

Aus der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie

(Prof. Dr. med. C. Hermann-Lingen)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Reevaluation der potenziell onkogenen,  
Lymphom-assoziierten Missense-  
Mutation D427H im STAT3-Molekül**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lena Sophie Behrendsen

aus

Flensburg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

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

Kobetreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. S. Lutz

### **Prüfungskommission**

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

Koreferent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Reevaluation der potenziell onkogenen, Lymphom-assoziierten Missense-Mutation D427H im STAT3-Molekül" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
Lena Sophie Behrendsen

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion der STAT-Proteine.....	1
1.2 Der JAK/STAT-Signalweg.....	4
1.3 Zytokininduzierte Aktivierung von STAT-Proteinen .....	8
1.4 Charakteristika von STAT3 .....	9
1.5 Onkogene STAT3-Mutationen .....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Material.....	12
2.1.1 Humane Zelllinien.....	12
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	12
2.1.3 Wasser .....	15
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	15
2.1.5 Enzyme, Plasmide und Zytokine .....	18
2.1.6 Reaktions-Kits.....	20
2.1.7 Antikörper .....	20
2.1.8 Primer und Oligonukleotide.....	21
2.1.9 Bakterienstämme und Medien.....	22
2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 STAT3-Mutagenese .....	25
2.2.2 Isolation und Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	26
2.2.3 Amplifikation der Plasmid-DNA.....	27
2.2.4 Zellkulturmethoden .....	27
2.2.5 Transfektion von Säugetierzellen.....	29
2.2.6 Stimulation von Säugetierzellen .....	29
2.2.7 Proteinextraktion.....	29
2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse.....	30
2.2.9 Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA).....	32
2.2.10 Luciferase-Reportergen-Assay.....	33
2.2.11 Real-time PCR.....	34
2.2.12 Fluoreszenzanalysen.....	35
2.2.13 Statistische Analysen.....	37
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
3.1 Kristallographische Darstellung der zwei Aminosäurereste F174 und D427 im STAT3-Molekül .....	38
3.2 Normale Phosphorylierungskinetik von STAT3-D427H im Vergleich zum WT-Molekül .....	40

---

3.3	Normale Kinetik der induzierbaren Kernakkumulation von STAT3-D427H.....	43
3.4	Immunzytochemische Darstellung der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von D427H in STAT3-exprimierenden U34A- und HeLa-Zellen.....	47
3.5	Transkriptionelle Aktivität der F174A- und D427H-Mutanten im Luciferase-Reportergen-Assay .....	50
3.6	Gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT .....	51
3.7	Regelmäßige Zielgenaktivierung der STAT3-D427H-Mutante und des WT-Moleküls ...	53
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über den JAK/STAT-Signalweg .....	7
Abbildung 2: Kristallstruktur eines parallel angeordneten, DNA-gebundenen STAT3-Dimers .....	39
Abbildung 3: Kristallstruktur eines STAT3-Dimers in antiparalleler Konformation.....	39
Abbildung 4: Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül in transient transfizierten U3A-Zellen nach IFN $\gamma$ -Stimulation .....	40
Abbildung 5: Fehlende signifikante Hyperphosphorylierung der STAT3-D427H-Mutante im Unterschied zu F174A in IL-6-stimulierten U3A-Zellen .....	41
Abbildung 6: Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-D427H im Vergleich zum Wildtyp-Molekül in IFN $\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen .....	42
Abbildung 7: Korrespondierende Kernakkumulation von STAT3-D427H und dem WT-Molekül in IFN $\gamma$ -stimulierten U3A-Zellen bei vorzeitiger Kernakkumulation der F174A-Mutante .....	44
Abbildung 8: Vergleichbares nukleäres Akkumulationsverhalten der D427H-Mutante und des STAT3-WT in transient transfizierten U3A-Zellen nach IL-6-Stimulation .....	45
Abbildung 9: STAT3-D427H zeigt eine dem WT-Molekül entsprechende Kernakkumulation in IFN $\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen .....	46
Abbildung 10: Immunzytochemischer Nachweis der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-D427H und STAT3-F174A im Vergleich zum Wildtyp-Molekül in IFN $\gamma$ -stimulierten U3A-Zellen .....	48
Abbildung 11: Zeitabhängigkeit der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-WT sowie den Mutanten D427H und F174A in IL-6-stimulierten U3A-Zellen .....	49
Abbildung 12: Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-WT sowie den Mutanten D427H und F174A in IFN $\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen .....	50
Abbildung 13: Erhöhte transkriptionelle Aktivität im Luciferase-Reportergen-Assay von STAT3-D427H und -F174A verglichen mit dem WT-Molekül in IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-stimulierten U3A-Zellen .....	51
Abbildung 14: Gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül in transient transfizierten U3A-Zellen nach IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-Stimulation .....	52
Abbildung 15: Regelmäßige Genexpression von IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-induzierten Zielgenen durch die STAT3-Punktmutanten D427H und F174A in transient transfizierten U3A-Zellen .....	54
Abbildung 16: Alternative Kristallstruktur eines parallel angeordneten STAT3-Dimers .....	57
Abbildung 17: Kristallographische Darstellung der Interaktionsflächen eines STAT1-Dimers mit DNA .....	58
Abbildung 18: Oberflächenstruktur eines DNA-gebundenen STAT1-Moleküls .....	59

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Chemikalien und Reagenzien .....	14
Tabelle 2: Bezeichnungen und Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen.	18
Tabelle 3: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Enzyme.....	18
Tabelle 4: Bezeichnungen, Beschreibungen und Hersteller der verwendeten STAT3-Plasmide .....	19
Tabelle 5: Bezeichnungen, Beschreibungen und Hersteller der für Reporter-Gen-Assays genutzten Plasmide.....	19
Tabelle 6: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Zytokine .....	19
Tabelle 7: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Reaktions-Kits.....	20
Tabelle 8: Bezeichnungen, Hersteller und Konzentrationen der verwendeten Antikörper .....	20
Tabelle 9: Gene und Sequenzen der verwendeten Mutageneseprimer .....	21
Tabelle 10: Gen und Sequenz des verwendeten Sequenzierungsprimers.....	21
Tabelle 11: Gene und Sequenzen der für RT-PCRs genutzten Primer .....	21
Tabelle 12: Bezeichnungen und Sequenzen der Oligonukleotid-Sonden für EMSA .....	22
Tabelle 13: Verwendete Bakterienstämme und Hersteller.....	22
Tabelle 14: Bezeichnungen, Zusammensetzungen, pH-Werte und Hersteller der verwendeten Zellkulturmedien.....	23
Tabelle 15: Bezeichnungen und Hersteller der zur Herstellung von Vollmedien genutzten Medien .....	23
Tabelle 16: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Geräte .....	24
Tabelle 17: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 18: Ablauf der Zyklen der PCR.....	26
Tabelle 19: Reaktionsschritte der Real-time PCR.....	34

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β-Gal	Beta-Galaktosidase
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cystein
CCD	Coiled-coil-Domäne
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIS	<i>cytokine-inducible SH2-containing protein</i>
CRM-1	<i>chromosome region maintenance-1</i>
D	Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Elektromobilitäts-Shift-Assay
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FATHMM	<i>functional analysis through hidden markov models</i>
FCS	Fetales Kälberserum
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma-aktivierte Stelle
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
gp130	Glykoprotein 130 kDa
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin



---

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- $\alpha$ / $\beta$ -Rezeptor
IFNGR	Interferon- $\gamma$ -Rezeptor
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
KCl	Kaliumchlorid
LB	Lysogenie-Brühe (engl.: <i>lysogeny broth</i> )
LD	Linker-Domäne
M	Methionin
mAb	Monoklonaler Antikörper (engl.: <i>monoclonal antibody</i> )
MeOH	Methanol
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> )
N	Asparagin
ND	Amino-terminale Domäne
NES	Nukleäres Exportsignal
NKTL	NK/T-Zell-Lymphom
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPC	Nukleärer Porenkomplex
ONPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT (engl.: <i>protein inhibitor of activated STAT</i> )
Poly-dIdC	<i>poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)acid</i>
pSTAT	Phosphoryliertes STAT
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B

---

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
SC	Pefabloc
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	Src-Homologie-2
SHP-1	Protein-Tyrosin-Phosphatase-1
SHP-2	Protein-Tyrosin-Phosphatase-2
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SOCS	Suppressor des Zytokin-Signalweges (engl.: <i>suppressor of cytokine signaling</i> )
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
T-Zelle	Thymus-Lymphozyt
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween
Tc45	T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T-LGL	T-Zell-Leukämie mit großen granulären Lymphozyten (engl.: <i>T-cell large granular lymphocyte leukaemia</i> )
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
V	Valin
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der STAT-Proteine

Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) sind eine Gruppe von zytokinregulierten Transkriptionsfaktoren, die zahlreiche proliferative sowie immunologische Prozesse in Zellen initiieren und beeinflussen (Levy und Darnell 2002). STAT1-Proteine sind beispielsweise an der Hochregulation vielfältiger Effektormechanismen in Immun- und Nicht-Immunzellen zur Kontrolle verschiedenster Infektionen beteiligt. Hierbei sind sie essenziell für die direkte Aktivierung zahlreicher Immuneffektor-Gene. Aus diesem Grund weisen Menschen mit einer Änderung der Primärstruktur im STAT1-Molekül, zum Beispiel durch Nonsense- oder Missense-Mutationen, häufig eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle oder virale Infektionen auf.

Es sind nach heutigem Kenntnisstand mindestens sieben verschiedene, evolutionär hochkonservierte humane STAT-Proteine bekannt, namentlich STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Durch den Prozess des alternativen Spleißens, bei dem funktionell abweichende STAT-Isoformen gebildet werden können, wird die Variation der einzelnen Proteine innerhalb der STAT-Familie erhöht. Im Rahmen von Spleißvorgängen entstehen zum Beispiel im STAT1-Molekül aus derselben DNA-Sequenz die beiden sich in Länge und Funktion unterscheidenden STAT1-Isoformen STAT1- $\alpha$  und STAT1- $\beta$  (Schindler et al. 1992; Horvath 2000). Die kodierenden Gene für die unterschiedlichen STAT-Proteine befinden sich auf drei verschiedenen Chromosomen. Auf Chromosom 2 (Banden q12 bis q33) sind die Gene von STAT1 und STAT4, auf Chromosom 12 (Banden q13 bis q14-1) die von STAT3, STAT5A und STAT5B und auf Chromosom 17 (Banden q11-1 bis q22) die von STAT2 und STAT6 lokalisiert (Darnell 1997). Die Proteine bestehen aus jeweils 750 - 850 Aminosäuren und ihr Molekulargewicht liegt zwischen 80 - 113 kDa (Darnell 1997; Levy und Darnell 2002). Sie sind vorrangig zytosolisch lokalisiert; es findet jedoch ein kontinuierlicher Austausch zwischen Nukleus und Zytoplasma statt. Die STAT-Aktivierung erfolgt durch verschiedene extrazelluläre Signalmoleküle, darunter Interferone, Interleukine, bestimmte Wachstumsfaktoren und einige Hormone.

Die verschiedenen STAT-Proteine können als Monomere, Homo- bzw. Heterodimere oder in tetrameren Komplexen vorliegen. Die in der Literatur vorhandenen Kristallstrukturen zeigen, dass es zwei unterschiedliche Konformationsmöglichkeiten von STAT-Dimeren gibt.

Zum einen existiert eine parallele Konformation, bei der die beiden zentralen Molekülbereiche parallel ausgerichtet sind und die Transaktivierungsdomänen der beiden Monomere folglich auf der gleichen Seite liegen. Hier liegen die Protomere so dicht beieinander, dass ihre SH2-Domänen und Transaktivierungsdomänen untereinander interagieren können. Andererseits gibt es die antiparallele Konformation, bei der die beiden zentralen Molekülbereiche antiparallel ausgerichtet sind und sich die Transaktivierungsdomänen der beiden Monomere auf gegenüberliegenden Seiten befinden. Diese Konformation wird durch reziproke Wechselwirkungen der Coiled-coil-Domäne und DNA-Bindedomäne der beiden Protomere stabilisiert. Außerdem sind die beiden Aminotermini an der Stabilisierung des antiparallelen Dimers beteiligt (Vinkemeier et al. 1996; Vinkemeier et al. 1998; Chen et al. 2003). Für die stetig erfolgende Oszillation zwischen paralleler und antiparalleler Konformation existieren zwei mögliche Modelle. Entweder erfolgt eine Dissoziation und Reassoziierung der beiden Monomere oder es bleibt während des Konformationswechsels eine Bindung zwischen den beiden N-terminalen Domänen erhalten, um die die Monomere rotieren (Mertens et al. 2006). Durch Zytokinstimulation kommt es zu einer hohen Konzentration phosphorylierter, paralleler STAT-Dimere, die am Zyklus des JAK/STAT-Signalweges partizipieren.

Transkriptionell aktive STAT-Proteine zeigen einen modularen Domänenaufbau mit sechs funktionellen Domänen. Dieser ist bei allen Mitgliedern der STAT-Familie in ähnlicher Weise vorhanden, obwohl sie innerhalb der ersten 700 Aminosäuren nur eine Sequenzhomologie von 28-40% aufweisen (Schindler und Darnell 1995; Levy und Darnell 2002). Sie bestehen aus einer N-terminalen Domäne (ND), einem konservierten zentralen Fragment und einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD). Das zentrale Fragment setzt sich zusammen aus einer DNA-Bindedomäne (DBD), gefolgt von einer Linker- (LD), einer Src-Homologie-2- (SH2D) und einer Coiled-coil-Domäne (CCD) (Levy und Darnell 2002). Die N-terminale Domäne und die Transaktivierungsdomäne sind mit dem zentralen Fragment über flexible Linker verbunden, von denen der C-terminale Linkerbereich den konservierten Tyrosin-Rest beherbergt. Die größte Sequenzhomologie weisen die STAT-Proteine hierbei zwischen den Aminosäureresten 600-700 auf, also im N-terminalen Bereich der SH2-Domäne (Schindler und Darnell 1995). Der analoge Domänenaufbau in der Struktur der verschiedenen STAT-Moleküle spiegelt die Ähnlichkeiten bei der Aktivierung, Dimerisierung und DNA-Bindung wider.

Die N-terminale Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen zwischen verschiedenen STAT-Proteinen und ermöglicht die Ausbildung von Tetrameren. Dadurch hat sie einen

Einfluss auf die Rezeptor-Interaktion sowie ablaufende Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse. Außerdem stabilisiert sie die antiparallele Konformation (Chen et al. 2003; Meyer et al. 2004; Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006). Die Coiled-coil-Domäne beinhaltet leucinreiche Bereiche, die ein nukleäres Exportsignal (NES) bilden, und ist an der Ausbildung der antiparallelen Konformation bei der Dimerisierung zweier STAT-Monomere beteiligt. In dieser Konformation erfolgt die Dephosphorylierung und auch der Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Mao et al. 2005; Zhong et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008).

Die DNA-Bindedomäne zeigt eine den Immunglobulinen ähnliche Organisation, bestehend aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen, und hat dadurch große strukturelle Ähnlichkeiten zum Aufbau der DNA-Bindedomänen von p53 oder NF- $\kappa$ B. Sie enthält einen hoch-konservierten Abschnitt zwischen den Aminosäureresten 400-500, welcher die präzise Bindung an palindromische DNA-Sequenzen ermöglicht. Dabei kontaktiert jedes Protomer mit seinen spezifischen Aminosäureresten eine halbe palindromische GAS-Bindestelle (Gamma-aktivierte Stelle) (Decker et al. 1997; Chen et al. 1998). Weiterhin besitzt die DNA-Bindedomäne ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), an das das Importin- $\alpha$ 5 binden kann, vorausgesetzt zwei STAT-Protomere dimerisieren und liegen in paralleler Konformation zueinander vor. Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges führt zur Formation von Dimeren in paralleler Konformation. In dieser Konformation sind die STAT-Dimere vor Dephosphorylierung geschützt (Meyer et al. 2003).

Die Linker-Domäne verbindet die DNA-Bindedomäne mit der davon C-terminal gelegenen SH2-Domäne (Chen et al. 1998). Ihre Funktion ist noch nicht gänzlich bekannt, es wird jedoch ein Einfluss auf die DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität vermutet (Yang et al. 1999; Yang et al. 2002; Hüntelmann et al. 2014). Die SH2-Domäne ist die am stärksten konservierte Domäne des STAT-Moleküls und besteht aus ungefähr 100 Aminosäuren. Ihre Aufgabe besteht in der Bindung an membranständige Rezeptoren oder intrazellulär befindliche Tyrosin-Kinasen (Shuai et al. 1994). Darüber hinaus ermöglicht die SH2-Domäne durch reziproke Phosphotyrosin-SH2-Wechselwirkungen die Interaktion zweier STAT-Monomere und die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren (Shuai et al. 1993; Shuai et al. 1994; Chen et al. 1998).

Die C-terminale Transaktivierungsdomäne ist auch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Sie enthält einen kritischen, hoch-konservierten Tyrosin-Rest, der nach Zytokinstimulation phosphoryliert wird und essenziell für die transkriptionelle Aktivierung ist (Levy und Darnell 2002). Dieser ist im STAT1-Molekül an Position 701 lokalisiert (Shuai et al. 1993).

Zusätzlich beherbergt sie einen konservierten Serin-Rest, der ebenfalls nach Zytokinstimulation phosphoryliert wird und dadurch maximale transkriptionelle Effektivität sicherstellt (Decker und Kovarik 2000). Insgesamt ist die Transaktivierungsdomäne intrinsisch unstrukturiert und durchläuft einen Faltungswechsel bei Interaktion mit transkriptionellen Koaktivatoren. Sie stellt die am wenigsten konservierte Domäne dar und ermöglicht so eine Spezifizierung innerhalb der STAT-Proteinfamilie.

## 1.2 Der JAK/STAT-Signalweg

Der JAK/STAT-Signalweg ist hoch-konserviert und gehört zu den vergleichsweise gut untersuchten Signaltransduktionswegen. Er ist essenziell für die Induktion zellulärer Antworten nach Zytokinstimulation, zum Beispiel durch Interferone, Interleukine und Wachstumsfaktoren. Der ligandeninduzierte Signalweg der STAT-Proteine beginnt an Oberflächenrezeptoren und endet intranukleär an der Transkriptionsmaschinerie. Somit sind STAT-Proteine sowohl an der Informationsübermittlung von der Zellmembran an den Nukleus als auch an der Genregulation von Zellen beteiligt. Dabei sind keine Second-Messenger involviert, sondern es erfolgt eine direkte Interaktion sowohl mit den membrangebundenen Rezeptoren als auch mit der DNA. Das Basisprinzip dieses Signalweges beinhaltet eine Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungsschritten.

Die extrazelluläre Zytokinbindung führt zur Dimerisierung oder Multimerisierung der Rezeptoruntereinheiten. Diese Konformationsänderung im Rezeptorkomplex bringt die nicht-kovalent am Rezeptor assoziierten Janus-Kinasen in räumliche Nähe zueinander und erlaubt so eine Transphosphorylierung und damit Aktivierung der Janus-Kinasen (Darnell et al. 1994; Schindler und Darnell 1995). Die Zytokinrezeptoren setzen sich aus drei verschiedenen Molekülbereichen zusammen: einer extrazellulären, N-terminalen, ligandenbindenden, einer transmembranösen und einer intrazellulären, C-terminalen Domäne. Da der Zytokinrezeptor keine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität hat, sind die Janus-Kinasen unentbehrlicher Bestandteil dieses Signalweges. In Säugetieren sind vier verschiedene Janus-Kinasen bekannt: JAK1, JAK2 sowie TYK2, die ubiquitär exprimiert werden, und JAK3, die nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Leonard und O'Shea 1998). Die aktivierten Janus-Kinasen schaffen durch die Phosphorylierung von spezifischen Tyrosin-Resten in der intrazellulären Domäne des Rezeptors Andockstellen für zytoplasmatische STAT-Proteine. Die Rekrutierung und Bindung der STAT-Moleküle an diese Andockstellen erfolgt über deren SH2-Domäne (Darnell et al. 1994). Daraufhin phosphorylieren die Janus-Kinasen die STAT-

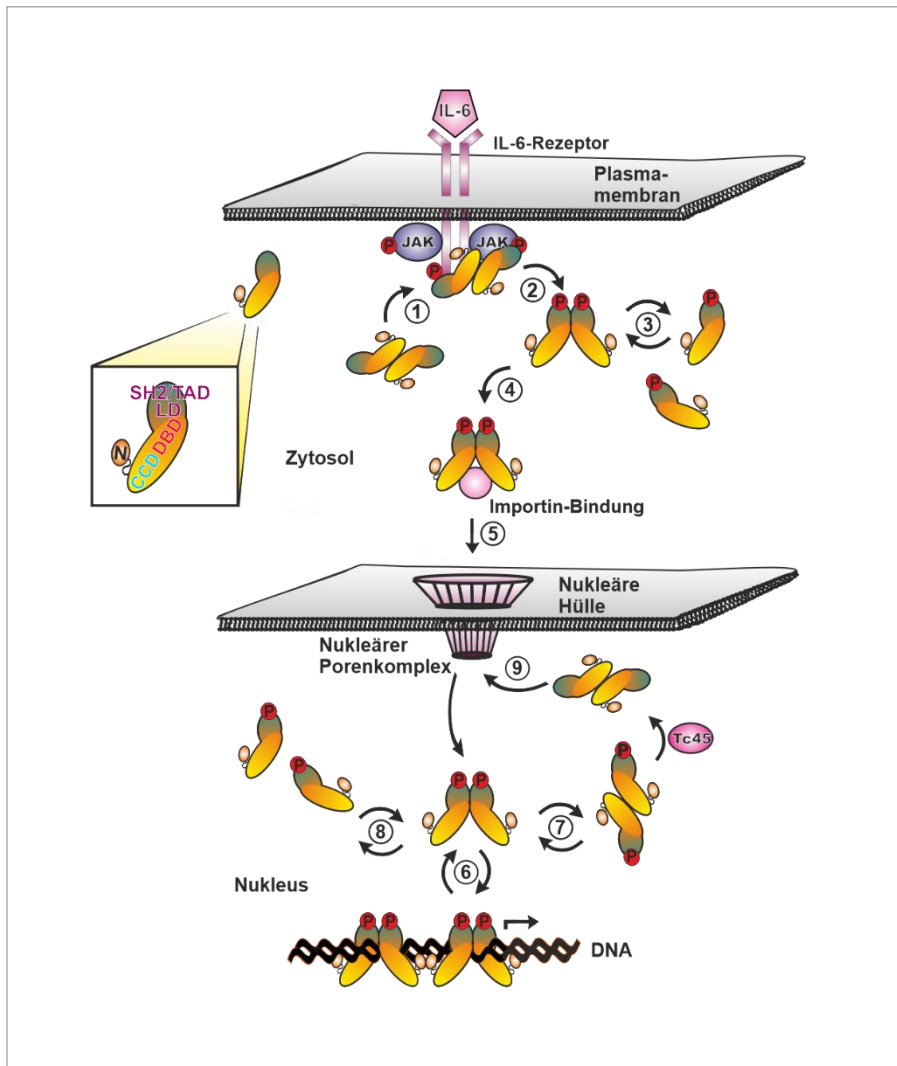
Proteine an einem hoch-konservierten, invariablen Tyrosin-Rest in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne. Diese Phosphorylierung führt über reziproke Phosphotyrosin-SH2-Domänen-Wechselwirkungen zur Ausbildung von parallelen Homodimeren. Mit Ausnahme von STAT2 formen alle in Säugtieren vorkommenden STAT-Proteine Homodimere.

Makromoleküle größer als 40-60 kDa sind nicht im Stande, durch freie Diffusion in den Zellkern zu gelangen, sondern benötigen einen aktiven Transportmechanismus. Daher ist der nukleäre Import der circa 180 kDa großen, phosphorylierten STAT-Dimere energieabhängig und wird durch Importine vermittelt. Importine sind Transportadapter, die zur Gruppe der Karyopherine gehören und den Transport durch nukleäre Porenkomplexe (NPC) vermitteln. Hierbei erkennen die Karyopherine eine spezielle Abfolge basischer Aminosäurereste, die das nukleäre Lokalisationssignal darstellen. Dieses befindet sich im Fall von STAT1 in der DNA-Bindedomäne und wird nur bei Dimerisierung phosphorylierter STAT-Proteine zugänglich. Das bedeutet, Importine können weder mit unphosphorylierten STAT-Dimeren noch mit STAT-Monomeren interagieren (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002). Dieser Mechanismus stellt sicher, dass die unphosphorylierten STAT-Proteine im Zytoplasma verbleiben und dort für eine zytokinabhängige Aktivierung bereitstehen. Bei den beteiligten Importinen handelt es sich für STAT1 um Importin- $\alpha$ 5 und Importin- $\beta$ 1, die im Komplex vorliegen. Die Stöchiometrie beträgt hierbei 2:1, das heißt, zwei STAT-Dimere werden von einem Importin-Dimer gebunden. Zuerst erfolgt die Bindung der phosphorylierten Dimere an das aus  $\alpha$ -Helices, sogenannten Armadillo-Repeats, bestehende Importin- $\alpha$ 5 (Sekimoto et al. 1997; Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Nardozzi et al. 2010). Das Importin- $\beta$ 1 interagiert mit einer Ran-abhängigen GTPase und den Nukleoporinen des NPC und so gelangen STAT-Dimere über einen aktiven Transportmechanismus, der einen intrazellulären Ran-GTP/-GDP Gradienten erfordert, in den Nukleus (Mattaj und Englmeier 1998; Görlich und Kutay 1999). Der nukleäre Import von STAT3, STAT5 und STAT6 erfolgt ebenfalls durch Interaktion mit Mitgliedern der Proteinfamilie der Karyopherine. Im Gegensatz dazu können unphosphorylierte STAT-Proteine energieunabhängig die nukleäre Membran passieren und es findet eine stetige Translokation zwischen Nukleus und Zytoplasma statt, die weder Zytokinstimulation noch Transportsysteme erfordert (Meyer et al. 2002; Marg et al. 2004). Die hohe nukleäre Ran-GTP-Konzentration begünstigt die Freisetzung der Importine aus dem Importkomplex und katalysiert gleichzeitig die Beladung der Exportine (Mattaj und Englmeier 1998).

Im Nukleus binden transkriptionell aktive STAT-Proteine an hoch-affine, STAT-spezifische Response-Elements und induzieren oder supprimieren die Expression von zytokinabhängigen Zielgenen. Diese gezielte Genregulation erfolgt über palindromische DNA-Sequenzen, sogenannte GAS-Stellen, mit der festgelegten Sequenz 5'-TTC(N)<sub>3,4</sub>GAA-3' (Lew et al. 1989; Decker et al. 1991). Die Inaktivierung der STAT-Proteine erfolgt nach Dissoziation von der DNA und einem Konformationswechsel in die antiparallele Konformation durch Dephosphorylierung mittels nukleärer Phosphatasen, wie der T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (Tc45) oder der SH2-Domänen-enthaltenden Protein-Tyrosin-Phosphatase-2 (SHP-2). Die DNA-Bindung schützt hierbei die STAT-Dimere vor Dephosphorylierung, da im DNA-gebundenen Zustand keine Interaktion zwischen STAT-Molekül und Tc45 stattfinden kann. Die Dissoziationsrate von der DNA wird maßgeblich durch die Sequenzspezifität und somit durch die Affinität des STAT-Dimers bestimmt (Meyer und Vinkemeier 2004).

Außer durch erleichterte Diffusion verläuft der nukleäre Export ebenfalls energieabhängig und wird im Fall von STAT1 durch das Exportin CRM-1 (*chromosome region maintenance-1*) vermittelt. Im Unterschied zu den Importinen können Exportine nur mit unphosphorylierten STAT-Proteinen interagieren (Meyer et al. 2002). Daher terminieren die nukleären Tyrosin-Phosphatasen die Kernakkumulation. Die Ausschleusung von dephosphorylierten STAT-Proteinen erfolgt durch Bindung des in der CCD lokalisierten Exportsignals an CRM-1 und Kontaktaufnahme mit einem nukleären Porenkomplex (Mattaj und Englmeier 1998; Begitt et al. 2000; Meyer et al. 2003). Die benötigte Energie wird, ebenso wie beim nukleären Import, durch eine Ran-abhängige GTPase zur Verfügung gestellt. Nach dem nukleären Export können die STAT-Proteine in Abhängigkeit von der Aktivität des Zytokinrezeptors reaktiviert und erneut importiert oder aber inaktiviert werden.





**Abbildung 1: Übersicht über den JAK/STAT-Signalweg.** Aktivierungs- und Inaktivierungszyklus von STAT-Proteinen nach IL-6-Stimulation. Zytokinbindung an den jeweiligen Oberflächenrezeptor führt zu intrazellulärer Dimerisierung der beiden Rezeptoruntereinheiten. Aktivierte JAK phosphorylieren STAT (1) und ermöglichen so die Ausbildung paralleler, phosphorylierter STAT-Dimere (2), die wieder dissoziieren können (3). Importine binden an dimerisierte STAT (4) und es kommt zum nukleären Import (5). Intranukleär bindet transkriptionell aktives STAT an palindromische DNA-Sequenzen (6). Nach Ablösung von der DNA kommt es zum Wechsel in die antiparallele Konformation (7), zur Tc45-katalysierten Dephosphorylierung, zur Dissoziation in Monomere (8) sowie zum nukleären Export (9).

Die STAT-induzierte Transkription von Genen wird sowohl im zytoplasmatischen als auch im nukleären Kompartiment durch Modulatoren reguliert. Zur Verhinderung einer dauerhaften Zielgenaktivierung gibt es eine Negativregulation durch verschiedene Proteine, deren Expression wiederum transkriptionell durch STAT-Proteine reguliert sein kann. Wesentlich hierfür sind die SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signaling*), eine im Zytoplasma lokalisierte Proteinfamilie, die aus verschiedenen Mitgliedern besteht: SOCS1-7 und den CIS-Proteinen (*cytokine-inducible SH2-domain-containing protein*). Bei der Regulierung durch die SOCS-Proteine

handelt es sich um eine klassische Feedback-Schleife, da die für sie kodierenden Gene unter der Kontrolle von STAT-Proteinen stehen. Sie verhindern eine STAT-Aktivierung über die Blockierung der katalytischen Region von Janus-Kinasen oder die Bindung an phosphorylierte Oberflächenrezeptoren (Starr und Hilton 1999; Levy und Darnell 2002; Rawlings et al. 2004). Zum Beispiel fungieren SOCS1 und SOCS3 als Pseudosubstrat der katalytischen Region der Janus-Kinasen und vermindern so deren Aktivität (Starr und Hilton 1999; Krebs und Hilton 2001). Im Gegensatz dazu konkurrieren SOCS2 und CIS direkt mit den STAT-Proteinen um die Bindung an Andockstellen der Zytokinrezeptoren.

Darüber hinaus existieren zytoplasmatische Tyrosin-Phosphatasen, die die Dephosphorylierung von aktivierten Zytokinrezeptoren und Janus-Kinasen beschleunigen. Hierzu zählen SHP-1 (*SH2-containing phosphatase 1*), SHP-2 und PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) (Levy und Darnell 2002; Rawlings et al. 2004). Zusätzlich gibt es nukleäre Phosphatasen und mehrere PIAS-Proteine (*protein inhibitor of activated STAT*) (Haspel und Darnell 1999; Starr und Hilton 1999). PIAS-Proteine werden konstitutiv exprimiert, können aber nur an aktivierte STAT-Dimere binden und inhibieren diese über unterschiedliche Mechanismen, zum Beispiel über Blockierung der DNA-Bindung oder Rekrutierung von transkriptionellen Korepressoren.

### 1.3 Zytokininduzierte Aktivierung von STAT-Proteinen

Zytokine sind extrazellulär lokalisierte Glykoproteine, die ungefähr aus 100-200 Aminosäureresten bestehen und eine wesentliche Rolle in antiproliferativen sowie immunmodulatorischen Prozessen spielen. Zu dieser Familie von Botenstoffen zählen Wachstumsfaktoren, Interferone, Interleukine (IL) und Chemokine (Schooltink und Rose-John 2002). Bei den Interferonen unterscheidet man Typ-1- (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\omega$ ) und Typ-2-Interferone (IFN $\gamma$ ) (Platanias 2005). IFN $\gamma$ , dessen Gen auf Chromosom 12 lokalisiert ist, besitzt ein breites antimikrobielles Wirkungsspektrum. Der IFN $\gamma$ -Rezeptor (IFNGR) wird auf der Zelloberfläche von kernhaltigen Zellen exprimiert und setzt sich aus den zwei Untereinheiten IFNGR1, welcher mit JAK1 interagiert, und dem mit JAK2 interagierenden IFNGR2 zusammen (Langer und Pestka 1988). Das Zytokin IFN $\gamma$  hat vielfältige immunologische Funktionen, unter anderem die Stimulation von antigenpräsentierenden Zellen und Phagozyten über den Haupt-Histokompatibilitätskomplex I und II (MHC I und II) (Boehm et al. 1997). Die Transkription von IFN $\gamma$  findet vorrangig in natürlichen Killerzellen und aktivier-

ten T-Zellen statt. Die Typ-1-Interferone besitzen antivirale Funktionen und ihre Aktivierung erfolgt durch natürliche Killerzellen. Der Typ-1-Zytokinrezeptor wird ebenfalls auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert und besteht aus den zwei Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2. Die Transkription von Typ-1-Interferonen findet in Fibroblasten und virusinfizierten Leukozyten statt (Chang et al. 1992; Plataniias 2005). Da die Zytokinbindung an den jeweiligen Interferonrezeptor zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges führt, können STAT-Mutationen an entscheidenden Stellen im STAT-Molekül zu einer gesteigerten oder verminderten Immunantwort mit entsprechenden Folgen für den Organismus führen (Boisson-Dupuis et al. 2012).

Zytokine der IL-6-Familie sind definiert als Zytokine, deren Signalweg die Rezeptoruntereinheit Glykoprotein 130 kDa (gp130) einschließt. Aktuell erfüllen acht Zytokine diese Definition (Rose-John 2018). Die Signaltransduktion der verschiedenen Mitglieder der IL-6-Familie ist sehr ähnlich und wird durch eine STAT3-Aktivierung dominiert. Die IL-6-Zytokine sind in viele immunologische Prozesse involviert, unter anderem der B-Zell-Stimulation, der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen regulatorischen und Effektor-T-Zellen und der Induktion der hepatischen Akute-Phase-Proteine. Darüber hinaus werden ihnen zahlreiche metabolische und neurotrophe Eigenschaften zugeschrieben. Normalerweise ist der IL-6-Spiegel sehr niedrig, steigt jedoch bei entzündlichen Prozessen bis auf das Tausendfache an. Außerdem sind Autoimmunkrankheiten mit einem erhöhten IL-6-Spiegel assoziiert. Daher zeigt die Blockade der Zytokine der IL-6-Familie durch den IL-6-Rezeptor-neutralisierenden Antikörper Tocilizumab vorteilhafte Effekte bei Autoimmunkrankheiten (Rose-John 2018).

#### **1.4 Charakteristika von STAT3**

Das STAT3-Molekül gehört zu den wichtigsten Mitgliedern der STAT-Familie. Anfänglich wurde es aufgrund der Induktion von Akute-Phase-Genen als Akute-Phase-Response-Faktor bezeichnet, dann jedoch zu STAT3 umbenannt, da es eine ausgeprägte Homologie zu den restlichen Mitgliedern der STAT-Proteinfamilie aufweist (Raz et al. 1994; Wegenka et al. 1994; Zhong et al. 1994). Die Aktivierung erfolgt über IL-6 sowie Interferone. STAT3 vermittelt als Transkriptionsfaktor zahlreiche zelluläre Antworten. Dazu gehören neben der Induktion von Akute-Phase-Reaktionen die Stimulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung in Lymphozyten, die Erhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen und die Inhibition von Apoptose. Dadurch ist STAT3 unentbehrlich in der Embryogenese und frühen Entwicklung, was in einem Maus-Experiment, in dem eine Ablation von STAT3 durchgeführt wurde, durch embryonale Letalität deutlich wurde. STAT3 zeigt aber auch in

zahlreichen anderen Geweben wie der Haut, dem Thymusepithel, der Brustdrüse, der Leber, dem Nervensystem und dem Knochenmark pleiotrope Effekte (Levy und Lee 2002). Im Falle einer Dysregulation und konstitutiven Aktivierung kann das STAT3-Molekül aufgrund seines fördernden Einflusses auf das Zellüberleben onkogene Wirkung entfalten (Bromberg et al. 1999). STAT1 und STAT3 haben also sowohl physiologisch als auch im pathologischen Kontext gegensätzliche Rollen. Während STAT1 angeborene und erworbene Immunität vermittelt, Zellwachstum begrenzt und Apoptose begünstigt, fördert STAT3 Zellproliferation, Immunsuppression und Überlebenssignale in Zellen.

## 1.5 Onkogene STAT3-Mutationen

Das onkogene Potenzial von STAT3 wurde durch Punktmutationen, zum Beispiel die Aminosäureaustausche D661H und D661V und andere, in der SH2-Domäne des Moleküls identifiziert, die mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivierung einhergehen (Koskela et al. 2012). Bei Patienten, bei denen sich eine T-Zell-Leukämie mit großen granulären Lymphozyten (T-LGL), zahlreiche andere maligne Erkrankungen oder ein Hyper-IgE-Syndrom fand, wurden Mutationen in der SH2-Domäne von STAT3 nachgewiesen, insbesondere V637M und Y640F (de Araujo et al. 2019). Diese Tatsache macht die SH2-Domäne zu einem wichtigen pharmakologischen Angriffspunkt für eine gezielte Therapie, zum Beispiel durch die Entwicklung kleinmolekularer STAT3-Inhibitoren (Miklossy et al. 2013).

Bei Patienten mit NK/T-Zell-Lymphomen (NKTL) gehört STAT3 zu den am häufigsten mutierten Genen. Vier Mutationen sind hier durch FATHMM (*functional analysis through hidden markov models*)-Bewertung als schädlich deklariert worden, dazu zählen D427H, E616G, E616K und E696K. Diese Mutanten sind als konstitutiv aktiv beschrieben und ihnen wird eine Hyperphosphorylierung sowie eine erhöhte mRNA-Expression von STAT3-Zielgenen im Vergleich zum Wildtyp (WT)-Molekül zugeschrieben (Song et al. 2018). Aus diesem Grund könnte die STAT3-Inhibition ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Behandlung von NKTL sein. Die STAT3-Blockade kann auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade erfolgen, hierbei wären mögliche Konzepte die Inhibition der Phosphorylierung, die Verhinderung des Kernimports, die Blockade der DNA-Bindung oder die Hemmung der Genexpression durch die STAT3-Moleküle selbst (O’Shea et al. 2015). Eine zusätzliche Möglichkeit ist die selektive Inhibition phosphorylierter STAT-Proteine durch sogenannte Intrabodies. Dabei handelt es sich um chimäre Kaninchen/Mensch-Antikörperfragmente, die selektiv Y705-phosphorylierte STAT3-Moleküle hemmen könnten (Koo et al. 2014). Nach wie vor

bestehende Schwierigkeiten im Bereich der STAT-Inhibition sind deren niedrige Bioverfügbarkeit, die geringe *In-vivo*-Effektivität und die häufig nicht vorhandene Selektivität innerhalb der Mitglieder der STAT-Familie (O'Shea et al. 2015). Außerdem ist beschrieben, dass die STAT3-Aktivierung signifikant mit der PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*)-Expression korreliert, wodurch die Immunevasion von Tumorzellen begünstigt wird. Daher könnte durch eine Kombination von STAT3-Inhibitoren mit Anti-PD-L1-Antikörpern möglicherweise ein potenziell synergistischer Effekt in der Therapie von NKTL erzielt werden (Song et. al 2018).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Humane Zelllinien

Es wurden zwei verschiedene humane Zelllinien genutzt, beide bezogen von Prof. Dr. Uwe Vinkemeier, Universität Nottingham: zum einen HeLa-S3-Zellen, wobei es sich um humane adhärenzte Epithelzellen eines Zervix-Adenokarzinoms handelt, die sowohl endogenes STAT1 als auch endogenes STAT3 besitzen und HPV16 positiv sind (Scherer et al. 1953), zum anderen als zweite Zelllinie, die sogenannten U3A-Zellen, humane adhärenzte Epithelzellen eines Fibrosarkoms, die endogenes STAT3 enthalten, aber STAT1-defizient sind (McKendry et al. 1991).

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Hartmann Analytic, Braunschweig
10 x Eco-Pol-Puffer	New England Biolabs, Ipswich, UK
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth
Bromophenol	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich

Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Ficoll-Plaque Plus	Amersham Bioscience, Freiburg
Fluoromount-G-Eindeckmedium	SouthernBiotech, Birmingham, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Glukose	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycylglycin	Sigma-Aldrich
N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansul- fonsäure (HEPES)	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich
IGEPAL-CA-360	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid	Merck Millipore, Darmstadt
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	Carl Roth
MegaTran 2.0	Origene, Rockville, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Natriumcarbonat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck Millipore
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth

Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese-Laufpuffer (SDS-Laufpuffer)	Carl Roth
Natriumorthovanadat	ACROS Organics, New Jersey, USA
ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
Pefabloc (SC)	Carl Roth
Penicillin (500 U/ml) - Streptomycin (500 U/ml)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies
Polydeoxyinosindeoxycytosin (Poly-dIdC)	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
Rotipherese Gel 30 + 40	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
SNAP-Cell-TMR-Star	New England Biolabs, Massachusetts, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypton	Carl Roth
Trypsin	Biochrom
Tween-20	Sigma-Aldrich

**Tabelle 1: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.**



### 2.1.3 Wasser

Für die Herstellung von Medien, Puffern und Lösungen wurde doppelt-destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Der spezifische Widerstand des ddH<sub>2</sub>O betrug 18.2 MΩcm und die Aufbereitung erfolgte über die Anlage Arium pro der Firma Sartorius in Göttingen. Bei Verwendung von DNase-, RNase- oder proteinasefreiem Wasser wurde Molecular Biological Grade Water der Firma 5 Prime in Hilden verwendet.

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5 x Shift-Puffer, pH 7,9	100 mM HEPES 200 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM EDTA 0,5 mM EGTA 20% Ficoll-Plaque Plus
5 x TBE-Laufpuffer, pH 8,0	445 mM Tris-HCl 445 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 10 mM EDTA
6 x SDS-Puffer	350 mM Tris-HCl 8% SDS 30% Glycerin 10% β-Mercaptoethanol 0,04% Bromophenol
100 x Magnesium-Lösung	100 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 4,5 mM β-Mercaptoethanol
Ablösepuffer, pH 6,8	62,5 mM Tris-HCl 2% SDS 0,7% β -Mercaptoethanol

$\beta$ -Galaktosidase-Puffer	23,5% ONPG-Puffer 1,07% 100 x Magnesium-Lösung + Natriumphosphatpuffer
Complete-Lösung	Complete-Mini-Protease-Inhibitoren
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
Luciferase-Puffer	0,3% DTT (1 M) 0,1% Pefabloc (100 mg/ml) 1% Complete-Lösung in Triton-Glycylglycin-Lysepuffer
Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2	23,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 76,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Nukleärer Extraktionspuffer, pH 7,4	420 mM KCl 1 mM EDTA 0,1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 20 mM HEPES 20% (v/v) Glycerin
Oligo-Puffer, pH 7,5	10 mM $\text{MgCl}_2$ 50 mM KCl 20 mM Tris-HCl
ONPG-Puffer	13,3 mM ONPG 100 mM Natriumphosphat-Puffer
PBS, pH 7,4	136 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,5 M Tris-HCl 0,4% SDS
Trenngelpuffer, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl 0,4% SDS
TBS, pH 7,4	137 mM NaCl 10 mM Tris-HCl
Transferpuffer, pH 8,0	25 mM Tris 150 mM Glycin 10% Methanol
Triton-Glycylglycin-Lysepuffer, pH 7,8	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO <sub>4</sub> 4 mM EGTA 1% Triton X-100
Zellkulturmedium HeLa-Zellen, Vollmedium	1% oder 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin 85 nM Puromycin in Roswell-Park-Memorial-Institute (RPMI)-Medium
Zellkulturmedium U3A-Zellen, Vollmedium	1% oder 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin 85 nM Puromycin in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM)
Zytoplasmatischer Extraktionspuffer, pH 7,4	10 mM KCl 1 mM EDTA

	0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	20 mM HEPES
	10% (v/v) Glycerin

**Tabelle 2: Bezeichnungen und Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen.**

## 2.1.5 Enzyme, Plasmide und Zytokine

### 2.1.5.1 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>DnpI</i> -Endonuklease	Stratagene, La Jolla, USA
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase	Stratagene
peqGold-DNAse I	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

**Tabelle 3: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Enzyme.**

### 2.1.5.2 STAT3-Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
(1): pcDNA-FRT-STAT3 GFP	Vollängen murine STAT3 $\alpha$ -cDNA kloniert in pEGFP-N1	(Domoszlai et al. 2014)
pSTAT3 $\alpha$ (F174A)-GFP	Erhalten durch sequenz- spezifische Mutagenese aus (1) mit dem Primerpaar STAT3 F174A F/R	Hergestellt für diese Arbeit
pSTAT3 $\alpha$ (D427H)-GFP	Erhalten durch sequenz- spezifische Mutagenese aus (1) mit dem Primerpaar STAT3 D427H F/R	Hergestellt für diese Arbeit

(2): pcDNA5-muSTAT3-SNAP-HIS	Vollängen murine STAT3 $\alpha$ -cDNA kloniert in pcDNA5/FRT/TO-SNAP-YFP	(Domoszlai et al. 2014)
pSTAT3 $\alpha$ (F174A)-SNAP	Erhalten durch sequenz-spezifische Mutagenese aus (2) mit dem Primerpaar STAT3 F174A F/R	Hergestellt für diese Arbeit
pSTAT3 $\alpha$ (D427H)-SNAP	Erhalten durch sequenz-spezifische Mutagenese aus (2) mit dem Primerpaar STAT3 D427H F/R	Hergestellt für diese Arbeit

**Tabelle 4: Bezeichnungen, Beschreibungen und Hersteller der verwendeten STAT3-Plasmide.**

#### 2.1.5.3 Plasmide für Reporter-Gen-Assays

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
p $\beta$ Gal	Expressionsvektor der $\beta$ -Galaktosidase	Stratagene
pGAS3xLy6E	IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-abhängiges Reporter-Gen-Konstrukt mit drei GAS-Bindestellen	(Wen et al. 1995)

**Tabelle 5: Bezeichnungen, Beschreibungen und Hersteller der für Reporter-Gen-Assays genutzten Plasmide.**

#### 2.1.5.4 Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
IFN $\gamma$ , human, rekombinant aus <i>E. coli</i> -Zellen (50 ng/ml bzw. 1:2000)	Biomol, Hamburg
IL-6, human, rekombinant aus <i>E. coli</i> -Zellen (25 ng/ml bzw. 1:4000)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Tabelle 6: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Zytokine.**

### 2.1.6 Reaktions-Kits

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

Tabelle 7: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Reaktions-Kits.

### 2.1.7 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration
STAT3 (D1B2J) Kaninchen-mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:1000 (in 4% BSA in TBS-T)
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP Kaninchen-mAb	Cell Signaling Technology	1:1000 (in 4% BSA in TBS-T)
IRDye 800CW konjugierter Esel-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper IgG (H+L)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg	1:10000 (in 4% BSA in TBS-T)
Cy2-konjugierter AffiniPure Esel-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Philadelphia, USA	1:1000 (in 25% FCS in PBS)
Cy3-konjugierter AffiniPure Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:1000 (in 25% FCS in PBS)

Tabelle 8: Bezeichnungen, Hersteller und Konzentrationen der verwendeten Antikörper.

## 2.1.8 Primer und Oligonukleotide

### 2.1.8.1 Mutageneseprimer (nur Vorwärtsprimer abgebildet)

Gen	Sequenz
F174A F	5'-CTC CAG GAC GAC TTT GAT GCC AAC TAC AAA ACC CTC AAG-3'
D427H F	5'-GGA GGC CGT GCC AAT TGT CAT GCC TCC TTG ATC GTG ACT G-3'

Tabelle 9: Gene und Sequenzen der verwendeten Mutageneseprimer.

### 2.1.8.2 Sequenzierungsprimer

Gen	Sequenz
304 F	5'-CAT GCT GGA GGA GAG GAT CGT GG-3'

Tabelle 10: Gen und Sequenz des verwendeten Sequenzierungsprimers.

### 2.1.8.3 Primer für RT-PCR

Gen	Sequenz
<i>bBCL-XL</i> F	5'-GAT GGG GTA AAC TGG GGT CG-3'
<i>bBCL-XL</i> R	5'-TCC ACA AAA GTA TCC CAG CCG-3'
<i>bC-Myc</i> F	5'-GGT CTT CCC CTA CCC TCT CAA CGA-3'
<i>bC-Myc</i> R	5'-GGC AGC AGG ATABGTC CTT CCG AGT-3'
<i>bCyclinD1</i> F	5'-CGG TGT CCT ACT TCA AAT GT-3'
<i>bCyclinD1</i> R	5'-ATG GAG TTG TCG GTG TAG AT-3'
<i>bGAPDH</i> F	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
<i>bGAPDH</i> R	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'

Tabelle 11: Gene und Sequenzen der für RT-PCRs genutzten Primer.

## 2.1.8.4 Oligonukleotid-Sonden für EMSA

Bezeichnung	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'

Tabelle 12: Bezeichnungen und Sequenzen der Oligonukleotid-Sonden für EMSA.

Alle Primer und Oligonukleotide stammen von der Firma Sigma-Aldrich in Taufkirchen. Die Primer wurden in Tris-EDTA Puffer oder DNase-, RNase-, proteinasefreiem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

## 2.1.9 Bakterienstämme und Medien

Bakterienstamm	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -Zellen	Prof. Dr. Uwe Vinkemeier
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Tabelle 13: Verwendete Bakterienstämme und Hersteller.

## 2.1.9.1 Zellkulturmedien zur Anzucht von Bakterien

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert	Hersteller
LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl	7,0	Carl Roth
SOC-Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub>	7,5	Thermo Fisher Scientific
LB-Agar-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt	7,0	Carl Roth



	1% NaCl		
	1,5% Agar-Agar		

**Tabelle 14: Bezeichnungen, Zusammensetzungen, pH-Werte und Hersteller der verwendeten Zellkulturmedien.**

Das LB-Medium und das LB-Agar-Medium wurden jeweils 30 min bei 1,5 bar und 121 °C autoklaviert und mit Ampicillin (50 µg/ml) als Selektionsmarker beimpft. Der pH-Wert wurde mittels NaOH eingestellt. Das SOC-Medium wurde für 20 min ebenfalls bei 1,5 bar und 121 °C autoklaviert und anschließend mit 20 mM steril filtrierter Glucose versehen. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte auch mit NaOH.

#### 2.1.9.2 Medien zur Herstellung von Vollmedien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)	Biochrom
Roswell-Park-Memorial-Institute (RPMI)-Medium	Lonza, Basel, Schweiz

**Tabelle 15: Bezeichnungen und Hersteller der zur Herstellung von Vollmedien genutzten Medien.**

### 2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.10.1 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BioPhotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Cycler	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
Inkubator B 5061 EC-CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
Laser-Scanner FLA-5100	Fuji, Düsseldorf
Lesegerät Infinite M200Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Luminometer Centro XS <sup>3</sup> LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad

Mikrozentrifuge 5415 R	Eppendorf
Mikrozentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf
Odyssey-Sa-Imaging-System	LI-COR Biosciences
Pipetten (P1000, P200, P100, P10, P2,5)	Eppendorf
Schüttelinkubator, Innova 42	Eppendorf
Schüttler, Heidolph Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Semi-Dry-Transfer-Apparatur	PEQLAB Biotechnologie
Wasserbad	schuett-biotec, Göttingen
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf

**Tabelle 16: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Geräte.**

#### 2.1.10.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96-Lochplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark
8-Kammer-Objektträger	Sarstedt, Nümbrecht
Atenschutzmaske, 1873+ Aura FFP3	3M, Berkshire, UK
Deckglas	Thermo Fisher Scientific
Illustra MicroSpin-G-25 Säulen	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Injektionsnadeln	B. Braun, Melsungen
Lochplatten (8-Loch, 48-Loch)	Sarstedt
Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Parafilm	Merz, Frankfurt am Main
Pipettenspitzen (P10, P100, P1000)	Sarstedt/Eppendorf
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck Millipore
Purple Nitrile-Xtra Handschuh	Halyard Health, Alpharetta, USA
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Rundboden-Röhrchen (14 ml)	BD, Heidelberg

Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
Spritze (10 ml, 20 ml)	BD
Schutzfolie MicroAmp Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
ThermoFast 96-Lochplatte, weiß	Thermo Fisher Scientific
UV-Küvette (70 $\mu$ l)	Brand, Wertheim
Vasco Nitril Handschuh	B. Braun
Whatman-Papier	GE Healthcare
Zellkulturflasche (T75)	Sarstedt
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt

**Tabelle 17: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien.**

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 STAT3-Mutagenese

Es wurde die Punktmutation D427H in der DNA-Bindedomäne des STAT3-Moleküls zur Mutagenese ausgewählt. Die bereits beschriebene Punktmutante F174A in der Coiled-coil-Domäne wurde als Positivkontrolle genutzt. Zuerst wurden die entsprechenden spezifischen Primer ausgewählt und mit Hilfe des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis-Kits die gewünschten Punktmutationen in STAT3-kodierende Plasmide eingefügt. Die zwei Expressionsvektoren pcDNA-FRT-STAT3-GFP und pcDNA5-muSTAT3-SNAP-HIS wurden als Matrize verwendet. Der Start der Mutagenesereaktion erfolgte durch Zugabe von jeweils 0,5  $\mu$ l der Vorwärts- und Rückwärts-Mutagenese-Primer (125 ng/ $\mu$ l) zu 1,25  $\mu$ l STAT3-kodierendem Plasmid (10 ng/ $\mu$ l). Danach wurde die Mischung mit 19,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 2,5  $\mu$ l 10 x Reaktionspuffer, 0,5  $\mu$ l dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat)-Mix und 0,5  $\mu$ l *Pfu Turbo*-DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l) komplettiert. Anschließend erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit 16 Zyklen. Der Ablauf der Zyklen im Thermocycler sah wie folgt aus:

Schritt 1 (nur in der ersten Amplifikationsrunde)	Denaturierung, 30 sek, 95 °C
Schritt 2	Denaturierung, 30 sek, 95 °C
Schritt 3	Hybridisierung, 60 sek, 55 °C
Schritt 4 (15-malige Wiederholung von Schritten 2 bis 4)	Elongation, 14 min, 68 °C

**Tabelle 18: Ablauf der Zyklen der PCR.**

Im Anschluss erfolgte bei 37 °C ein 60-minütiger Verdau mit 0,5 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/µl). Durch den *DpnI*-Verdau wurden methylierte Anteile der DNA-Matrize entfernt und so die unmutierte Ausgangs-DNA eliminiert. Der nächste Schritt war die Transformation der Plasmid-DNA in superkompetente XL1-blue *E. coli*-Zellen. Hierfür wurden die normalerweise bei -80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und im Anschluss ein Ansatz bestehend aus 50 µl XL1-blue *E. coli*-Zellen und 2 µl Plasmid-DNA hergestellt. Dieser Ansatz wurde zunächst 30 min auf Eis inkubiert, dann folgte ein 45-sekündiger Hitzeschock in einem auf 42 °C erwärmten Wasserbad und danach wurden die Zellen erneut 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden sie in 0,5 ml vorgewärmtes SOC-Medium übertragen und für 60 min bei 37 °C und 225 rpm unter Schütteln inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 250 µl der Zellsuspension auf eine ampicillinhaltige (50 µg/ml) LB-Agar-Platte aufgetragen und eine Nacht bei 37 °C kultiviert und antibiotisch selektiert.

### 2.2.2 Isolation und Sequenzierung von Plasmid-DNA

Aus den transformierten XL1-blue *E. coli*-Zellen wurde nun amplifizierte STAT3-Plasmid-DNA isoliert. Hierfür wurde zunächst eine der Bakterienkolonien von der Agar-Platte ausgewählt und in ampicillinhaltigem (50 µg/ml) LB-Medium eine Nacht im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde zur Isolation einer kleinen Menge Plasmid-DNA eine Minipräparation mit Hilfe des peqGOLD-Plasmid-Miniprep-Kits I durchgeführt. Im Anschluss wurde ein Sequenzierungsansatz hergestellt, bestehend aus 6 µl der isolierten Miniprep-Plasmid-DNA, 1 µl des Sequenzier-Primers (40 pMol/µl) und 8 µl H<sub>2</sub>O. Dieser wurde zur Sequenzierung an das SEQLAB Sequence Laboratories in Göttingen gegeben. Bei Nachweis der gewünschten Mutation im Sequenzierungsergebnis folgte die Produktion größerer Mengen Plasmid-DNA mittels Maxipräparation.

### 2.2.3 Amplifikation der Plasmid-DNA

Der erste Schritt zur Produktion größerer Mengen Plasmid-DNA war die Transformation in DH5 $\alpha$ -kompetente *E. coli*-Zellen. Diese Zellen wurden ebenfalls bei -80 °C gelagert und mussten daher auch zunächst auf Eis aufgetaut werden. Anschließend wurden zu 100  $\mu$ l DH5 $\alpha$ -Zellen 2  $\mu$ l Miniprep-Plasmid-DNA gegeben und es schloss sich eine 30-minütige Inkubation auf Eis an. Danach folgten eine Hitzeschock-Behandlung in einem 42 °C warmen Wasserbad für 30 sek und eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium transferiert und für 1 h unter Schütteln bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Dann wurden 250  $\mu$ l der Zellsuspension auf eine ampicillinhaltige (50  $\mu$ g/ml) LB-Agar-Platte aufgetragen und eine Nacht bei 37 °C kultiviert.

Am Folgetag wurde eine der Bakterienkolonien von der Agar-Platte ausgewählt, mit 2  $\mu$ l Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) in 2 ml LB-Medium gegeben und für 6 h im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in 100 ml LB-Medium und 100  $\mu$ l Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) überführt und nochmals eine Nacht im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Maxipräparation mit Hilfe des QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kits. Im Anschluss wurde die bei der Maxipräparation extrahierte DNA in 50  $\mu$ l DNase-, RNase- und proteinasefreiem Wasser resuspendiert und eine Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde die Konzentration der gewonnenen DNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer 1-ml-UV-Küvette bestimmt. Hierbei diente 1 ml H<sub>2</sub>O als Blindwert. Die Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration lautete:

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

Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA überprüft, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gebildet wurde. Bei einem Wert von circa 1,8 wurde von einer reinen Probe ausgegangen. Im letzten Schritt erfolgte eine Adjustierung der DNA-Konzentration auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l und das Aliquotieren der Proben. Zur Lagerung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.4 Zellkulturmethoden

#### Zellpassage

Bei Erreichen eines konfluenten Wachstums wurden die Zellen weiter passagiert; dieses erfolgte in einem gleichmäßigen Rhythmus alle 2 bis 3 Tage. Hierzu wurde zuerst das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,2 g/L EDTA) im Brutschrank bei 37 °C für

2-3 min inkubiert. Danach erfolgte die Resuspension und das Stoppen der Trypsin-/EDTA-Aktivität durch Hinzufügen von entsprechendem Vollmedium (10% FCS). Zum Ausplattieren wurden die Zellen in der Regel im Verhältnis 1:8 bis 1:10 verdünnt. Das PBS, Trypsin/EDTA und das genutzte Kulturmedium wurden vor der Verwendung auf 37 °C vorgewärmt.

#### Einfriervorgang humaner Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde sogenanntes Einfriermedium verwendet, ein spezielles Medium bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Lagerungstemperatur der Zellen betrug -80 °C, hierbei fungierte DMSO als Gefrierschutz. Die gewünschte Konfluenz der Zellen vor dem Einfrieren betrug circa 70%. Als Vorbereitung auf den Einfriervorgang wurde zunächst das alte Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Trypsin-Zugabe gelöst; dieser Vorgang wurde durch Zugabe von frischem Kulturmedium gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen resuspendiert und für 10 min bei 800 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Zellpellet in der entsprechenden Menge Einfriermedium resuspendiert und eine Nacht in einer Gefrierbox (Nalgene, Heidelberg) gelagert.

#### Auftauvorgang und Kultivierung humaner Zellen

Für die Kultivierung von humanen Zellen war ein steriles Arbeiten unter mikrobiologischen Sicherheitsbänken unabdingbar. Die Kultivierung der in dieser Arbeit genutzten Zellen erfolgte in dem für die jeweilige Zelllinie spezifischen Medium. Die U3A-Zellen wurden in DMEM, versetzt mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,04 µg/ml Puromycin, und die HeLa-Zellen in RPMI-Medium, versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Für den Auftauvorgang der normalerweise bei -80 °C gelagerten Zellen wurde ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad genutzt. Danach erfolgte zuerst die Resuspension in vorgewärmtem Medium und dann die Überführung in 10 ml des gleichen Mediums. Daran schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm und RT an. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet erneut in Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C im Brutschrank in einer mit Wasserdampf gesättigten 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Die Weiterpassagierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche.

### 2.2.5 Transfektion von Säugetierzellen

Die Transfektion mit der mutationsspezifischen Plasmid-DNA fand jeweils bei einer Zellkonfluenz von 50-70% statt. Es wurden je nach dem sich anschließenden Experiment Lochplatten oder Objektträger genutzt und abhängig davon verschiedene Transfektionsansätze hergestellt:

6-Lochplatte, je Loch:

2 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl), 200 µl NaCl (150 mM), 6 µl MegaTran 2.0

48-Lochplatte, je Loch:

0,25 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl), 50 µl NaCl (150 mM), 1,56 µl MegaTran 2.0

8-Kammer-Objektträger, je Kammer:

0,25 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl), 30 µl NaCl (150 mM), 0,75 µl MegaTran 2.0

Nach Herstellung wurde der Transfektionsansatz jeweils 10 sek gevortext und dann für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz direkt auf die Zellen pipettiert und die Lochplatten bzw. Objektträger wurden eine Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach circa 18 h waren die Zellen zur Verwendung für Experimente bereit. Der Grad der Transfektion der GFP-Konstrukte konnte vor Beginn des Experimentes durch Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops geprüft werden.

### 2.2.6 Stimulation von Säugetierzellen

Die Zellen wurden in dieser Arbeit mit rekombinantem IFN $\gamma$  und IL-6 stimuliert. Hierbei wurden verschiedene Protokolle und Stimulationszeiten angewandt. Die Zytokine wurden zunächst mit vorgewärmtem Medium auf eine bestimmte Konzentration verdünnt und dann zur Stimulation direkt auf die Zellen pipettiert. Die verwendeten Konzentrationen waren für IFN $\gamma$  50 ng/ml und für IL-6 25 ng/ml.

### 2.2.7 Proteinextraktion

Bei der Herstellung der Gesamtproteinextrakte wurden alle Versuchsschritte auf Eis durchgeführt und die genutzten Puffer stets gekühlt gelagert. Die Proteinextraktion für Western-Blot-Analysen und Elektromobilitäts-Shift-Assays erfolgte aus zuvor transfizierten und stimulierten U3A- bzw. HeLa-Zellen. Nach Abschluss der Stimulation wurde eine Waschung der Zellen mit PBS durchgeführt, anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 60 µl pro

Loch des zuvor frisch hergestellten zytoplasmatischen Extraktionspuffers. Kurz vor Verwendung wurde der Puffer mit 1% Complete-Mini-Protease-Inhibitoren, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und 0,1% IGEPAL-CA-630 komplettiert. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Lysate mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert. Daran schloss sich ein 15 sek andauernder Zentrifugationsvorgang bei 4 °C und 16.100 g an. Der komplette Überstand wurde abgenommen, in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 4 °C und 16.100 g für 5 min zentrifugiert. Bei dem hierbei entstandenen Überstand handelte es sich um den zytosolischen Proteinextrakt. Von diesem wurden 40 µl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die beim ersten Zentrifugationsvorgang entstandenen Zellpellets wurden in 60 µl nukleärem Extraktionspuffer resuspendiert. Dem Puffer wurden, ähnlich wie dem zytosolischen Extraktionspuffer, kurz vor Gebrauch 1% Complete-Mini-Protease-Inhibitoren, 3 mM DTT und 0,4 mM Pefabloc zugefügt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Lysate wurde eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 16.100 g durchgeführt. Bei dem durch diese Zentrifugation entstandenen Überstand handelte es sich um den nukleären Proteinextrakt. Hiervon wurden 40 µl mit dem zuvor hergestellten zytoplasmatischen Proteinextrakt vereinigt. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte abhängig von dem sich anschließenden Experiment. Die Proben, die für EMSA-Experimente verwendet werden sollten, wurden sofort bei -80 °C eingefroren. Im Gegensatz dazu wurde den Extrakten für die Western-Blot-Analysen bei 80 µl Proteinextrakt 14,4 µl 6 x SDS-Probenpuffer zugefügt und sie wurden für 3 min bei 95 °C gekocht. Nach der Denaturierung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### **2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine entsprechend ihres molekularen Gewichtes separiert werden. Das Ziel war die Auftrennung der STAT3-Proteine aus den zuvor hergestellten Proteinextrakten. Hierfür wurde ein diskontinuierliches Zwei-Phasen-Gel genutzt, das aus zwei Gelen mit unterschiedlicher Zusammensetzung bestand. Im oberen Teil wurde ein Sammelgel verwendet, zusammengesetzt aus 25% Sammelgelpuffer, 16% Rotipherese Gel 30, 0,06% APS und 0,2% TEMED. Im unteren Teil wurde ein Trenngel genutzt, das sich aus 25% Trenngelpuffer, 33,1% Rotipherese Gel 30, 0,03% APS und 0,16% TEMED zusammensetzte. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt und dabei dessen obere Kante mit Isopropanol bedeckt, um einen möglichst geraden Abschluss des Gels zu erreichen. Nach circa 20 min war das Gel ausreichend polymerisiert und das verbliebene Isopropanol konnte abgekippt werden. Im Anschluss an die Herstellung des Sammelgels



wurde dieses direkt auf das Trenngel gegossen. Mit Hilfe eines Plastikammes wurden hierbei Geltaschen modelliert. Erneut dauerte die Polymerisation des Gels circa 20 min.

Danach konnten die Geltaschen mit jeweils 16  $\mu$ l der in SDS-Puffer aufgenommenen Gesamtproteinextrakte beladen werden. In eine weitere Geltasche wurde 8  $\mu$ l SDS-Puffer mit Molekulargewichtsmarkern als Laufkontrolle geladen. Die Proteinauftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer unter konstanter Stromstärke bei 11 mA. Beendet wurde die Elektrophorese sobald die Blaufärbung des SDS-Proben-Puffers das Trenngel durchlaufen hatte; dies dauerte üblicherweise 2 bis 2,5 h. Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine mit einer Semi-Dry-Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, die zuvor für 5 min auf dem Schüttler in Methanol aktiviert worden war. Dieser Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 80 mA pro Gel und dauerte 1,5 h. Danach folgte die Blockierung der Membran für 60 min bei RT in 4%-igem Rinder-Serumalbumin (BSA) gelöst in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) und 0,05%-igem Tween-20 (TBS-T). Eine Nacht wurde die Membran mit einem Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP bzw. STAT3 (D1B2J) monoklonalem Primärantikörper, beide aus Kaninchen, die zuvor auf eine Konzentration von 1:1000 in 4%-igem BSA in TBS-T verdünnt worden waren, auf einem Schwenker bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag konnten die verschiedenen Proteinbanden immunologisch detektiert werden und gaben so Aufschluss über die Menge an pSTAT3 und totalem STAT3. Dazu wurde die Membran zunächst fünfmal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde ein an IRDye gekoppelter Esel-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper, der zuvor auf eine Konzentration von 1:10000 in 4% BSA in TBS-T verdünnt worden war, hinzugefügt und es folgte eine 60-minütige Inkubation unter Schütteln in einem abgedunkelten Raum, da der Sekundärantikörper photosensitiv ist. Danach wurde die Membran erneut jeweils für 5 min fünfmal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Schließlich erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit Hilfe des LI-COR-Odyssey-Sa-Imaging-Systems.

Um auf derselben Membran die Menge an phosphoryliertem und gesamtem STAT3 sichtbar zu machen, konnte mit Hilfe des Strippings je nach verwendetem Primärantikörper der pSTAT3- oder STAT3-Antikörper entfernt werden. Dafür wurden die Membranen zunächst für 60 min in einem 60 °C warmen Wasserbad in Ablösepuffer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen viermal für jeweils 15 min mit TBS-T gewaschen und für 60 min in 4% BSA in TBS-T blockiert. Danach wurden die Membranen mit dem jeweils anderen STAT3-spezifischen monoklonalen Primärantikörper, entweder Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP Kaninchen oder STAT3 (D1B2J) Kaninchen, eine Nacht auf einem Schwenker

bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die neuen Proteinbanden unter Verwendung des IRDye-konjugierten Sekundärantikörpers auf dem LI-COR-Odyssey-Sa-Imaging-System dargestellt werden.

### 2.2.9 Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Ziel des EMSA war die autoradiographische Darstellung von DNA-STAT3-Interaktionen mittels [<sup>33</sup>P]-markierter DNA-Sonden. Die radioaktive Markierung erfolgte am 3'-Ende der zuvor hybridisierten, doppelsträngigen Oligonukleotid-Sonden mit [<sup>33</sup>P]-dATP-Nukleotiden unter Zuhilfenahme eines Klenow-Fragmentes der *E. coli*-DNA-Polymerase. Hierfür wurde als Sonde M67 mit einer hoch-affinen GAS-Sequenz genutzt.

Für die Oligonukleotid-Hybridisierung wurde 50 pM Oligo-Puffer mit 100 pM teilweise komplementären Oligonukleotiden gemischt und die Mischung wurde für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die radioaktive Markierung erfolgte durch Zugabe von 0,1 ng Oligonukleotiden, 0,8 µl [<sup>33</sup>P]-dATP und 5 U Klenow-Enzym zu 5 µl Eco-Pol-Puffer. Diese Mischung wurde für 25 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der 5-minütigen Inkubationsperiode wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl EDTA Lösung (0,5 M) gestoppt. Mittels einer sich anschließenden 3-minütigen Zentrifugation mit Illustra MicroSpin-G-25-Säulen bei 700 g und RT wurden freie Nukleotide entfernt. Die radioaktiv markierten Proben wurden bis zur Nutzung in EMSA-Experimenten bei 4 °C gelagert.

Für die Elektrophorese wurde ein nicht-denaturierendes TBE-Polyacrylamidgel verwendet. Hierdurch war eine Differenzierung der Proteinbanden von DNA-gebundenem STAT3 und der freien, ungebundenen Sonde möglich. Das TBE-Polyacrylamidgel setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen: 0,1% TEMED, 12% Rotiphorese-Gel 40, 4,8% 5 x TBE und 0,2% APS. Vor der Nutzung wurden die Gele für 2 h bei einer konstanten Spannung von 400 V äquilibriert. Für den EMSA wurden 4,5 µl der zuvor gewonnenen Proteinextrakte in einem SDS-freien Puffer zu 8,5 µl eines hergestellten Master-Mixes, bestehend aus 1 µl Poly-dIdC (2 mg/ml), 2,5 µl 5 x Shift-Puffer, 1,3 µl DTT (100 mM), 0,2 µl DNA-Probe und 3,5 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Beladung des Polyacrylamid-Gels mit den fertigen Proben und der Start der Elektrophorese. Die Elektrophorese dauerte insgesamt circa 2,5 h und fand bei 400 V pro Gel in 0,25 x TBE-Puffer statt. Nach erfolgreicher elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel auf ein Whatman-Papier übertragen und dieses wurde vollständig auf einer Heizplatte vakuumgetrocknet. Schließlich erfolgten der Nachweis der radioaktiven Signale auf einer Phosphor-Imager-

Platte und das Auswerten der Autoradiographie mit Hilfe des Typhoon FLA 9500 Scanners und des Software-Programmes TINA v. 2.0.

### 2.2.10 Luciferase-Reportergen-Assay

Ziel des Luciferase-Reportergen-Assays war die Charakterisierung der transkriptionellen Aktivität des STAT3-Wildtyp-Moleküls im Vergleich zur STAT3-Mutante. Hierfür wurde das IFN $\gamma$ - und IL-6-sensitive Reportergenkonstrukt 3xLy6E genutzt, welches aus einer dreifachen GAS-Bindestelle gefolgt vom Luciferase-Gen besteht (Khan et al. 1993; Wen et al. 1995). Zuerst erfolgte die Kultivierung und Transfektion von STAT1-negativen U3A-Zellen in 48-Lochplatten mit den oben genannten STAT3-exprimierenden Plasmiden. Für die Transfektion wurden in jede Kammer jeweils 70 ng des genannten Reportergenkonstruktes zusammen mit 200 ng des  $\beta$ -Galaktosidase-kodierenden Plasmids und 250 ng des jeweiligen STAT3-Expressionsvektors gegeben. Am Folgetag wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder es erfolgte eine 6-stündige Stimulation mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) oder IL-6 (25 ng/ml). Nach Abschluss der Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach folgte die Lyse der Zellen durch 15-minütige Inkubation mit 100  $\mu$ l frisch angesetztem Luciferase-Puffer bei RT. Die Lysate wurden anschließend komplett in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Von dem hierbei entstandenen Überstand wurden jeweils 20  $\mu$ l pro Loch in eine 96-Lochplatte pipettiert. Nach Hinzufügen von 50  $\mu$ l Substratlösung wurde die Luciferase-Aktivität mit dem Luminometer Centro XS<sup>3</sup> LB 960 gemessen. Gemessen wurden pro STAT3-Konstrukt und Stimulationsbedingung jeweils sechs unabhängige Transfektionsansätze. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde das Software Programm MikroWin Version 4.41 genutzt.

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden jeweils 20  $\mu$ l des Überstandes der zentrifugierten Lysate in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben und es wurde 280  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer hinzugefügt. Dadurch kam es nach circa 20-minütiger Inkubationszeit zur Umwandlung von farblosem ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu gelbem ortho-Nitrophenol. Die Reaktionen wurden nach Auftreten des Farbumschlages für alle Proben einer Platte zeitgleich durch Hinzufügen von 500  $\mu$ l Natriumcarbonat-Lösung (0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) beendet. Im Anschluss wurde jeweils 20  $\mu$ l pro Loch in eine frische 96-Lochplatte pipettiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des Lesegerätes Infinite 200 PRO bei einer Wellenlänge von 420 nm photometrisch bestimmt. Um eine standardisierte Messung zu gewährleisten, erfolgte eine Normierung der Luciferase-Aktivität auf die Expression

der kotransfizierten  $\beta$ -Galaktosidase, indem der Quotient aus Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gebildet wurde.

### 2.2.11 Real-time PCR

#### RNA-Extraktion und reverse Transkription in cDNA

Ziel der Real-time PCR war die Messung der Expression von STAT3-regulierten Zielgenen. Hierfür wurden die mit pcDNA-FRT-STAT3-GFP und pcDNA5-muSTAT3-SNAP- HIS-Plasmid transfizierten U3A-Zellen zunächst in Hungermedium (DMEM mit 1% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert und im Anschluss entweder unbehandelt belassen oder für die Dauer von 6 h mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) bzw. IL-6 (25 ng/ml) stimuliert. Danach folgte eine Waschung mit PBS und schließlich die Extraktion der RNA mit Hilfe des PeqGold-Total-RNA-Kits. Die extrahierte RNA konnte entweder eingefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt unter Verwendung des Verso cDNA-Kits von Thermo Fisher Scientific in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die reverse Transkription setzte sich aus einer 30-minütigen Synthesephase bei 42 °C und im Anschluss einem 2-minütigen Denaturierungsvorgang bei 95 °C zusammen. Der genutzte Reaktionsansatz enthielt 8  $\mu$ l RNA in einem Volumen von 20  $\mu$ l. Die gewonnene cDNA konnte bis zur Verwendung in der Real-time PCR bei -20 °C gelagert werden.

#### Real-time PCR

Zunächst wurde ein Master-Mix, bestehend aus 10  $\mu$ l Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green-Mix, 8,4  $\mu$ l ddH $_2$ O und jeweils 0,28  $\mu$ l eines spezifischen Primerpaares (5  $\mu$ M), hergestellt. Hiervon wurden 19  $\mu$ l zusammen mit 1  $\mu$ l cDNA blasenfrei auf eine weiße 96-Lochplatte gegeben. Diese wurde im Anschluss dicht mit adhärentem Film verschlossen. Verwendete Primerpaare waren: *BCL-XL* F und R, *c-Myc* F und R sowie *CyclinD1* F und R. Außerdem wurde konstitutiv exprimierte *GAPDH* als Referenzgen genutzt. Es erfolgten pro Reaktionsansatz drei unabhängige Messungen und die Reaktion lief in folgenden Schritten ab:

Schritt 1	Denaturierung, 15 min, 95 °C
Schritt 2	Denaturierung, 15 sek, 95 °C
Schritt 3	Primer-Hybridisierung, 30 sek, 55 °C
Schritt 4 (45 Zyklen der Schritte 2 bis 4)	Synthese, 30 sek, 72 °C

**Tabelle 19: Reaktionsschritte der Real-time PCR.**

Abschließend erfolgte die Quantifizierung und der Vergleich der relativen Expressionsniveaus der verschiedenen STAT3-Zielgene. Hierfür wurde folgende Formel genutzt:

$$2^{-(\Delta\Delta Ct \text{ Ziel} - \Delta Ct \text{ Referenzprobe})}$$

### 2.2.12 Fluoreszenzanalysen

#### Mikroskopische Analysen

##### Direkte Immunfluoreszenz

Ziel der direkten Fluoreszenzmikroskopie war es, die subzelluläre Verteilung und das nukleäre Akkumulationsverhalten der verschiedenen STAT3-Konstrukte zu charakterisieren. Zur Detektion und Darstellung der Zellkerne wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M genutzt und verschiedene Fluoreszenzfilter sowie Wellenlängen verwendet. Die Aufnahme der Hoechst-gefärbten Zellkerne erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm, die der GFP-markierten STAT3-Emissionen bei 480 nm und die der SNAP-markierten STAT3-Emissionen bei 550 nm. Für diese Analysen wurden auf 8-Kammer-Objektträgern kultivierte HeLa- bzw. U3A-Zellen genutzt. Diese wurden mit STAT3-WT oder mutiertem Plasmid transfiziert und am Folgetag zu den angegebenen Zeiten mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) oder IL-6 (25 ng/ml) stimuliert.

Bei den SNAP-konjugierten Proben wurde vor der Stimulation das chromophore Substrat SNAP-Cell-TMR-Star zur Markierung eingebracht. Hierfür wurde zuerst das Kulturmedium aus den jeweiligen Kammern entfernt, anschließend 60  $\mu$ l pro Kammer SNAP-Cell-TMR-Star, verdünnt auf 1:2000 in frischem, vorgewärmtem Kulturmedium, auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit frischem, vorgewärmtem Medium gewaschen, danach pro Kammer mit 300  $\mu$ l neuem Kulturmedium versehen und abermals für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Nach Abschluss der Stimulation wurde das Medium aus allen Kammern verworfen und es folgte eine einmalige Waschung mit PBS. Anschließend erfolgte die Fixation der Zellen mit 300  $\mu$ l 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) verdünnt in PBS für 15 min auf dem Schüttler. Der Fixation schloss sich jeweils eine Waschung mit PBS und eine mit ddH<sub>2</sub>O an. Danach wurden 300  $\mu$ l photosensitive Hoechst-Lösung (1:2000 in PBS) pro Kammer hinzugefügt und die Objektträger für 10 min bei RT im Dunkeln und auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut gewaschen, zweimalig mit PBS und einmalig mit ddH<sub>2</sub>O. Im letzten Schritt wurden die Kammern von dem Objektträger entfernt und es folgte die Bedeckung

der Zellen mit Fluoromount-G-Eindeckmedium. Für eine optimale Aushärtung des Eindeckmediums wurden die Objektträger mindestens eine Nacht lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

### Immunfärbung

Zur Beurteilung der zytokininduzierten, nukleären Akkumulation von unmarkiertem, rekombinantem STAT3 wurden immunzytochemische Färbungen genutzt. Zuerst wurden U3A- bzw. HeLa-Zellen in 8-Kammer-Objektträgern mit pcDNA-FRT-STAT3-GFP- und pcDNA5-muSTAT3-SNAP-HIS-Konstrukten kultiviert und am nächsten Tag transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen oder mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) bzw. IL-6 (25 ng/ml) zu den angegebenen Zeiten stimuliert. Nach Abschluss der Stimulation folgte eine einmalige Waschung mit PBS und danach die Zugabe von 200  $\mu$ l pro Kammer -20 °C kaltem Methanol zur Fixierung der Zellen. Nach 15 min Inkubationszeit bei -20 °C wurde das Methanol entfernt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Dann erfolgte unter kontinuierlichem Schütteln für 20 min die Permeabilisierung der Zellen durch Zugabe von 1,0% Triton X-100 verdünnt in PBS. Dem schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit PBS an. Danach wurden die Zellen zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen für 45 min mit 200  $\mu$ l pro Kammer 25% FCS in PBS bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss folgte eine 45-minütige Inkubationsperiode mit 200  $\mu$ l pro Kammer pSTAT3-spezifischem monoklonalem Anti-Kaninchen-Primärantikörper (1:1000 mit 25% FCS verdünnt in PBS) und eine dreimalige Waschung mit PBS. Daraufhin wurden 200  $\mu$ l des photosensitiven monoklonalen Sekundärantikörpers (1:1000 in 25% FCS verdünnt in PBS) auf jede Kammer gegeben und es folgte eine 45-minütige Inkubation unter kontinuierlichem Schütteln im Dunkeln. Hierbei wurde für die SNAP-gekoppelten Proben ein Cy2-konjugierter und für die GFP-gekoppelten Proben ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Anschließend fand eine zweimalige Waschung mit PBS statt. Danach erfolgte die bereits beschriebene Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff und die Fixation der Zellen auf dem Objektträger mittels Fluoromount-G-Eindeckmedium.

Unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops wurden mit einer CCD-Kamera Aufnahmen der Präparate angefertigt. Hierbei wurde für die Cy2-konjugierten Proben eine Wellenlänge von 492 nm und für die Cy3-konjugierten Proben eine Wellenlänge von 550 nm verwendet. Anhand der Aufnahmen wurden die Fluoreszenzintensitäten von Zytoplasma und Nukleus verglichen und die nukleozytoplasmatische Verteilung bestimmt. Für die Auswertung und Bearbeitung der Aufnahmen wurden die Software Programme Fiji/ImageJ (NIH) und CorelDRAW 2019 graphics suite (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) genutzt. Hierbei

wurden von mindestens zehn zufällig ausgewählten Zellen pro Stimulationsbedingung Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet und diese graphisch dargestellt.

### 2.2.13 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens dreimal mit unabhängigen Reaktions- sowie Transfektionsansätzen durchgeführt. Es wurden für die Proben des STAT3-WT und der generierten Punktmutanten für jede Stimulationsbedingung Standardabweichungen und Mittelwerte errechnet. Die verschiedenen STAT3-Konstrukte wurden mit Hilfe unpaariger, zweiseitiger t-Tests oder Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests verglichen und statistisch signifikante Unterschiede erfasst. In allen Tests wurde ein p-Wert  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant bewertet.

Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der Software-Programme GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim). Digitale Bilder wurden mit Hilfe des Software-Programmes Fiji/ImageJ ausgewertet und für die Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm CorelDRAW 2019 graphics suite genutzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kristallographische Darstellung der zwei Aminosäurereste F174 und D427 im STAT3-Molekül

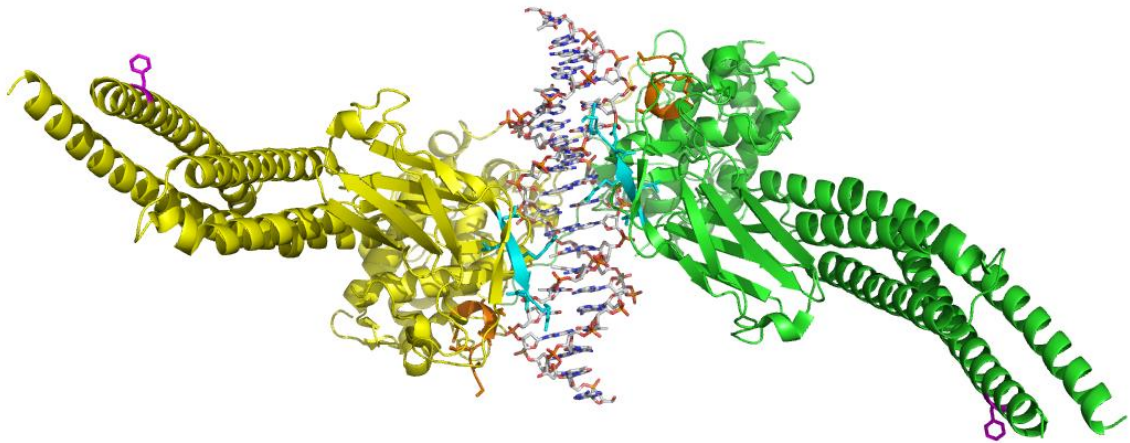
Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit Hilfe gentechnischer Methoden die Herstellung der zwei Punktmutationen F174A bzw. D427H im murinen STAT3-Molekül, dessen Aminosäuresequenz sich vom homologen humanen STAT3 nur in einer Position (760) unterscheidet (Pietra et al. 1998). Das Ziel war die genaue Charakterisierung der spezifischen Eigenschaften der STAT3-D427H-Mutante, dazu zählen das Phosphorylierungsniveau, das nukleäre Akkumulationsverhalten, die Zielgenaktivierung, die DNA-Interaktion und die transkriptionelle Aktivität. Die bereits beschriebene und charakterisierte F174A-Mutante in der Coiled-coil-Domäne des STAT3-Moleküls wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle im Sinne einer Gain-of-Function-Mutation verwendet.

Die Entscheidung, den Aminosäurerest Aspartat an Position 427 im STAT3-Molekül für die Mutagenese zu verwenden, hatte mehrere Gründe. Zum einen zeigen alle humanen STAT-Proteine an dieser Position der DNA-Bindedomäne eine starke Homologie und weisen eine Aminosäure mit negativer Ladung auf. Daher erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Aminosäurerest eine spezifische Funktion haben könnte. Zum anderen wurde die STAT3-D427H-Mutante bereits in der Literatur mit möglicherweise onkogenem Potential erwähnt und das Ziel dieser Arbeit war es, die Mutante weiter zu charakterisieren bzw. zu reevaluieren.

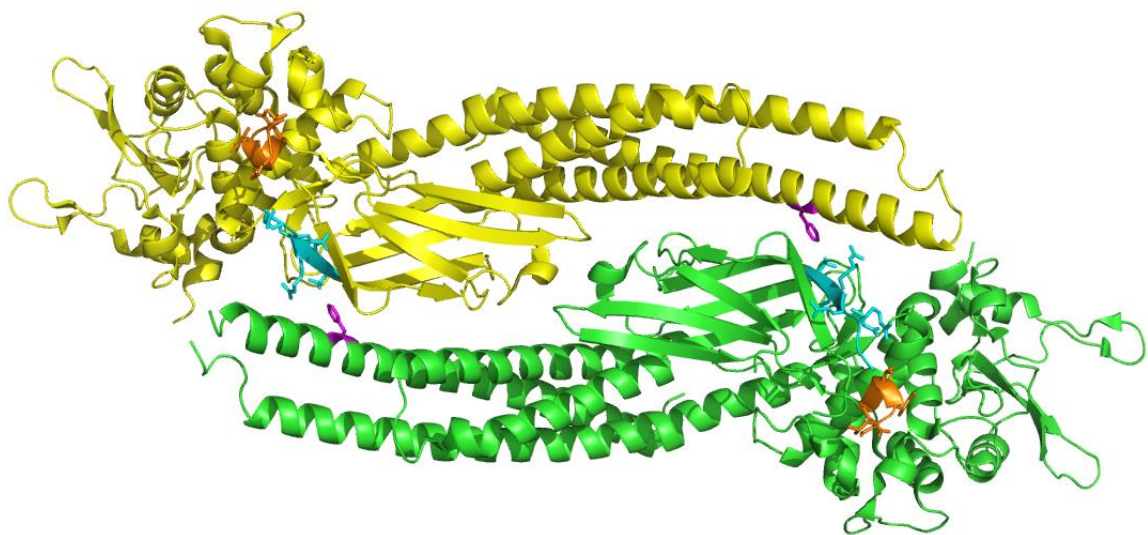
Um die Lokalisation der Punktmutation D427H innerhalb des STAT3-Moleküls bzw. genauer die Lage des nativen Aminosäurerestes D427 zur DNA-Doppelhelix bei der DNA-Bindung zu veranschaulichen, wurde dessen Position in der kristallographischen Struktur des DNA-gebundenen STAT3-Dimers bestimmt (Abbildung 2). Sowohl in Abbildung 2 als auch in Abbildung 3 konnte der Sequenzbereich der untersuchten Punktmutation D427H im STAT3-Molekül nicht dargestellt werden, da die Elektronendichte aufgrund der Flexibilität dieses Bereiches hier nicht genau definiert ist. Aus diesem Grund konnten nur die Sequenzbereiche vor und hinter der Punktmutation D427H markiert werden. Dennoch ist aus Abbildung 2 ersichtlich, dass der Sequenzbereich der Punktmutation selbst, trotz der Flexibilität dieser Region, in naher räumlicher Beziehung zur DNA stehen muss.



Die als Positivkontrolle fungierende Punktmutante F174A ist in den Abbildungen ebenfalls hervorgehoben. Diese zeigt aufgrund der großen räumlichen Distanz zur DNA (Abbildung 2) keinen Einfluss auf die DNA-Bindung, ist aber essenziell an der Ausbildung der antiparallelen Konformation des STAT3-Dimers beteiligt (Abbildung 3).



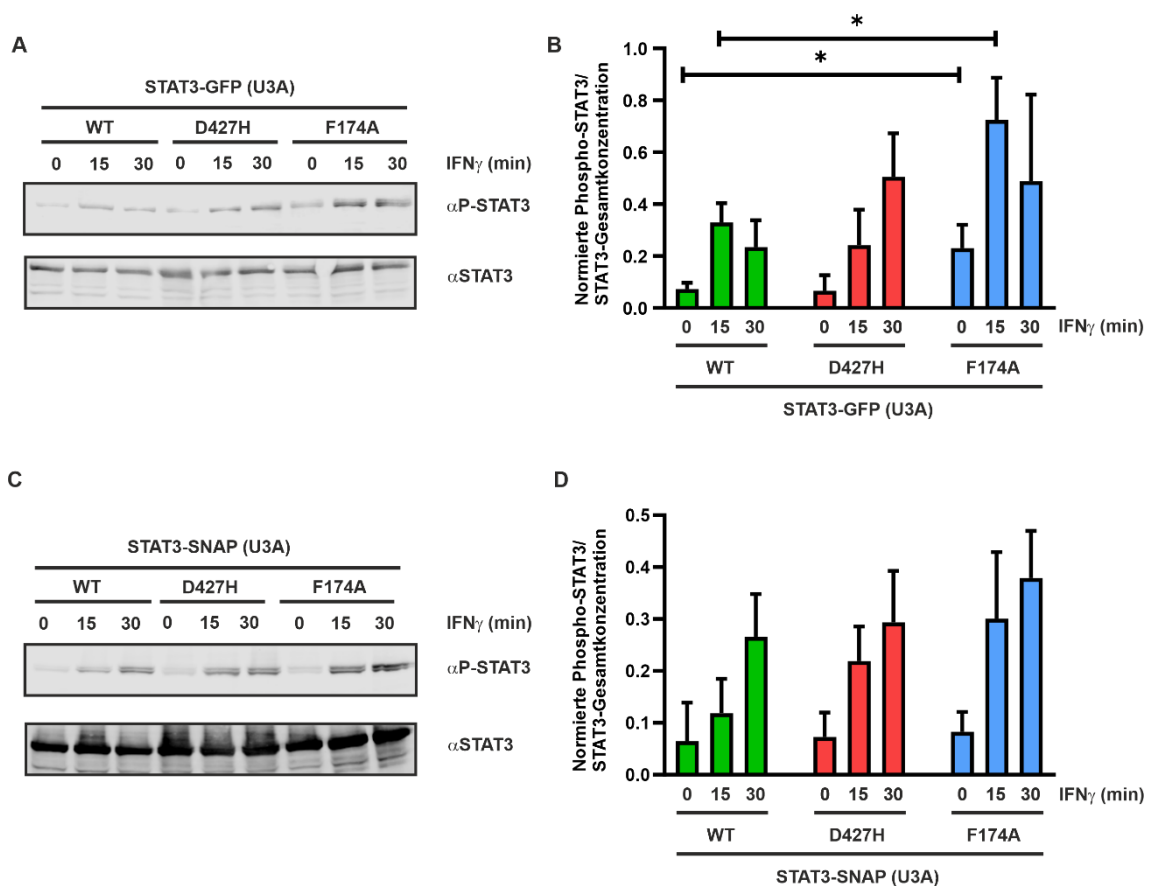
**Abbildung 2: Kristallstruktur eines parallel angeordneten, DNA-gebundenen STAT3-Dimers.** Die kristallographische Darstellung zeigt die Interaktion eines parallelen STAT3-Dimers mit der DNA-Doppelhelix und die daran beteiligten Strukturen (Belo et al. 2019). Besonders hervorgehoben sind die Sequenzbereiche, die unmittelbar N-terminal (türkis) und C-terminal (orange) der untersuchten Punktmutation D427H lokalisiert sind. Zusätzlich ist die Punktmutante F174A (magenta) dargestellt.



**Abbildung 3: Kristallstruktur eines STAT3-Dimers in antiparalleler Konformation.** Die kristallographische Darstellung veranschaulicht die interagierenden Strukturen in einem antiparallel angeordneten STAT3-Dimer (La Sala et al. 2020). Besonders hervorgehoben sind die Sequenzbereiche vor (türkis) und hinter (orange) der untersuchten Punktmutation D427H. Zusätzlich ist die Punktmutante F174A (magenta) dargestellt.

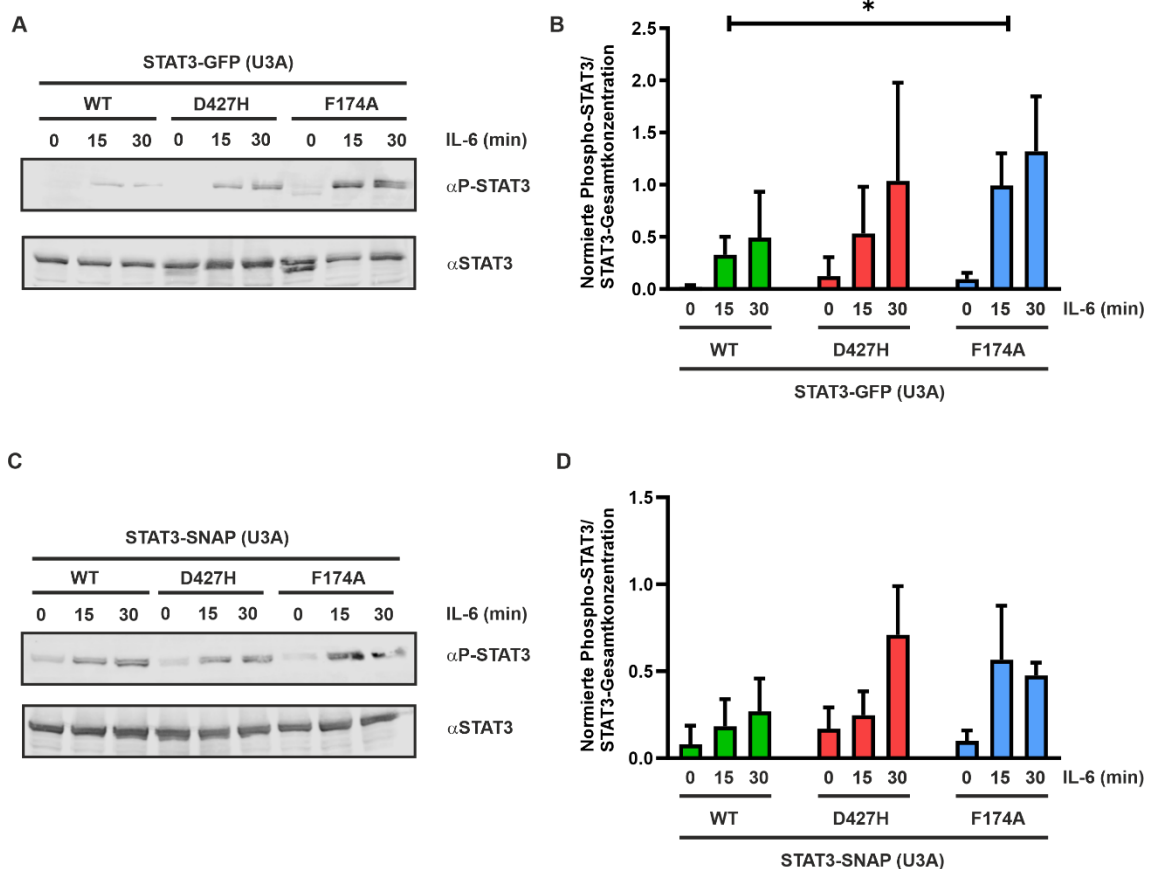
### 3.2 Normale Phosphorylierungskinetik von STAT3-D427H im Vergleich zum WT-Molekül

Für die Untersuchung der Phosphorylierungskinetik der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül sowie zur F174A-Mutante wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen ausplattiert, am Folgetag mit GFP- oder SNAP-Plasmiden, kodierend für die Mutanten bzw. den WT, transfiziert und wiederum am nächsten Tag unstimuliert belassen oder mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) oder IL-6 (25 ng/ml) für 15 bzw. 30 min stimuliert. Aus den Zellen wurden Gesamtzellextrakte gewonnen und für die SDS-Gelelektrophorese genutzt. Im Anschluss wurden die elektrophoretisch separierten Proteinbanden auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurden zwei verschiedene Antikörper zur Darstellung verwendet, ein Phosphotyrosin-spezifischer STAT3-Antikörper zur Charakterisierung des Phosphorylierungsniveaus und ein pan-STAT3-spezifischer Antikörper zur Bestimmung der Gesamt-STAT3-Menge.

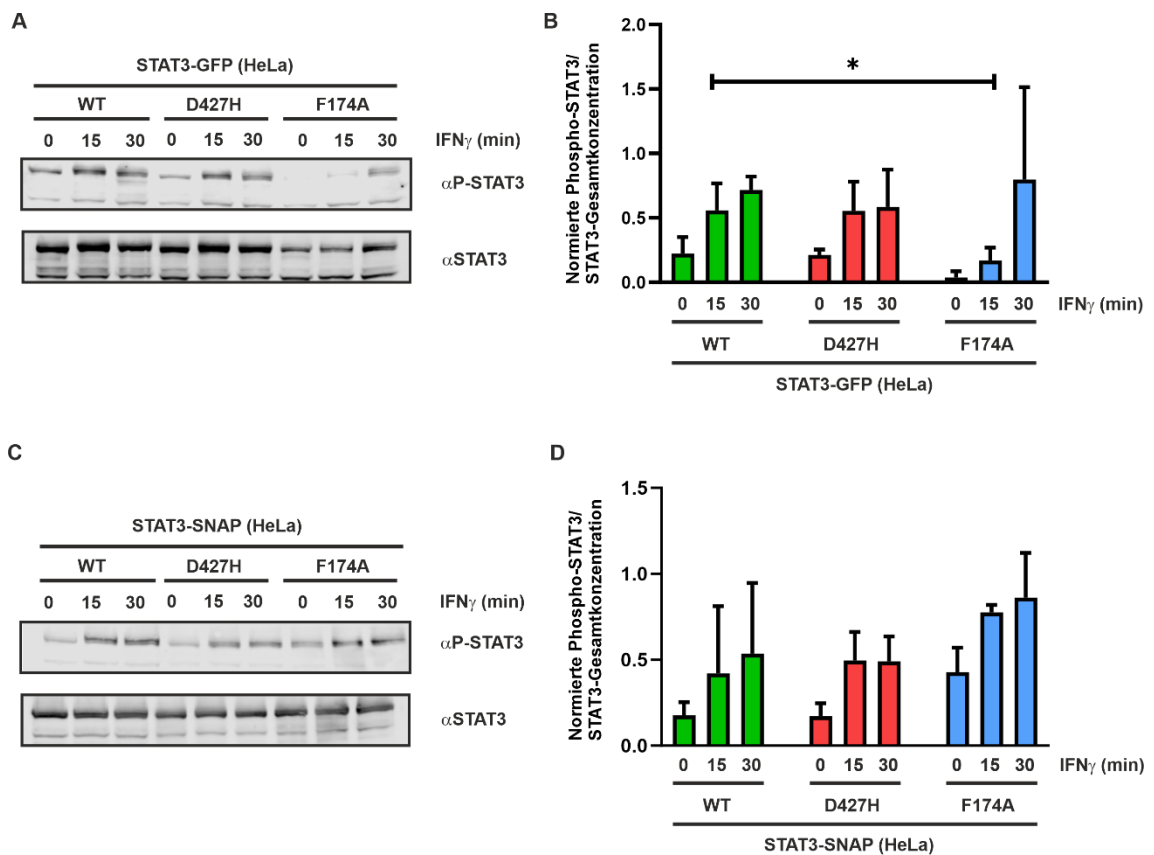


**Abbildung 4: Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül in transient transfizierten U3A-Zellen nach IFN $\gamma$ -Stimulation.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit GFP- oder SNAP-Plasmiden, kodierend für die Mutanten bzw. den WT, transfiziert und am Folgetag für 15 bzw. 30 min mit IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Repräsentative Ergebnisse von Western-Blot-

Analysen, durchgeführt mit GFP-konjugierten Gesamtzellextrakten, dargestellt mit Hilfe eines Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörpers ( $\alpha$ pSTAT3) und eines pan-STAT3-spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ STAT3). (B) Darstellung der Quantifizierung dieser Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Sternchen in (B) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied im Phosphorylierungsniveau zwischen dem WT-Molekül und der jeweiligen STAT3-Mutante. (C) Repräsentatives Western-Blot-Resultat aus mit SNAP-Fusionsproteinen markierten Gesamtzellextrakten, angefärbt mit einem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper ( $\alpha$ pSTAT3) und einem pan-STAT3-spezifischen Antikörper ( $\alpha$ STAT3). (D) Abbildung der Quantifizierung dieser Resultate aus drei verschiedenen Transfektionsansätzen.



**Abbildung 5: Fehlende signifikante Hyperphosphorylierung der STAT3-D427H-Mutante im Unterschied zu F174A in IL-6-stimulierten U3A-Zellen.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit GFP- oder SNAP-Plasmiden, kodierend für die Mutanten bzw. das WT-Protein, transfiziert und am Folgetag für 15 bzw. 30 min mit IL-6 stimuliert. (A) Repräsentatives Ergebnis einer Western-Blot-Analyse durchgeführt mit GFP-konjugierten Gesamtzellextrakten und dargestellt mit Hilfe eines Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörpers ( $\alpha$ pSTAT3) sowie eines pan-STAT3-spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ STAT3). (B) Darstellung der Quantifizierung dieser Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Ein Sternchen in (B) kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen dem WT-Molekül und der jeweiligen STAT3-Mutante. (C) Typisches Western-Blot-Resultat aus mit SNAP-Fusionsproteinen markierten Gesamtzellextrakten, angefärbt mit einem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper ( $\alpha$ pSTAT3) und einem pan-STAT3-spezifischen Antikörper ( $\alpha$ STAT3). (D) Quantifizierung dieser Resultate von SNAP-markierten STAT3-Varianten aus drei verschiedenen Transfektionsansätzen.

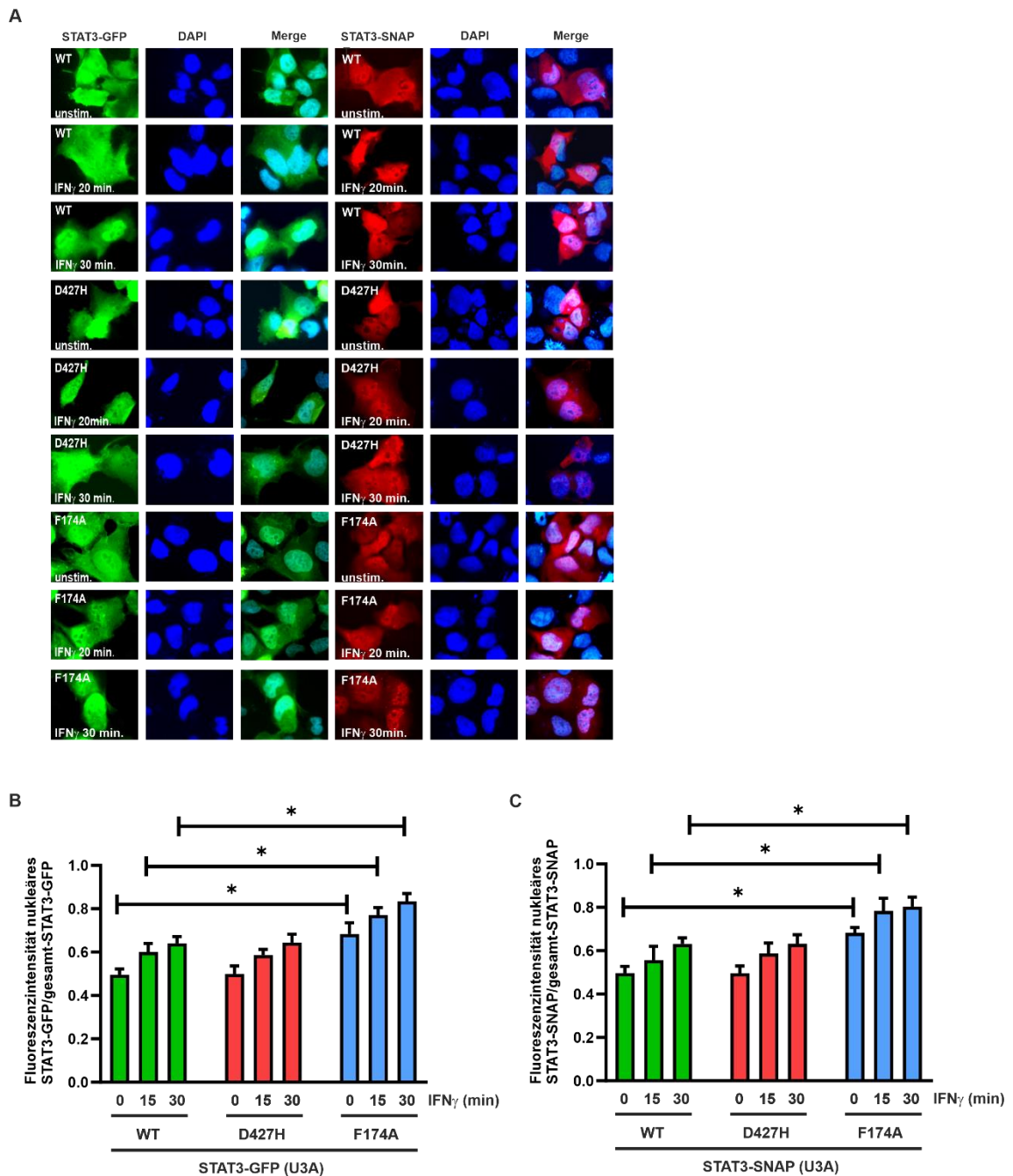


**Abbildung 6: Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-D427H im Vergleich zum Wildtyp-Molekül in IFN $\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen.** HeLa-S3-Zellen wurden mit GFP- oder SNAP-Plasmiden, kodierend für die Mutanten bzw. den WT, transfiziert und am Folgetag für 15 bzw. 30 min mit IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Repräsentatives Ergebnis einer Western-Blot-Bestimmung, durchgeführt mit GFP-konjugierten Gesamtzell-extrakten und dargestellt mit Hilfe eines Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörpers ( $\alpha$ pSTAT3) sowie eines pan-STAT3-spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ STAT3). (B) Darstellung der Quantifizierung dieser Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Ein Sternchen in (B) kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen dem WT-Molekül und der jeweiligen STAT3-Mutante. (C) Repräsentatives Western-Blot-Resultat aus SNAP-Fusionsproteinen enthaltenden Gesamtzell-extrakten, angefärbt mit einem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper ( $\alpha$ pSTAT3) und einem pan-STAT3-spezifischen Antikörper ( $\alpha$ STAT3). (D) Die Abbildung zeigt die Quantifizierung dieser Resultate aus drei verschiedenen Transfektionsansätzen.

Die Phosphorylierungskinetik betreffend konnte zwischen der D427H-Mutante und dem STAT3-WT kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 4–6). Im Gegensatz dazu zeigte die F174A-Mutante eine leichte bis teilweise signifikante Hyperphosphorylierung im Vergleich zum STAT3-WT und der D427H-Mutante (Abb. 4–6). Dieses Ergebnis bestätigte sich in U3A- und HeLa-S3-Zellen sowohl unter den Bedingungen einer IFN $\gamma$ - wie auch einer IL-6-Stimulation.

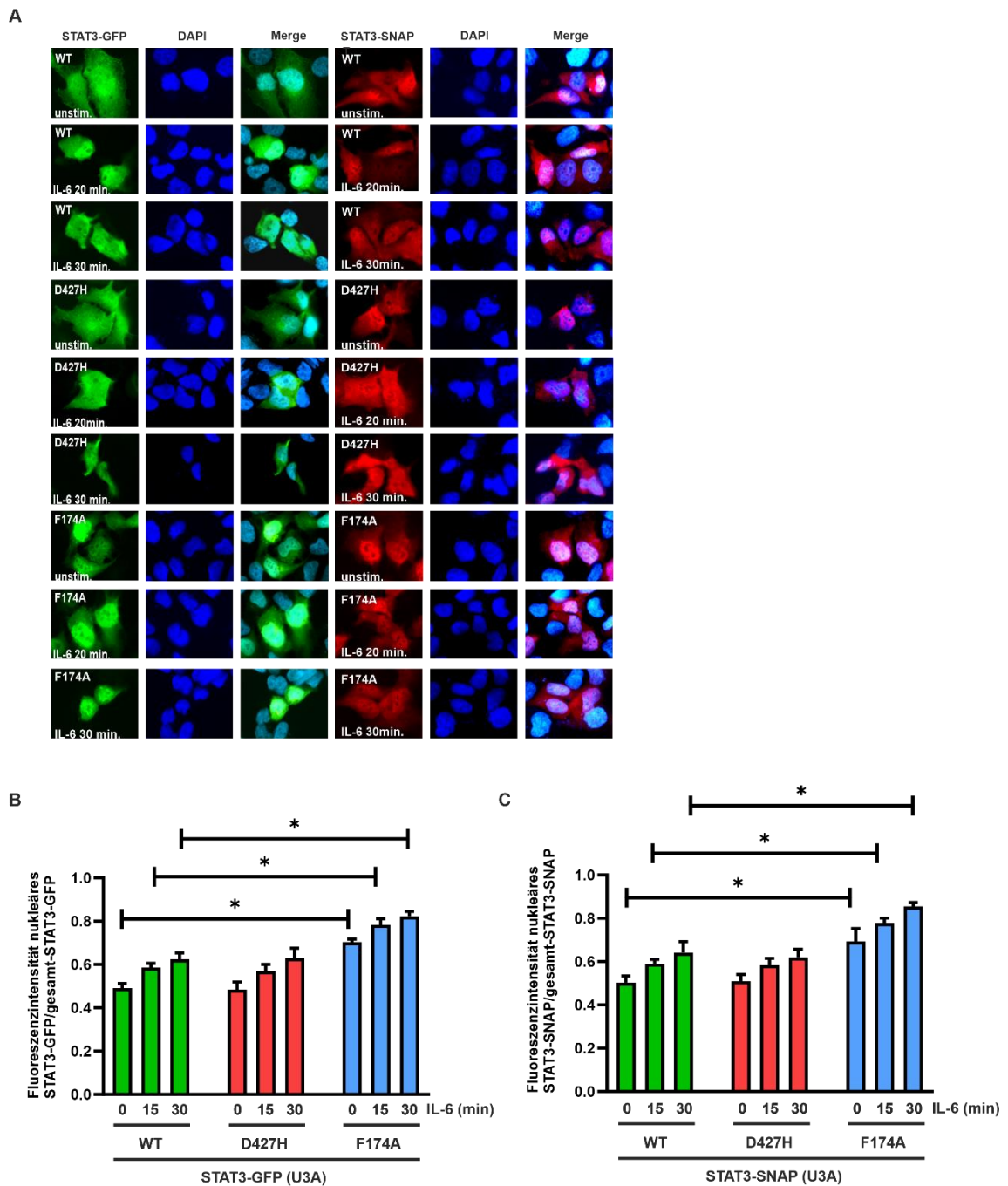
### **3.3 Normale Kinetik der induzierbaren Kernakkumulation von STAT3-D427H**

Die subzelluläre Distribution in unstimulierten Zellen und die zytokininduzierbare nukleäre Akkumulation der verschiedenen STAT3-Konstrukte wurden mittels direkter Immunfluoreszenz sowie in immunzytochemischen Färbungen charakterisiert. Zuerst wurden kultivierte, adhärent wachsende U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen mit GFP- oder SNAP-Plasmiden, kodierend für die STAT3-Mutanten bzw. den WT, transfiziert und am nächsten Tag unstimuliert belassen oder mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) bzw. IL-6 (25 ng/ml) für 15 und 30 min stimuliert. Die Fixierung der Zellen erfolgte in den Präparaten mit der direkten Immunfluoreszenz durch Paraformaldehyd und bei der Immunfärbung durch Methanol. Für die Immunfärbung wurde ein Phospho-STAT3-spezifischer Primärantikörper gefolgt von einem Cy2- bzw. Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper genutzt. Zur mikroskopischen Visualisierung der Lage der Zellkerne wurde sowohl bei der direkten Immunfluoreszenz wie auch bei der Immunfärbung eine Hoechst-Färbung vorgenommen.



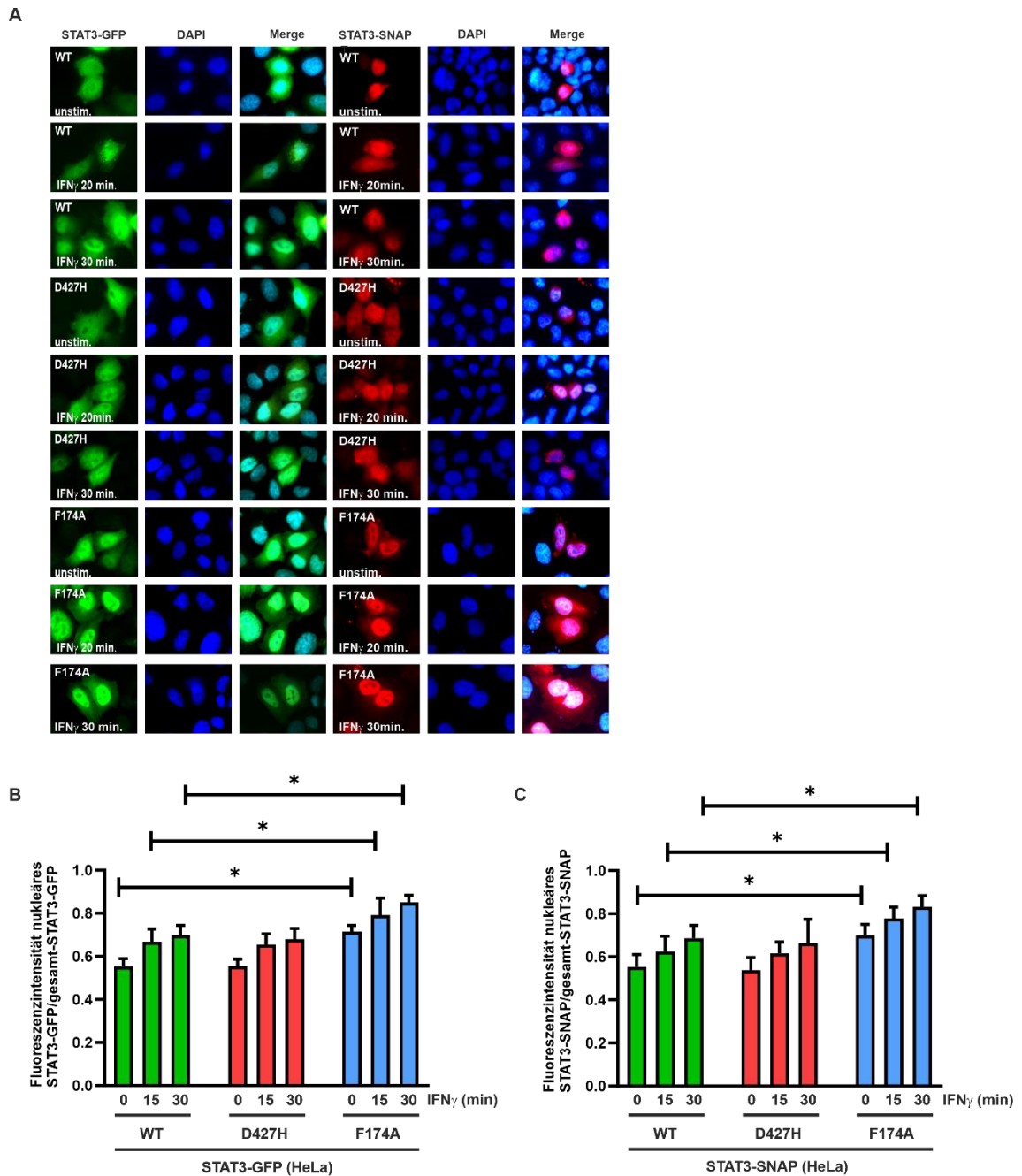
**Abbildung 7: Korrespondierende Kernakkumulation von STAT3-D427H und dem WT-Molekül in IFN $\gamma$ -stimulierten U3A-Zellen bei vorzeitiger Kernakkumulation der F174A-Mutante.** U3A-Zellen, die SNAP-Fusionsproteine oder GFP-Addukte des WT-Moleküls oder der STAT3-Mutanten exprimierten, wurden über die angegebenen Zeiträume mit rekombinantem IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen zeigen die Kinetik der intrazellulären Verteilung der GFP- bzw. SNAP-konjugierten STAT3-Konstrukte sowie die Lokalisation der Hoechst-gefärbten Zellkerne ( $n = 3$  unabhängige Transfektionsansätze). (B) Die Histogramme veranschaulichen die nukleozytoplasmatische Distribution von STAT3-GFP in unstimulierten oder IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen, dargestellt durch das Verhältnis von nukleärer zu totaler Fluoreszenzintensität. (C) Die Quantifizierung, dargestellt in Form von Histogrammen, zeigt die nukleozytoplasmatische Verteilung der SNAP-konjugierten STAT3-Konstrukte in Zellen ohne Stimulation bzw. nach IFN $\gamma$ -Stimulation

zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (15 min und 30 min), bestimmt als Quotient aus nukleärer zu totaler Fluoreszenzintensität. Sternchen kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen dem WT-Molekül und der jeweiligen STAT3-Mutante.



**Abbildung 8: Vergleichbares nukleäres Akkumulationsverhalten der D427H-Mutante und des STAT3-WT in transient transfizierten U3A-Zellen nach IL-6-Stimulation.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit SNAP-Fusionsproteinen bzw. GFP-Addukten des WT-Moleküls oder der STAT3-Mutanten transfiziert und zu den angegebenen Zeiten mit 25 ng/ml rekombinantem IL-6 stimuliert. (A) Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen zeigen die intrazelluläre Lokalisation der GFP- bzw. SNAP-konjugierten STAT3-Konstrukte sowie die Position der zugehörigen Hoechst-gefärbten Zellkerne (n = 3 unabhängige Transfektionen).

(B) Die Histogramme veranschaulichen die nukleozytoplasmatische Distribution von STAT3-GFP in unbehandelten und IL-6-stimulierten Zellen, gemessen als das Verhältnis von nukleärer zu totaler Fluoreszenzintensität. (C) Quantifizierung der nukleozytoplasmatischen Verteilung der SNAP-konjugierten STAT3-Konstrukte in Zellen ohne Stimulation und zu zwei Zeitpunkten nach IL-6-Stimulation, bestimmt durch den Quotienten aus nukleärer zu gesamtzellulärer Fluoreszenzintensität. Sternchen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem WT-Molekül und der jeweiligen STAT3-Mutante.



**Abbildung 9: STAT3-D427H zeigt eine dem WT-Molekül entsprechende Kernakkumulation in IFN $\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen.** HeLa-S3-Zellen, die SNAP-Addukte bzw. GFP-Fusionsproteine des WT-Moleküls oder der STAT3-Mutanten exprimierten, wurden zu den angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml rekombinanten IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen zeigen die Kinetik der intrazellulären



Verteilung der GFP- bzw. SNAP-konjugierten STAT3-Konstrukte sowie die Lokalisation der Hoechst-gefärbten Zellkerne ( $n = 3$  unabhängige Transfektionen). (B) Die zu (A) gehörenden Histogramme veranschaulichen die nukleozytoplasmatische Distribution von STAT3-GFP in unstimulierten oder IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen als das Verhältnis von nukleärer zu totaler Fluoreszenzintensität. (C) Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der nukleozytoplasmatischen Verteilung der SNAP-konjugierten STAT3-Konstrukte in Zellen ohne Stimulation oder nach IFN $\gamma$ -Stimulation, bestimmt durch den Quotienten aus nukleärer zu totaler Fluoreszenzintensität. Sternchen kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen dem WT-Molekül und jeweiliger STAT3-Mutante.

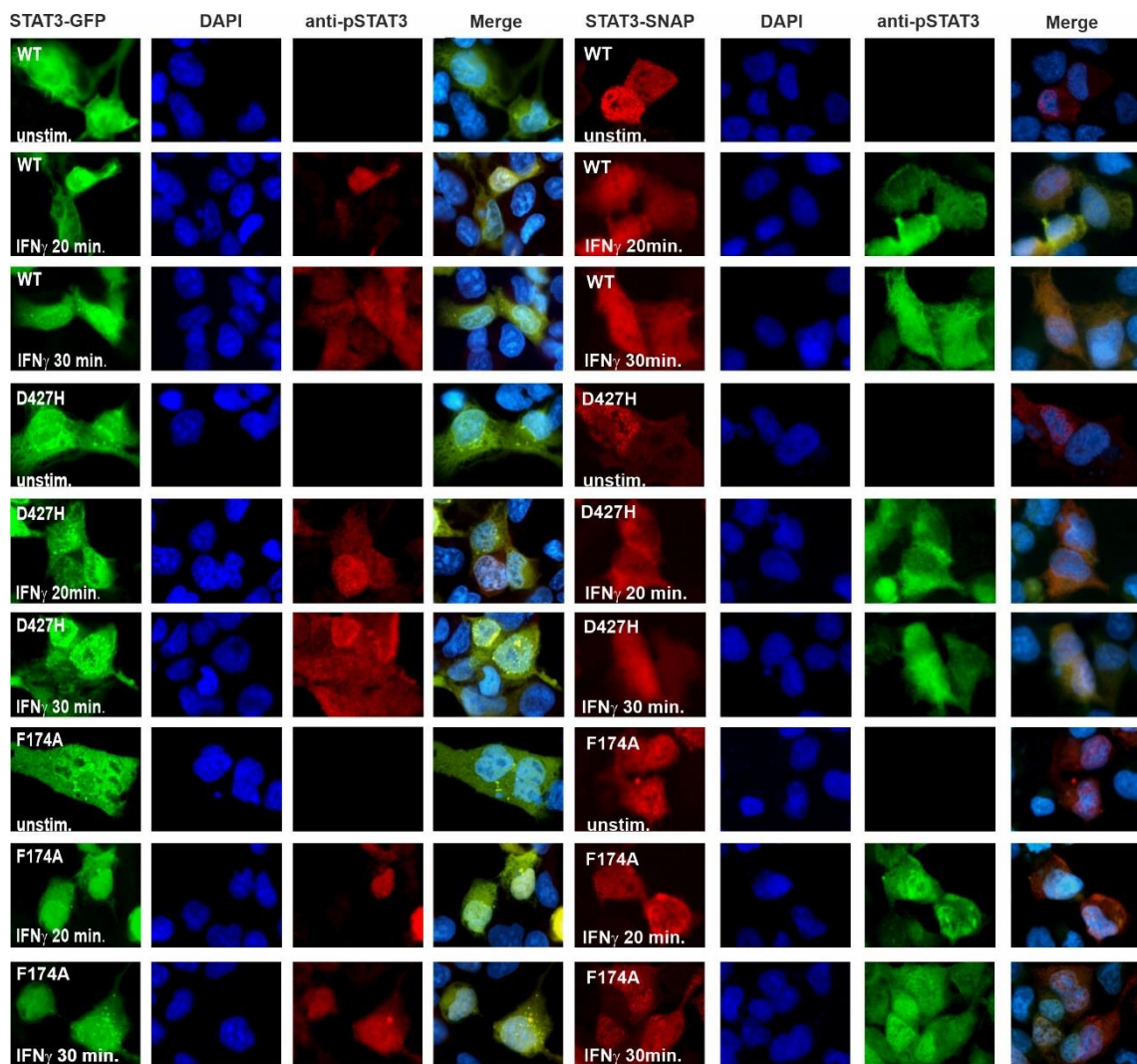
Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der unstimulierten Zellen ermöglichte eine Aussage über die Ruheverteilung von STAT3-Molekülen innerhalb der Zelle. Sie demonstrierte eine panzelluläre Verteilung von STAT3 mit vorrangig zytoplasmatischer Lokalisation. Nach Zytokinexposition sowohl mit IFN $\gamma$  als auch mit IL-6 kam es zur Akkumulation von Phospho-STAT3 im Nukleus. Die Kernakkumulation war bereits nach 15 min zu beobachten und erreichte ihr Maximum nach 30 min. Die D427H-Mutante und das WT-Protein unterschieden sich nicht in Bezug auf die Kinetik der induzierbaren nukleären Akkumulation; sie hatten ein vergleichbares Verhalten (Abb. 7–9). Im Vergleich dazu zeigte die F174A-Mutante bereits im unstimulierten Zustand eine signifikant höhere Kernretention als das WT-Molekül und die D427H-Mutante. Diese signifikant erhöhte nukleäre Akkumulation war auch nach Stimulation mit IFN $\gamma$  oder IL-6 zu beobachten (Abb. 7–9).

### **3.4 Immunzytochemische Darstellung der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von D427H in STAT3-exprimierenden U34A- und HeLa-Zellen**

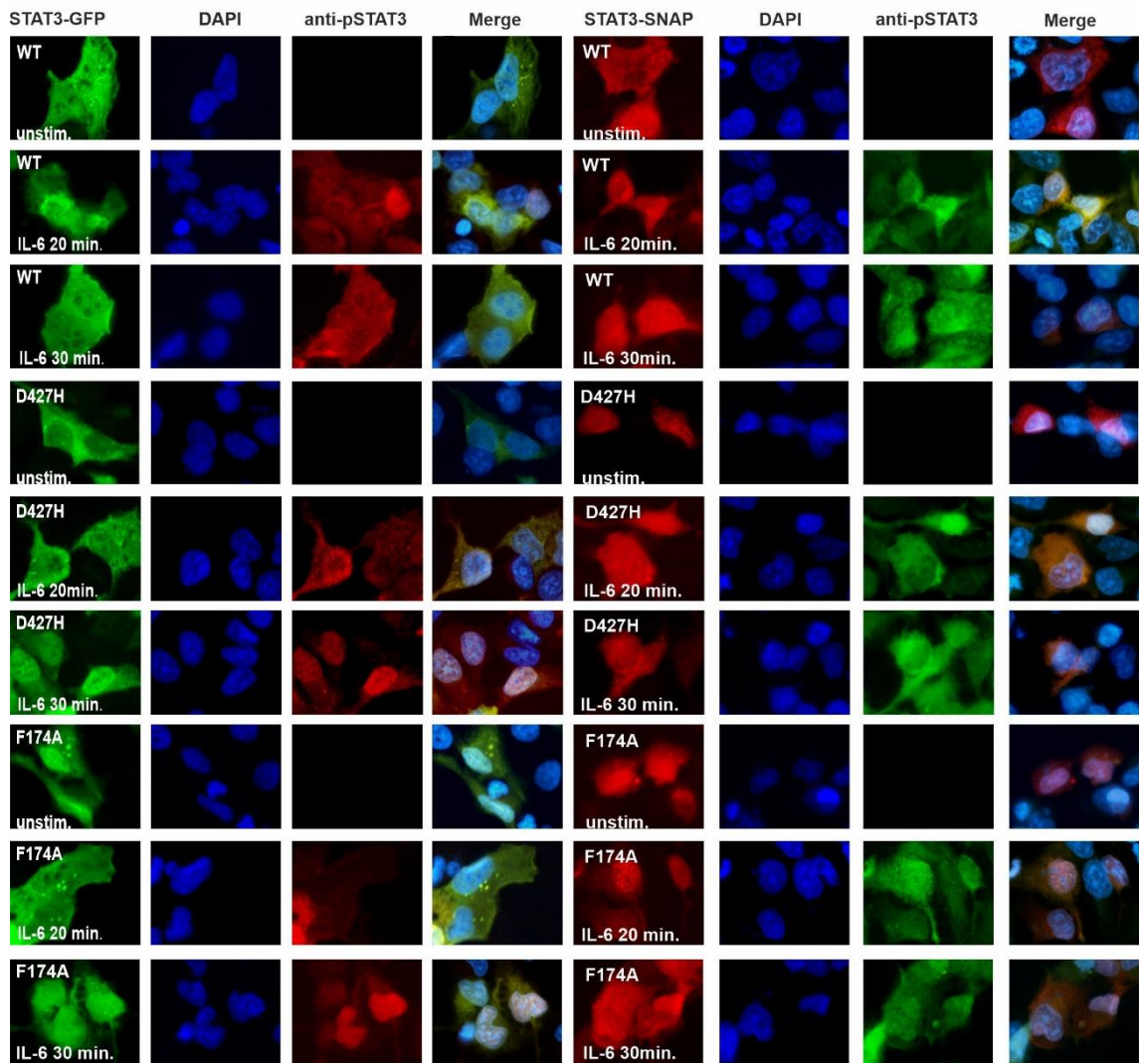
In einer Serie von weiteren Experimenten wurde mittels immunozytochemischer Färbungen die Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung in U3A- und HeLa-Zellen untersucht, die Wildtyp-STAT3 oder seine beiden Punktmutanten D427H und F174A exprimierten. Dazu wurden Methanol-fixierte Zellen, die entweder GFP- oder SNAP-markierte STAT3-Varianten exprimierten und zuvor mit den Zytokinen IFN $\gamma$  oder IL-6 stimuliert worden waren, verwendet. Die fixierten Zellen wurden mit dem Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper Y705 gegen STAT3 unter Verwendung von Chromophor-gekoppelten Zweitantikörpern gefärbt. Bei den Zweitantikörpern handelte es sich im Falle der GFP-Konstrukte um Cy3-markierte und bei den SNAP-Addukten um Cy2-markierte Immunglobuline.

In den unstimulierten Zellen fand sich kein spezifisches, durch Phosphotyrosin detektierbares Signal im Sinne einer nicht stattgefundenen Tyrosin-Phosphorylierung (Abb. 10–12).

Demgegenüber konnte durch Stimulation mit den Zytokinen IFN $\gamma$  bzw. IL-6 in allen durchgeführten Experimenten eine spezifische Immunopositivität als Hinweis auf die erfolgte Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 10–12). Dieses galt sowohl für GFP- als auch SNAP-markierte STAT3-Konstrukte in U3A- und HeLa-Zellen. In vielen der untersuchten Färbungen fand sich zudem eine Zunahme der Kernakkumulation von Tyrosinphosphoryliertem STAT3 über einen Stimulationszeitraum von 20 zu 30 min.



**Abbildung 10: Immunzytochemischer Nachweis der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-D427H und STAT3-F174A im Vergleich zum Wildtyp-Molekül in IFN $\gamma$ -stimulierten U3A-Zellen.** U3A-Zellen, die GFP-Addukte (linke Hälfte) bzw. SNAP-Fusionsproteine (rechte Hälfte) des WT-Moleküls oder der STAT3-Mutanten exprimierten, wurden zu den angegebenen Zeiten mit 50 ng/ml rekombinantem IFN $\gamma$  stimuliert. In den mit kaltem Methanol fixierten Zellen erfolgte die Färbung mit dem Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper Y705 gegen STAT3 unter Verwendung von Chromophor-gekoppelten Zweitantikörpern. Die GFP-Konstrukte wurden mit Cy3-markierten und die SNAP-Addukte mit Cy2-markierten Sekundärantikörpern gefärbt; eine Kernfärbung erfolgte mit Hoechst-Farbstoff.



**Abbildung 11: Zeitabhängigkeit der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-WT sowie den Mutanten D427H und F174A in IL-6-stimulierten U3A-Zellen.** Der experimentelle Ablauf entsprach der in Abbildung 10 beschriebenen Versuchsdurchführung mit dem Unterschied, dass anstelle von  $\text{IFN}\gamma$  als stimulierendes Zytokin IL-6 in der Konzentration 25 ng/ml verwendet wurde.

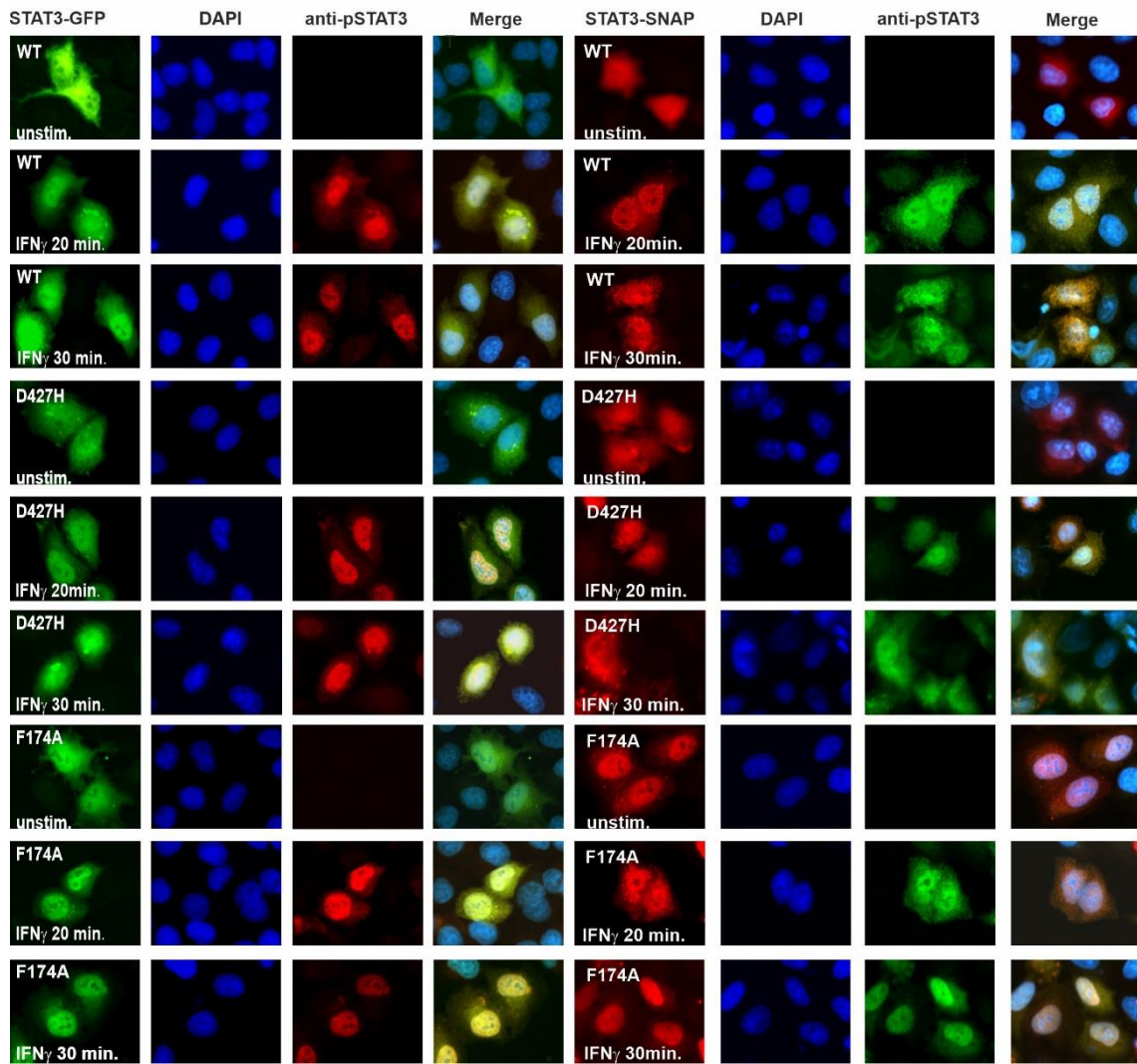
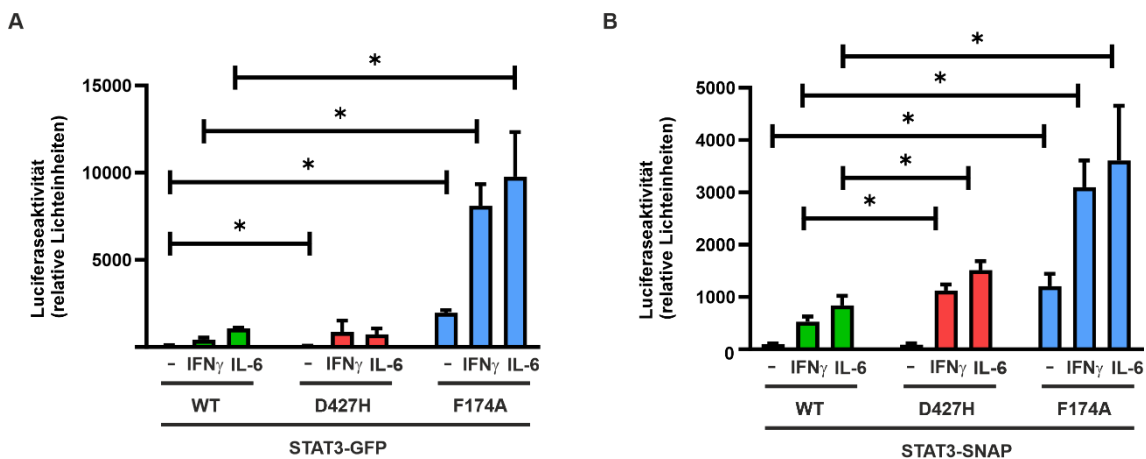


Abbildung 12: Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3-WT sowie den Mutanten D427H und F174A in IFN $\gamma$ -stimulierten HeLa-Zellen. Der experimentelle Ablauf entsprach dem in Abbildung 10, außer dass hier als Zelllinie transfizierte HeLa-Zellen verwendet wurden.

### 3.5 Transkriptionelle Aktivität der F174A- und D427H-Mutanten im Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Zur Charakterisierung der Zielgenaktivierung der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT-Protein sowie zur F174A-Mutante wurde der an das Luciferase-Gen gekoppelte Promotor 3xLy6E mit dreifacher GAS-Bindestelle genutzt, der von STAT3 nach IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-Stimulation in den transfizierten Zellen gebunden wird. Es wurden U3A-Zellen verwendet und mit GFP- oder SNAP-Plasmiden, kodierend für die Mutanten bzw. das WT-Molekül, zusammen mit einem Luciferase-kodierenden Reporter mit dem Promotor 3xLy6E sowie dem  $\beta$ -Galaktosidase-Vektor als drittes Plasmid kotransfiziert. Am Folgetag nach der Transfektion wurden die Zellen unstimuliert belassen oder für 6 h mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) bzw.

IL-6 (25 ng/ml) stimuliert. Aus den gewonnenen Gesamtzelllysaten erfolgte die photometrische Bestimmung der Luciferase-Aktivität. Die Bestimmung der Aktivität der kotransfizierten  $\beta$ -Galaktosidase diente der Normierung und erfolgte über die Bestimmung des Quotienten aus der Luciferase- zur  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Hierfür wurden die Extinktionen des bei der Reaktion entstandenen gelben Farbstoffes ONPG photometrisch gemessen. Die beiden Punktmutanten zeigten in den Reporteragen-Assays eine gegenüber dem STAT3-WT-Molekül erhöhte transkriptionelle Aktivität, wobei die Genexpression durch die F174A-Mutante im Vergleich zur D427H-Mutante noch höher war (Abb. 13).

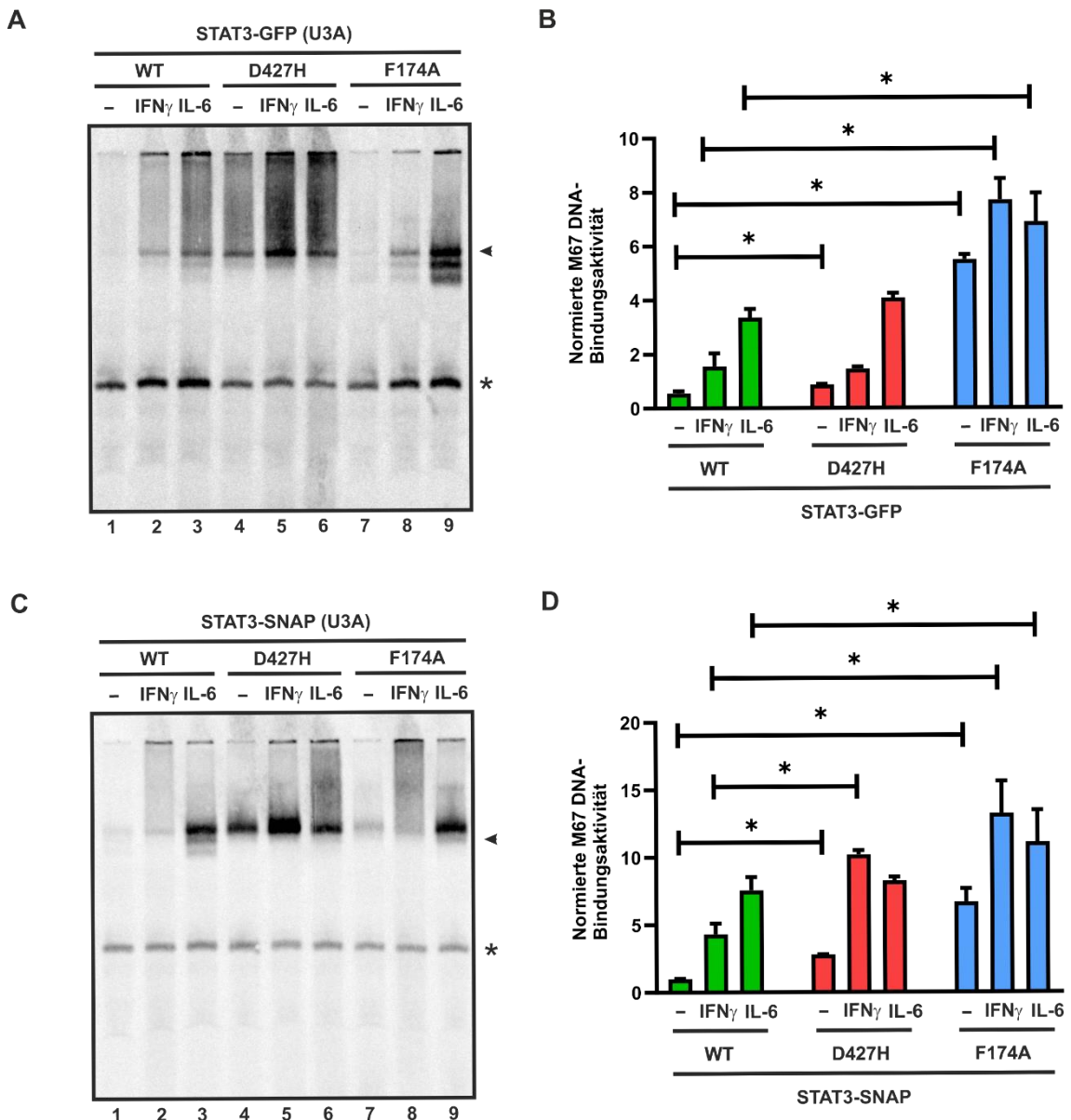


**Abbildung 13: Erhöhte transkriptionelle Aktivität im Luciferase-Reporteragen-Assay von STAT3-D427H und -F174A verglichen mit dem WT-Molekül in IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-stimulierten U3A-Zellen.** Dargestellt sind die Ergebnisse von Luciferase-Reporteragen-Assays in U3A-Zellen, die die verschiedenen STAT3-Konstrukte exprimierten und auf das Expressionslevel der konstitutiv koexprimierten  $\beta$ -Galaktosidase normiert wurden. Das verwendete Reporteragen-Konstrukt 3xLy6E enthält eine dreifache GAS-Bindestelle. Die Zellen verblieben entweder unstimuliert oder wurden für 6 h mit 50 ng/ml IFN $\gamma$  bzw. 25 ng/ml IL-6 behandelt. Es wurde in den Gesamtzellextrakten die Lumineszenz der Luciferase und die enzymatische Aktivität der koexprimierten  $\beta$ -Galaktosidase gemessen. Das Experiment wurde mit jeweils sechs unabhängigen Transfektionsansätzen dreimal wiederholt. Die Graphen zeigen die zytokininduzierte Luciferase-Aktivität der GFP-konjugierten (A) und SNAP-gekoppelten (B) STAT3-Konstrukte. Sternchen signalisieren einen signifikanten Unterschied zwischen STAT3-WT-Protein und jeweiliger Mutante. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, zeigte die Punktmutante STAT3-F174A eine stark erhöhte Reporteragenaktivität für den Promotor 3xLy6E, während STAT3-D427H nur eine diskrete Erhöhung der transkriptionellen Aktivität im Vergleich zum WT-Molekül aufwies.

### 3.6 Gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT

Zur Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT bzw. zur F174A-Mutante wurden elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays durchgeführt. Hierfür wurden U3A-Zellen mit GFP- oder SNAP-Plasmiden, kodierend für

die Mutanten bzw. den WT, transfiziert und entweder unbehandelt belassen oder mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) bzw. IL-6 (25 ng/ml) stimuliert. Die aus den Zellen gewonnenen Gesamtzell-extrakte wurden zuerst für 15 min mit der [ $^{33}$ P]-radioaktiv markierten, hoch-affinen M67-Sonde mit singulärer GAS-Bindestelle inkubiert. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung mittels eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels sowie die autoradiographische Detektion der DNA-Bindung mit Hilfe einer Phosphor-Imager-Platte.



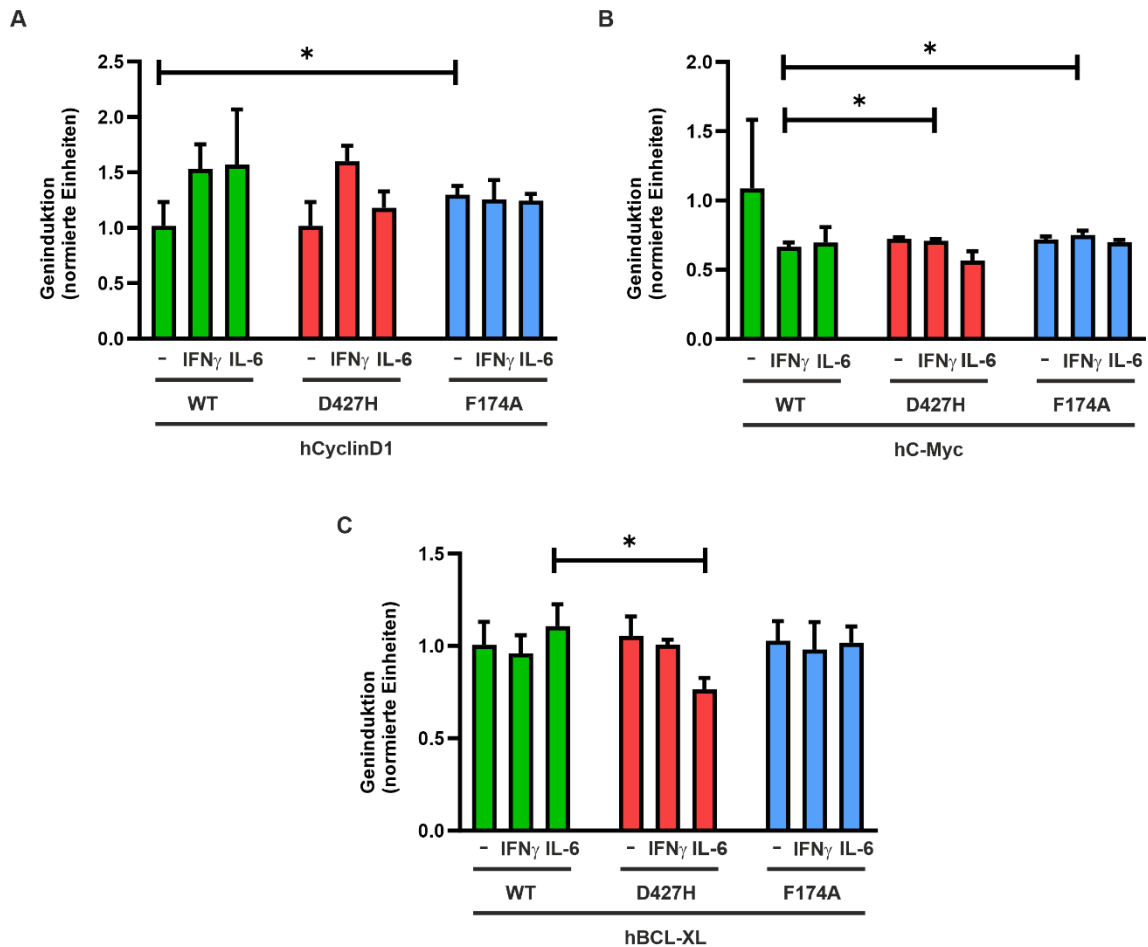
**Abbildung 14: Gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit der D427H-Mutante im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül in transient transfizierten U3A-Zellen nach IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-Stimulation.** Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) mit Gesamtzell-extrakten aus U3A-Zellen unter Verwendung der [ $^{33}$ P]-radioaktiv markierten M67-Sonde mit singulärer GAS-Bindestelle demonstrierten die gesteigerte DNA-Interaktion der GFP- bzw. SNAP-konjugierten STAT3-Mutanten F174A und D427H. (A, C) Autoradiogramme zeigen repräsentative EMSA-Ergebnisse. Sternchen seitlich der Gele markieren unspezifische Bindungen. (B, D) Histogramme stellen die Quantifizierung der Autoradiogramme aus drei Experimenten mit unabhängigen

Transfektionsansätzen dar. Mit Sternchen sind signifikante Unterschiede zwischen dem WT-Molekül und der jeweiligen STAT3-Mutante gekennzeichnet.

Die STAT3-D427H-Mutante zeigte im Vergleich zum WT-Molekül eine gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit, dies war besonders im unstimulierten Zustand deutlich zu beobachten (Abb. 14). Auch die F174A-Mutante zeigte sowohl unstimuliert als auch nach Stimulation mit IFN $\gamma$  bzw. IL-6 eine signifikant stärkere DNA-Bindungsaktivität verglichen mit dem STAT3-WT (Abb. 14).

### **3.7 Regelhafte Zielgenaktivierung der STAT3-D427H-Mutante und des WT-Moleküls**

Für den Vergleich der Genexpressionsmuster der D427H-Mutante mit dem STAT3-WT sowie der F174A-Mutante wurden U3A-Zellen analog zu den Versuchen für die Western-Blot-Analysen ausplattiert und nachfolgend transfiziert, mit dem Unterschied, dass für die Zellen zuletzt statt Vollmedium ein Hungermedium, bestehend aus DMEM mit 1% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, verwendet wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen unstimuliert belassen oder für 3 h mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) bzw. IL-6 (25 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss erfolgten die RNA-Isolation sowie die cDNA-Synthese und schließlich die RT-PCR. Es wurden folgende Primerpaare von bekannten endogenen STAT3-Zielgenen genutzt: *bBCL-XL* F und R, *bC-Myc* F und R sowie *bCyclinD1* F und R. Das *GAPDH*-Gen, welches als Haushaltsgen konstitutiv exprimiert wird, diente zur Normierung und Überprüfung einer erfolgreichen Transfektion. Die Analyse der Genexpressionsmuster erfolgte mit den Computerprogrammen SigmaPlot und Microsoft Office-Excel.



**Abbildung 15: Regelmäßige Genexpression von IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-induzierten Zielgenen durch die STAT3-Punktmutanten D427H und F174A in transient transfizierten U3A-Zellen.** Die genspezifischen Expressionsmuster der STAT3-D427H- und STAT3-F174A-Mutante wurden mittels RT-PCR-Assays bestimmt. Die Histogramme zeigen die Expressionslevel der Gene *bCyclinD1* (A), *bC-Myc* (B) und *bBCL-XL* (C) vor und nach 3-stündiger IFN $\gamma$ - bzw. IL-6-Stimulation. Das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als Referenzgen. Die Histogramme zeigen Mittelwerte sowie Standardabweichungen; signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert. Das Experiment wurde drei Mal mit drei unabhängigen Transfektionsansätzen wiederholt.

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, zeigten sowohl die D427H-Mutante als auch die F174A-Mutante keine signifikant erhöhte Genexpression, sondern verhielten sich, mit Ausnahme des unstimulierten Zustands in Bezug auf das Zielgen *bC-Myc*, ähnlich wie der STAT3-WT.



## 4 Diskussion

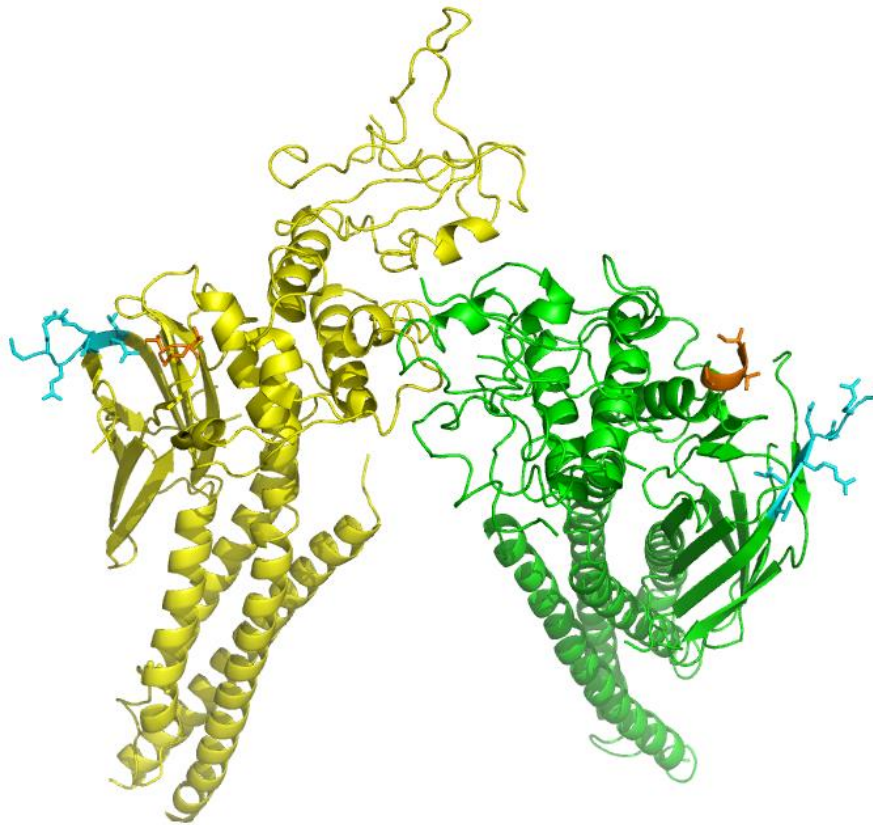
In dieser Arbeit wurde die Punktmutation D427H im STAT3-Molekül, welche oberflächenexponiert innerhalb der DNA-Bindedomäne lokalisiert ist, mit Hilfe biochemischer Verfahren generiert und genauer charakterisiert. Für die Charakterisierung wurden die Phosphorylierungskinetik, das nukleäre Akkumulationsverhalten, die Zielgenaktivierung, die DNA-Bindungsfähigkeit sowie die transkriptionelle Aktivität der Mutante untersucht und sowohl mit dem STAT3-WT-Molekül als auch der als Positivkontrolle fungierenden STAT3-F174A-Mutante verglichen. Wie bereits aus dem Ergebnisteil ersichtlich, zeigte die STAT3-D427H-Mutante weder eine Hyperphosphorylierung noch eine vorzeitige nukleäre Akkumulation, jedoch eine diskret erhöhte DNA-Bindungsfähigkeit bei nicht gesteigerter transkriptioneller Aktivität endogener Zielgene im Vergleich zum WT-Molekül.

Aus der Literatur ist bekannt, dass STAT3-Mutationen generell zu den am häufigsten mutierten Genen in NK/T-Zell-Lymphomen gehören, wobei es sich meistens um Missense-Mutationen handelt. In 23 von 109 untersuchten Tumorgeweben aus NK/-T-Zell-Lymphomen konnte eine STAT3-Mutation nachgewiesen werden; dies entspricht einem Anteil von 21% (Song et al. 2018). Die D427H-Mutante im Speziellen wurde durch FATHMM-Schätzung als gesundheitsschädigend eingestuft und hat daher eventuell eine pathogenetische Relevanz bei der Entstehung von NKTL. Es existieren jedoch bedauerlicherweise keine Daten dazu, wie häufig die D427H-Punktmutation unter den identifizierten STAT3-Mutationen vertreten war. In der Beschreibung der STAT3-D427H-Punktmutation durch Song und Kollegen zeigte die Mutante eine konstitutive Aktivierung im Vergleich zum WT-Molekül. Die Hyperaktivität der D427H-Mutante spiegelte sich sowohl in Western-Blot-Analysen durch eine signifikante Hyperphosphorylierung als auch in Messungen der mRNA-Expression von STAT3-Zielgenen durch eine signifikant erhöhte transkriptionelle Aktivität, verglichen mit dem STAT3-WT-Protein, wider (Song et al. 2018). Diese Ergebnisse legen ein onkogenes Potenzial der STAT3-D427H-Mutante nahe.

In einem Experiment ohne Zytokinstimulation zeigte sich jedoch, dass es sich bei der Mutante nicht um eine Treibermutation handelt, da die STAT3-D427H-Mutante nicht zu einem IL-3-unabhängigen Wachstum beitrug. Laut Song und Koautoren sei die Lokalisation des Aminosäurerestes D427 im STAT3-Molekül eine mögliche Erklärung für die Hyperaktivität der D427H-Mutante. Dieser Rest sei an der asymmetrischen Dimerisierungsschnittstelle der

SH2-Domäne positioniert und die Punktmutation von Aspartat zu Histidin trüge möglicherweise zu einer gesteigerten Polarität sowie Hydrophobizität der SH2-Dimerisierungsfläche bei (Song et al. 2018). Dadurch würde unter Umständen die Affinität der reziproken Phosphotyrosin-SH2-Interaktionen moduliert, dadurch die Stabilität von STAT3-Homo- oder Heterodimeren erhöht und so die STAT-Aktivierung begünstigt. Zusätzlich zeigte die D427H-Mutante im Vergleich zum WT-Molekül in Zellviabilitäts-Assays eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem STAT3-Inhibitor Stattic, sodass die Mutante unter Umständen ein guter pharmakologischer Ansatzpunkt in der gezielten Behandlung von NKTL sein könnte (Song et al. 2018). In der hier vorliegenden Studie wurde die STAT3-D427H-Mutante einer Reevaluation unterzogen und zeigte hierbei lediglich in Bezug auf das DNA-Bindeverhalten eine Hyperaktivität, besaß aber eine regelhafte, nicht vom WT-Molekül abweichende, Phosphorylierungskinetik sowie eine im allgemeinen normale transkriptionelle Aktivität.

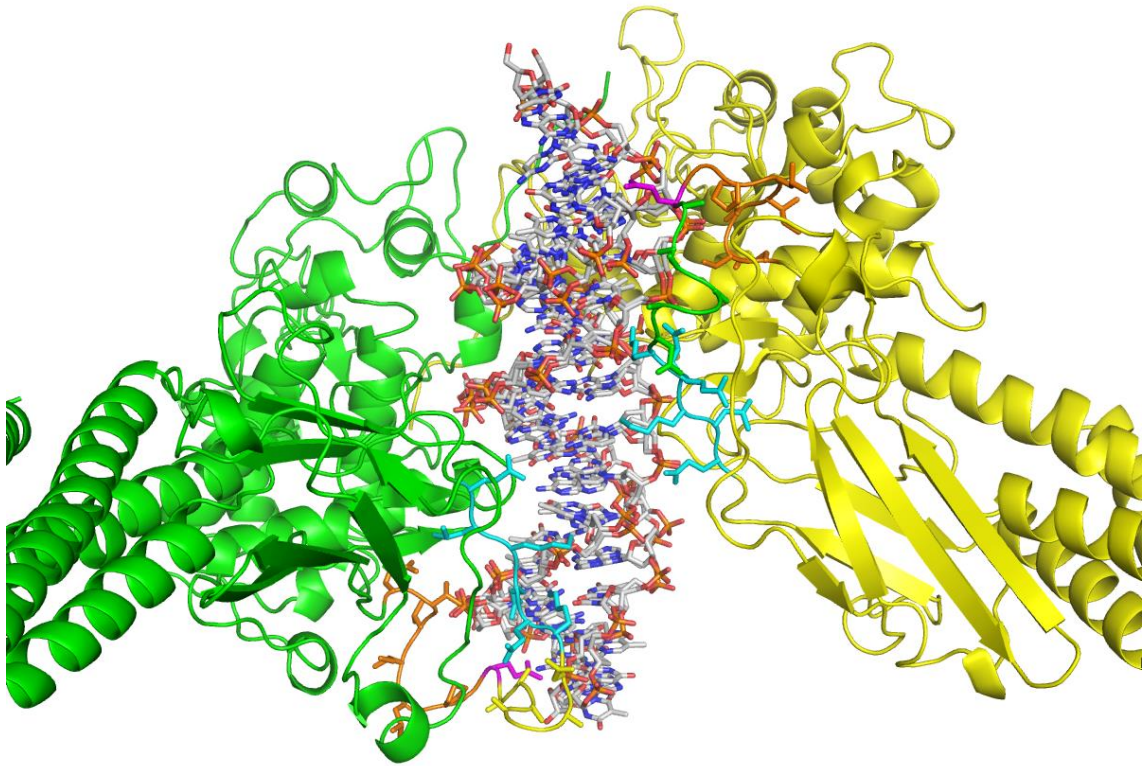
Die Aminosäuren Aspartat und Histidin zählen beide zur Gruppe der polaren Aminosäuren, unterscheiden sich jedoch in ihrer Ladung: Während Aspartat negativ geladen ist, weist Histidin in seiner funktionellen Gruppe eine positive Partialladung auf. Aus diesem Grund führt die Punktmutation D427H zu einer Ladungsveränderung vom Negativen zum Positiven. Dies könnte möglicherweise die gesteigerte Bindungsaffinität zu den negativ geladenen und nach außen gerichteten Phosphodiestergruppen der DNA-Doppelhelix erklären. Abbildung 16 veranschaulicht die große räumliche Distanz zwischen dem Sequenzbereich der Punktmutation D427H und dem jeweils anderen Protomer in einem ebenfalls parallel angeordneten, aber alternativen STAT3-Dimer ohne reziproke Phosphotyrosin-SH2-Interaktionen, dessen physiologische Bedeutung, wenn es überhaupt eine gibt, allerdings vollkommen unklar ist. Daher ist der Aminosäurerest D427, bzw. nach erfolgter Mutagenese H427, mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht wesentlich an der sequenzspezifischen Erkennung einer GAS-Bindestelle beteiligt.



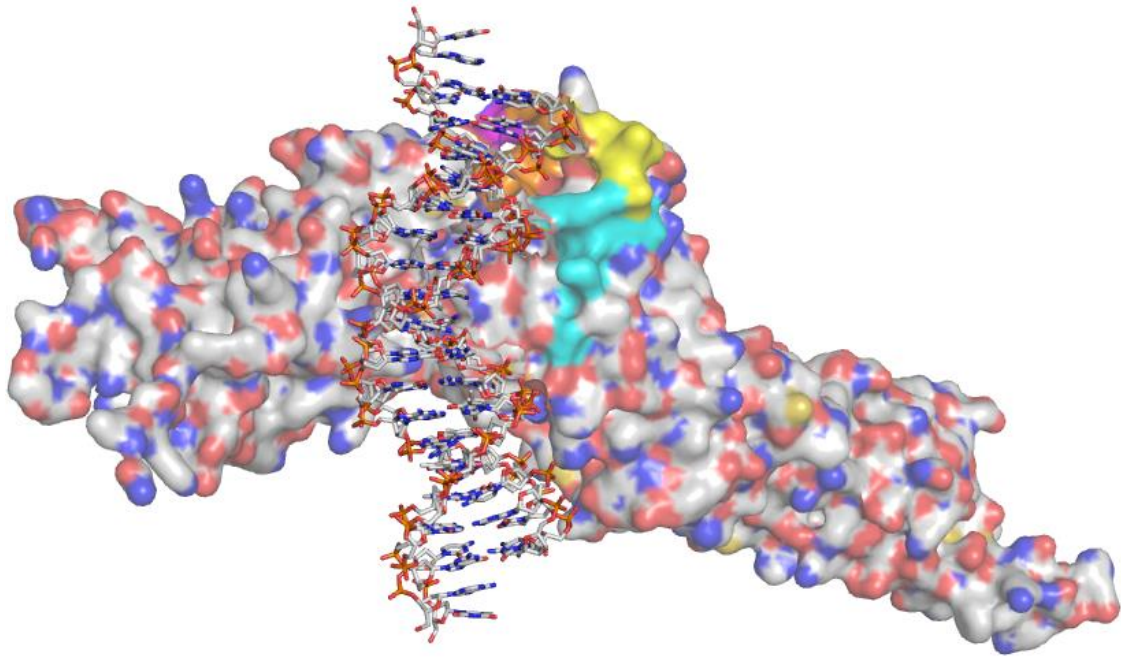
**Abbildung 16: Alternative Kristallstruktur eines parallel angeordneten STAT3-Dimers.** Die Abbildung zeigt die kristallographische Darstellung einer möglichen alternativen räumlichen Anordnung zweier STAT3-Monomere in einem parallel angeordneten STAT3-Dimer (Ren et al. 2008). Besonders hervorgehoben sind die Sequenzbereiche N-terminal (türkis) und C-terminal (orange) der untersuchten Punktmutation D427H.

Im Folgenden sollen zur weiteren Einschätzung der STAT3-D427H-Mutante einige Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu einer vorbeschriebenen, homologen Punktmutation im STAT1-Molekül diskutiert werden. Im Gegensatz zu STAT3 ist im STAT1-Molekül die Elektronendichte in Kristallstrukturen im homologen Bereich der STAT3-D427H-Punktmutation durchaus definiert. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen kristallographische Darstellungen von STAT1-Proteinen mit farblich hervorgehobenen Molekülbereichen, deren räumliche Lage im Kontext der hier untersuchten Mutation von Bedeutung ist. Dem Aminosäurerest D427 in STAT3 entspricht im STAT1-Molekül der Aminosäurerest E421. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, ragt die Seitenkette der Aminosäure E421 im DNA-gebundenen STAT1-Dimer direkt in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix hinein und geht sogar Wasserstoffbrückenbindungen mit der Base Guanin der DNA ein (Koch et al. 2012). Somit steht der Aminosäurerest E421 im STAT1-Protein bei der DNA-Bindung in unmittelbarer räumlicher Beziehung zur DNA. Aufgrund der ausgeprägten Homologien innerhalb der STAT-Proteinfamilie sowie der identischen Ladung und ähnlichen Polarität der

beiden Aminosäurereste E421 in STAT1 und D427 in STAT3 wird mit hoher Wahrscheinlichkeit auch der Aminosäurerest D427 im STAT3-Molekül bei der DNA-Bindung, trotz der vorhandenen Flexibilität, in vergleichbar enger räumlicher Beziehung zur DNA stehen.



**Abbildung 17: Kristallographische Darstellung der Interaktionsflächen eines STAT1-Dimers mit DNA.** Die Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der interagierenden Strukturen zwischen einem parallelen STAT1-Dimer und der DNA-Doppelhelix (Chen et al. 1998). Besonders hervorgehoben sind die homologen Sequenzbereiche vor (türkis) und hinter (orange) der im STAT3-Molekül untersuchten, homologen Punktmutation D427H. Der zur untersuchten Punktmutation STAT3-D427H homologe Aminosäurerest E421 ist ebenfalls markiert (magenta).



**Abbildung 18: Oberflächenstruktur eines DNA-gebundenen STAT1-Moleküls.** Die Abbildung zeigt die Verteilung positiv und negativ geladener funktioneller Gruppen in der Oberflächenstruktur eines DNA-gebundenen STAT1-Proteins (Chen et al. 1998). Besonders hervorgehoben sind die homologen Sequenzbereiche vor (türkis) und hinter (orange) der im STAT3-Molekül untersuchten Punktmutation D427H. Der zur untersuchten Punktmutation STAT3-D427H homologe Aminosäurerest E421 ist ebenfalls markiert (magenta).

Die sich an homologer Stelle im STAT1-Molekül befindliche Punktmutation E421K ist bereits vorher beschrieben (Koch et al. 2012). Mit Ausnahme der transkriptionellen Aktivität verhielt sich die STAT1-E421K-Mutante in den von Koch und Kollegen durchgeführten Experimenten hyperaktiv. Bedingt durch eine in Dephosphorylierungs-Assays nachgewiesene insuffizientere Dephosphorylierung der E421K-Mutante, zeigte sich verglichen mit dem STAT1-WT-Protein, in Western-Blot-Analysen eine signifikante Hyperphosphorylierung. Außerdem zeichnete sich die STAT1-E421K-Mutante durch eine prolongierte Kernakkumulation aufgrund eines reduzierten nukleären Exports aus.

Das wesentlichste Merkmal der E421K-Mutante ist jedoch die in Elektromobilitäts-Shift-Assays nachgewiesene gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit sowie die erniedrigte Dissoziationsrate von DNA im Vergleich zum STAT1-WT (Koch et al. 2012). Der negativ geladene Glutamat-Rest an Position 421 ist in den Prozess der Freisetzung des STAT1-Dimers von der DNA involviert, indem er wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen die Ablösung von der ebenfalls negativ geladenen DNA erleichtert. Bei der Punktmutation E421K hat sich die Ladung des Aminosäurerestes von negativ zu positiv umgekehrt, welches eine Änderung der Elektrostatik nach sich zieht und dadurch möglicherweise eine erhöhte DNA-Bindungsfähigkeit bedingt. Durch die überdurchschnittliche DNA-Bindung lassen

sich sowohl die mangelhafte Dephosphorylierung als auch der schlechtere nukleäre Export der STAT1-E421K-Mutante erklären. Da DNA-gebundene STAT-Dimere vor der Dephosphorylierung geschützt sind, können sie nicht durch die nukleäre Phosphatase Tc45 inaktiviert und somit auch nicht aus dem Nukleus exportiert werden. Dies führt zu einer Hyperphosphorylierung und einer verlängerten nukleären Akkumulation der Mutante (Meyer et al. 2003; Koch et al. 2012).

Interessanterweise war sowohl in Reporteragen-Assays als auch in RT-PCR-Experimenten die transkriptionelle Aktivität und Zielgenaktivierung durch die STAT1-E421K-Mutante im Vergleich zum WT-Molekül signifikant reduziert (Koch et al. 2012). Dies erscheint auf den ersten Blick zunächst nicht verständlich, ließe sich jedoch durch zwei denkbare Hypothesen erklären. Zum einen könnte es durch die stärkere DNA-Bindung zu einer verminderten Austauschrate an einer Promotorregion sowie insbesondere auch abseits von GAS-Bindestellen kommen, woraus ein insgesamt reduzierter nukleozytoplasmatischer Austausch von STAT1-Molekülen resultiert. Dies wäre mit einer Verringerung des Aktivierungs- und Inaktivierungszyklus verbunden, sodass weniger STAT1-Moleküle am Zyklus teilnehmen und dadurch die transkriptionelle Antwort auf extrazelluläre Signalmoleküle erheblich limitiert ist (Koch et al. 2012). Zum anderen könnte eine verringerte Dissoziationsrate von DNA sowohl für das Bindeverhalten an GAS-Stellen als auch für die Bindung an GAS-ähnliche- oder Non-GAS-Stellen vorliegen, sodass es bei der Suche nach GAS-Stellen zu einer längeren Retention an transkriptionsinerten Stellen kommen würde. Dies führe zu einer verminderten Promotorbesetzung und dadurch einer erniedrigten transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen, wie sie für die STAT1-E421K-Mutante beschrieben wurde.

Für die zweite Hypothese spricht, dass die STAT1-E421K-Mutante in Elektromobilitäts-Shift-Assays ebenfalls in der Lage war, an Non-GAS-Elemente zu binden. Diese Bindung war zwar schwächer als die Bindung an hoch-affine GAS-Stellen, aber insgesamt wies die STAT1-E421K-Mutante bei der DNA-Bindung eine geringere Sequenzanforderung als das WT-Molekül auf. Da die Zielensuche sehr wahrscheinlich über ein Absuchen der DNA nach möglichen Bindestellen über ein Zufallsprinzip erfolgt, kommt es zu einer Konkurrenz zwischen einer niedrigen Anzahl von hoch-affinen GAS-Bindestellen und einer Vielzahl von Non-GAS-Elementen. Aus diesem Grund ist eine hohe Dissoziationsrate von unspezifischen DNA-Bereichen ohne GAS-Bindestellen eine essenzielle Eigenschaft für ein schnelles Auffinden von Zielgenen. Insgesamt bestimmen daher viel mehr die verschiedenen Ablöse-raten von spezifischen und unspezifischen Bindestellen, und nicht die Unterschiede in der

Affinität für GAS-Stellen, die Effizienz von STAT-Proteinen als transkriptionelle Aktivatoren (Koch et al. 2012).

Da die Mitglieder der STAT-Proteinfamilie generell eine große Homologie aufweisen und die STAT1-E421K-Mutante an homologer Position zur STAT3-D427H-Mutante lokalisiert ist sowie beide Mutanten eine ähnliche Polarität und Ladung besitzen, ist davon auszugehen, dass es signifikante Parallelen im Verhalten der beiden Mutanten gibt. Es wird deshalb hier vermutet, dass sich die STAT3-D427H-Mutante und die STAT1-E421K-Mutante vor allem im Hinblick auf das DNA-Bindungsverhalten und die transkriptionelle Aktivierung ähneln. Die STAT3-D427H-Mutante zeigte in den eigens durchgeführten Experimenten eine erhöhte DNA-Bindungsfähigkeit bei nicht gesteigerter transkriptioneller Aktivität im Vergleich zum WT-Molekül. Analog zum STAT1-Molekül wird auch in STAT3 die stärkere DNA-Bindung vermutlich einen nachteiligen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität haben. Dieser Effekt stellte sich in meinen Experimenten im STAT3-Molekül jedoch weniger ausgeprägt dar als in den vorbeschriebenen STAT1-Experimenten, in denen eine drastische Reduktion der transkriptionellen Aktivität gemessen wurde. Dieser Unterschied in der Ausprägung lässt sich möglicherweise durch die insgesamt geringere Induzierbarkeit der Genexpression von STAT3 im Vergleich zu STAT1 erklären. Die Dissoziationsrate von der DNA ist vermutlich im STAT3-WT-Molekül generell deutlich niedriger als im STAT1-WT-Protein, sodass sich eine weitere Reduktion der Ablöserate durch die Punktmutation STAT3-D427H gegebenenfalls nicht so stark auf dessen transkriptionelle Aktivität auswirkt, wie die STAT1-E421K-Mutation im viel dynamischeren und transkriptionell aktiveren STAT1-Molekül. Die in dieser Studie generierte Aspartat-zu-Histidin-Mutante im STAT3-Protein zeigte jedoch im Gegensatz zur STAT1-E421K-Mutante weder eine signifikant erhöhte Phosphorylierung noch eine vorzeitige Kernakkumulation im Vergleich zum STAT3-WT. Gemäß dem Zusammenhang zwischen gesteigerter DNA-Bindungsfähigkeit und verminderter Dephosphorylierungsrate sowie schlechterem nukleären Export, wäre eine Hyperphosphorylierung und prolongierte nukleäre Akkumulation der STAT3-D427H-Mutante denkbar gewesen. Dies bestätigte sich in den von mir durchgeführten Experimenten jedoch nicht.

Zusätzlich zur STAT1-E421K-Mutante sind im STAT1-Molekül drei weitere Punktmutationen vorbeschrieben, die einen ähnlichen Einfluss auf das DNA-Bindungsverhalten von STAT1-Dimeren haben. Hierbei handelt es sich um die ebenfalls in der DNA-Bindedomäne lokalisierte E411K-Mutante und die beiden in der Linker-Domäne positionierten Punktmutationen E559A und E563A (Koch et al. 2012; Hüntelmann et al. 2014). Alle Mutanten zeig-

ten wie die STAT1-E421K-Mutante eine signifikante Hyperphosphorylierung, eine prolongierte Kernakkumulation sowie eine signifikant gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit bei verminderter bis regelhafter transkriptioneller Aktivität. Anhand dieser Eigenschaften ist davon auszugehen, dass diese vier Aminosäurereste für die Dissoziation von STAT1-Dimeren von der DNA notwendig sind (Koch et al. 2012; Hüntelmann et al. 2014). Kristallographische Darstellungen eines DNA-gebundenen STAT1-Dimers veranschaulichen, dass die vier negativ geladenen Glutamat-Reste gemeinsam kranzartig die DNA umfassen, wobei die Aminosäurereste E411 und E421 gegenüber den beiden Aminosäuren E559 und E563 auf verschiedenen Seiten im Verhältnis zur DNA-Doppelhelix lokalisiert sind. Durch ihre negative Ladung und die DNA-umrahmende Anordnung sind diese Reste sehr wahrscheinlich nicht nur an der Freisetzung von STAT1-Dimeren von der DNA beteiligt, sondern erleichtern als negativ geladenes Motiv durch elektrostatische Wechselwirkungen auch die Ausrichtung des STAT1-Dimers zum linearen DNA-Doppelstrang (Hüntelmann et al. 2014). So hat bereits die Mutation eines dieser vier Glutamat-Reste dramatische Auswirkungen auf die Dauer der Signaltransduktion im STAT1-Signalweg.

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, wie genau die Erkennung von GAS-Elementen durch STAT-Moleküle erfolgt. Zum einen wird eine Art Hit-and-Run-Mechanismus bei der Zielgensuche diskutiert, zum anderen die Wanderung von STAT-Dimeren entlang der Achse der DNA bis zur Erkennung einer GAS-Sequenz. Die Tatsache, dass jedoch auch die Bindung an DNA abseits von Konsensus-Sequenzen für transkriptionelle Regulatoren typisch ist, erschwert Vorhersagen über die DNA-Bindung (Lin und Riggs 1975; Meyer et al. 2003). Außerdem sind GAS-Bindestellen nur zu einem geringen Maße evolutionär konserviert, so dass die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Bindestellen eine graduelle ist (Decker et al. 1997; Meyer et al. 2003). Die Daten von Hüntelmann und Kollegen sind vereinbar mit einem Scanning-Mechanismus bei der Suche nach GAS-Bindestellen; es sind aber weitere Experimente notwendig, um vollends aufzuklären, wie präzise die Zielgenerkennung inmitten einer Vielzahl von unspezifischen, genomischen DNA-Sequenzen erfolgt, die vielleicht als „Junk-DNA“ dienen (Lin und Riggs 1975; Hüntelmann et al. 2014).

Da bei allen anderen Mitgliedern der STAT-Proteinfamilie an den homologen Positionen zu den Glutamat-Resten E411, E421, E559 und E563 im STAT1-Molekül ebenfalls Aminosäurereste mit negativer Ladung vorhanden sind, weisen möglicherweise auch die anderen Mitglieder der STAT-Proteinfamilie ein ähnliches Motiv negativ geladener Aminosäurereste zur Ausrichtung der DNA im Prozess der DNA-Bindung auf. Im Transkriptionsfaktor STAT3 sind an diesen Positionen die Aminosäurereste Glutamat und Aspartat vertreten. Trotz eines



gleichartigen Motivs von negativ geladenen Resten in diesen Positionen ist jedoch unter Umständen der Mechanismus der DNA-Ausrichtung im STAT3-Molekül nicht so stark ausgeprägt wie in STAT1, welches die deutlich geringere zytokinabhängige Induzierbarkeit der Genexpression im Vergleich zum STAT1-Protein erklären könnte.

Aufgrund der in dieser Studie erhobenen und hier diskutierten Ergebnisse sowie unter Berücksichtigung der Tatsache, dass auch die Daten von Koch et al. zu der homologen Punktmutation E421K im STAT1-Molekül keine erhöhte transkriptionelle Aktivität erbracht hatten, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die STAT3-D427H-Mutante ein erhöhtes onkogenes Potenzial besitzt und ihr eine pathogenetische Bedeutung in der Ätiologie von NK/T-Zell-Lymphomen zukommt. Für eine definitive Aussage zum onkogenen Potenzial der STAT3-D427H-Mutante müsste jedoch eine größere Anzahl an Tumorgeweben von Patienten mit NK/T-Zell-Lymphomen untersucht werden. Außerdem müsste eine genauere Bestimmung erfolgen, wie häufig die STAT3-D427H-Mutante unter den STAT3-Mutationen tatsächlich auftritt und ob diese als alleinige Punktmutation im STAT3-Molekül vorliegt oder nur als zusätzliche Zufalls-, aber nicht pathogenetisch relevante Punktmutation neben anderen STAT3-Punktmutationen vorhanden ist.

Darüber hinaus lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede zwischen der STAT3-D427H-Mutante und der homologen Punktmutation im STAT1-Molekül E421K ableiten. Meine Daten unterstützen die Hypothese, dass nicht nur im STAT1-Molekül, sondern auch in STAT3 eine gesteigerte DNA-Bindungsfähigkeit mit einer verminderten transkriptionellen Aktivität einhergeht. Der im STAT1-Molekül bestehende Zusammenhang zwischen verlängerter DNA-Bindung und Hyperphosphorylierung sowie erhöhter Kernakkumulation bildete sich in den Ergebnissen meiner Experimente jedoch nicht ab. Die Hypothese, dass es wie im STAT1-Molekül auch bei den anderen Mitgliedern der STAT-Proteinfamilie in der DNA-Bindedomäne ein Motiv bestehend aus negativ geladenen Aminosäureresten zur Ausrichtung der DNA-Doppelhelix und Verbesserung der Transkriptionsleistung geben könnte, erscheint vor dem Hintergrund der eigenen Experimente plausibel. Dies müsste jedoch durch weitere Mutagenesestudien in den übrigen STAT-Proteinen mittels Einfach- oder Mehrfach-Mutanten weitergehend untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor STAT3 (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3) fördert Zellproliferation, Immunmodulation und die Aufrechterhaltung eines Stammzellzustands, sodass seine konstitutive Aktivierung in Zellen ein onkogenes Potenzial birgt. Es sind zahlreiche Punktmutationen im STAT3-Protein beschrieben worden, die dem Molekül erhöhte onkogene Eigenschaften verleihen und mit verschiedenen Tumoren assoziiert wurden. Darunter befindet sich auch die in der DNA-Bindedomäne des STAT3-Moleküls lokalisierte Missense-Mutation D427H, die im Zusammenhang mit NK/T-Zell-Lymphomen entdeckt wurde. Die in dieser Studie durchgeführte Charakterisierung der STAT3-D427H-Mutante zeigte aber weder eine signifikante durch Zytokinexposition stimulierbare Hyperphosphorylierung noch eine vorzeitige, induzierbare Kernakkumulation, jedoch wurde eine erhöhte DNA-Bindungsfähigkeit bei nicht gesteigerter transkriptioneller Aktivität im Vergleich zum WT-Molekül festgestellt. Die verbesserte Bindung an STAT-spezifische DNA-Bindestellen wurde mittels elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assays unter Verwendung einer radioaktiv-markierten hoch-affinen GAS-Sequenz autoradiographisch nachgewiesen. Zusammenfassend decken sich diese Beobachtungen mit der an der homologen Position im STAT1-Molekül befindlichen E421K-Mutation, die ebenfalls mit keiner Steigerung, sondern im Gegenteil sogar mit einer deutlichen Verminderung der transkriptionellen Aktivität der hyperphosphorylierten Mutante einherging. Aus diesem Grund erscheint es unwahrscheinlich, dass die D427H-Mutante im STAT3-Protein ein über das Wildtyp-Molekül hinausgehendes, onkogenes Potenzial besitzt und somit eine pathogenetische Bedeutung in der Ätiologie von NK/T-Zell-Lymphomen hat.

## 6 Literaturverzeichnis

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

Belo Y, Mielko Z, Nudelman H, Afek A, Ben-David O, Shahar A, Zarivach R, Gordan R, Arbely E (2019): Unexpected implications of STAT3 acetylation revealed by genetic encoding of acetyl-lysine. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1863, 1343-1350

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

Boisson-Dupuis S, Kong XF, Okada S, Cypowyj S, Puel A, Abel L, Casanova JL (2012): Inborn errors of human STAT1: allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Curr Opin Immunol* 24, 364–378

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE (1999): Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295–303

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

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

Darnell JE (1997): Stats and gene regulation. *Science* 277, 1630–1635

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

de Araujo ED, Orlova A, Neubauer HA, Bajusz D, Seo HS, Dhe-Paganon S, Keserű GM, Moriggl R, Gunning PT (2019): Structural implications of STAT3 and STAT5 SH2 domain mutations. *Cancers* 11, 1757

- Decker T, Kovarik P (2000): Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628–2637
- Decker T, Lew DJ, Mirkovitch J, Darnell JE (1991): Cytoplasmic activation of GAF, an IFN- $\gamma$ -regulated DNA-binding factor. *EMBO J* 10, 927–932
- Decker T, Kovarik P, Meinke A (1997): GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 17, 121–134
- Domoszlai T, Martincuks A, Fahrenkamp D, van de Leur HS, Küster A, Müller-Newen G (2014): Consequences of the disease-related L78R mutation for dimerization and activity of STAT3. *J Cell Sci* 127, 1899–1910
- Fagerlund R, Melén K, Kinnunen L, Julkunen I (2002): Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric stats and importin  $\alpha$ 5. *J Biol Chem* 277, 30072–30078
- Görlich D, Kutay U (1999): Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607–660
- 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
- Horvath CM (2000): STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 25, 496–502
- 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, e97633
- Khan KD, Shuai K, Lindwall G, Maher SE, Darnell JE, Bothwell ALM (1993): Induction of the Ly-6A/E gene by interferon  $\alpha/\beta$  and  $\gamma$  requires a DNA element to which a tyrosine-phosphorylated 91-kDa protein binds. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6806–6810
- 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
- Koo MY, Park J, Lim JM, Joo SY, Shin SP, Shim HB, Chung J, Kang D, Woo HA, Rhee SG (2014): Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 6269–6274
- Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, van Adrichem AJ, Kuusanmäki H, Andersson EI, Lagström S, Clemente MJ, Olson T, Jalkanen SE et al. (2012): Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 366, 1905–1913

- Krebs DL, Hilton DJ (2001): SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378–387
- La Sala G, Michiels C, Kükenshöner T, Brandstoetter, Maurer B, Koide B, Lau K, Pojer F, Koide S, Sexl V et al. (2020): Selective inhibition of STAT3 signaling using monobodies targeting the coiled-coil and N-terminal domains. *Nat Commun* 11, 4115
- Langer JA, Pestka S (1988): Interferon receptors. *Immunol Today* 9, 393–400
- Leonard WJ, O’Shea JJ (1998): Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293–322
- Levy DE, Darnell JE (2002): Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651–662
- Levy DE, Lee C (2002): What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109, 1143–1148
- Lew DJ, Decker T, Darnell JE (1989): Alpha interferon and gamma interferon stimulate transcription of a single gene through different signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 9, 5404–5411
- Lin S, Riggs AD (1975): The general affinity of lac repressor for *E. coli* DNA: Implications for gene regulation in procaryotes and eucaryotes. *Cell* 4, 107–111
- 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
- Mattaj JW, Englmeier L (1998): Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265–306
- McBride KM, Banninger G, McDonald C, Reich NC (2002): Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- $\alpha$ . *EMBO J* 21, 1754–1763
- McKendry R, John J, Flavell D, Müller M, Kerr IM, Stark GR (1991): High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both  $\alpha$  and  $\gamma$  interferons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11455–11459
- 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. *Euro J Bio* 271, 4606–4612
- Meyer T, Begitt A, Lödige I, van Rossum M, Vinkemeier U (2002): Constitutive and IFN- $\gamma$ -induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J* 21, 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. *Gen 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
- Miklossy G, Hilliard TS, Turkson J (2013): Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nat Rev Drug Discov* 12, 611–629
- Nardozzi J, Wenta N, Yasuhara N, Vinkemeier U, Cingolani G (2010): Molecular basis for the recognition of phosphorylated stat1 by importin  $\alpha$ 5. *J Mol Biol* 402, 83–100
- O’Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A (2015): The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 66, 311–328
- Pietra LD, Bressan A, Pezzotti AR, Serlupi-Crescenzi O (1998): Highly conserved amino-acid sequence between murine STAT3 and a revised human STAT3 sequence. *Gene* 213, 119–24
- Platanias LC (2005): Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375–386
- Raz R, Durbin JE, Levy DE (1994): Acute phase response factor and additional members of the interferon-stimulated gene factor 3 family integrate diverse signals from cytokines, interferons, and growth factors. *J Biol Chem* 269, 24391–24395
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281–1283
- Ren Z, Mao X, Mertens C, Krishnaraj R, Qin J, Mandal PK, Romanowski MJ, McMurray JS, Chen X (2008): Crystal structure of unphosphorylated STAT3 core fragment. *Biochem*

Biophys Res Commun 374, 1-5

Rose-John S (2018): Interleukin-6 family cytokines. Cold Spring Harb Perspect Biol 10, a028415

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953): Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med 97, 695–710

Schindler C, Darnell J (1995): Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. Annu Rev Biochem 64, 621–652

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

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

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

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

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

Song TL, Nairismägi ML, Laurensia Y, Lim JQ, Tan J, Li ZM, Pang WL, Kizhakeyil A, Wijaya GC, Huang DC et al. (2018): Oncogenic activation of the STAT3 pathway drives PD-L1 expression in natural killer/T-cell lymphoma. Blood 132, 1146-1158

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

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

Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE Jr, Kuriyan J (1998): Structure of the amino-terminal

protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279, 1048–1052

Wegenka UM, Lütticken C, Buschmann J, Yuan J, Lottspeich F, Müller-Esterl W, Schindler C, Roeb E, Heinrich PC, Horn F (1994): The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. *Mol Cell Biol* 14, 3186–3196

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

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

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

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

Zhong Z, Wen Z, Darnell JE (1994): Stat3: A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95–98



## Danksagung

Die experimentelle Dissertation hat mein Medizinstudium in großem Maße bereichert. Ich bin dankbar für die gewonnenen, tiefen Einblicke in die Grundlagenforschung, die in diesem Zusammenhang zahlreich geführten wissenschaftlichen Diskussionen sowie die entstandenen Freundschaften. Der größte Dank gilt meinem überaus engagierten Doktorvater Prof. Dr. mult. Thomas Meyer für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Erstgutachtens und die zu jeder Zeit hervorragende Betreuung im Rahmen dieses Forschungsprojektes. Sein unermüdlicher Forschungsdrang sowie unsere intensiven, fachlich herausfordernden Diskussionen haben mich angespornt und gelehrt querzudenken sowie Sachverhalte zu hinterfragen. Darüber hinaus danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Lutz für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die freundlichen Anregungen und kritischen Fragen im Rahmen meiner Progress Reports.

In besonderem Maße danke ich Frau Dr. rer. nat. Priyanka Menon, die mir mit ihrer überaus positiven und hilfsbereiten Art die verschiedenen experimentellen Methoden vermittelte und mir jederzeit unterstützend zur Seite stand. Sie hat die Arbeit im Labor menschlich geprägt und ist zu einer engen Freundin geworden. Ich danke herzlich der medizinisch-technischen Assistentin Anke Gregus, die mir eine große, zuverlässige Unterstützung beim wissenschaftlichen Experimentieren war und mir als gute Seele des Labors stets mit Rat zur Seite stand. Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Julia Staab und Frau Sana Muntaz, an die ich mich jederzeit wenden durfte und die durch wertvolle sowohl fachliche als auch persönliche Gespräche die Arbeit im Labor bereichert haben.