STAT1-Mutanten binden sowohl an GAS-Stellen sowie weniger affin auch an Nicht-GAS-Bindestellen. Mit der Charakterisierung dieser Substitutionsmutanten demonstrierte Koch (2010) einen simplen molekularen Mechanismus, der STAT1-Dimeren durch hohe Dissoziationskinetik zur Freisetzung von DNA verhilft, um somit erneut am Zyklus der nukleozytoplasmatischen Translokation teilnehmen zu können. Denn erst nach Dissoziation ist es STAT1-Dimeren möglich, von der Phosphatase inaktiviert zu werden

(Meyer et al. 2003) und am nukleozytoplasmatischen Shuttling teilzunehmen bzw. erneut an GAS-Stellen binden zu können.

Anhand eines kristallographischen Modells des DNA-gebundenen STAT1-Dimers (Abb. 26) zeigt sich, dass die Reste E411 und E421 in Bezug auf die DNA-Doppelhelix vorne, d. h. in Richtung der CCD lokalisiert sind, während sich E559 und E563 auf der Rückseite im carboxyterminalen Kern des STAT1-Dimers befinden. Daraus lässt sich schließen, dass die Anordnung der vier negativ geladenen Reste auf der Oberfläche eines jeden Monomers die Ausrichtung des STAT1-Dimers zur DNA erleichtert. Die DNA befindet sich in gebundenem Zustand senkrecht zur Achse des STAT1-Dimer-Konformers. Zusammenfassend haben die Analysen der vier negativ geladenen Glutaminsäurereste gezeigt, dass jeder einzelne Rest maßgeblich an der Dissoziation des DNA-gebundenen STAT1-Dimers beteiligt ist und eine Substitution von einer einzelnen dieser Positionen signifikanten Auswirkungen auf den zeitlichen Verlauf der Signaltransduktion von STAT1 hat.

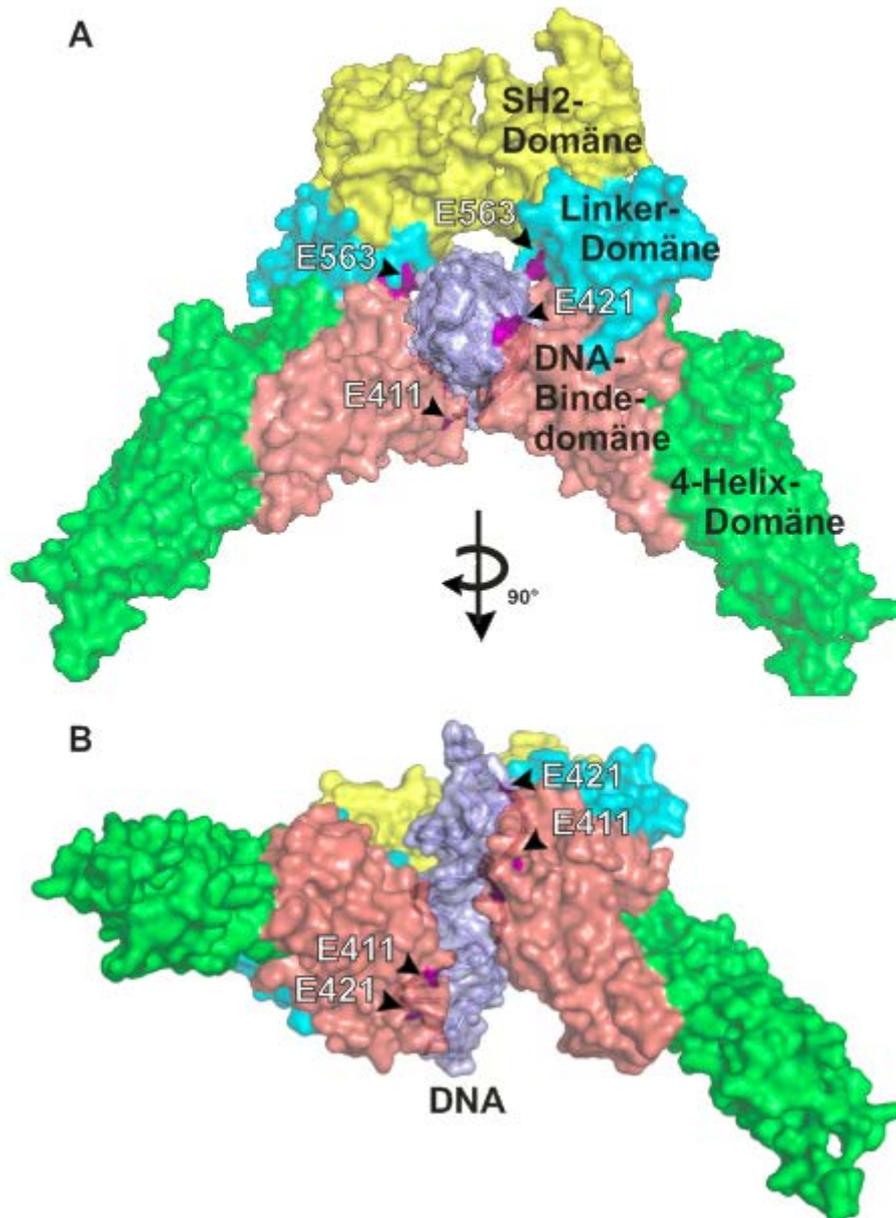


Abb. 26: Eine Anordnung von oberflächenexponierten Glutaminsäureresten richtet das STAT1-Dimer zur DNA aus. Das Modell zeigt die Lokalisationen der Aminosäurereste (in Magenta markiert) an der Oberfläche des, mit der DNA komplexierten, STAT1-Dimers. In Abb. 26 A wird die axiale und in B die frontale Orientierung der beiden Monomere zur DNA-Doppelhelix (in Grau) dargestellt.

Die dritte der in dieser Arbeit analysierten Mutanten der STAT1-Linker-Domäne befindet sich an Position 567 des STAT1-Proteins. Dieser hochkonservierte Lysinrest wurde ebenso durch sequenzspezifische Mutagenese nach Alanin substituiert und dessen Auswirkungen untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Untersuchung von K567A demonstrieren, dass diese Mutation keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsniveau (Abb. 10 und Abb. 11) sowie die Anreicherung

von STAT1 im Zellkern hat (Abb. 13 und Abb. 14). Interessanterweise zeigt die Punktmutante K567A jedoch in EMSA-Experimenten eine niedrig-affine bis nahezu keine Bindung an singuläre GAS-Bindestellen (Abb. 15 A, B und Abb. 17 A). In Kompetitionsversuchen (Abb. 20 B) lässt sich dieses Ergebnis möglicherweise durch die Präsenz eines hochmolaren Überschusses des unspezifischen Kompetitors Poly-dIdC erklären, mit dem K567A möglicherweise sequenzunspezifisch in Interaktion tritt.

Im Vergleich zur Dephosphorylierungskinetik des WT-Moleküls ist die DNA-gebundene Punktmutante an Position 567 vor Inaktivierung durch die Phosphatase TC45 geschützt; dies lässt sich anhand des *In-vitro*-Dephosphorylierungs-Assays in Abb. 22 nachweisen. Hier zeigt sich in Gegenwart von DNA eine anhaltende Phosphorylierung von K567A trotz Exposition durch die Phosphatase. Zum Nachweis von STAT1-DNA-Interaktionen wurde ein Pull-down-Assay mit biotinylierten Oligonukleotiden durchgeführt, in dem gezeigt werden konnte, dass durch die Substitution von Lysin nach Alanin das STAT1-Protein besser an unspezifischer DNA in Form von degenerierten GAS-Stellen bindet als im unmutierten Zustand (Abb. 23). Allerdings besteht kein signifikanter Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer DNA-Bindung von K567A (Abb. 23 B). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die K567A-Mutante nicht grundsätzlich in ihrer Interaktion zur DNA beeinträchtigt ist, sondern ihre Sequenzspezifität für GAS-Sonden partiell verloren hat. Der nach Alanin substituierte Lysinrest erschwert somit die GAS-Erkennung und führt zu einem praktisch vollständigen Verlust der transkriptionellen Zielgenaktivierung. Im Reporteragen-Assay mit dem synthetischen 3xLy6E-Promotor zeigt sich das supprimierte Zytokin-induzierte Transaktivierungspotential der Punktmutante K567A (Abb. 24). Bei weiterer Prüfung der Genaktivierung mittels Real-time PCR ließ sich das Ergebnis der signifikant inhibierten Genexpression bestätigen. Abb. 25 zeigt das Aktivierungspotential von endogenen STAT1-Zielgenen (*gbp1*, *irf1*, *mig1* und *ccl2* sowie die Kontrolle der Expressionsrate *stat1*) durch die verschiedenen Substitutionsmutanten.

Im Gegensatz zu den invarianten Glutaminsäureresten an Position 559 und 563, die als negativ geladener Stützpfiler für die räumliche Anordnung des DNA-Moleküls fungieren, präsentiert sich die positiv geladene Seitenkette des unmutierten Lysinrestes 567 als entscheidender Faktor für eine hoch-affine GAS-Bindung des STAT1-Proteins. Nach GAS-Bindung scheint die terminale Aminogruppe von K567 die DNA in eine für die Genaktivierung bevorzugte Position zu bringen, indem sie mit einem Phosphat-

Rest des DNA-Rückgrates interagiert und sich dadurch mutmaßlich die helikale Struktur der DNA verändert. Sicherlich werden weitere Experimente die Bedeutung der in der Linker-Domäne lokalisierten Promotor-Erkennung für transkriptionelle Ereignisse in einem physiologischen Kontext klären können.

5. Zusammenfassung

STAT-Proteine (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription) haben eine essentielle Rolle in einem der ältesten und hochkonservierten Signaltransduktionswege, dem JAK-STAT-Signaltransduktionsweg. Sie leiten die an der Plasmamembran ankommenden Signale vieler Zytokine bis in den Zellkern weiter und bewirken dort eine Modulation der Genexpression. Dadurch sind sie an der Vermittlung von Prozessen wie dem Zellwachstum und der Immunantwort beteiligt. Ein Kennzeichen der Geninduktion der STAT-Proteine ist die Bindung an spezifische Palindrom-Sequenzen, bezeichnet als Gamma-aktivierte Stellen (GAS). Da jedoch der genaue Mechanismus der signalabhängigen Zielgenerkennung durch Tyrosin-phosphorylierte STAT-Dimere nicht sehr umfassend untersucht ist, wurden in dieser Arbeit durch gerichtete Mutagenesen nach Alanin Aminosäureaustausche in der STAT1-Linker- sowie der -DNA-Bindedomäne generiert und diese funktionell charakterisiert. Die drei Aminosäurereste der STAT1-Linker-Domäne (E559, E563 und K567) befinden sich auf einem unter den sieben humanen STAT-Proteinen hochkonservierten Sequenzmuster, auf dem oberflächliche Reste in unmittelbarer Nähe zur gebundenen DNA lokalisiert sind. Die Substitutionsmutation des konservierten Lysinrests in Position 567 führte zum Verlust der spezifischen Bindung an hoch-affinen GAS-Stellen, wie auch zum Verlust der Transaktivierung von endogenen Zielgenen in IFN γ -stimulierten Zellen, während sich der zeitliche Verlauf transienter Kernakkumulation und Tyrosin-Phosphorylierung nicht vom Wildtyp-Molekül unterschieden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Lysinrest in Position 567 der STAT1-Linker-Domäne für die sequenzspezifische GAS-Erkennung erforderlich ist. Demgegenüber konnte nachgewiesen werden, dass zwei Glutaminsäurereste an den Positionen E559 und E563 auf jedem Protomer für die Dissoziation der STAT1-Dimere von der DNA wichtig sind. Die Mutagenese der Glutaminsäurereste führt zu einer erhöhten Rate an Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 sowie zu einer verlängerten IFN γ -stimulierten Anreicherung im Zellkern. Die Charakterisierung der nach Alanin substituierten Punktmutante K350A der STAT1 DNA-Bindedomäne dagegen erbrachte bei einem im Vergleich zum Wildtyp ähnlichen Phänotyp keine weiteren Aufschlüsse über molekulare Mechanismen der signalabhängigen Zielgenerkennung bzw. DNA-Bindung.

Zusammenfassend bestätigen die Daten einen Einfluss der Linker-Domäne auf die Kinetik der signalabhängigen GAS-Bindung durch die Anordnung der an der Innenfläche des STAT1-Dimers lokalisierten Glutaminsäurereste E559 und E563. Die zwei Glutaminsäurereste befinden sich an der Längsachse des STAT1-Dimers senkrecht zur DNA ausgerichtet. Durch ihre Anordnung scheinen sie die Wechselwirkung zwischen dem Lysinrest 567 und dem Phosphodiester-Rückgrat eines gebundenen GAS-Elementes zu erleichtern und stellen dadurch die Voraussetzung für eine transiente Geninduktion her.

Summary

STAT proteins (signal transducers and activators of transcription) play an essential part in one of the oldest and highly conserved signal transduction pathways. The JAK-STAT pathway transmits signals from many cytokines arriving at the plasma-membrane to the cell nucleus, resulting in a modulation of gene expression. STATs are involved in a variety of processes such as cell growth and immune responses. A key feature in gene induction by STAT proteins is the binding to specific palindrome sequences, known as gamma-activated sites (GAS). Since the exact mechanisms of signal-dependent target recognition by tyrosine-phosphorylated STAT have not yet been thoroughly investigated, directed mutagenesis was used in this study to introduce point mutations in the STAT1 linker and DNA-binding domain. The resulting mutants were characterized functionally. Results showed that three critical amino acid residues in the STAT1 linker domain (E559, E563 and K567) are located in a homologous sequence pattern which is highly conserved among the seven STAT human proteins. Furthermore, these superficially exposed residues are located in close proximity to the bound DNA helix. Substitution of the conserved lysine residue at position 567 resulted in a loss of specific binding to high-affinity GAS sites, as well as a complete lack in the transactivation of IFN γ -regulated endogenous target genes. However, the time course of transient nuclear accumulation and tyrosine phosphorylation did not differ from the kinetics of the wild-type molecule. These results demonstrated that the lysine residue at position 567 of the STAT1 linker domain is required for GAS recognition. In addition, two glutamic acid residues at position E559 and E563 are important for the dissociation of the STAT1 dimer from DNA. The substitution of the glutamic acid residues led to an increased rate of tyrosine phosphorylation as well as prolonged cytokine-stimulated

nuclear accumulation in IFN γ -treated cells. The point mutant K350A in the STAT1 DNA-binding domain did not provide any further information about molecular mechanisms of signal-dependent target gene recognition, since the mutant did not differ from the wildtype protein.

In conclusion, the data confirm the impact of the linker domain on signal-dependent GAS binding mediated by the steric arrangement of the glutamic acid residues E559 and E563 located on the inner surface of the STAT1 dimer. The two glutamic acid residues are aligned perpendicular to the DNA on the longitudinal axis of the STAT1 dimer. By this arrangement, the residues seem to facilitate the interaction between the lysine residue 567 and the phosphodiester backbone of the bound GAS element, thereby establishing the prerequisite for transient gene induction.

6. Literaturverzeichnis

- Adam SA, Marr RS, Gerace L (1990): Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* 111, 807-816
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD (1997): The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 563-591
- Barillas-Mury C, Han Y-S, Selley 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, 959-967
- Becker S, Groner B, Müller CW (1998): Three-dimensional structure of the Stat3b homodimer bound to DNA. *Nature* 394, 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, 10418-10423
- Begitt A, Droscher M, Meyer T, Schmid CD, Baker M, Antunes F, Knobloch KP, Owen MR, Naumann R, Decker T, Vinkemeier U (2014): STAT1-cooperative DNA binding distinguishes type 1 from type 2 interferon signaling. *Nat Immunol* 15, 168-176
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997): Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 15, 749-795
- Bolten JC: Die Rolle der Linker-Domäne von STAT1 bei der Regulation transkriptioneller Antworten im Interferon-Signalweg. Med. Diss. Göttingen 2013
- Brivanlou AH, Darnell JE Jr (2002): Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-818
- 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, 378-384
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Kuriyan J (1998): Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827-839
- 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, 1803-1805
- Clemens MJ (2003): Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 23, 277-292

- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA 69, 2110-2114
- Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JI, Jenkins NA (1995): Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. Genomics 29, 225-228
- Darnell JE (1997): STATs and gene regulation. Science 277, 1630-1635
- Darnell JE, Kerr IM, Stark GR (1994): Jak-STAT pathways and transkriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science 264, 1415-1421
- Decker T, Kovarik P (2000): Serine phosphorylation of STATs. Oncogene 19, 2628-2637
- 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, 121-134
- Drozina G, Kohoutek J, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM (2005): Expression of MHC II genes. Curr Top Microbiol Immunol 290, 147-170
- Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE (1991): Three-dimensional structure of recombinant human interferon- γ . Science 252, 698-702
- Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, Bucher P (2001): DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. J Biol Chem 276, 6675-6688
- Evinger M, Rubinstein M, Pestka S (1981): Antiproliferative and antiviral activities of human leukocyte interferons. Arch Biochem Biophys 210, 319-329
- Fagerlund R, Melen K, Kinnunen L, Julkunen I (2002): Arginine/Lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and Importin α 5. J Biol Chem 277, 30072-30078
- Fahrenkrog B, Köser J, Aebi U (2004): The nuclear pore complex: a jack of all trades? Trends Biochem Sci 29, 175-182

- Fu XY, Schindler C, Imbrota T, Aebersold R, Darnell JE (1992): The proteins of ISGF-3, the interferon α -induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7840-7843
- Görlich D, Kutay U (1999): Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-660
- Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD (1994): Ligand-induced IFN γ receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* 13, 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, 677-687
- Haspel RL, Darnell JE (1999): A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10188-10193
- Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE (1996): The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 15, 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, 160-167
- Horvath CM (2000): STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 25, 496-502
- Horvath CM, Wen Z, Darnell JE (1995): A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9, 984-994
- Ihle JN (2001): The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 13, 211-217
- Isaacs A, Lindenmann J (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267
- 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. *Nature* 9, 1140-1146
- John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell JE, Leonard WJ (1999): The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat 5. *Mol Cell Biol* 19, 1910-1918

- 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, 909-916
- Koch V: Molekulare Mechanismen bei der Zielgenerkennung und -aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1. Nat. wiss. Diss. Marburg 2010
- Koch V, Staab J, Ruppert V, Meyer T (2012): Two glutamic acid residues in the DNA-binding domain are engaged in the release of STAT1 dimers from DNA. *BMC Cell Biol* 13, 22
- Koerner C, Guan T, Gerace L, Cingolani G (2003): Synergy of silent and hot spot mutations in importin b reveals a dynamic mechanism for recognition of a nuclear localization signal. *J Biol Chem* 278, 16216-16221
- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG (1998): Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-707
- Kypta RM, Hemming A, Courtneidge SA (1988): Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J* 7, 3837-3844
- Langer JA, Pestka S (1988): Interferon receptors. *Immunol Today* 9, 393-400
- Lefèvre F, Boulay V (1993): A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy. *J Biol Chem* 268, 19760-19768
- Levy DE, Darnell JE (2002): Stats: Transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662
- Lim CP, Cao X (2006): Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2, 536-550
- Litterst CM, Pfizner E (2001): Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. *J Biol Chem* 276, 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, 10626-10631
- Liu X, Quinn AM, Chin YE, Fu XY (1999): STAT genes found in *C. elegans*. *Science* 285, 167

- 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, 43087-43099
- Macara IG (2001): Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 570-594
- Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W (1996): Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14, 301-331
- Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE, Chen X (2005): Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* 17, 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, 823-833
- Marg A, Meyer T, Vigneron M, Vinkemeier U (2008): Microinjected antibodies interfere with protein nucleocytoplasmic shuttling by distinct molecular mechanisms. *Cytometry Part A* 73A, 1128-1140
- Mattaj JW, Engelmeier L (1998): Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306
- Mayer BJ, Hanafusa H (1990): Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine-containing proteins and protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 2638-2642
- Mayer BJ, Jackson PK, Baltimore D (1991): The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 627-631
- McBride K, Banninger G, McDonald C, Reich NC (2002): Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *EMBO J* 21, 1754-1763
- Mertens C, Zhong M, Krishnaraj R, Zou W, Chen X, Darnell JE (2006): Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev* 20, 3372-3381

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

Meyer T, Vinkemeier U (2010): Assessing sequence-specific DNA binding and transcriptional activity of STAT1 transcription factor. *Methods Mol Biol* 647, 139-13526

Meyer T, Begitt A, Lödige I, van Rossum M, Vinkemeier U (2002): Constitutive and IFN- γ -induced nuclear import of Stat1 proceed through independent pathways. *EMBO J* 21, 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, 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, 18998-19007

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

Müller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthun BA, Schindler C, Pellegrini S, Wilks AF, Ihle JN, Stark GR, Kerr IM (1993): The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- α/β and - γ signal transduction. *Nature* 366, 129-135

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

Nigg E (1997): Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787

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, 352-370

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- γ target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5208-5213

- Pascal A, Riou JF, Carron C, Boucaut JC, Umbhauer M (2001): Cloning and developmental expression of STAT5 in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 106, 171-174
- Paulillo SM, Phillips EM, Koser J, Sauder U, Ullman KS, Powers MA, Fahrenkrog B (2005): Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J Mol Biol* 351, 784-798
- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004): Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004): The Jak/STAT signaling pathway. *J Cell Science* 117, 1281-1283
- Roberts RM, Cross JC, Leaman DW (1991): Unique features of the trophoblast interferons. *Pharmacol Ther* 51, 329-345
- Rout MP, Aitchison JD, Magnasco MO, Chait BT (2003): Virtual gating and nuclear transport: the (w)?hole picture. *Trends Cell Biol* 13, 622-628
- Schaefer T, Sanders L, Nathans D (1995): Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3b, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9097-9101
- Schindler C, Darnell JE (1995): Transcriptional responses to polypeptide ligands: The Jak-STAT-Pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651
- Schindler C, Plumlee C (2008): Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19, 311-318
- Schindler C, Fu XY, Improta T, Aebersold R, Darnell JE (1992a): Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon α . *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7836-7839
- Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE (1992b): Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 257, 809-813
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004): Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189
- Sehgal PB (2008): Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol* 19, 329-340

- 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, 7067-7077
- Senda T, Shimazu T, Matsuda S, Kawano G, Shimizu H, Nakamura KT, Mitsui Y (1992): Three-dimensional crystal structure of rekombinant murine interferon- β . *EMBO J* 11, 3193-3201
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4, 63-68
- Shuai K (2000): Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638-2644
- Shuai K, Liu B (2005): Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 593-605
- Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE (1992): Activation of transcription by IFN- γ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258, 1808-1812
- Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE (1993a): A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science* 261, 1744-1746
- Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE (1993b): Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 336, 580-583
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Quereshi SA, Cowburn D, Darnell JE (1994): Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821-828
- Soler-Lopez M, Petosa C, Fukuzawa M, Ravelli R, Williams JG, Müller CW (2004): Structure of an activated Dictyostelium STAT in its DNA-bound form. *Mol Cell* 13, 791-804
- Speil J, Baumgart E, Siebrasse JP, Veith R, Vinkemeier U, Kubitscheck U (2011): Activated STAT1 transcription factors conduct distinct saltatory movements in the cell nucleus. *Biophys J* 101, 2592-2600

Staab J: Molekulare Determinanten der Dephosphorylierung und Genaktivierung des Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 1. Nat. wiss. Diss. Marburg 2011

Staab J, Herrmann-Lingen C, Meyer T (2013): Clinically relevant dimer interface mutants of STAT1 transcription factor exhibit differential gene expression. PLoS One 8, e69903

Starr R, Hilton DJ (1999): Negative regulation of the JAK/STAT pathway. BioEssays 21, 47-52

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

Sung S-C, Fan T-J, Chou C-M, Leu J-H, Hsu Y-L, Chen S-T, Hsieh Y-C, Huang C-J (2003): Genomic structure, expression and characterization of a STAT5 homologue from pufferfish. Eur J Biochem 270, 239-252

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

Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE (1996): DNA binding of *in vitro* activated Stat1 α , Stat1 β and truncated Stat1: interaction between NH₂-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. EMBO J 15, 5616-5626

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

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

Weis K (1998): Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. TIBS 23, 185-189

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE (1995): Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell 82, 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, 9238-9243

Wente S, Rout M (2010): The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000562

Williams JG (1999): Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends Biochem Sci* 24, 333-334

Wormald S, Hilton DJ (2004): Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Bio Chem* 279, 821-824

Wu TR, Hong YK, Wang X-D, Ling MY, Dragoi AM, Chung AS, Campbell AG, HanZ-Y, Feng G-S, 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, 47572-47580

Xu X, Sun YL, Hoey T (1996): Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 271, 794-797

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

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

Yang E, Henriksen M, Schaefer O, Kakharova N, Darnell JE (2002): Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a Stat1 linker mutant. *J Biol Chem* 277, 13455-13462

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

Zhang JJ, Zhao Y, Chait BT, Lathem WW, Ritzi M, Knippers R, Darnell JE (1998): Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1 α in IFN- γ -induced transcriptional activation. *EMBO J* 17, 6963-6971

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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in: Hüntelmann B, Staab J, Herrmann-Lingen C, Meyer T (2014) A Conserved Motif in the Linker Domain of STAT1 Transcription Factor Is Required for Both Recognition and Release from High-Affinity DNA-Binding Sites. PLoS ONE 9(5): e97633. doi:10.1371/journal.pone.0097633.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. mult. Thomas Meyer. Die Möglichkeit, unter seiner Leitung eine experimentelle Dissertation zu verfassen, hat mich nicht nur an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt, sondern mich darüber hinaus Einblick in diesen hochinteressanten Teil der Grundlagenforschung erhalten lassen. Neben seiner immerwährenden wissenschaftlichen Betreuung und fachlichen Hilfestellung verdanke ich den Erfolg dieser Arbeit auch seinen motivierenden Anregungen und einer, im besten Sinne, unermüdlischen Bereitschaft zur Diskussion. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Übernahme des Erstgutachtens meiner Dissertation bedanke ich mich vielmals.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Christoph Hermann-Lingen für das wissenschaftliche Engagement und sein Interesse an meiner Promotionsarbeit.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Julia Staab für die tatkräftige Unterstützung bei den Real-time-Experimenten und die gute Einarbeitung in die Laborarbeit.

Zudem möchte ich mich im besonderen Maße bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Anke Gregus und Heike Hühn bedanken. Ihre geduldige und zuverlässige Hilfe hat die experimentelle Arbeit erst möglich gemacht und die stete Freundlichkeit den gemeinsamen Laboralltag sehr bereichert.

Den Arbeitsgruppen der Abteilung "Neurodegeneration, Neuroimmunology/IMSF und Neurophysiology" danke ich für die Möglichkeit der Nutzung ihrer Laborgeräte.

Lebenslauf

Mein Name ist Bettina Hüntelmann, geboren am 05. Juli 1984 in Lippstadt als eines von vier Kindern der Eheleute Bernhard und Anna Maria Hüntelmann.

Im Jahr 2001 erlangte ich die Fachoberschulreife an der Graf-Bernhard-Realschule in Lipperode und begann Ende 2001 meine Ausbildung zur Physiotherapeutin an der Westfalen-Akademie in Lippstadt. Diese beendete ich nach drei Jahren mit einer staatlich anerkannten Abschlussprüfung erfolgreich.

Nachdem ich anschließend eine Fortbildung in Manueller Lymphdrainage absolvierte, trat ich im Dezember 2004 meine erste Stelle als staatlich anerkannte Physiotherapeutin im Marienhospital Oelde an.

2005 entschied ich mich, die Allgemeine Hochschulreife zu erlangen. Neben meiner beruflichen Tätigkeit als Physiotherapeutin besuchte ich das Abendgymnasium in Lippstadt und absolvierte 2008 das Abitur.

Mit dem Sommersemester 2009 nahm ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Während des Studiums war ich weiterhin als Physiotherapeutin tätig und arbeitete über die Praxis Vitalis in Göttingen in einem Seniorenzentrum und betreute dort einen eigenen Patientenstamm.

Im Rahmen des Studiums konnte ich durch meine Famulaturen in der Inneren Medizin, der Chirurgie sowie der Psychosomatischen Medizin und Psychotherapie erste Erfahrungen in der klinischen Praxis sammeln. Ebenso war ich im Maßregelvollzugszentrum in Moringen (Niedersachsen) im Bereich Forensische Psychiatrie und Psychotherapie und in der Ambulanz für Schmerzbehandlung der Universitätsmedizin Göttingen als Famulantin tätig.

Das erste Tertial meines Praktischen Jahres absolvierte ich in der Chirurgischen Klinik des Städtischen Klinikums Lüneburg, in dem ich heute als Assistenzärztin tätig bin. Entsprechend meinem Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe habe ich das zweite Tertial im Rotkreuzklinikum in München verbracht und das Praktische Jahr mit dem dritten Tertial an meiner Heimatuniversität in Göttingen im Bereich Innere Medizin abgeschlossen.

Im Juli 2012 begann ich mit dem experimentellen Teil meiner Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. mult. Thomas Meyer im Labor für Molekulare Psychokardiologie

in der Abteilung Psychosomatische Medizin und Psychotherapie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

Mein Studium der Humanmedizin habe ich im Herbst 2015 mit Erfolg abgeschlossen und begann im Anschluss meine Assistenzarztzeit in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie im Städtischen Klinikum Lüneburg.