

Aus der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie

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

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Funktionelle Charakterisierung von  
Substitutionsmutationen in Position 566  
der Linker-Domäne des onkogenen  
Transkriptionsfaktors STAT3**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Niklas Matthias Bohne

aus

Göttingen

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

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

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Lutz

### **Prüfungskommission**

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

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Funktionelle Charakterisierung von Substitutionsmutationen in Position 566 der Linker-Domäne des onkogenen Transkriptionsfaktors STAT3" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion der STAT-Proteine.....	1
1.2 Der JAK/STAT-Signalweg.....	5
1.3 Physiologie und Pathologie von STAT3.....	8
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1 Material.....	10
2.1.1 Verwendete Zelllinien.....	10
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	10
2.1.3 Wasser .....	13
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	13
2.1.5 Enzyme, Plasmide und Zytokine .....	16
2.1.6 Reaktions-Kits.....	18
2.1.7 Antikörper .....	18
2.1.8 Primer und Oligonukleotide.....	19
2.1.9 Bakterienstämme und Medien.....	20
2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Kristallographische Darstellung des STAT3-Moleküls .....	23
2.2.2 STAT3-Mutagenese .....	24
2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA und deren Sequenzierung .....	25
2.2.4 Amplifikation der Plasmid-DNA.....	25
2.2.5 Methoden der Zellkultur .....	26
2.2.6 Transfektion von Säugetierzellen.....	27
2.2.7 Stimulation der Zellen .....	28
2.2.8 Proteinextraktion.....	28
2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse.....	29
2.2.10 Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA).....	30
2.2.11 Luziferase-Reportergen-Assay.....	31
2.2.12 Real-time PCR.....	32
2.2.13 Fluoreszenzanalyse.....	33
2.2.14 Statistische Analyse .....	34
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1 Kristallographische Analyse der STAT3-Linker-Domäne in der Umgebung des D566-Restes.....	35

---

3.2	Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT3-Punktmutationen D566A und D566N gegenüber dem STAT3-WT in der Western-Blot-Analyse.....	36
3.3	DNA-Bindung der D566-Mutanten.....	41
3.4	Erhöhte transkriptionelle Aktivität der D566-Mutanten im Luziferase-Reporter-Gen-Assay.....	44
3.5	Erhöhte Geninduktion der STAT3-Mutanten im Vergleich zum WT-Molekül in der Real-time PCR.....	45
3.6	Kein Unterschied im nukleären Akkumulationsverhalten der STAT3-Punktmutationen im Vergleich zum WT-Molekül.....	48
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht des Zytokin-aktivierten JAK/STAT-Signalweges. ....	6
Abbildung 2: Kristallographische Darstellung eines STAT3-Dimers in antiparalleler Konformation.....	36
Abbildung 3: Kein Unterschied in der Phosphorylierung des STAT3-WT-Moleküls und der STAT3-D566A- und STAT3-D566N-Moleküle nach IFN $\gamma$ -Stimulation in HeLa-S3-Zellen .....	37
Abbildung 4: Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT3-D566A und STAT3-D566N-Mutanten nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen .....	38
Abbildung 5: Normale Kinetik der Phosphorylierung des GFP- und SNAP-markierten STAT3-WT-Moleküls und seiner Punktmutanten STAT3-D566A und STAT3-D566N nach IFN $\gamma$ -Stimulation in U3A-Zellen.....	39
Abbildung 6: Fehlende Hyperphosphorylierung der STAT3-D566A- und STAT3-D566N-Moleküle verglichen mit dem STAT3-WT nach IL-6-Stimulation in U3A-Zellen.....	40
Abbildung 7: Geringfügig gesteigerte DNA-Bindefähigkeit der D566A- und D566N-Mutante im Vergleich zum WT-Protein nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen und IFN $\gamma$ -Stimulation in U3A-Zellen .....	42
Abbildung 8: Hinweise auf ein reduziertes DNA-Dissoziationsverhalten der STAT3-Punktmutationen verglichen mit dem WT-Molekül im EMSA-Kompetitionsexperiment.....	43
Abbildung 9: Gesteigerte transkriptionelle Aktivität der D566A- und der D566N-Mutante gegenüber dem STAT3-Wildtyp-Molekül im Luziferase-Reportergen-Assay in U3A-Zellen nach 6h Stimulation mit IFN $\gamma$ .....	45
Abbildung 10: Erhöhte Genexpression der STAT3-Punktmutationen D566A und D566N bezüglich der untersuchten Gene <i>hSocs3</i> , <i>hJmB</i> und <i>hMCP1</i> verglichen mit dem STAT3-Wildtyp in U3A-Zellen nach 3h IFN $\gamma$ -Stimulation .....	47
Abbildung 11: Keine Veränderung der nukleozytoplasmatischen Verteilung von GFP-markierten STAT3-D566-Mutanten im Vergleich zum WT-Molekül nach IFN $\gamma$ -Stimulation in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen .....	49
Abbildung 12: Keine nachweisbare Kernakkumulation von STAT3-WT, STAT3-D566A und -D566N nach IFN $\gamma$ -Stimulation in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.....	50
Abbildung 13: Geringfügig stärker ausgeprägte Kernakkumulation der GFP-Addukte von STAT3-D566A im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen .....	51
Abbildung 14: Kein Unterschied der nukleären Akkumulation von STAT3-D566A, STAT3-D566N sowie des STAT3-WT-Moleküls nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen ..	52
Abbildung 15: Keine Veränderung der nukleozytoplasmatischen Verteilung von GFP-Addukten der STAT3-Mutanten im Vergleich zum WT-Molekül nach IFN $\gamma$ -Stimulation in transfizierten U3A-Zellen.....	53
Abbildung 16: Kein Unterschied im Akkumulationsverhalten von STAT3-D566A, STAT3-D566N und STAT3-WT-Molekül nach IFN $\gamma$ -Stimulation in U3A-Zellen .....	54
Abbildung 17: Keine nachweisbare Zunahme der Kernakkumulation der STAT3-Mutanten nach IL-6-Stimulation in transient transfizierten U3A-Zellen .....	55
Abbildung 18: Nukleozytoplasmatische Verteilung von SNAP-markierten STAT3-Mutanten nach IL-6-Stimulation in transient transfizierten U3A-Zellen .....	56
Abbildung 19: Abbildung homologer Aminosäuren in Teilen der Linker-Domäne in allen bekannten humanen STAT-Proteinen .....	59
Abbildung 20: Lokalisation und Orientierung des Aminosäurerests D566 in der Linker-Domäne zur DNA eines an eine GAS-Bindestelle gebundenen STAT3-Dimers.....	60
Abbildung 21: Parallele Konformation eines an einem DNA-Doppelstrang gebundenen STAT1-Moleküls.....	62

---

Abbildung 22: Kristallographische Darstellung eines STAT1-Dimers, das an einen DNA-Doppelstrang gebunden ist .....	64
--	----

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien. ....	10
Tabelle 2: Puffer und Lösungen. ....	13
Tabelle 3: Enzyme. ....	16
Tabelle 4: STAT3-Plasmide. ....	16
Tabelle 5: Plasmide für den Reportergen-Assay. ....	17
Tabelle 6: Zytokine. ....	17
Tabelle 7: Reaktionskits. ....	18
Tabelle 8: Antikörper. ....	18
Tabelle 9: Mutageneseprimer. ....	19
Tabelle 10: Sequenzierungsprimer. ....	19
Tabelle 11: Primer für RT-PCR. ....	19
Tabelle 12: Oligonukleotid-Sonden für EMSA. ....	20
Tabelle 13: Bakterienstämme. ....	20
Tabelle 14: Zellkulturmedien. ....	20
Tabelle 15: Medien zur Herstellung von Vollmedien. ....	21
Tabelle 16: Geräte. ....	21
Tabelle 17: Verbrauchsmaterialien. ....	22
Tabelle 18: Zyklen der PCR. ....	24
Tabelle 19: Übersicht der Transfektionsansätze für verschiedene Lochplatten und 8-Kammer-Objektträger. ....	27
Tabelle 20: Schema der Real-time PCR. ....	32



## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	Coiled-coil-Domäne
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
D	Asparaginsäure
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
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay
F	Phenylalanin
FCS	Fetales Kälberserum
G	Glycin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma-aktivierte Stelle
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
GOF	<i>Gain-of-function</i>
H	Histidin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IFN	Interferon

---

IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
K	Lysin
LB	Lysogenie-Brühe (engl.: <i>lysogeny broth</i> )
LD	Linker-Domäne
LGL	<i>Large-Granular-Lymphocyte</i>
MeOH	Methanol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> )
N	Asparagin
ND	Amino-terminale Domäne
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
ONPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT (engl.: <i>protein inhibitors of activated STAT</i> )
PFA	Paraformaldehyd
Poly-dIdC	<i>Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)acid</i>
pSTAT	Phosphoryliertes STAT
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time-PCR

---

SDS	Natriumlaurylsulfat
SH2	Src-Homologie-2
SOCS	Suppressor des Zytokin-Signalwegs (engl.: <i>suppressor of the cytokine signalling</i> )
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween
Tc45	T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der STAT-Proteine

In den 1980er Jahren wurde entdeckt, dass sich bei bestimmten Zellen innerhalb von Minuten nach einer Stimulation mit einem Typ-I-Interferon eine Genantwort provozieren lässt. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es einen sehr kurzen und schnellen Signalweg zwischen dem Interferon-Rezeptor in der Zellmembran und Transkriptionsfaktoren im Zellkern geben muss. Dieser Weg wurde als JAK/STAT-Signalweg bekannt (Darnell et al. 1994). STAT (*Signal transducer and activator of transcription*)-Proteine gehören mittlerweile zu einer sehr gut bekannten Klasse von Signalproteinen, die evolutionär hoch konserviert sind. In Säugetierzellen sind sieben verschiedene STAT-Proteine bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Darnell 1997; Wang und Levy 2012; de Mendoza et al. 2013). Die Anzahl verschiedener STAT erhöht sich noch durch Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die Gene für die humanen STAT-Proteine liegen auf drei verschiedenen Chromosomen: Die Gene für STAT1 und STAT4 liegen auf Chromosom 2, auf Chromosom 12 liegen die kodierenden Regionen für STAT3, STAT5a und STAT5b, während die Gene für STAT2 und STAT6 auf Chromosom 17 lokalisiert sind. STAT können von über 50 Signalmolekülen aktiviert werden, darunter Interferone, Interleukine, Wachstumsfaktoren und Hormone (Abroun et al. 2015). Sie steuern verschiedene biologische Prozesse, wie etwa Zelldifferenzierung, Wachstum, Immunantworten oder Apoptose (Levy und Darnell 2002). STAT1 ist das am besten untersuchte STAT-Protein, welches durch Interferon und Interleukin-6 (IL-6) aktiviert wird und für die Auslösung einer Immunantwort auf infektiöse Pathogene wichtig ist. So zeigen Patienten, die eine *Loss-of-function*-Mutation eines STAT-Moleküls aufweisen, eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für bakterielle, virale und mykotische Infektionen. STAT1 kodiert dabei für antimikrobielle und antivirale Proteine sowie für Antigen-präsentierende Moleküle, Chemokine und Zytokine (Hu und Ivashkiv 2009).

Die meisten Erkenntnisse über STAT-Proteine stammen aus Experimenten mit STAT1. Die humanen STAT-Proteine bestehen aus 750-847 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 80-113 kDa und lassen sich in sechs verschiedene Domänen unterteilen: N-terminale-Domäne (NTD), Coiled-Coil-Domäne (CCD), DNA-Bindedomäne (DBD), Linker-Domäne (LD), Src-Homologie-2-Domäne (SH2D) und C-terminale Transaktivierungs-

Domäne (TAD). Dieser modulare Aufbau ist in allen STAT-Proteinen in ähnlicher Form vorhanden, wobei die Domänen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Homologie untereinander aufweisen.

Hierbei stellt die NTD neben der SH2D die am höchsten konservierte Domäne dar, weil sie an wichtigen Funktionen, z. B. der Protein-Protein-Interaktion während der Tetramerisierung sowie der Bindung an Rezeptoren und DNA beteiligt ist (Zhang et al. 1996). Neben der Affinität der DBD zur DNA, ist die Stabilität des STAT1-Tetramers für die kooperative DNA-Bindung notwendig. Hierbei spielt die NTD eine wichtige Rolle, da sie die parallele Anordnung der STAT-Dimere stabilisiert. Führt man in diesen Abschnitt Deletionen ein, wird die Dimer-Dimer-Interaktion verhindert und eine Oligomerisierung kann nicht stattfinden (Vinkemeier et al. 1996; Xu et al. 1996; Vinkemeier et al. 1998; Zhang und Darnell 2001; Meyer et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass STAT1 tetramerisieren oder Oligomere höherer Ordnung bilden muss, um transkriptionell aktiv sein zu können (Vinkemeier et al. 1998). An dieser Oligomerisierung ist ein Phenylalanin an Position 77 maßgeblich beteiligt. Die Mutation F77A in STAT1 verhinderte eine Tetramerisierung und somit eine kooperative Bindung an die DNA (Meyer et al. 2004). Mäuse, die diese Mutation tragen, weisen in Experimenten einen schweren Immundefekt in der Abwehr einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* auf (Begitt et al. 2014).

Die CCD enthält ein nukleäres Exportsignal (NES) und ist an der Dimerisierung von STAT-Molekülen beteiligt. Kristallographische Untersuchungen haben gezeigt, dass STAT-Proteine auch inaktiviert, also unphosphoryliert, hauptsächlich als antiparallel konfiguriertes Dimer vorliegen. Hierbei lagern sich zwei STAT-Proteine reziprok zueinander an und stabilisieren diese Lage durch Interaktionen zwischen der CCD des einen Monomers mit der DBD des anderen Monomers. Die in STAT1 hierfür relevante Aminosäure ist ein Phenylalanin an Position 172 in der CCD des einen STAT1-Moleküls, das sich in eine Tasche aus Aminosäureresten (Q340, L383, G384, T385, H406, L407, Q408) der DBD des anderen STAT1-Monomers legt (Mao et al. 2005). Dadurch entsteht ein antiparalleles STAT-Dimer. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die Aminosäure F172, die sich nur 7 Å vom gegenüberliegenden T385 befindet. Phosphorylierte STAT oszillieren zwischen dem parallelen und dem antiparallelen Zustand (Wenta et al. 2008). Der Ablauf dieser Oszillation ist noch nicht abschließend geklärt, es werden in der Literatur momentan zwei verschiedene Mechanismen diskutiert. Entweder erfolgt die Transformation von der parallelen in die antiparallele Konformation mittels Dissoziation und Reassoziaton oder aber die beiden Monomere dissoziieren nicht voneinander, sondern rotieren um einen gemeinsamen

Fixpunkt in der NTD und bilden daraufhin die jeweils andere Konformation (Mertens et al. 2006). Wird das kritische F172 in der CCD oder das T385 in der DBD mutiert, verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten der parallelen Anordnung und es zeigt sich eine gesteigerte Kernakkumulation im Vergleich zum WT-Molekül (Staab et al. 2013; Hüntelmann et al. 2014; Nast et al. 2019).

Die Bindung von STAT-Proteinen an die DNA erfolgt über die DBD, die mit hoher Affinität an eine spezifische Stelle in der DNA binden kann (Horvath et al. 1995; Chen et al. 1998). Die DBD besteht aus einer immunoglobulinähnlichen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und ähnelt den Bindedomänen von p53 und NF- $\kappa$ B an DNA. Eine palindromische Sequenz in der DNA mit der Abfolge 5'-TTCN<sub>2,3</sub>GAA-3', die sogenannte *gamma-interferon-activated-sequence* (GAS), bildet den Promotor für aktivierte STAT-Moleküle (Seidel et al. 1995; Mikita et al. 1996). Für die Stabilität der Bindung ist die elektrostatische Interaktion zwischen dem negativ geladenen Rückgrat der DNA und der DBD von entscheidender Bedeutung. Experimente, bei denen in der DBD von STAT1 eine Punktmutation der negativ geladenen Aminosäure Asparaginsäure an den Stellen Val-426 und Thr-427 eingefügt wurde, haben gezeigt, dass die Mutanten zwar ein unverändertes Niveau an Tyrosin-Phosphorylierung aufwiesen, jedoch keine nukleäre Akkumulation zeigten, ihre Fähigkeit zur DNA-Bindung verloren und sie im Kern häufiger von der T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase (Tc45) deaktiviert wurden (Meyer et al. 2003). Wurden hingegen STAT1-Konstrukte erzeugt, die an den entsprechenden Stellen in der DBD eine positive Aminosäure aufwiesen, führte dies zu einem Verlust der GAS-Spezifität in der DNA-Bindung und einer erhöhten Akkumulation von STAT1 im Kern, infolge der verlängerten Bindedauer an die DNA sowie fehlender Dephosphorylierung durch die Tc45 (Meyer et al. 2003). Daraus folgt, dass für eine adäquate Funktion von STAT1 sowohl eine spezifische Bindung an die GAS-Sequenz als auch eine schnelle Dissoziation von der DNA erforderlich sind (Nast et al. 2019). Des Weiteren besitzt die DBD ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), an welches das Importin- $\alpha$ -5 binden kann, um den Transport in den Zellkern einzuleiten (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al. 2002a).

Die Linker-Domäne verbindet die DBD flexibel mit der SH2-Domäne, um eine optimale Ausrichtung des STAT-Moleküls während der DNA-Bindung zu ermöglichen. In der Linker-Domäne ist ein Motiv enthalten, das zwischen den verschiedenen STAT-Molekülen hoch konserviert ist. Dieses Motiv bildet eine  $\alpha$ -Helix, die während der STAT-DNA-Bindung nahezu parallel zum helikalen DNA-Strang liegt. In STAT1 sind drei Aminosäurereste identifiziert worden, die für die spezifische Erkennung der GAS-

Bindestelle, die Dissoziation der STAT-Dimere von der DNA sowie die korrekte räumliche Orientierung der Dimere zum DNA-Strang essenziell sind. Ein positiv geladener Lysin-Rest an Position 567 in STAT1 ist für die spezifische Bindung an die GAS-Sequenz nötig. Dieser Rest liegt in einer Tasche, die durch das elektrisch negativ geladene Phosphodiester-Rückgrat der DNA gebildet wird. Wird dieser Lysin-Rest durch die neutrale Aminosäure Alanin mutiert, führt dies zu einer Verminderung der Bindung von STAT1 an die DNA. Infolge dessen kommt es zu einer verminderten Transkription endogener STAT1-Zielgene nach IFN-Stimulation, während sowohl die nukleäre Akkumulation als auch die Tyrosin-Phosphorylierung unverändert bleiben. Die Fähigkeit zur DNA-Bindung ist bei der K567A-Mutante allerdings nicht grundsätzlich verloren gegangen und führt somit nicht zwingend zu einer Veränderung des nukleozytoplasmatischen Austausches sowie der zytokininduzierten transkriptionellen Aktivität. Die beiden negativ geladenen Glutaminsäure-Reste an den Positionen 559 und 563 sind hingegen wichtig für die Dissoziation der STAT-Proteine von der DNA und halten darüber hinaus das STAT-Dimer in der korrekten räumlichen Orientierung zur DNA. Werden diese negativ geladenen Glutaminsäure-Reste zum elektrisch neutralen Alanin mutiert, resultiert daraus ein erhöhtes Level an Tyrosin-Phosphorylierung sowie eine prolongierte DNA-Bindung und damit verbundene nukleäre Akkumulation (Hüntelmann et al. 2014).

Die SH2-Domäne ist die am stärksten konservierte Domäne innerhalb der STAT-Proteine und enthält ungefähr 100 Aminosäuren. Nach Phosphorylierung der STAT-Proteine lagern diese sich in paralleler Konfiguration zu Homo- und Heterodimeren zusammen. Dieser Komplex wird durch die SH2-Domänen der jeweiligen Monomere stabilisiert, indem im STAT1-Molekül ein Arginin-Rest in Position 602 mit einem Phosphotyrosin-Rest in Position 701 des gegenüberliegenden Monomers interagiert (Shuai et al. 1994; Becker et al. 1998; Chen et al. 1998). Gleichzeitig wird durch diese Konfiguration der phosphorylierte Tyrosin-Rest vor Dephosphorylierung geschützt, indem er der Tc45-Phosphatase nicht mehr exponiert ist. Die zweite Funktion der SH2-Domäne besteht darin, die Bindung des STAT-Monomers an den zytoplasmatischen Teil des Zytokinrezeptors zu ermöglichen, um die anschließende Phosphorylierung und somit Aktivierung durch die Janus-Kinase (JAK) zu gewährleisten (Shuai et al. 1994).

Die C-terminale TAD weist die geringste Homologie zwischen den STAT-Proteinen auf. Dies ist möglicherweise die Erklärung für die unterschiedlichen Zielgene der einzelnen STAT-Klassen. Die TAD enthält das für die transkriptionelle Aktivität der STAT entscheidende Element, nämlich den hoch konservierten kritischen Tyrosin-Rest an Position

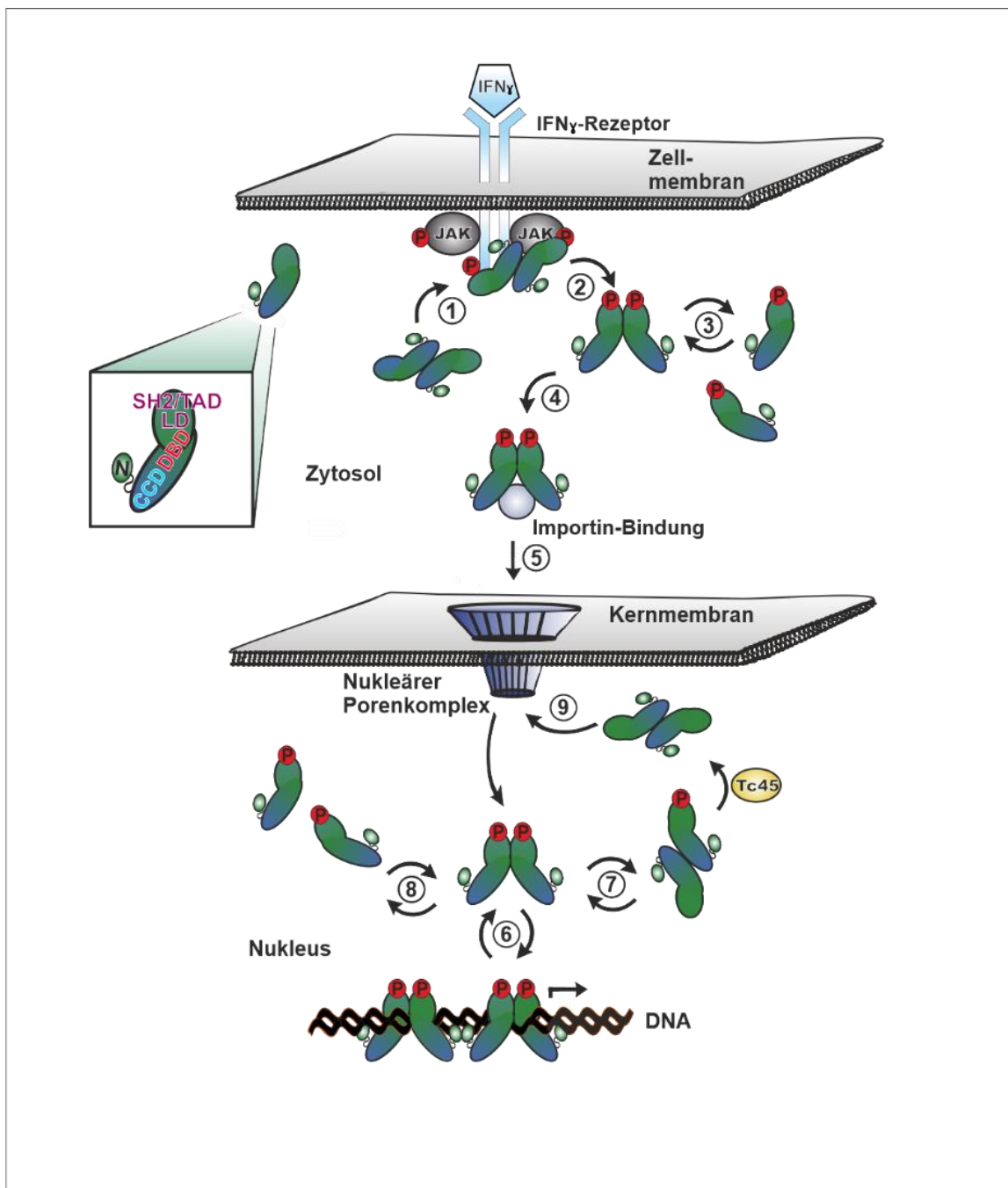
701 im STAT1-Molekül, der nach Zytokinstimulation von der JAK phosphoryliert wird und dadurch das STAT-Molekül aktiviert (Schindler et al. 1992; Shuai et al. 1992). Alle STAT-Proteine außer STAT2 können nicht nur an diesem Tyrosin-Rest, sondern auch an einem Serin-Rest im C-Terminus der TAD phosphoryliert werden (Decker und Kovarik 2000). Erst wenn beide Reste phosphoryliert sind, erreichen die STAT-Proteine ihr Maximum an transkriptioneller Aktivität (Wen et al. 1995; Visconti et al. 2000; Morinobu et al. 2002; Varinou et al. 2003; Friedbichler et al. 2011). Funktionell ist dies bedeutsam, da bestimmte Stimuli wie bakterielle Lipopolysaccharide, Entzündungsmediatoren oder zellulärer Stress eine alleinige Phosphorylierung am Serin-Rest bewirken (Kovarik et al. 1998). Kommt es nun zu einer Stimulation der Zelle mit Interferon und somit zur zusätzlichen Phosphorylierung des kritischen Tyrosin-Rests, fällt die zelluläre Antwort in Form des Anstiegs der transkriptionellen Aktivität durch die nun vorliegende doppelte Phosphorylierung deutlich stärker aus. Die Serin-Phosphorylierung leistet somit die Vorarbeit, dass die Zelle z. B. nach Kontakt mit einem Pathogen auf einen Interferon-Stimulus mit maximaler Intensität reagieren kann (Kovarik et al. 2001).

Es ist beschrieben worden, dass STAT1 und STAT3 auch im unphosphorylierten Zustand im Nukleus vorkommen (Meyer et al. 2002a; Meyer et al. 2002b; Liu et al. 2005), indem unphosphorylierte STAT-Proteine durch Kernporen in den Zellkern diffundieren (Marg et al. 2004). Weiterhin ist gezeigt worden, dass auch unphosphorylierte STATs an DNA binden können, allerdings 200-mal schwächer als phosphoryliertes STAT (Wenta et al. 2008). Dies erklärt die Beobachtung, dass STATs auch ohne externen Stimulus an der Expression bestimmter Gene beteiligt sind (Cui et al. 2007; Yang et al. 2007; Yang und Stark 2008; Testoni et al. 2011; Pfeffer et al. 2017). Eine Aktivierung von STAT durch IFN $\alpha$  und IFN $\gamma$  erzeugt ein molekulares Signal, das sowohl den JAK/STAT-Signalweg aktiviert als auch die Konzentration von STAT1 und STAT2 selbst über mehrere Tage erhöht. In dieser Zeit ist die STAT1-Expression nach Stimulation mit einer geringeren Dosis Interferon gegenüber dem Normalzustand deutlich gesteigert, infolge einer erhöhten Menge an vorliegendem STAT1 im Zytosol (Lehtonen et al. 1997).

## 1.2 Der JAK/STAT-Signalweg

Der JAK/STAT-Signalweg ist ein Liganden-aktivierter Signalweg, der von der Zelloberfläche direkt zur DNA im Zellkern führt, ohne dass weitere Signalproteine involviert sind. (Abb. 1). STAT-Proteine haben damit sowohl zum Rezeptor in der Zytoplasmamembran als auch zum DNA-Strang direkten Kontakt.





**Abbildung 1: Schematische Übersicht des Zytokin-aktivierten JAK/STAT-Signalweges.** Bindet ein Zytokin an den extrazellulären Teil des Zytokinrezeptors, so ändert dieser auf der intrazellulären Seite seine Konformation und aktiviert Janus-Kinasen. Diese werden durch Autophosphorylierung aktiviert und aktivieren ihrerseits zyttoplasmatische STAT. Die aktivierten STAT-Proteine bilden Dimere aus und werden Ran-abhängig über einen Importin-Komplex in den Zellkern transportiert. Dort wirken sie als Transkriptionsfaktor und binden an eine GAS-Sequenz der DNA. Nach Dissoziation von der DNA werden die Dimere von der Tc45-Phosphatase dephosphoryliert, aus dem Zellkern transloziert, wo sie wieder zur erneuten Aktivierung zur Verfügung stehen.

Bindet ein extrazelluläres Zytokin oder ein Wachstumsfaktor an einen transmembranösen Rezeptor, so ändert dieser seine Konformation in solcher Weise, dass Janus-Kinasen an den Rezeptor binden können. Es kommt zu einer Autophosphorylierung der JAK an einem Tyrosin-Rest und dadurch zur Aktivierung der Kinasen. Anschließend phosphorylieren sie eine Untereinheit des Rezeptors und rekrutieren so zytoplasmatische STAT, indem sie über diese Tyrosin-Phosphorylierung eine Bindestelle schaffen, an der die STAT-Proteine mit ihrer SH2-Domäne an den Rezeptor binden können. Daraufhin findet eine Phosphorylierung des STAT-Proteins an Y701 in der Nähe seines C-Terminus durch die katalytische Domäne der JAKs statt. Nach erfolgter Phosphorylierung dissoziieren die STAT-Proteine von den JAK und dimerisieren mit anderen phosphorylierten STAT-Proteinen unter Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren, z. B. STAT1/STAT1 oder STAT1/STAT3. Die Verteilung von Homo- und Heterodimeren entspricht hierbei dem Mengenverhältnis der verschiedenen STAT-Proteine im Zytosol.

Aufgrund der Größe der STAT-Dimere von ca. 180 kDa ist eine passive Diffusion in den Zellkern nicht möglich, sodass ein aktiver Transport erforderlich ist. Dies geschieht über den Importin- $\alpha$ -Proteinkomplex (Meyer und Vinkemeier 2007), der Ran abhängig die STAT-Dimere in den Zellkern transportiert (Sekimoto et al. 1996; Sekimoto et al. 1997; Fagerlund et al. 2002). Im Zellkern verhalten sich die STAT wie klassische Transkriptionsfaktoren und lagern sich als Di- und Tetramere an eine spezifische DNA-Sequenz mit GAS-Bindestelle an.

Der JAK/STAT-Signalweg wird sowohl durch zytosolische als auch durch nukleäre Mechanismen reguliert. So wird durch die Dissoziation von DNA die Dimerstabilität vermindert, wodurch das phosphorylierte Tyrosin an Stelle 701 der Tc45-Phosphatase zugänglich wird und von ihr dephosphoryliert werden kann (Zhong et al. 2005; Mertens et al. 2006; Wenta et al. 2008; Staab et al. 2013). Dies stellt eine notwendige Voraussetzung als Signal zum Export aus dem Nukleus über das Ran-abhängige Exportin CRM1 dar (Meyer et al. 2003). Außerdem gehören zu den Zielgenen von STAT negativ regulatorische Proteine, zum Beispiel aus der Klasse der *supressors of cytokine signalling* (SOCS), die als autoregulative Feedbackschleife fungieren (Linossi et al. 2013; Linossi et al. 2015; Seif et al. 2017). Es gibt acht verschiedene SOCS-Proteine, die auch in unstimulierten Zellen auf einem niedrigen Niveau exprimiert werden, ihre Konzentration steigt aber mit der Aktivierung des STAT-Signals sprunghaft an. So bindet SOCS1 beispielsweise an die katalytische Untereinheit der JAK (Endo et al. 1997), während SOCS2 kompetitiv und SOCS3 direkt am Rezeptor der Zelloberfläche bindet (Matsumoto et al. 1997; Verdier et al. 1998; Kershaw et al. 2013).

Zusätzlich üben Mitglieder der Klasse der *Protein inhibitors of activated STAT* (PIAS) eine hemmende Wirkung aus, indem sie direkt an unphosphorylierte STAT-Dimere binden (Chung et al. 1997; Liu et al. 1998; Arora et al. 2003; Shuai 2006). Dies verhindert die Phosphorylierung und damit Aktivierung der gebundenen STAT-Moleküle, sodass das Signal zum Erliegen kommt.

### 1.3 Physiologie und Pathologie von STAT3

STAT3, das 1994 entdeckt und beschrieben wurde (Zhong et al. 1994), wird auf der Ebene seines Gens mit 24 Exons kodiert und es existieren drei verschiedene Splicevarianten (Shao et al. 2001; Dewilde et al. 2008; Ng et al. 2012), deren Unterschiede allerdings bisher noch nicht gut erforscht sind (Chakraborty und Tweardy 1998; Hevehan et al. 2002). Physiologisch ist STAT3 an der Regulation von Zellproliferation, -überleben und -wachstum beteiligt (Hevehan et al. 2002). Daneben ist es in eine Reihe von Prozessen involviert, die einen Teil der Immunantwort darstellen. So reguliert STAT3 die CD<sup>4+</sup>-T-Zell-Differenzierung (Vogel et al. 2015) und sorgt entweder für Aktivierung oder Inhibition von Th17-Zellen. Darüber hinaus wurde in Experimenten anhand von STAT3-Deletionen gezeigt, dass STAT3 an der Produktion T-Zell-abhängiger Antikörper beteiligt ist (Takeda et al. 1999; Tangye et al. 2009; Cui et al. 2011; Gotthardt et al. 2014; Kane et al. 2014).

In allen Domänen des hoch konservierten STAT3-Moleküls, das sich bei der Maus nur in einer Aminosäure von dem des Menschen unterscheidet (Mogensen 2013), sind Mutationen beschrieben, die mit Autoimmunerkrankungen und lymphoproliferativen Erkrankungen assoziiert sind. Die meisten dieser Mutationen befinden sich in der für die Funktion von STAT3 wichtigen DBD und SH2-Domäne (Vogel et al. 2015). Während heterozygote *Loss-of-function*-Mutationen mit dem HIES (Hyper-IgE-Syndrom) assoziiert sind (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007), führt eine heterozygote *Gain-of-function*-Mutation eher zu onkogenen Prozessen, wie z. B. der Large-Granular-Lymphocyte (LGL)-Leukämie oder einer Autoimmunerkrankung (Jerez et al. 2012; Koskela et al. 2012; Flanagan et al. 2014; Haapaniemi et al. 2015; Milner et al. 2015). Es wurde gezeigt, dass Punktmutationen in bestimmten Bereichen zu einer erheblichen Änderung der transkriptionellen Aktivität führen können, ohne dass die übrigen Charakteristika der STAT-Proteine verändert sein müssen (Yang et al. 2002; Mertens et al. 2015).

Die Erforschung von STAT3-Mutationen ist von großem Interesse, weil eine Vielzahl menschlicher Tumore eine Überaktivität von STAT3-Proteinen aufweist (Yu et al. 2009; Yu et al. 2014). Damit könnte die Blockade des STAT3-Signalwegs ein möglicher Angriffspunkt

einer medikamentösen Krebstherapie sein. Es sind in allen Domänen von STAT3 Mutationen gefunden worden, die eine pathophysiologische Relevanz besitzen (Vogel et al. 2015). In der Linker-Domäne soll hier beispielhaft auf vier Punktmutationen etwas näher eingegangen werden. Jäggle et al. (2020) untersuchten die Punktmutation D570N in der Linker-Domäne des STAT3-Moleküls, die in einem Patienten nachgewiesen wurde, der Symptome einer primären Immundefizienz mit autoimmuner Beteiligung bzw. eine lymphoproliferative Erkrankung aufwies. Es zeigte sich, dass die D570N-Mutante dem STAT3-WT äußerst ähnelte, mit Ausnahme einer gesteigerten Kernakkumulation. Mertens et al. (2015) untersuchten eine Punktmutation an gleicher Stelle im STAT3-Protein und kamen zu dem Ergebnis, dass die D570K-Variante, verglichen mit dem Wildtyp, eine prolongierte DNA-Bindung aufwies. In beiden Fällen unterschied sich die transkriptionelle Aktivität jedoch nicht von der des WT-Moleküls.

Die von mir in dieser Arbeit untersuchte Punktmutation D566A in STAT3 wies in der Literatur unter IL-6-Stimulation im Vergleich zum WT-Molekül eine erheblich geringere transkriptionelle Aktivität auf, während die transkriptionelle Aktivität in Ruhe etwas stärker war als die des WT (Mertens et al. 2015). Diese Beobachtung deckt sich nicht mit dem Verhalten der homologen Mutante E559 im STAT1-Molekül, welche zwar nicht für alle, jedoch für einige Gene eine erhöhte Transkription aufweist (Hüntelmann et al. 2014). In einer Arbeit über die LGL-Leukämie ist die zweite in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Punktmutation, STAT3-D566N, erwähnt worden (Barilà et al. 2020). Es wurden STAT3-Proteine von LGL-Leukämie-Patienten genetisch aufgeschlüsselt und die STAT3-D566N-Mutation bei einem Patienten identifiziert, jedoch ihr biochemisches Verhalten und ihre pathogenetische Relevanz in der Erkrankung nicht eingehend beschrieben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Zelllinien zu Einsatz. Zum einen HeLa-S3-Zellen, welche Epithelzellen sind, die aus einem Zervix-Adenokarzinom stammen, und zum anderen STAT1-defiziente U3A-Zellen, die einem epithelialen Fibrosarkom kultiviert wurden. Beide Zelllinien wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Uwe Vinkemeier, Universität Nottingham.

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
A-[ <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
Bromphenol	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-Paque 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-ethansulfonsäure (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-Gelelektrophorese-Laufpuffer (SDS-Laufpuffer)	Carl Roth
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
Polydeoxyinosin-deoxycytosin (Poly-dIdC)	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30 + 40	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
SNAP-Cell-TMR-Star	New England Biolabs, Massachusetts, USA
N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (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

### 2.1.3 Wasser

Für die Herstellung von Medien, Lösungen und Puffern wurde doppelt-destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet, das einen spezifischen Widerstand von 18,2 MΩcm aufwies und mit Hilfe der Anlage Arium pro (Sartorius, Göttingen) aufbereitet wurde. Wurde für bestimmte Zwecke RNase-, DNase- und proteinfreies Wasser benötigt, so kam Molecular Biological Grade Water (5 Prime, Hilden) zum Einsatz.

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2: Puffer und Lösungen.**

Name	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
β-Galaktosidase-Puffer	23,5% ONPG-Puffer 1,07% 100 x Magnesium-Lösung + Natriumphosphatpuffer
Complete-Lösung	Complete-Mini-Protease-Inhibitoren
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
Luziferase-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 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 76,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Nukleärer Extraktionspuffer, pH 7,4	420 mM KCl 1 mM EDTA 0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 20 mM HEPES 20% (v/v) Glycerin
Oligo-Puffer, pH 7,5	10 mM MgCl <sub>2</sub> 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 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,5 M Tris-HCl

	0,4% SDS
Trenngelbuffer, 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

## 2.1.5 Enzyme, Plasmide und Zytokine

### 2.1.5.1 Enzyme

**Tabelle 3: Enzyme.**

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

### 2.1.5.2 STAT3-Plasmide

**Tabelle 4: STAT3-Plasmide.**

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
(1): pcDNA-FRT-STAT3 GFP	Volllänge murine STAT3 $\alpha$ - cDNA in pEGFP-N1 kloniert	(Domoszlai et al. 2014)
(2) pcDNA5-muSTAT3- SNAP-HIS	Volllänge murine STAT3 $\alpha$ - cDNA in pcDNA5/FRT/TO- SNAP-YFP kloniert	(Domoszlai et al. 2014)
STAT3 $\alpha$ (D566A)-GFP	Durch sequenzspezifische Mutagenese aus (1) mit dem Primerpaar STAT3-D566A F/R erhalten	Hergestellt für diese Arbeit
STAT3 $\alpha$ (D566A)-SNAP	Durch sequenzspezifische Mutagenese aus (2) mit dem	Hergestellt für diese Arbeit

	Primerpaar STAT3-D566A F/R erhalten	
STAT3 $\alpha$ (D566N)-GFP	Durch sequenzspezifische Mutagenese aus (1) mit dem Primerpaar STAT3-D566N F/R erhalten	Hergestellt für diese Arbeit
STAT3 $\alpha$ (D566N)-SNAP	Durch sequenzspezifische Mutagenese aus (2) mit dem Primerpaar STAT3-D566N F/R erhalten	Hergestellt für diese Arbeit

### 2.1.5.3 Plasmide für die Reporteragen-Assays

**Tabelle 5: Plasmide für den Reporteragen-Assay.**

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

### 2.1.5.4 Zytokine

Für die Experimente dieser Arbeit wurden die Zytokine Interleukin-6 und Interferon- $\gamma$  als Zellstimulantien verwendet. Die jeweiligen Zytokine wurden im Verhältnis 1:2000 mit den Zellkulturmedien gemischt und direkt auf die jeweiligen Zellen pipettiert.

**Tabelle 6: Zytokine.**

Bezeichnung	Hersteller
IFN $\gamma$ , human, rekombinant aus <i>E. coli</i> -Zellen	Biomol, Hamburg
IL-6, human, rekombinant aus <i>E. coli</i> -Zellen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.1.6 Reaktions-Kits

Tabelle 7: Reaktionskits.

Bezeichnung	Hersteller
Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green-Mix	Thermo Fisher Scientific
Luziferase-Assay-Reagent-Assay	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

### 2.1.7 Antikörper

Tabelle 8: 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)

## 2.1.8 Primer und Oligonukleotide

### 2.1.8.1 Mutageneseprimer

**Tabelle 9: Mutageneseprimer.**

Gen	Sequenz
D566A F	5'-C TTC TCC TTC TGG GTC TGG CTA GCC AAT ATC ATC GAC CTT GTG AAA -3'
D566A R	5'- CTT TTT CAC AAG GTC GAT GAT ATT GGC TAG CCA GAC CCA GAA GGA G -3'
D566N F	5'-CT TCT CCT TCT GGG TCT GG CTA AAC AAT ATC ATC GAC CTT GTG AAA-3'
D566N R	5'- CTT TTT CAC AAG GTC GAT GAT ATT GTT TAG CCA GAC CCA GAA GGA G -3'

### 2.1.8.2 Sequenzierungsprimer

**Tabelle 10: Sequenzierungsprimer.**

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

### 2.1.8.3 Primer für RT-PCR

**Tabelle 11: Primer für RT-PCR.**

Gen	Sequenz
<i>bSOCS3</i> F	5'-AAG CAC AAG AAG CCA ACC AG-3'
<i>bSOCS3</i> R	5'-TTG TGG TTG CTA TCG TCC CA-3'
<i>bJunB</i> F	5'-CCT TCT ACC ACG ACG ACT CA-3'
<i>bJunB</i> R	5'-GCC CTG ACC AGA AAA GTA GC-3'
<i>bMCP1</i> F	5'-CCA GTC ACC TGC TGT TAT ACC-3'

<i>bMCP1</i> R	5'-TGG AAT CCT GAA CCC ACT TCT-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'

#### 2.1.8.4 Oligonukleotid-Sonden für EMSA

**Tabelle 12: Oligonukleotid-Sonden für EMSA.**

2xGAS F	5'-TTT TCG TTT CCC CGA AAT TGA CGG ATT TCC CCG AAA C-3'
2xGAS R	5'-TTT TGT TTC GGG GAA ATC CGT CAA TTT CGG GGA AAC G-3'
M67 F	5'-TTT TCG ACA TTT CCC GTA AAT CTG-3'
M67 R	5'-TTT TCA GAT TTA CGG GAA ATG TCG-3'

### 2.1.9 Bakterienstämme und Medien

#### 2.1.9.1 Bakterienstämme

**Tabelle 13: Bakterienstämme.**

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

#### 2.1.9.2 Zellkulturmedien

**Tabelle 14: Zellkulturmedien.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert	Hersteller
LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl	7,0	Carl Roth
SOC-Medium	2% Trypton	7,5	Thermo Fisher Scientific

	0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub>		
LB-Agar-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1,5% Agar-Agar	7,0	Carl Roth

Das LB-Medium und das LB-Agar-Medium wurden 30 min autoklaviert und mit Ampicillin (Verhältnis 1:1000) als Selektionsmarker versetzt. Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt. Beim SOC-Medium wurde zunächst der pH-Wert mit NaOH eingestellt und dieses dann bei 121°C und 1,5 bar für 20 min autoklaviert. Anschließend wurden dem Medium 20 mM steril filtrierte Glucose hinzugefügt.

### 2.1.9.3 Medien zur Herstellung von Vollmedien

**Tabelle 15: Medien zur Herstellung von Vollmedien.**

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)	Biochrom
Rosewell Park-Memorial-Institut (RPMI)-Medium	Lonza, Basel, Switzerland

### 2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.10.1 Geräte

**Tabelle 16: Geräte.**

Bezeichnung	Hersteller
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 Spark	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
Sicherheitsbank HERAsafe KS9	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	shuett-biotec, Göttingen
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf

#### 2.1.10.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 17: 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 µl)	Brand, Wertheim
Vasco Nitril Handschuh	B. Braun
Whatman-Papier	GE Healthcare
Zellkulturflasche (T75)	Sarstedt
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kristallographische Darstellung des STAT3-Moleküls

Zur Wahl der Punktmutationen wurde eine kristallographische Darstellung genutzt, mit deren Hilfe im STAT3-Molekül Aminosäuren ausgewählt wurden, die aufgrund ihrer Lokalisation im Protein potentiell eine funktionelle Bedeutung besitzen könnten. Es wurde neben einem STAT3-Dimer in paralleler sowie antiparalleler Ausrichtung auch ein an den DNA-Strang gebundenes STAT3-Dimer verwendet. Die Darstellung erfolgte mittels der

Software PyMol (DeLano Scientific, San Francisco, USA) unter Verwendung der Proteindatenbank PDB.

### 2.2.2 STAT3-Mutagenese

Für die Mutagenese wurden die Punktmutationen D566A und D566N, die in der Linker-Domäne liegen, ausgewählt. Die entsprechenden Primer wurden bestellt und mit Hilfe des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis-Kits wurden die Punktmutationen in die für STAT3 kodierenden Plasmide eingefügt. Als Vorlage für das Plasmid dienten die Expressionsvektoren pcDNA-FRT-STAT3-GFP und pcDNA5-muSTAT3-SNAP-HIS, die beide freundlicherweise von Prof. Dr. Müller-Newen, Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, zur Verfügung gestellt wurden (Domoszai et al. 2014). Für den Reaktionsansatz wurden zu je 0,5 µl des Mutageneseprimers (vorwärts und rückwärts, 125 ng/µl) 1,25 µl STAT3-Plasmid (10 ng/µl), 0,5 µl dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat)-Mix, 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer und 19,75 µl H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Anschließend wurde die PCR durch die Zugabe von 0,5 µl *PfuTurbo*-DNA-Polymerase gestartet und durchlief insgesamt 20 Zyklen. Diese Zyklen wurden im Thermocycler (Biometra, Göttingen) wie folgt programmiert:

**Tabelle 18: Zyklen der PCR.**

Schritt 1 (nur im ersten Amplifikationszyklus)	Denaturierung, 30 sek, 95 °C
Schritt 2	Denaturierung, 30 sek, 95 °C
Schritt 3	Hybridisierung, 60 sek, 55 °C
Schritt 4 (19-malige Wiederholung der Schritte 2 bis 4)	Elongation, 14 min, 68 °C

Im Anschluss wurden die methylierten und damit unmutierten Anteile der DNA-Matrize entfernt, indem ein Verdau mit 0,5 µl des Restriktionsenzym *Dpn1* bei 37 °C für eine Stunde stattfand. Im nächsten Schritt wurde die nun die Punktmutation enthaltende Plasmid-DNA in superkompetente XL1-blue *E. coli*-Zellen transformiert. Dazu wurde zunächst die Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, da die Bakterien bei -80 °C gelagert werden. Anschließend wurden 50 µl dieser Suspension mit 2 µl der Plasmid-DNA auf Eis für 30 min inkubiert. Nach einem 45-sekündigen Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C und erneuter Inkubation auf Eis für 2 min wurde der Ansatz in 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium überführt und für 60 min bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator belassen. Schließlich

wurden 250 µl der Zellsuspension auf einer mit Ampicillin/Kanamycin (50 µg/ml) als Selektionsmarker behandelten LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

### 2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA und deren Sequenzierung

Zur Isolation der gewünschten amplifizierten Plasmid-DNA aus den XL1-blue-Zellen wurde aus der Bakterienkultur eine Kolonie ausgewählt und in ein mit Ampicillin/Kanamycin (50 µg/ml) versetztes Nährmedium überführt. Anschließend wurde das Medium über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine kleine Menge Plasmid-DNA mit Hilfe des peqGOLD-Plasmid-Miniprep-Kits I nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Zur Sequenzierung wurde nun ein Ansatz aus 6 µl der isolierten Plasmid-DNA, 8 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl STAT3-304f-Sequenzierungsprimer an die SEQLAB Sequence Laboratories (Göttingen) gesendet. Nach Bestätigung der gewünschten Mutationen erfolgte mit Hilfe der Maxipräparation die Herstellung von größeren Mengen der Plasmid-DNA.

### 2.2.4 Amplifikation der Plasmid-DNA

Die Herstellung großer Mengen Plasmid-DNA erforderte die Transformation des Plasmids in DH5α-kompetente Zellen. Analog zum vorherigen Schritt handelte es sich wieder um *E. coli*-Zellen, die bei -80 °C gelagert und auf Eis aufgetaut wurden. Zunächst wurden 2 µl der Plasmid-DNA zu 100 µl zuvor aufgetauten Bakterienzellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C und erneuter Inkubation auf Eis für 2 min wurde der Ansatz in 1 ml SOC-Medium für 60 min bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden 250 µl dieser Zellsuspension auf einer mit Ampicillin (50 µg/ml) beimpften LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie aus der Kultur ausgewählt, in ampicillinhaltiges (50 µg/ml) LB-Medium transferiert und für 6 Stunden im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in 100 ml mit Ampicillin (50 µg/ml) versetztem LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Maxipräparation mit Hilfe des QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kits nach Anweisungen des Herstellers. Die nach erfolgter Maxipräparation gewonnene Plasmid-DNA wurde in 100 µl DNase-, RNase- und proteinasefreiem Wasser resuspendiert. Anschließend erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei

einer Wellenlänge von 260 nm in einer 1-ml-UV-Küvette. Als Leerwert diente 1 ml H<sub>2</sub>O. Die Konzentration der DNA wurde entsprechend folgender Formel berechnet:

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

Um sicherzustellen, dass die DNA in akzeptabler Reinheit vorlag, wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Von einer reinen Probe wurde bei einem Wert von ca. 1,8 ausgegangen. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 1 µg/µl adjustiert und die Proben bei -20 °C eingefroren und gelagert.

## 2.2.5 Methoden der Zellkultur

### 2.2.5.1 Auftauen und Kultivieren humaner Zellen

Zur erfolgreichen Kultivierung humaner Zellen war das sterile Arbeiten unter mikrobiologischen Sicherheitsbänken Voraussetzung. Die für diese Arbeit verwendeten Zellen wurden jeweils in ihrem zelllinienspezifischen Medium kultiviert. Für STAT1-defiziente U3A-Zellen war dies DMEM, mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,04 µg/ml Puromycin versetzt und für HeLa-S3-Zellen RPMI-Medium, das mit 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die bei -80 °C gelagerten Zellen wurden zunächst im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, danach in vorgewärmtem Medium suspendiert und anschließend in 10 ml des gleichen Mediums übertragen. Dieser Ansatz wurde nun für 10 min bei RT und 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das gewonnene Zentrifugat wieder in Vollmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Anschluss in einer mit Wasserdampf gesättigten 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die weitere Zellpassage erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm<sup>2</sup>.

### 2.2.5.2 Zellpassage

Zur Aufrechterhaltung einer Konfluenz von ca. 100% wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage vereinzelt und umgesetzt. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 5–10 ml vorgewärmtem PBS gewaschen und für 2–3 min im Brutschrank bei 37 °C mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,2 g/l EDTA; Biochrom) inkubiert. Durch Hinzugabe von vorgewärmtem entsprechendem Vollmedium (10% FCS) wurde die Trypsin/EDTA-Aktivität wieder gestoppt. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:8 bis 1:10 verdünnt und ausplattiert.

### 2.2.5.3 Einfrieren humaner Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein spezielles Einfriermedium verwendet, das aus 90% FCS und 10% DMSO bestand. Das DMSO fungierte hierbei während der Lagerung der Zellen bei -80 °C als Gefrierschutzmedium. Zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% beim Einfrieren wurde das Medium verworfen und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung gelöst und anschließend in Vollmedium resuspendiert, um die Trypsin-Aktivität zu stoppen. Nach Zentrifugation für 10 min bei RT und 800 rpm wurde der Überstand verworfen, das erhaltene Zellzentrifugat in entsprechender Menge Einfriermedium resuspendiert und eine Nacht in einer Gefrierbox (Nalgene, Heidelberg) verwahrt.

### 2.2.6 Transfektion von Säugetierzellen

Die Transfektion der Zellen mit dem mutierten oder zu Kontrollzwecken wildtypischem Expressionsplasmid fand jeweils bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 70% statt. Dafür standen sowohl Lochplatten als auch Objektträger zur Verfügung. Bei der Transfektion von HeLa-S3-Zellen erfolgte ein Mediumwechsel. Hierfür wurde das alte Medium entfernt und durch die gleiche Menge frisches Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden folgende Ansätze hergestellt und verwendet:

**Tabelle 19: Übersicht der Transfektionsansätze für verschiedene Lochplatten und 8-Kammer-Objektträger.**

Trägermaterial	Plasmid-DNA (1 µg/µl) in µl	NaCl (150 mM) in µl	MegaTran 2.0 in µl
6-Lochplatte, je Loch	2 (für Mutationskonstrukte), 4 (für WT)	200	4
48-Lochplatte, je Loch	0,25	50	1,56
8-Kammer-Objektträger, je Kammer	0,25	30	0,75

Im Anschluss wurden die Ansätze für 10 sek gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze direkt auf die Zellen pipettiert und die Lochplatten bzw. die Objektträger für ca. 18 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Transfektionsrate

konnte für die mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP) exprimierenden Konstrukte mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie vor Beginn der Experimente überprüft werden.

### 2.2.7 Stimulation der Zellen

Die Stimulation erfolgte mit den rekombinant hergestellten Zytokinen IL-6 und IFN $\gamma$  nach unterschiedlichen Stimulationsprotokollen und -zeiten. Dafür wurden die Zytokine in vorgewärmtem Medium stets auf eine Konzentration von 50 ng/ml verdünnt und im Anschluss direkt auf die Zellen pipettiert. 6-Lochplatten wurden je Loch mit 1000  $\mu$ l, 48-Lochplatten je Loch mit 500  $\mu$ l und 8-Kammer-Objektträger je Kammer mit 200  $\mu$ l zytokinhaltigem Medium stimuliert.

### 2.2.8 Proteinextraktion

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen gekühlt und die Reaktionsschritte stets auf Eis durchgeführt. Die für Western-Blot-Analysen oder elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays benötigten Proteinextraktionen erfolgten aus zuvor transfizierten und mit einem Zytokin stimulierten U3A- und HeLa-S3-Zellen. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend pro Loch mit 60  $\mu$ l zuvor frisch angesetztem zytosolischen Extraktionspuffer lysiert. Dem Puffer wurde kurz vor Gebrauch 3 mM DTT, 1% Complete-Mini-Protease-Inhibitoren, 0,4 mM Pefabloc und 0,1% IGEPAL-CA-630 hinzugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelllysate mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 10-sekündiger Zentrifugation bei 4 °C und 16000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, wiederum für 5 min bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert und 40  $\mu$ l des Überstands als zytosolischer Proteinextrakt gesichert. Das aus der ersten Zentrifugation erhaltene Proteinpellet wurde in 60  $\mu$ l frisch angesetztem nukleären Extraktionspuffer resuspendiert, dem kurz zuvor 3 mM DTT, 1% Complete-Mini-Protease-Inhibitoren und 0,4 mM Pefabloc hinzugefügt wurden. Dieses Lysat wurde 30 min auf Eis inkubiert, ehe es für 15 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert wurde. Auch hier wurden 40  $\mu$ l des Überstands entnommen und als nukleärer Proteinextrakt dem zuvor hergestellten zytosolischen Proteinextrakt hinzugefügt. Abhängig von den folgenden Experimenten wurden die Proben unterschiedlich behandelt. Während die Proteinextrakte für die EMSA-Experimente sofort bei -80 °C eingefroren wurden, wurden die Proben für die Western-Blot-Analysen mit 6 x SDS-Probenpuffer (14,4  $\mu$ l pro 80  $\mu$ l Proteinextrakt) versetzt, für 3 min einem Hitzeschock bei 95 °C ausgesetzt und nach erfolgter Denaturierung bei -20 °C gelagert.

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

Die SDS-PAGE wird verwendet, um ein Proteingemisch nach dem molekularen Gewicht der enthaltenen Proteine aufzutrennen, um anschließend eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung des Proteingemischs treffen zu können. Zu diesem Zweck wurde ein diskontinuierliches Zwei-Phasen-Gel verwendet, das aus zwei Gelen unterschiedlicher Zusammensetzung bestand. Im unteren Teil wurde ein Trenngel verwendet, das sich aus 25% Trenngelpuffer, 33,1% Rotipherese Gel 30, 0,03% APS und 0,16% TEMED zusammensetzte. Um einen möglichst geraden oberen Abschluss des Gels zu gewährleisten, wurde auf dieses Gel während der ca. 20-minütigen Polymerisation Isopropanol gegeben, das anschließend abgegossen wurde. Auf das Trenngel wurde nun ein Sammelgel gegossen, zusammengesetzt aus 25% Trenngelpuffer, 16% Rotipherese Gel 30, 0,06% APS und 0,16% TEMED. In dieses wurde während der ebenfalls 20-minütigen Polymerisation ein Plastikkamm gesteckt, der Taschen für die spätere Beladung des Gels bildete. Diese Geltaschen wurden nun mit 16 µl der mit SDS-Puffer versetzten Proteinlysate beladen, während in eine Tasche 8 µl eines SDS-Puffers mit Molekulargewichtsmarkern als Laufkontrolle geladen wurde. Zur Auftrennung der Proteine wurde für ca. 3 Stunden eine konstante Stromstärke von 15 mA pro Gel angelegt. Sobald die Blaufärbung des SDS-Laufpuffers das Trenngel durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Im folgenden Schritt wurden die aufgetrennten Proteinbanden mittels einer Semi-Dry-Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Diese wurde zuvor für 5 min mit Methanol inkubiert und dadurch aktiviert. Für diesen Transfer wurde für ca. 1,5 Stunden eine konstante Stromstärke von 80 mA pro Gel angelegt. Anschließend wurde die Membran für 60 min bei RT blockiert, indem sie in 4%-igem Rinderserumalbumin (BSA) gelöst in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) und hinzugesetztem 0,05%-igem Tween-20 (TBS-T) inkubiert wurde. Die Membran wurde anschließend bei 4 °C über Nacht mit entweder einem Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP-Antikörper oder einem STAT-3 (D1B2J)-Antikörper inkubiert, die auf eine Konzentration von 1:1000 in 4%-igem BSA in TBS-T verdünnt wurden. Dies geschah zur immunologischen Detektion der Proteinbanden und gab Auskunft über die Menge an pSTAT3 und gesamt-STAT3. Beide Antikörper sind aus Kaninchen stammende monoklonale Antikörper. Am folgenden Tag wurde die Membran fünfmal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Zur Visualisierung der Proteinbanden auf der Membran wurde ein an IRDye-gekoppelter Esel-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:10000 in 4%-igem BSA in TBS-T) auf die Membran gegeben und wegen der Photosensitivität des Antikörpers für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem 5-maligen Waschen der Membran für



je 5 min mit TBS-T und einmaligem Waschen für 5 min mit TBS wurden die Proteinbanden mit Hilfe des LI-COR-Odyssey-Sa-Imaging-Systems detektiert.

### 2.2.10 Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

In dieser Arbeit wurde in EMSA-Experimenten unter Verwendung von Phospho-Imager-Platten DNA-gebundenes STAT3 mit Hilfe radioaktiv markierter [<sup>33</sup>P]-DNA-Sonden autoradiographisch detektiert. Hierzu wurden zuvor hybridisierte, doppelsträngige Oligonukleotid-Sonden radioaktiv markiert, indem die überhängenden DNA-Enden mit Hilfe eines Klenow-Fragmentes der *E. coli*-DNA-Polymerase mit dem radioaktiven Nukleotid [<sup>33</sup>P]-dATP verlängert wurden. Zum Einsatz kamen die M67-Sonde, die eine singuläre, hoch-affine GAS-Bindestelle aufweist, und die 2xGAS-Sonde, die zwei kanonische GAS-Sequenzen besitzt.

Die Hybridisierung der Oligonukleotide erfolgte nach dem folgenden Protokoll: Zu 100 pM komplementärer Oligonukleotide wurde 50 pM Oligo-Puffer gegeben und dieses 5 min bei 95 °C gekocht. Zur radioaktiven Markierung wurde zu 0,1 ng Oligonukleotiden 0,8 µl [<sup>33</sup>P]-dATP und 5 U Enzym in 5 µl 10 x Eco-Pol-Puffer hinzugefügt und für 25 min bei RT inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl EDTA Lösung (0,5 M). Anschließend wurden freie Nukleotide mit Hilfe einer Zentrifugation mit Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen für 3 min bei 700 g und RT entfernt. Die Proben wurden bis zu ihrem Einsatz in EMSA-Versuchen bei 4 °C gelagert.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der verschiedenen DNA-STAT3-Komplexe und freier Sonden wurde ein nicht denaturierendes TBE-Polyacrylamidgel verwendet, das 0,1% TEMED, 12 % Rotiphorese-Gel 40, 4, 8% 5 x TBE und 0,2 % APS enthielt. Zur Modellierung von Geltaschen für die spätere Beladung mit Proben wurde ein Plastikamm verwendet. An das polymerisierte Gel wurde zur Äquilibration eine Spannung von 400 V für zwei Stunden angelegt. Für das EMSA-Experiment wurde zunächst 8,5 µl eines Master-Mixes hergestellt, 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. Diesem wurden 4,5 µl der gewonnenen Proteinextrakte hinzugefügt und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Für Konkurrenzexperimente wurde dem Ansatz zusätzlich eine nicht-radioaktiv markierte M67-Probe im 750-fachen molaren Überschuss hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurden die Geltaschen mit der Probe beladen und die Elektrophorese begonnen. Die Elektrophorese fand in 0,25 x TBE-Laufpuffer für ca. 2,5 Stunden bei 400 V pro Gel statt. Nach abgeschlossener Elektrophorese folgte die Übertragung des Gels auf ein Whatman-Papier,

indem das Gel auf das Papier gelegt und für ca. 2 Stunden unter Unterdruck auf einer Heizplatte vollständig getrocknet wurde. Zur Auswertung wurde das Whatman-Papier zum Nachweis radioaktiver Signalbanden auf der Phospho-Imager-Platte inkubiert, die anschließend mit Hilfe des Typhoon-FLA-9500-Scanners und der Software TINA v. 2.0 ausgelesen wurde.

### 2.2.11 Luziferase-Reportergen-Assay

Um die transkriptionelle Aktivität der STAT3-Punktmutationen mit der des Wildtyps vergleichen zu können, wurden in dieser Arbeit Luziferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Hierzu wurde das Genkonstrukt 3xLy6E, ein Luziferase-kodierendes, IFN $\gamma$ -sensitives Plasmid, benutzt. Dieses enthält neben der kodierenden Sequenz des Luziferase-Gens auch drei GAS-Bindestellen im Promoter (Khan et al. 1993; Wen et al. 1995). Zunächst wurden die STAT1-defizienten U3A-Zellen sowohl mit den STAT3-Konstrukten als auch mit dem Plasmid der  $\beta$ -Galaktosidase und dem 3xLy6E-Reportergenkonstrukt transfiziert. Dafür wurde in jedes Loch einer 48-Lochplatte 70 ng des genannten Reportergen-Plasmids, 200 ng des  $\beta$ -Galaktosidase-kodierenden Expressionsplasmids und 250 ng des STAT3-WT- bzw. der STAT3-Mutanten kodierenden Vektors pipettiert und die 48-Lochplatte über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Zellen für 6 Stunden mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) stimuliert, während die andere Hälfte unbehandelt belassen wurde. Nach Beendigung der Stimulation durch Abnahme des Mediums und Waschung der Zellen mit PBS, erfolgte die Lyse der Zellen mittels 100  $\mu$ l des frisch angesetzten Luziferase-Puffers bei RT für 15 min. Als nächstes wurde das Lysat für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert und 20  $\mu$ l des Überstands pro Loch in eine 96-Lochplatte übertragen. Nun wurde jeder Probe 50  $\mu$ l Substratlösung hinzugefügt und die Luziferase-Aktivität photometrisch mit Hilfe des Lesegeräts Tecan Infinite Spark gemessen. Pro STAT3-Konstrukt und Kondition wurden sechs unabhängige Transfektionsansätze gemessen. Zur Auswertung kamen die Software Spark I-Control und Magellan zum Einsatz.

Zur Normierung der Luziferase-Aktivität wurde die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase gemessen. Hierzu wurden aus dem Zellysat weitere 20  $\mu$ l in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 280  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer versetzt. Nachdem das farblose ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) nach ca. 15 min zu gelbem ortho-Nitrophenol reagiert hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu$ l Natriumcarbonat-Lösung (0,5 M Na $_2$ CO $_3$ ) pro Probe beendet. 150  $\mu$ l je Probe wurden nun in eine durchsichtige 96-Lochplatte pipettiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des Tecan Infinite Spark photometrisch bei einer

Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Als Leerwert dienten 300 µl Wasser in einem separaten Loch der 96-Lochplatte. Zur Normierung der Luziferase-Aktivität wurde nun der Quotient aus der Luziferase-Aktivität und der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gebildet.

### 2.2.12 Real-time PCR

#### 2.2.12.1 RNA-Extraktion und reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA)

Für die Real-time PCR-Experimente fand die Transfektion der U3A-Zellen mit pcDNA-FRT-STAT3-GFP- und pcDNA5-muSTAT3-SNAP-HIS-Plasmid in Hungermedium (DMEM mit 1% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) statt. Die Hälfte der Zellen wurde anschließend für 3 Stunden mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) stimuliert, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die RNA aus diesen Zellen mit Hilfe des peqGOLD-Total-RNA-Kits nach Herstellerangaben extrahiert. Die so gewonnenen 8 µl RNA wurden in 20 µl Volumen suspendiert und mit Hilfe des Verso-cDNA-Kits von Thermo Fisher Scientific in cDNA umgeschrieben. Dabei setzte sich die reverse Transkription aus einer Synthesephase bei 42 °C für 30 min und einer anschließenden Denaturierung bei 95 °C für 2 min zusammen. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.12.2 Real-time PCR

Es wurde ein Master-Mix hergestellt, der 10 µl Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green-Mix, 8,4 µl ddH<sub>2</sub>O und jeweils 0,28 µl eines spezifischen Primerpaares (5 µM) enthält. Aus diesem Master-Mix wurden je 19 µl zusammen mit je 1 µl der jeweiligen cDNA blasenfrei auf eine weiße 96-Lochplatte gegeben. Die Platte wurde danach mit einem adhärenen Film versiegelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare waren: *SOCS3* F und R, *JmB* F und R, *MCP1* F und R sowie *GAPDH* F und R, wobei Letztere zur Normierung genutzt wurden. Pro Reaktionsansatz erfolgten drei unabhängige Messungen, während die Reaktion nach dem folgenden Schema ablief:

**Tabelle 20: Schema der Real-time PCR.**

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

Schritt 4	Synthese, 30 sek, 72 °C
-----------	-------------------------

Zur Quantifizierung und zum Vergleich der relativen Expressionsniveaus der verschiedenen STAT3-Zielgene wurde folgende Formel verwendet:

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

### 2.2.13 Fluoreszenzanalyse

Zur Visualisierung des Zellkerns wurde die direkte Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von blau-fluoreszierendem Hoechst 33258 genutzt, sodass es möglich war, eine Charakterisierung der STAT3-Konstrukte bezüglich ihrer nukleären Kernakkumulation und zellulären Verteilung vorzunehmen. Dazu wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M verwendet, das mittels verschiedener Fluoreszenzfilter in der Lage war, die Zellkerne sowohl zu detektieren als auch darzustellen. Die mit GFP-markierten STAT3-Konstrukte wurden bei einer Wellenlänge von 480 nm aufgenommen, während die SNAP-markierten STAT3-Konstrukte bei 550 nm und die Hoechst-gefärbten Zellkerne bei 280 nm photographiert wurden. Hierzu wurden 8-Kammer-Objektträger genutzt. In diesen wurden die Zellen kultiviert, transfiziert und ggf. am nächsten Tag mit IL-6 (50 ng/ml) oder IFN $\gamma$  (50 ng/ml) nach verschiedenen Stimulationsprotokollen stimuliert. Zur Markierung der SNAP-Konstrukte wurde das chromophore Substrat SNAP-Cell-TMR-Star vor der Stimulation in die entsprechenden Zellen eingebracht. Die SNAP-markierten Konstrukte wurden mit 60  $\mu$ l pro Kammer SNAP-Cell-TMR-Star (1:2000 in Kulturmedium) für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde jede Kammer dreimal mit 300  $\mu$ l frischem Medium gewaschen, mit neuem Medium versehen und 30 min bei 37 °C inkubiert, ehe die eigentliche Stimulation begann. Nach erfolgter Stimulation wurden die Kammern mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei RT mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Nach einer weiteren Waschung mit je einmal PBS und ddH $_2$ O erfolgte die Inkubation mit der photosensitiven Hoechst-Lösung (1:2000 in PBS) für 10 min im Dunkeln. Schließlich wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS und einmal mit ddH $_2$ O gewaschen, die Kammern auf dem Objektträger entfernt und dieser blasenfrei mit Fluoromount-G-Eindeckmedium bedeckt. Der Objektträger härtete anschließend lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C aus.

Die Aufnahme der Präparate erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera (Nikon DS-Qi2) unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon Eclipse Ti fluorescence) ausgestattet mit entsprechenden Filtern. Diese Aufnahmen wurden genutzt, um die Fluoreszenzintensität sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus zu messen und daraus einen Quotienten zu

bilden. Zur graphischen Aufbereitung wurde die Software Fiji/ImageJ (NIH) sowie CoralDRAW 2019 graphics suite (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) verwendet. Es wurden aus drei unabhängigen Versuchsreihen pro Bedingung 10 Zellen zufällig ausgewählt und für diese sowohl Mittelwert als auch Standardabweichung berechnet sowie graphisch dargestellt.

#### **2.2.14 Statistische Analyse**

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal unabhängig mit verschiedenen Transfektions- und Reaktionsansätzen durchgeführt. Für jede Stimulationsbedingung der STAT3-Konstrukte wurde ein einzelner Messwert samt Standardabweichung erhoben. Die unterschiedlichen STAT3-Konstrukte wurden mit Hilfe unpaariger, zweiseitiger t-Tests oder Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen und statistisch signifikante Unterschiede erfasst. Als signifikant bewertet wurde dabei in allen Tests ein p-Wert  $\leq 0,05$ .

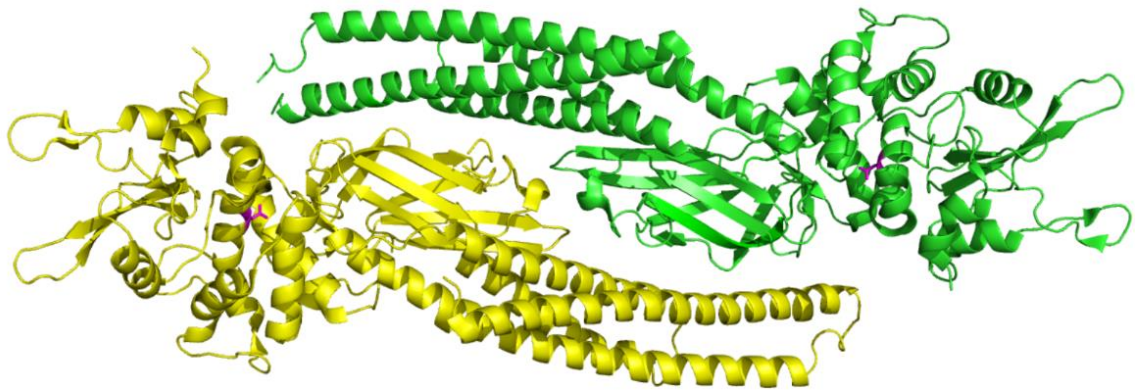
Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Software-Programme GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim). Unter Verwendung der Software Fiji/ImageJ wurden die digitalen Bilder ausgewertet und die Ergebnisse mit Hilfe des Programms CorelDRAW 2019 graphics suite dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kristallographische Analyse der STAT3-Linker-Domäne in der Umgebung des D566-Restes

Um potentielle Gain-of-function (GOF)-Mutationen in der Linker-Domäne des STAT3-Moleküls auszuwählen, wurde zunächst die Kristallstruktur eines an einem DNA-Strang gebundenen murinen STAT3-Dimers dargestellt, welches sich vom humanen STAT3 nur in einer Aminosäure an Position 760 unterscheidet (Pietra et al. 1998). Daraufhin wurde die Aminosäure D566 ausgewählt und die Punktmutationen D566A sowie D566N gentechnisch erzeugt und auf ihre Charakteristika und Unterschiede zum WT-Molekül hin untersucht. Zum Ziel dieser Arbeit gehörte insbesondere die Charakterisierung der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung, der subzellulären Distribution der zytokininduzierten Phosphorylierung, der transkriptionellen Aktivität, des DNA-Bindevhaltens, der Zielgenaktivierung sowie des nukleären Kernakkumulationsverhaltens.

Der Aminosäurerest Asparaginsäure an Position 566 wurde aufgrund mehrerer Erwägungen für die Mutagenese ausgewählt. In diesem Abschnitt der Linker-Domäne liegt eine große Homologie zwischen den verschiedenen STAT-Proteinen vor, was eine funktionelle Bedeutung dieses Bereichs des STAT3-Moleküls wahrscheinlich macht. In der Literatur sind Assoziationen mit onkogenen Entitäten genauso wie eine GOF-Mutation in der homologen Aminosäure E559 in STAT1 beschrieben. Da der Abstand der funktionellen Gruppe des Asparaginsäurerestes in Position 566 zum DNA-Strang ca. 11 Å beträgt, ist von einer schwachen elektrostatischen Wechselwirkung zwischen diesem Aminosäurerest und dem Phosphodiester-Rückgrat der DNA-Doppelhelix auszugehen. Der negativ geladene Aminosäurerest Asparaginsäure wurde daher in dieser Arbeit durch die elektrisch neutralen Aminosäuren Alanin bzw. Asparagin ersetzt.



**Abbildung 2: Kristallographische Darstellung eines STAT3-Dimers in antiparalleler Konformation.** Veranschaulichung der relevanten Strukturen sowie der räumlichen Orientierung eines STAT3-Dimers in antiparalleler Stellung. Die untersuchte Aminosäure Asparaginsäure an Position 566 wurde in beiden Protomeren farblich hervorgehoben (lila).

Zur Veranschaulichung der Position von D566 wurde eine Kristallstruktur erzeugt, die die Orientierung eines antiparallel angeordneten STAT3-Dimers zeigt (Abb. 2). Aufgrund der exponierten Lage des Asparaginsäurerestes in Position 566 ist in der Kristallstruktur des in paralleler Orientierung vorliegenden Konformers von einer elektrostatischen Wechselwirkung von Aminosäurerest und DNA-Rückgrat bei Bindung an eine GAS-Stelle auszugehen.

### **3.2 Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT3-Punktmutationen D566A und D566N gegenüber dem STAT3-WT in der Western-Blot-Analyse**

Das Ziel der SDS-PAGE und der anschließenden Western-Blot-Analyse war die quantitative Bestimmung des Expressionsgrades und der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT3-Varianten auf Grundlage ihres Molekulargewichtes aus den Proteinextrakten der transfizierten Zellen. Daraus ließen sich Aussagen über die Phosphorylierungskinetik der untersuchten STAT3-Punktmutationen D566A und D566N im Vergleich zum Wildtyp treffen. Dafür wurden sowohl HeLa-S3- als auch U3A-Zellen ausplattiert, mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert und am nächsten Tag für je 0, 15 und 30 min mit entweder IFN $\gamma$  oder IL-6 (je 50 ng/ml) stimuliert. Es wurde sowohl GFP- als auch SNAP-markierte STAT3-Plasmid-DNA verwendet. Anschließend wurden nach dem oben

beschriebenen Verfahren die Proteine aus den Zellen extrahiert und einer Gelelektrophorese unterzogen. Nach dem Laden einer Proteinprobe auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel und anschließender Anlage einer elektrischen Spannung migrierten die Proteine durch die Gelmatrix abhängig von ihrer Ladung und molekularen Größe unterschiedlich schnell und trennten sich dadurch nach einer festgelegten Zeit an verschiedenen Stellen im Gel auf. Nach Übertragung auf PVDF-Membran wurden die Proteinbanden immunologisch markiert, indem spezifische rekombinant hergestellte Antikörper auf der Membran inkubiert wurden. Zur Darstellung des Phosphorylierungsniveaus wurde ein Phosphotyrosin-spezifischer Antikörper und zur Darstellung der gesamten STAT3-Menge ein pan-STAT3-spezifischer Antikörper verwendet. Schließlich wurden diese Antikörper durch einen sekundären Antikörper, der sich gegen den primären Antikörper richtete und eine chromophore Markierung aufwies, detektierbar gemacht.

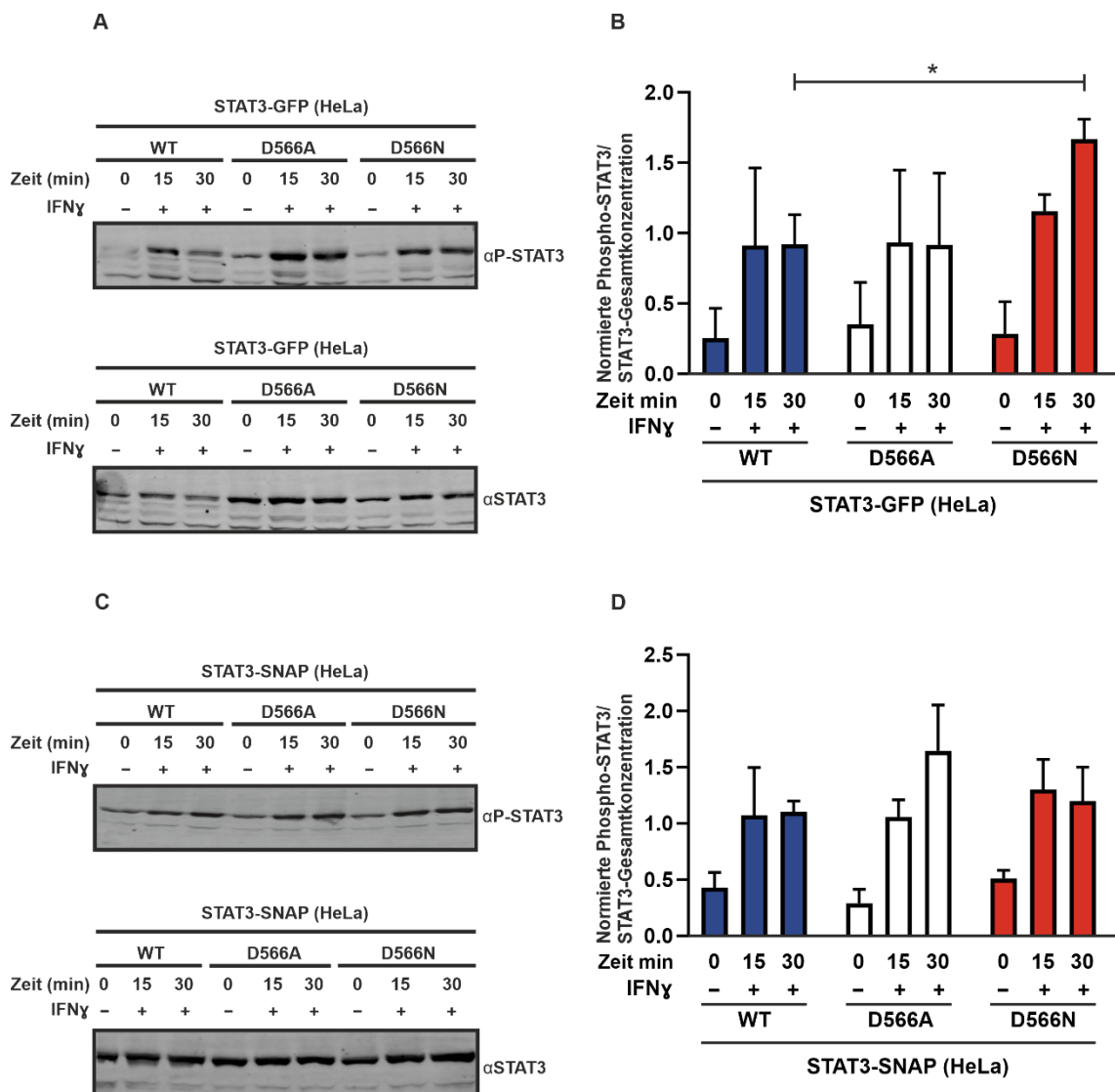
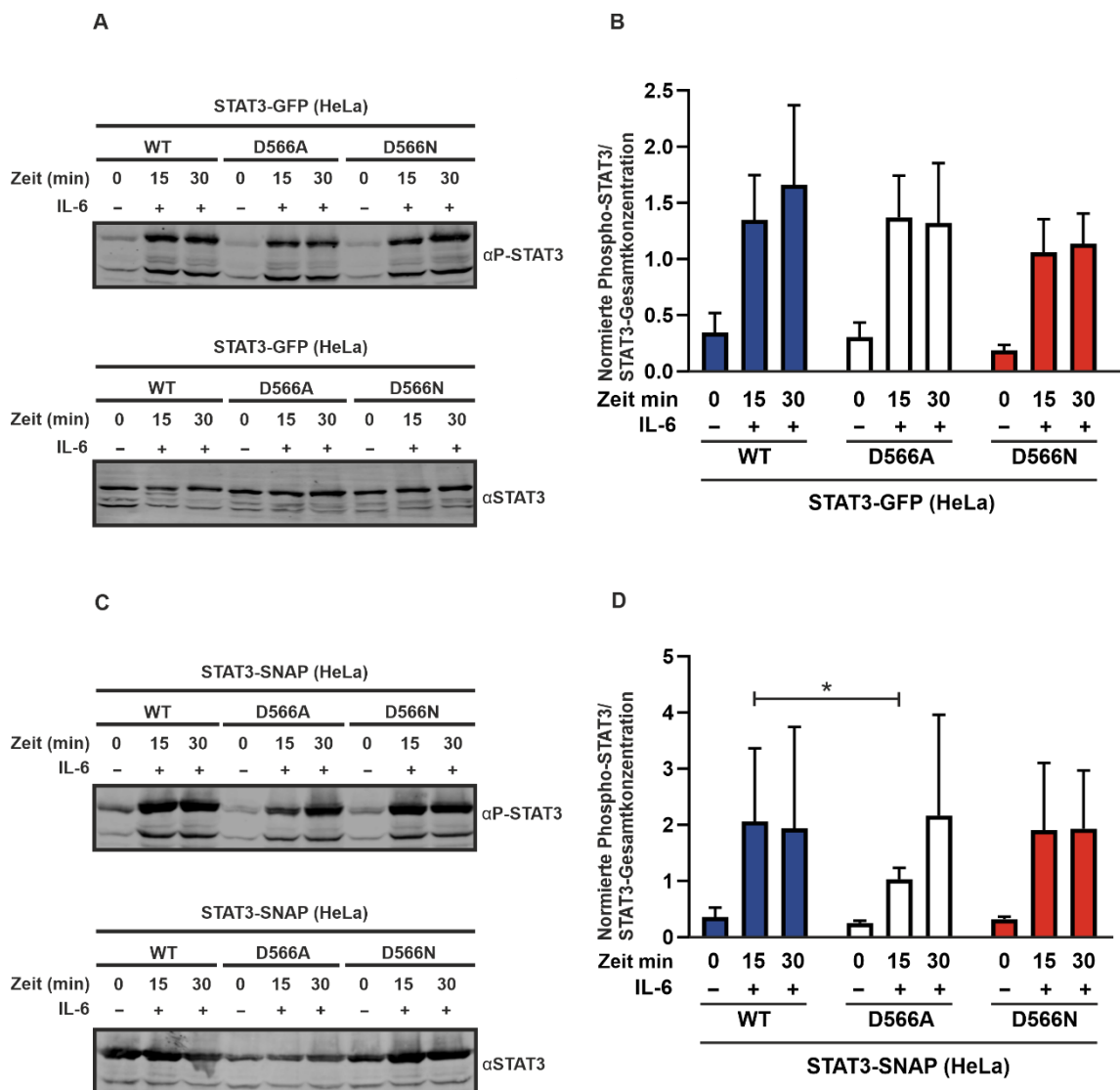


Abbildung 3: Kein Unterschied in der Phosphorylierung des STAT3-WT-Moleküls und der STAT3-D566A- und STAT3-D566N-Moleküle nach IFN $\gamma$ -Stimulation in HeLa-S3-Zellen. STAT3-D566A-,

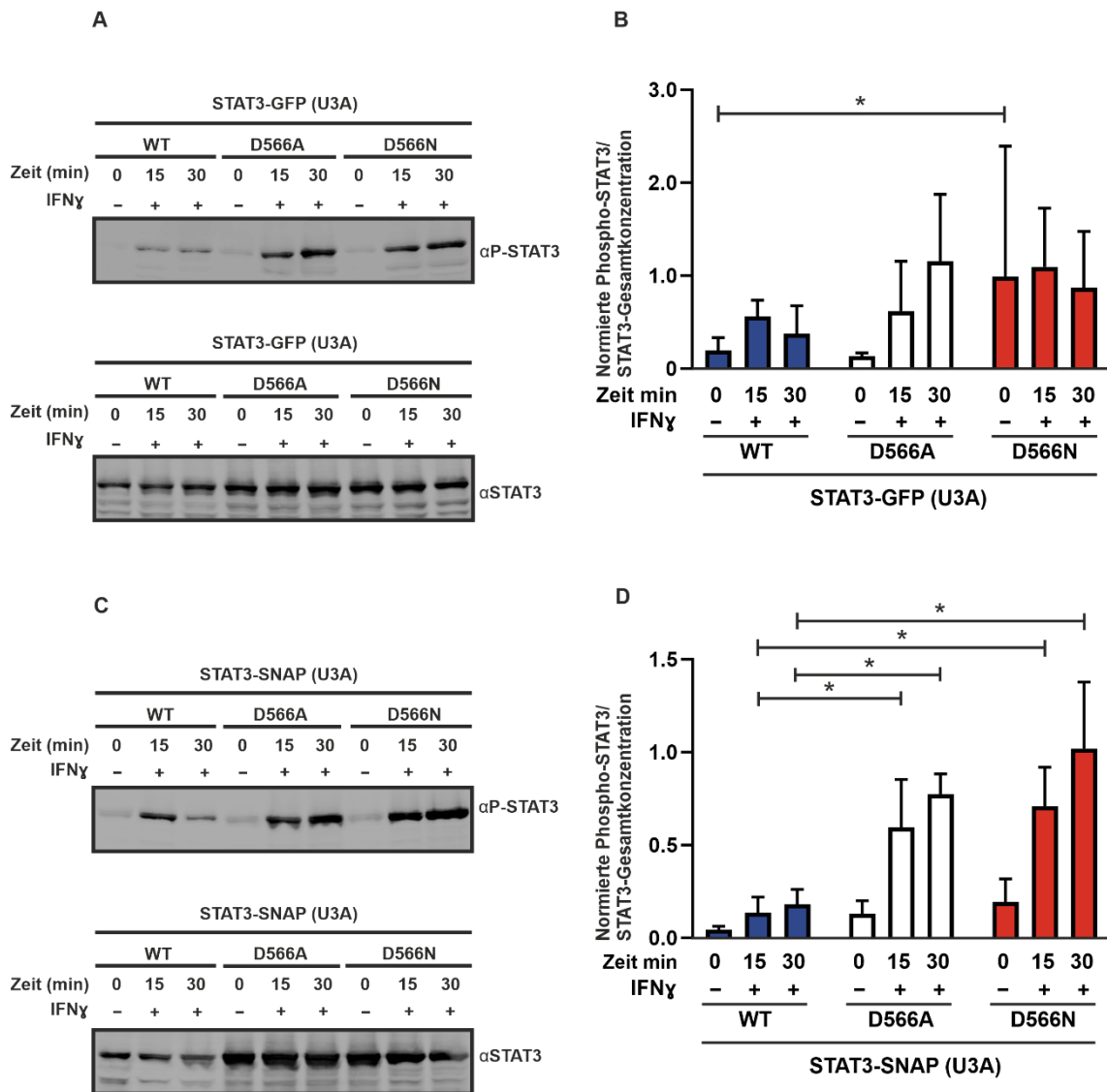


STAT3-D566N- oder STAT3-WT-exprimierende, transfizierte HeLa-S3-Zellen, deren Transgene entweder GFP- oder SNAP-markiert waren, wurden am Folgetag entweder unstimuliert belassen oder für 15 bzw. 30 min mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) stimuliert (A). Die verschiedenen Phosphorylierungsniveaus wurden mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper und einem pan-STAT3-spezifischen Antikörper detektiert. Signifikante Unterschiede wurden durch ein Sternchen kenntlich gemacht. Es zeigt sich in (B) ein signifikanter Unterschied zwischen der D566N-Mutante und dem WT nach 30 min Stimulation, während die anderen Konditionen keinen Unterschied zum Wildtyp aufwiesen. Kein Unterschied in der Phosphorylierungskinetik zeigte sich in repräsentativen Western-Blot-Analysen in den SNAP-markierten Konstrukten in (C) und der zugehörigen Quantifizierung dreier unabhängiger Transfektionsansätze in (D).



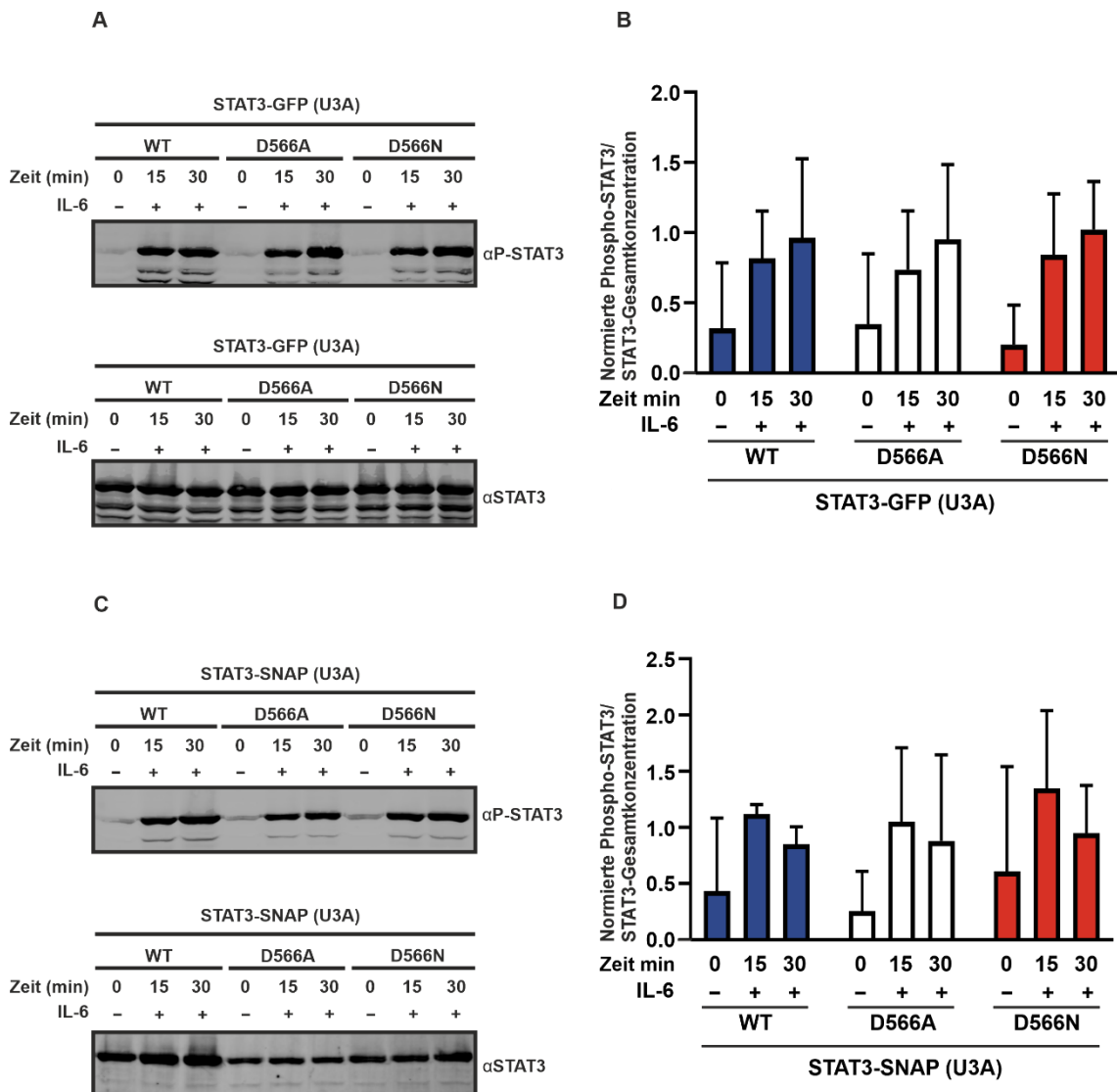
**Abbildung 4: Normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT3-D566A und STAT3-D566N-Mutanten nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen.** Mit STAT3-WT-kodierender Plasmid-DNA oder den entsprechenden Plasmiden für die Punktmutationen STAT3-D566A und STAT3-D566N transfizierte HeLa-S3-Zellen wurden für 0, 15 und 30 min mit IL-6 (50 ng/ml) stimuliert. Nach anschließender Gesamtproteinextraktion, elektrophoretischer Auftrennung und Western-Blot-Analyse in (A) zeigte sich kein Unterschied in der Phosphorylierungskinetik der mit GFP-markierten Zellen (B). In (C) sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese der Gesamtproteinextrakte von HeLa-S3-Zellen, die mit SNAP-Fusionsproteinen

transfiziert und deren Proteinbanden immunologisch mittels Phosphotyrosin-spezifischer STAT3-Antikörper und pan-STAT3-spezifischer Antikörper angefärbt wurden, dargestellt. Einzig im mit Sternchen markierten Phosphorylierungsniveau der STAT3-D566A-Punktmutation nach IL-6 Stimulation über 15 min zeigte sich ein Unterschied zum STAT3-Wildtyp, alle anderen Bedingungen wiesen diesen Unterschied nicht auf (D).



**Abbildung 5: Normale Kinetik der Phosphorylierung des GFP- und SNAP-markierten STAT3-WT-Moleküls und seiner Punktmutanten STAT3-D566A und STAT3-D566N nach IFN $\gamma$ -Stimulation in U3A-Zellen.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden ausplattiert, mit einem STAT3-Plasmid transfiziert (WT, D566A oder D566N) und anschließend entweder unbehandelt belassen oder für 15 bzw. 30 min mit dem Zytokin IFN $\gamma$  (50 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden mit GFP-Addukten oder SNAP-Fusionsproteinen transfiziert. Die Teilabbildung (A) zeigt die immunologisch mit einem Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörper und einem pan-STAT3-spezifischen Antikörper angefärbten GFP-markierten Proteinbanden. Es zeigte sich eine normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung nach drei unabhängigen Experimenten in (B). Es konnte eine mit Sternchen markierte signifikante Hyperphosphorylierung der mutierten STAT3-Proteine, die als SNAP-Fusionsprotein vorlagen, gegenüber dem WT-Molekül nach Stimulation mit IFN $\gamma$  gezeigt werden, während sich die verschiedenen STAT3-Konstrukte in Ruhe nicht vom Phosphorylierungsniveau des

WT unterschieden (D). Dafür wurden die Gesamtproteine dieser SNAP-markierten Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse ausgewertet (C).



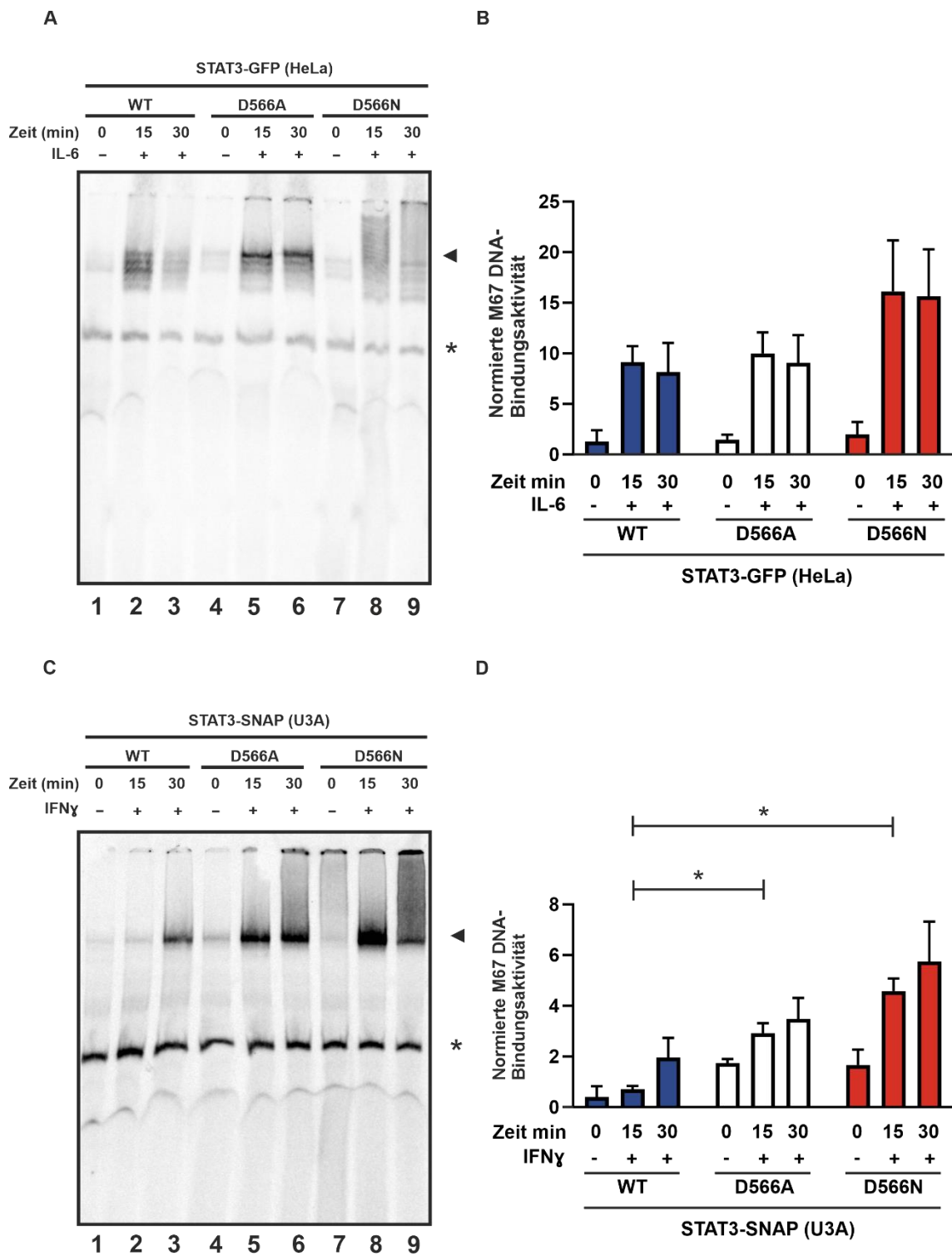
**Abbildung 6: Fehlende Hyperphosphorylierung der STAT3-D566A- und STAT3-D566N-Moleküle verglichen mit dem STAT3-WT nach IL-6-Stimulation in U3A-Zellen.** STAT3-kodierende Expressionsplamide für GFP und SNAP, die für den STAT3-WT oder die Punktmutanten D566A bzw. D566N kodieren, wurden in STAT1-defiziente U3A-Zellen eingebracht und am nächsten Tag für 0, 15 bzw. 30 min mit IL-6 (50 ng/ml) stimuliert (A). Nach repräsentativer Auswertung ergab sich in drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen eine normale Kinetik der Phosphorylierung der Mutanten im Vergleich zum WT (B). Resultat der Auftrennung der Gesamtproteinextrakte aus SNAP-markierten, STAT3-exprimierenden U3A-Zellen mittels Elektrophorese und anschließender Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Phosphotyrosin-spezifischen STAT3-Antikörpers und eines pan-STAT3-spezifischen Antikörpers (C). Repräsentative Quantifizierung der Proteinbanden und Bildung eines Quotienten aus der Menge des Phospho-STAT3 und des Gesamt-STAT3 sowie dessen graphische Darstellung, die ebenfalls keinen Unterschied in der Tyrosin-Phosphorylierung zwischen den Mutanten und dem WT-Molekül aufwies (D).

In HeLa-S3-Zellen konnte kein Unterschied im Phosphorylierungsniveau sowohl nach IFN $\gamma$  als auch nach IL-6 Stimulation zwischen dem STAT3-WT und den in dieser Arbeit untersuchten Punktmutationen STAT3-D566A und STAT3-D566N festgestellt werden (Abb. 3 und Abb. 4). In STAT1-defizienten U3A-Zell zeigte sich eine leichte bis in vereinzelt Experimenten signifikante Hyperphosphorylierung der STAT3-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nach Stimulation mit IFN $\gamma$  (Abb. 5). Nach Stimulation von U3A-Zellen mit IL-6 zeigte sich eine normale Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT3-Mutanten im Vergleich zum WT (Abb. 6).

### 3.3 DNA-Bindung der D566-Mutanten

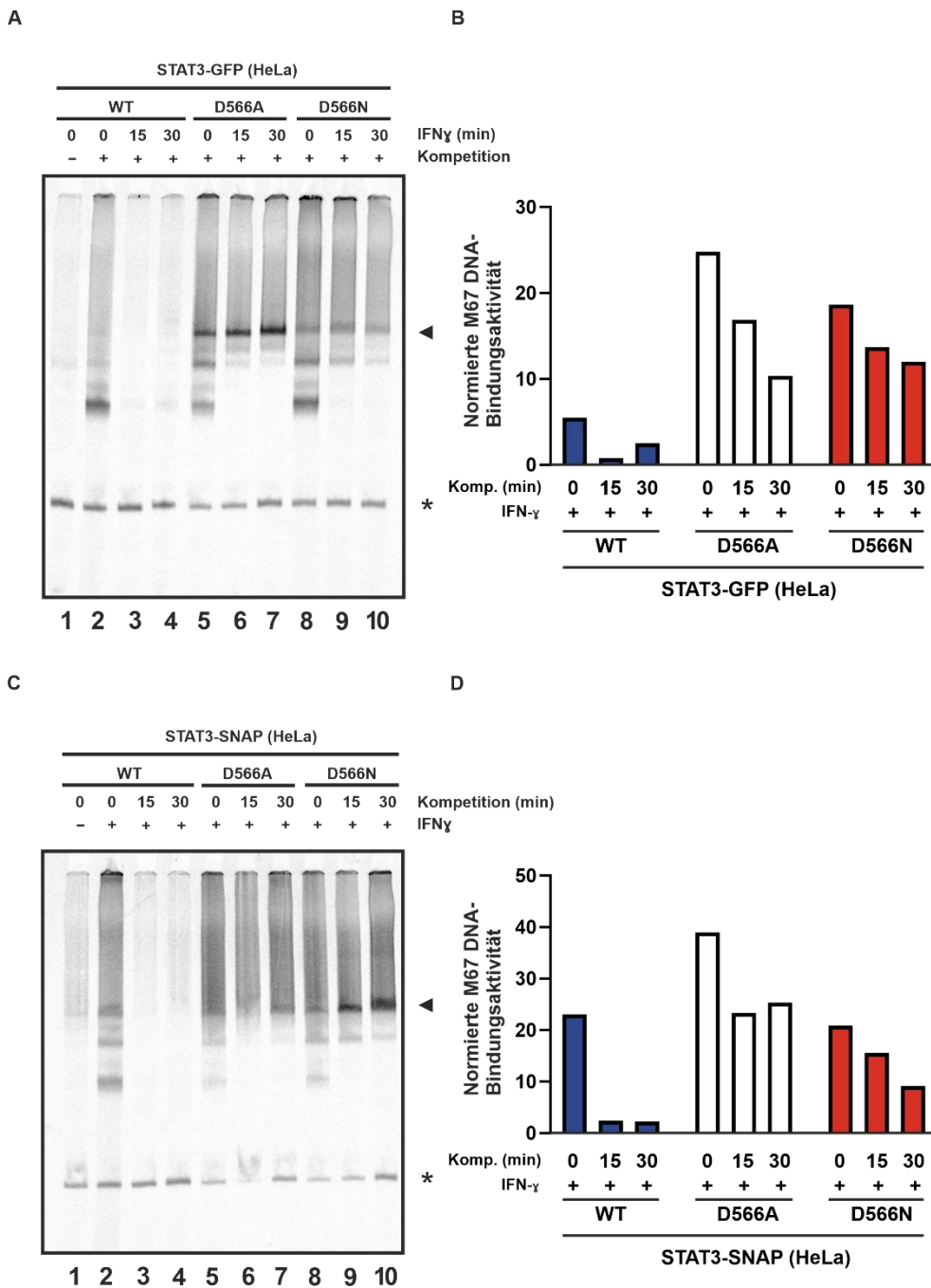
Ziel des elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) war es, Erkenntnisse über die Fähigkeit der STAT3-Konstrukte zur DNA-Bindung zu erhalten. In einem ersten Schritt wurden konfluent wachsende HeLa-S3- und U3A-Zellen kultiviert und ausplattiert. Als nächstes erfolgte die Transfektion mit exprimierenden Plasmiden, kodierend für STAT3-WT, STAT3-D566A bzw. STAT3-D566N. Am Folgetag wurden diese Zellen mit dem Zytokin IFN $\gamma$  oder IL-6 (50 ng/ml) für 0, 15 oder 30 min stimuliert und aus den Zellen Gesamtproteinextrakte gewonnen. Für das EMSA-Experiment wurden zunächst DNA-Sonden, die entweder eine hoch-affine GAS-Bindestelle (M67) aufwiesen oder zwei kanonische GAS-Sequenzen enthielten (2xGAS) radioaktiv markiert, indem die DNA-Stränge mit radioaktiv markierten Nukleotiden (dATP) verlängert wurden. Im nächsten Schritt wurde stets die gleiche Menge der zu untersuchenden Gesamtproteinextrakte für 15 min mit diesen Sonden inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele auf einer Trocknungsapparatur unter Vakuum getrocknet. Anschließend konnten die STAT3-Proteine, die an die radioaktiv markierte DNA gebunden hatten, mittels einer Phospho-Imager-Platte autoradiographisch detektiert werden.

Für das Konkurrenzexperiment wurde zum Proteinansatz nicht-radioaktiv markierte M67-Sonde mit singulärer GAS-Bindestelle in 750-fachem molaren Überschuss hinzugegeben.



**Abbildung 7: Geringfügig gesteigerte DNA-Bindefähigkeit der D566A- und D566N-Mutante im Vergleich zum WT-Protein nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen und IFN $\gamma$ -Stimulation in U3A-Zellen.** HeLa-S3- bzw. U3A-Zellen wurden kultiviert, mit den GFP- oder SNAP-Konstrukten der STAT3-Plasmide transfiziert und am nächsten Tag mit IL-6 bzw. IFN $\gamma$  stimuliert. Aus den Zellen wurden Gesamtproteine extrahiert, die für die Darstellung im elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assay verwendet wurden. Das jeweilige Lysat wurde mit einer [<sup>33</sup>P]-markierten M67-Sonde mit einfacher GAS-Bindestelle für 15 min inkubiert und anschließend auf das Gel geladen und elektrophoretisch getrennt. Die Pfeilspitzen in (A) und (C) markieren die Bande des STAT3-Tetramers, während das seitliche Sternchen eine unspezifische Bande

als Kontrolle kenntlich macht. Es zeigte sich in (B) kein Unterschied in der DNA-Bindefähigkeit zwischen den Punktmutationen im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül. In (C) zeigten sich stärker ausgeprägte Banden in den STAT3-Punktmutationen. Sternchen in (D) zeigen eine signifikante Erhöhung der DNA-Bindefähigkeit der D566A und der D566N nach 15-minütiger Stimulation mit IFN $\gamma$ . Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.



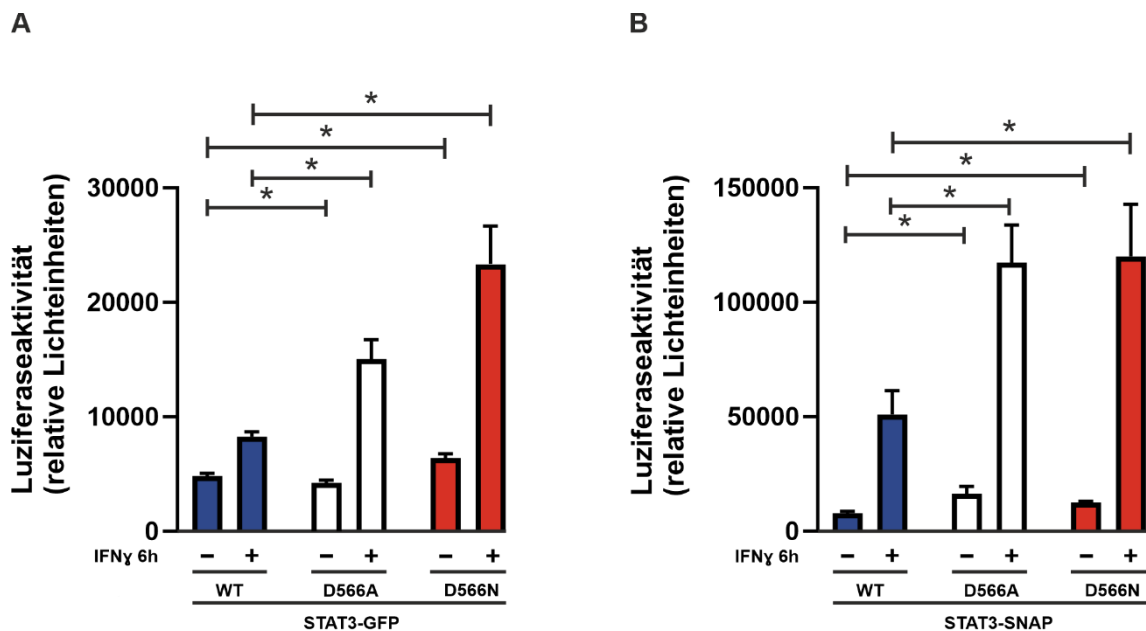
**Abbildung 8: Hinweise auf ein reduziertes DNA-Dissoziationsverhalten der STAT3-Punktmutationen verglichen mit dem WT-Molekül im EMSA-Kompetitionsexperiment.** HeLa-S3-Zellen wurden transient mit den GFP- oder SNAP-Konstrukten, kodierend für STAT3-WT, STAT3-D566A bzw. STAT3-D566N, transfiziert und am Folgetag mit IFN $\gamma$  stimuliert. Das aus diesen Zellen gewonnene Gesamtproteinextrakt wurde mit einer [ $^{33}$ P]-radioaktiv markierten M67-Sonde für 15 min inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

Das Histogramm in (A) zeigt die DNA-Bindung der STAT3-Moleküle unter Wettbewerbsdruck mit einer nicht-radioaktiv markierten M67-Sonde, die im 750-fachen molaren Überschuss dem Proteinextrakt hinzugefügt wurde. Die Pfeilspitzen in (A) und (C) markieren die Bande für das STAT3-Tetramer, das seitliche Sternchen zeigt eine unspezifische Bande als Laufkontrolle an. Das Balkendiagramm in (B) stellt die Quantifizierung der autoradiographisch detektierten Banden graphisch dar. In (D) zeigt sich eine verminderte Dissoziation der STAT3-Mutanten von der DNA im Vergleich zum WT-Molekül. Die Experimente wurden nur einmal durchgeführt.

Die STAT3-Mutanten zeigten eine leicht erhöhte Prolongation der DNA-Bindung im Vergleich zum WT-Molekül nach Stimulation mit IL-6 bzw. IFN $\gamma$  (Abb. 7). Unter Wettbewerbsbedingungen wurde in einem einmalig durchgeführten Experiment eine verminderte DNA-Dissoziation der Mutanten D566A und D566N verglichen mit dem STAT3-WT beobachtet (Abb. 8).

### **3.4 Erhöhte transkriptionelle Aktivität der D566-Mutanten im Luziferase-Reportergen-Assay**

Zur Beurteilung der transkriptionellen Aktivität der STAT3-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp, wurden STAT1-defiziente U3A-Zellen neben den GFP- und SNAP-Plasmiden, kodierend für STAT3-WT, STAT3-D566A bzw. STAT3-D566N, mit einem IFN $\gamma$ -sensitiven, Luziferase-exprimierenden Plasmid transfiziert. Dieses Luziferase-Gen ist in dem Genkonstrukt 3xLy6E enthalten, das zusätzlich drei GAS-Bindestellen in seinem Promotor aufweist. Erfolgt nun eine Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$ , kommt es je nach Aktivität der STAT3-Moleküle zu einer Transkription dieses Luziferase-Gens, indem die STAT3-Moleküle an die entsprechenden GAS-Sequenzen binden. Zur Normierung der Transfektionsrate wurden die Zellen zusätzlich mit einem STAT3-unabhängigen  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmid transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen oder für 6 Stunden mit IFN $\gamma$  stimuliert, die Zellen lysiert, Gesamtproteinextrakte gewonnen und anschließend die Luziferaseaktivität photometrisch bestimmt. Auch die  $\beta$ -Galaktosidase wurde photometrisch quantifiziert und anschließend der Quotient aus beiden Messgrößen gebildet.



**Abbildung 9: Gesteigerte transkriptionelle Aktivität der D566A- und der D566N-Mutante gegenüber dem STAT3-Wildtyp-Molekül im Luziferase-Reportergen-Assay in U3A-Zellen nach 6h Stimulation mit IFN $\gamma$ .** STAT1-defiziente Zellen wurden mit den STAT3-Plasmiden, dem Reportergenkonstrukt 3xLy6E sowie einem konstitutiv exprimierenden  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmid transfiziert und am Folgetag für 6 Stunden mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde in den Gesamtzellextrakten die Menge an lumineszierender Luziferase photometrisch gemessen und mit Hilfe der konstitutiv koexprimierten  $\beta$ -Galaktosidase normiert (A). Dieses Experiment wurde sowohl mit den GFP-Addukten als auch mit den SNAP-Fusionsproteinen durchgeführt. Sternchen zeigen in drei unabhängigen Versuchen eine signifikant erhöhte zytokininduzierte Luziferase-Aktivität der STAT3-Punktmutationen im Vergleich zum WT, sowohl in Ruhe als auch nach Stimulation an (B). Die Histogramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Der Abb. 9 ist zu entnehmen, dass sowohl die D566A- als auch die D566N-Mutante eine signifikant höhere Reportergenaktivität aufwiesen als das WT-Molekül. Während die Steigerung in ruhenden Zellen diskret ausfiel, war sie nach Stimulation mit IFN $\gamma$  ausgeprägt.

### 3.5 Erhöhte Geninduktion der STAT3-Mutanten im Vergleich zum WT-Molekül in der Real-time PCR

Um eine direkte Geninduktion bestimmter Gene nachweisen zu können, fand die Transfektion der U3A-Zellen in nährstoffarmem Hungermedium (DMEM mit 1% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) statt. Transfiziert wurden die Zellen mit den Plasmiden der GFP- oder SNAP-Konstrukte für den WT, D566A bzw. D566N. Am nächsten Tag erfolgte eine Stimulation mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) für 3 Stunden, in denen die Zellen STAT3-induzierte RNA-Abschriften von STAT3-Zielgenen synthetisierten. Diese RNA wurde aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA mit Hilfe der RT-PCR



auf bestimmte STAT3-induzierte Gene hin untersucht, deren Rolle aus verschiedenen physiologischen und pathogenen Zellprozessen bekannt ist. Dafür wurden in den RT-PCR-Ansätzen Primer der Gene *hSOCS3* F und R, *hJmB* F und R, *hMCP1* F und R und *hGAPDH* F und R verwendet. Als konstitutiv koexprimiertes Gen diente das *hGAPDH*-Gen hierbei der Normierung der anderen untersuchten Gene sowie der Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion. Das Genexpressionsmuster wurde unter Verwendung der Software SigmaPlot und Microsoft Office-Excel ausgewertet und analysiert.

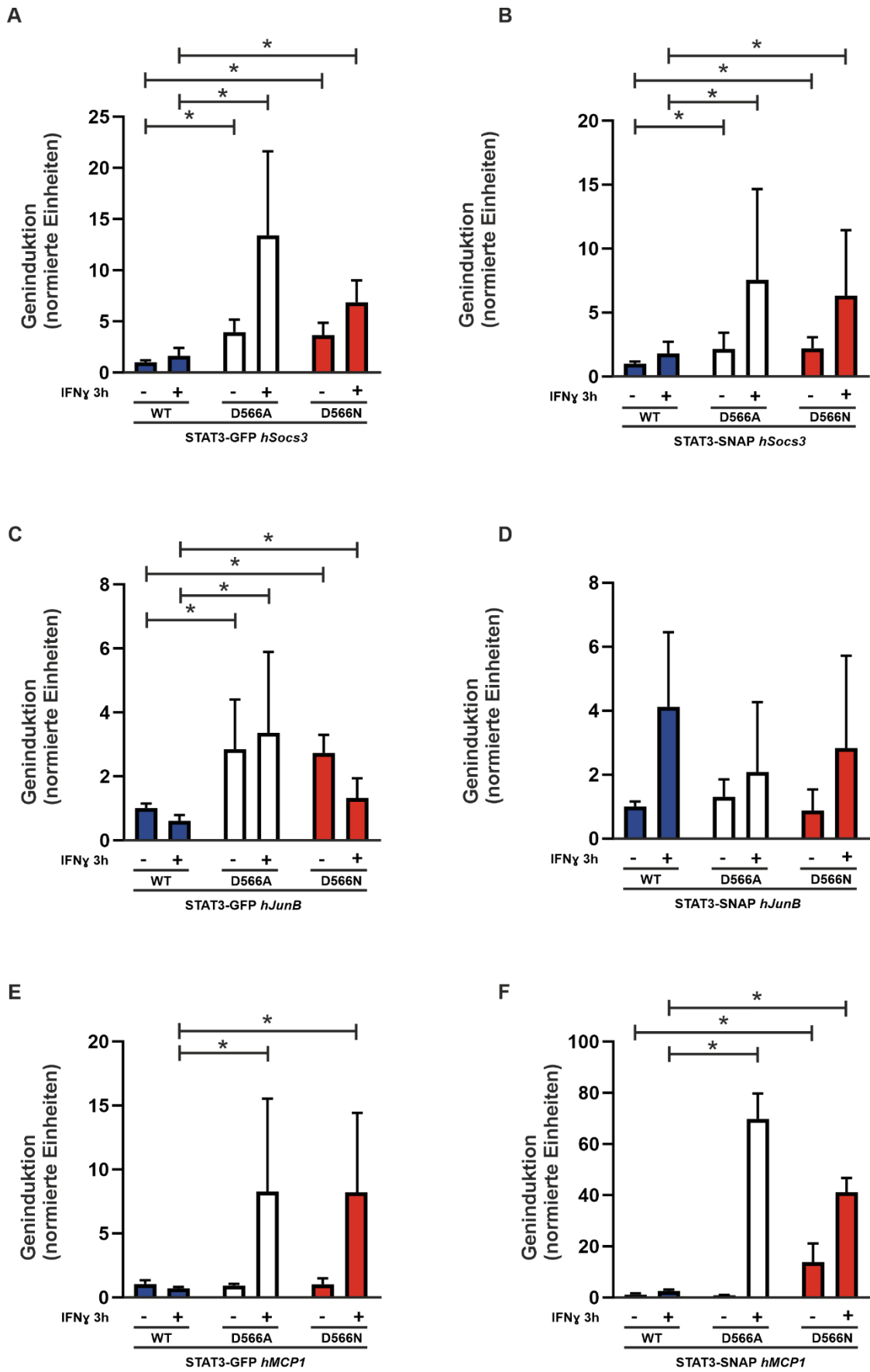


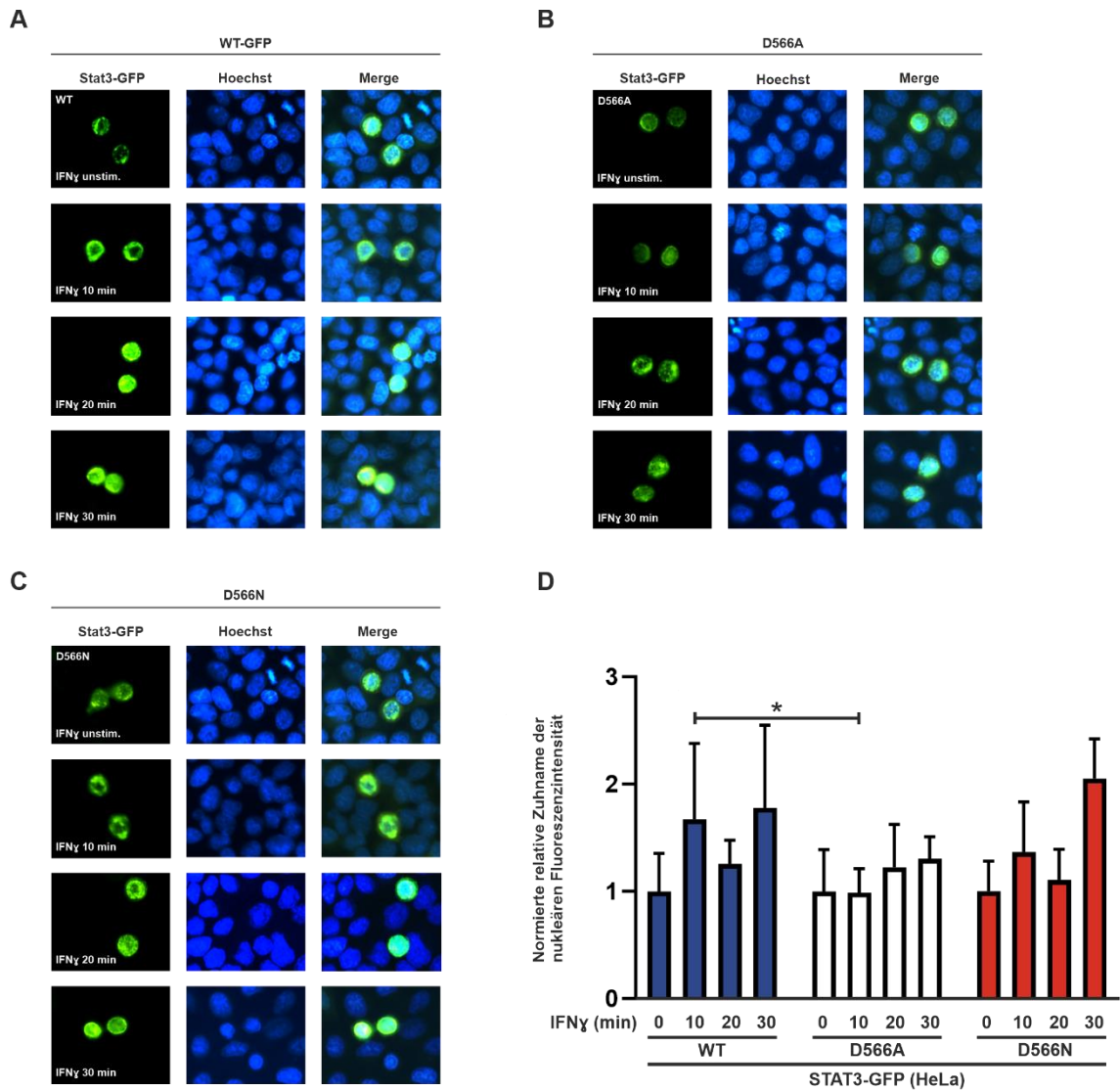
Abbildung 10: Erhöhte Genexpression der STAT3-Punktmutationen D566A und D566N bezüglich der untersuchten Gene *hSocs3*, *hJunB* und *hMCP1* verglichen mit dem STAT3-Wildtyp in U3A-Zellen

**nach 3h IFN $\gamma$ -Stimulation.** Das Genexpressionsmuster STAT1-defizienter U3A-Zellen wurde nach 3-stündiger Stimulation mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) mit Hilfe eines RT-PCR-Assays untersucht. Für das Zielgen *bSocs3* zeigte sich eine erhöhte Genexpression der STAT3-Mutanten im Vergleich zum STAT3-WT (A). Sternchen markieren die signifikanten Unterschiede (A–C, E, F). Für das STAT3-induzierte Gen *bJmB* ergibt sich eine differenzielle Betrachtung. So konnte in den GFP-Addukten eine Erhöhung der Geninduktion beobachtet werden (C), während dies bei den SNAP-Fusionsproteinen nicht der Fall war (D). Sternchen markieren in (E) eine erhöhte Genexpression von *bMCP1* bei den Punktmutationen D566A und D566N nach Stimulation. Eine ebenfalls erhöhte Geninduktion von *bMCP1* zeigte sich nach Auswertung dreier voneinander unabhängiger Transfektionsansätze in (F). Bei allen Experimenten diente *bGAPDH* als Haushalts- bzw. Referenzgen.

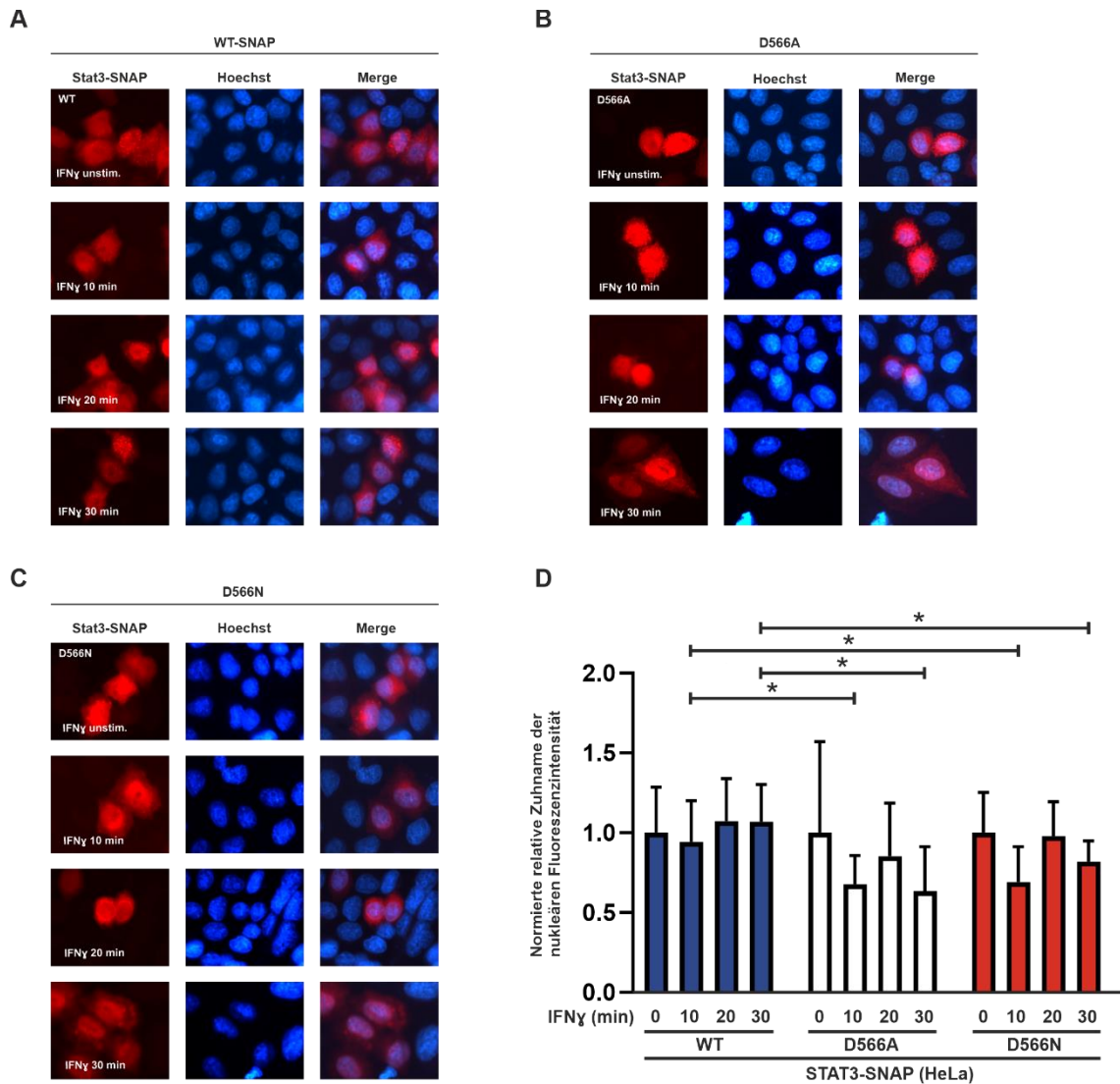
Abb. 10 stellt die Ergebnisse der RT-PCR graphisch dar, mit deren Hilfe verschiedene Genexpressionsmuster des STAT3-WT und der Punktmutationen untersucht wurden. Es ergab sich eine differenzielle Geninduktion, wobei sich in den meisten Konditionen eine erhöhte Genexpression der STAT3-Mutationen gegenüber dem WT-Molekül zeigte.

### **3.6 Kein Unterschied im nukleären Akkumulationsverhalten der STAT3-Punktmutationen im Vergleich zum WT-Molekül**

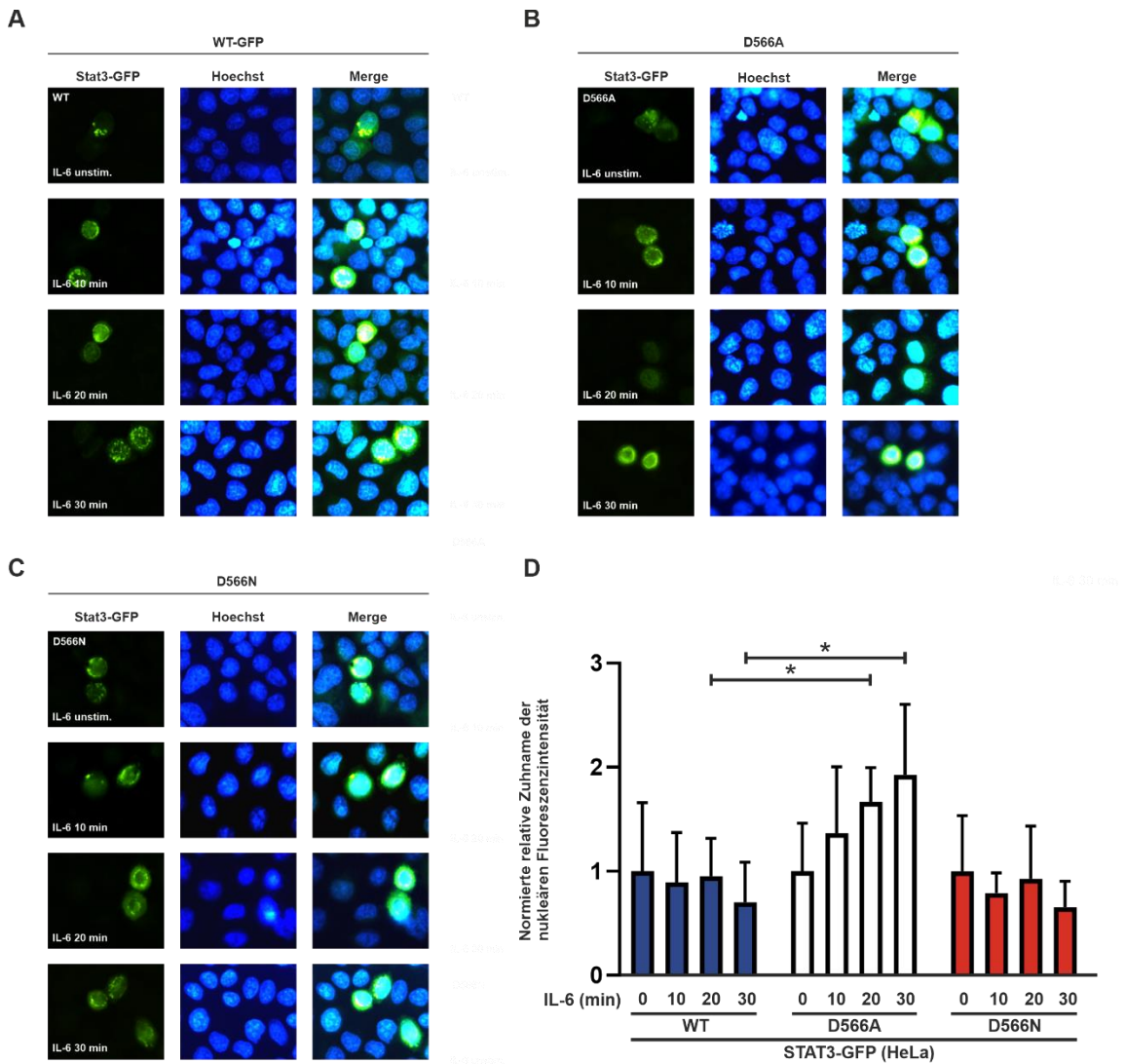
Mittels direkter Fluoreszenzanalyse war es möglich, die zytokininduzierte Kinetik der nukleären Akkumulation sowie die subzelluläre Verteilung zwischen Zytoplasma und Nukleus in HeLa-S3- und U3A-Zellen zu analysieren. Beide Zelllinien wurden mit den jeweiligen STAT3-Konstrukten, entweder GFP- oder SNAP-Plasmiden, auf 8-Kammer-Objektträgern transfiziert und am nächsten Tag entweder unstimuliert belassen oder für 15 bzw. 30 min mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) oder IL-6 (50 ng/ml) behandelt. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Mounting-Medium abgedeckt. Anschließend ermöglichte eine vorgenommene Hoechst-Färbung die mikroskopische Visualisierung unter einem Fluoreszenzmikroskop.



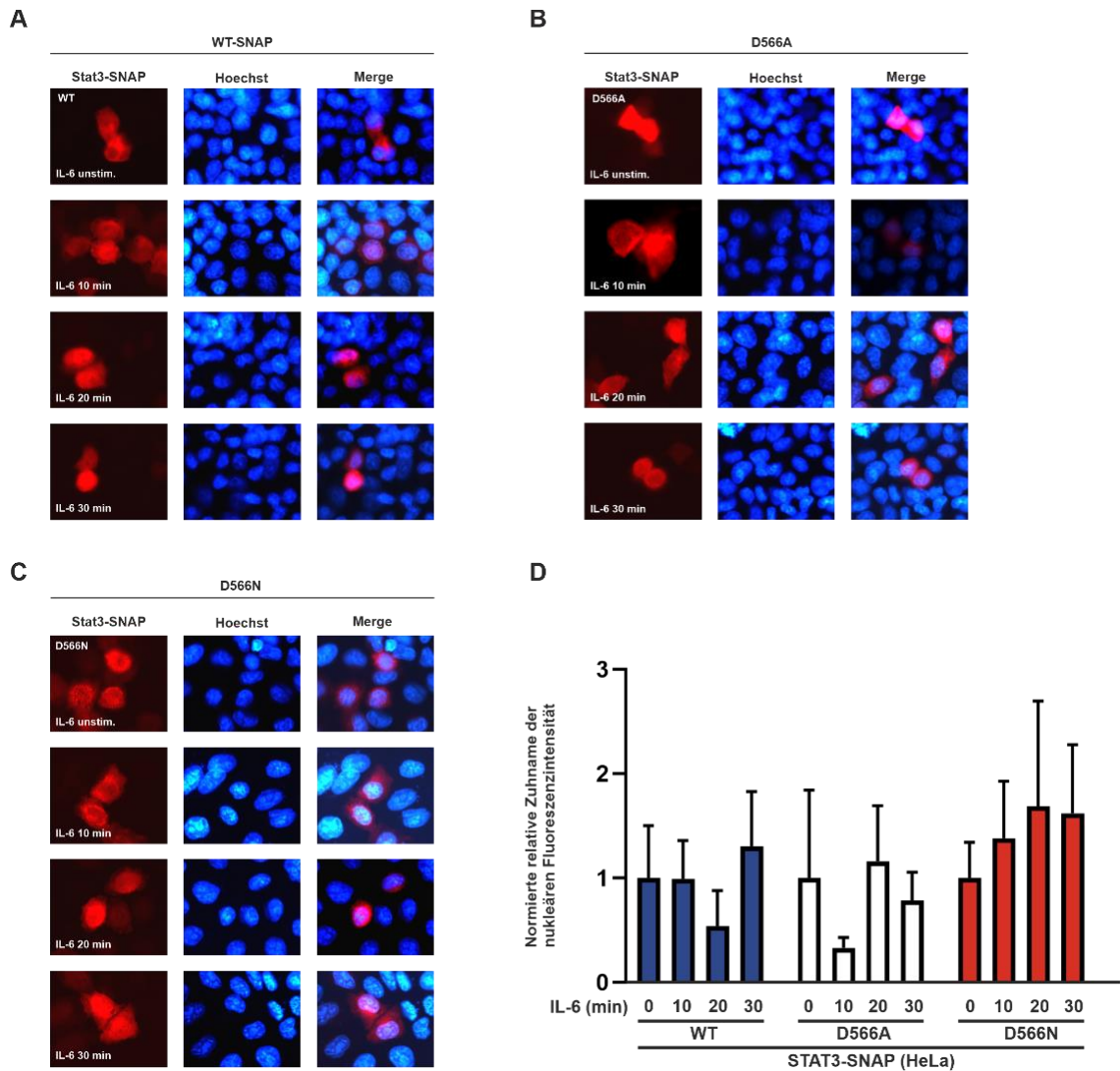
**Abbildung 11: Keine Veränderung der nukleozytoplasmatischen Verteilung von GFP-markierten STAT3-D566-Mutanten im Vergleich zum WT-Molekül nach IFN $\gamma$ -Stimulation in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.** STAT3-GFP exprimierende HeLa-S3-Zellen, die transient mit dem STAT3-WT oder den STAT3-D566-Mutanten transfiziert und am Folgetag nach dem angegebenen Protokoll mit IFN $\gamma$  stimuliert wurden. Es zeigt sich in (A) eine geringe Kernakkumulation von STAT3-WT nach Stimulation. Die Teilabbildung (B) zeigt die Kinetik der intrazellulären Verteilung der GFP-konjugierten Konstrukte nach Stimulation. In der mikroskopischen Fluoreszenzanalyse zeigte sich die Zunahme der Kernakkumulation der D566N-Mutante nach Stimulation mit IFN $\gamma$  (C). In (D) sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Transfektionsansätze graphisch aufbereitet. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zwischen dem WT-Molekül und der D566A-Mutante nach 10-minütiger Stimulation.



**Abbildung 12: Keine nachweisbare Kernakkumulation von STAT3-WT, STAT3-D566A und -D566N nach IFN $\gamma$ -Stimulation in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.** HeLa-S3-Zellen wurden mit SNAP-Fusionsproteinen transient transfiziert und am nächsten Tag mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) für jeweils 0, 10, 20 und 30 min stimuliert. Anschließend wurde die nukleäre Fluoreszenzintensität mikroskopisch gemessen. Es zeigte sich, dass das STAT3-WT-Protein nach IFN $\gamma$ -Stimulation nicht vermehrt im Nukleus akkumuliert (A). Auch die STAT3-D566A-Mutante zeigte keine Kernakkumulation (B). Die Punktmutation STAT3-D566N wies nach Zytokinstimulation ebenfalls keine Zunahme der SNAP-gebundenen STAT3-Proteine im Kern auf (C). Teilabbildung (D) zeigt die graphische Aufbereitung der quantifizierten Daten aus drei unabhängigen Transfektionsansätzen. Es wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen dem WT und den Punktmutationen beobachtet.

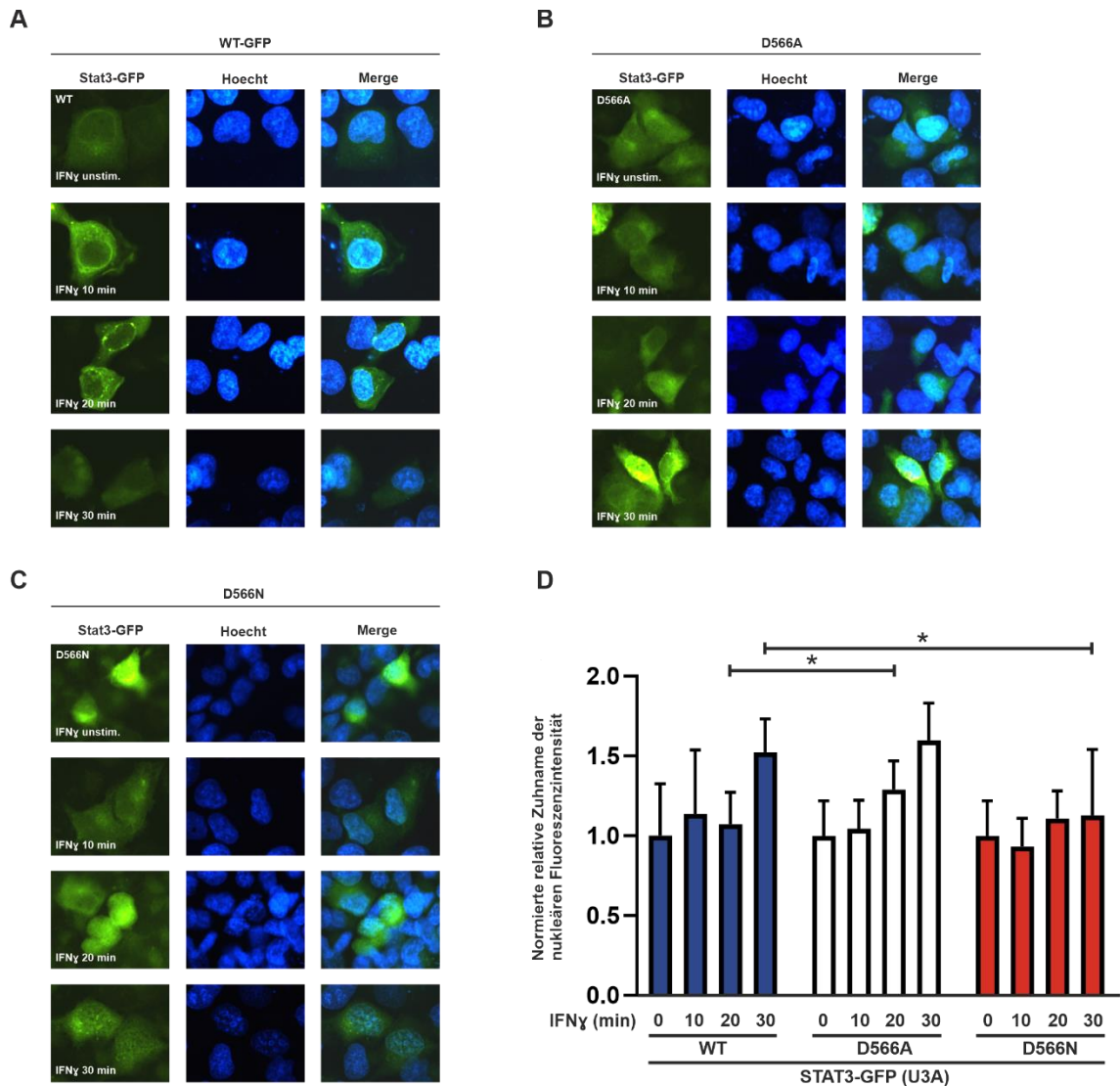


**Abbildung 13: Geringfügig stärker ausgeprägte Kernakkumulation der GFP-Addukte von STAT3-D566A im Vergleich zum STAT3-WT-Molekül nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen.** STAT3-WT-Proteine und STAT3-Mutanten wurden mit dem fluoreszierenden GFP-Molekül in carboxyterminaler Positionierung gekoppelt und in HeLa-S3-Zellen transient transfiziert. Nach Stimulation mit dem Zytokin IL-6 (50 ng/ml) zeigte sich beim STAT3-WT keine messbare Kernakkumulation (A). Die GFP-markierte STAT3-Mutante D566A stellte sich mit einer gering ausgeprägteren Akkumulationskinetik gegenüber dem WT-Molekül dar (B). Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließ sich in (C) keine Zunahme der nukleären Akkumulation der D566N-Punktmutation nachweisen. Das Balkendiagramm in (D) trägt den Beobachtungen aus drei verschiedenen und voneinander unabhängigen Experimenten in quantitativer Weise Rechnung.



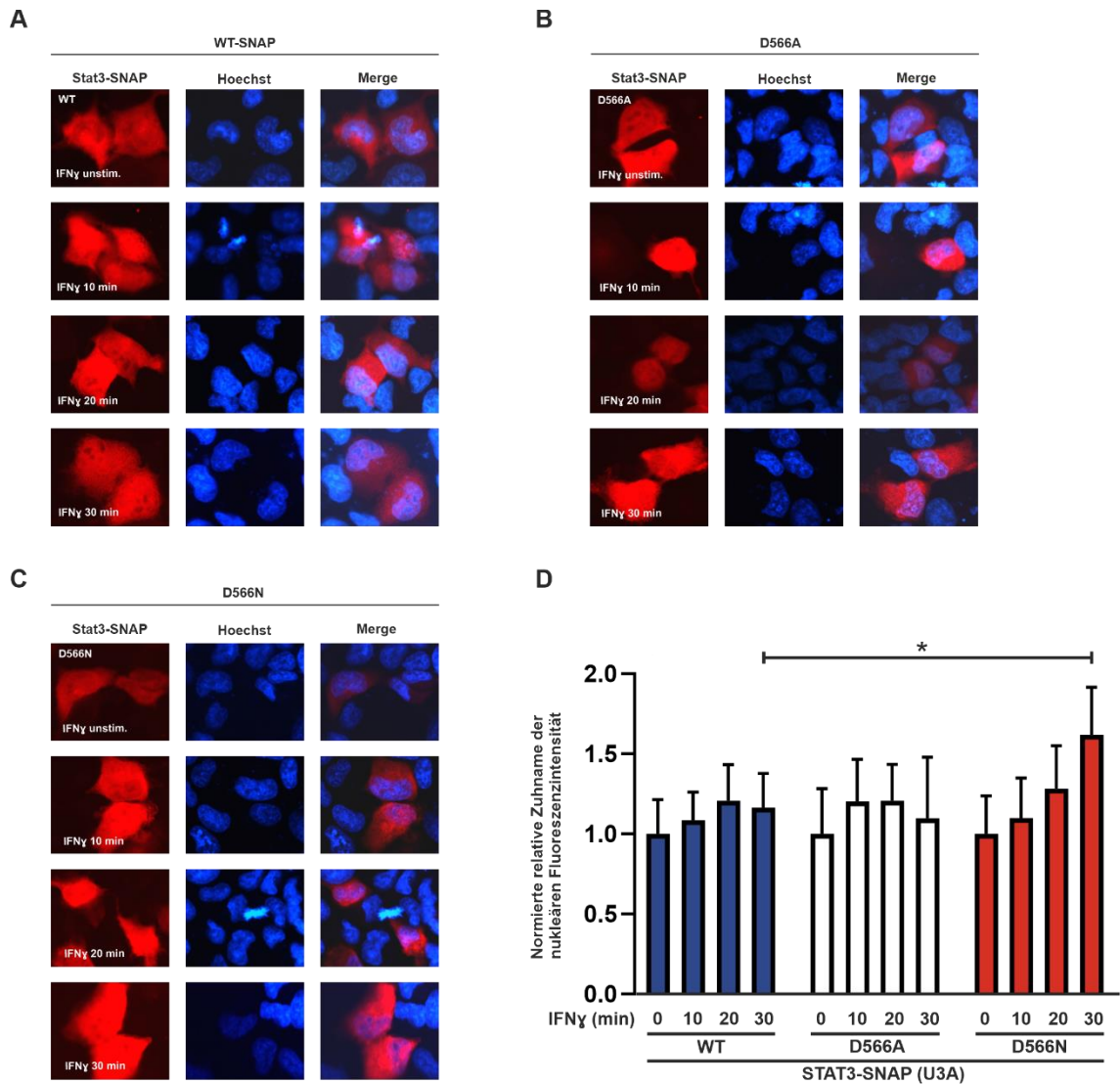
**Abbildung 14: Kein Unterschied der nukleären Akkumulation von STAT3-D566A, STAT3-D566N sowie des STAT3-WT-Moleküls nach IL-6-Stimulation in HeLa-S3-Zellen.** HeLa-S3-Zellen wurden ausplattiert und mit STAT3-Plasmid-DNA, die für den STAT3-WT oder die STAT3-Punktmutationen D566A und D566N kodierte, transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für je 10, 20 oder 30 min mit IL-6 (50 ng/ml) stimuliert. Nach anschließender mikroskopischer Visualisierung zeigte sich in (A) ein auch bei Stimulation unverändertes nukleozytoplasmatisches Verhältnis von STAT3-WT. Auch in (B) konnte durch IL-6-Stimulation keine Zunahme des SNAP-Fusionsproteins STAT3-D566A im Kern gezeigt werden. In Teilabbildung (C) zeigt sich eine geringfügige Akkumulation von STAT3-D566N im Nucleus im Vergleich zur unbehandelten Zelle. Die graphisch aufbereitete Quantifikation bestätigt den fehlenden Unterschied in der nukleären Akkumulation zwischen den Punktmutationen und dem WT-Molekül in drei voneinander unabhängigen Experimenten (D).



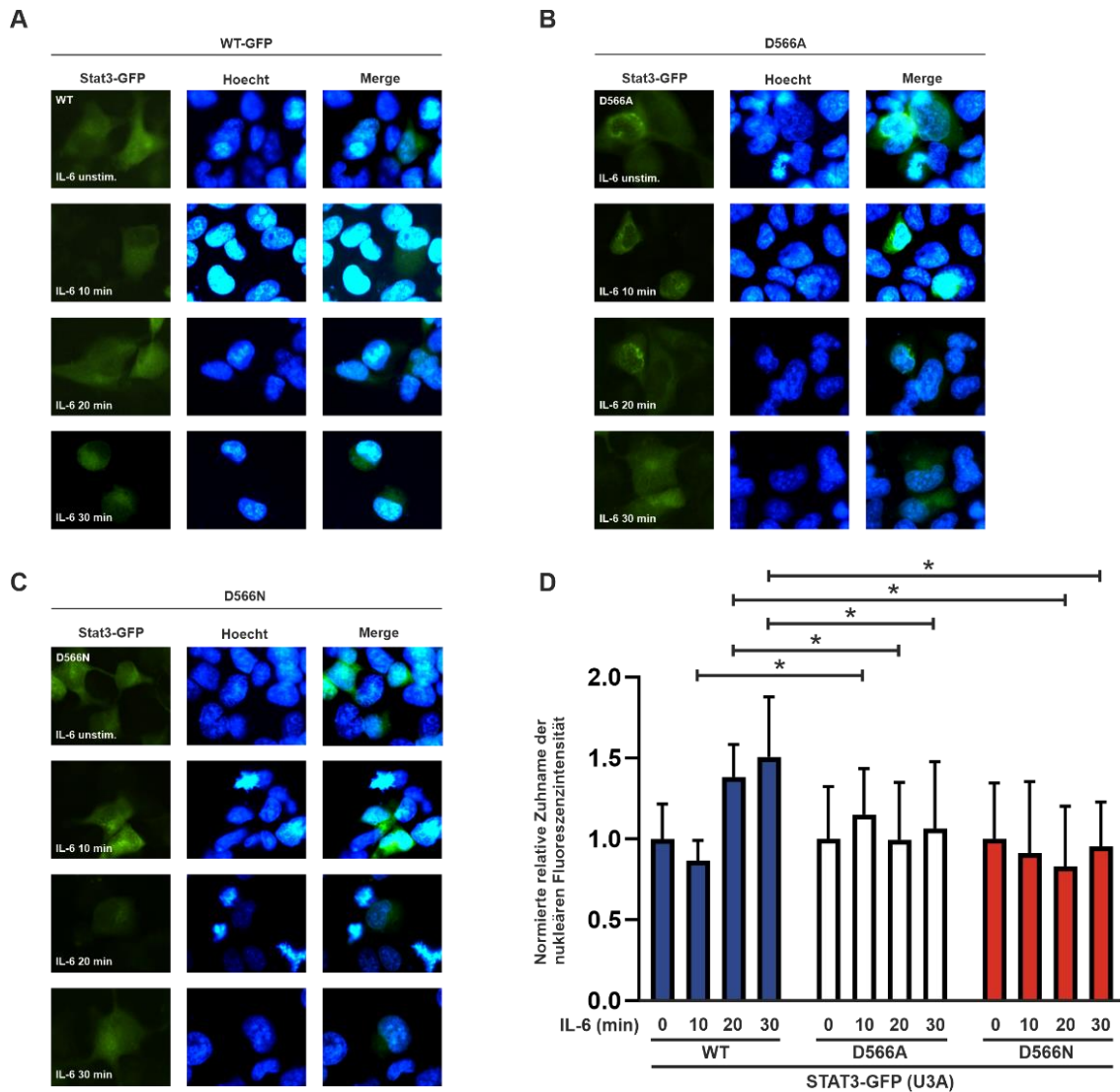


**Abbildung 15: Keine Veränderung der nukleozytoplasmatischen Verteilung von GFP-Addukten der STAT3-Mutanten im Vergleich zum WT-Molekül nach IFN $\gamma$ -Stimulation in transfizierten U3A-Zellen.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden kultiviert, ausplattiert und mit GFP-markierten STAT3-Konstrukten transient transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie gemäß dem Stimulationsprotokoll für 0, 10, 20 und 30 min mit dem Zytokin IFN $\gamma$  (50 ng/ml) stimuliert. Die Verteilung des WT-Moleküls in (A) lässt keine Zunahme der nukleären Akkumulation nach Stimulation erkennen. In (B) zeigt sich eine diskrete Kernakkumulation, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu der anderen STAT3-Mutante und dem WT-Molekül. Das Akkumulationsverhalten der STAT3-Punktmutante D566N in (C) änderte sich nach Stimulation ebenfalls nicht. Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und eine quantitative Auswertung durchgeführt (D).

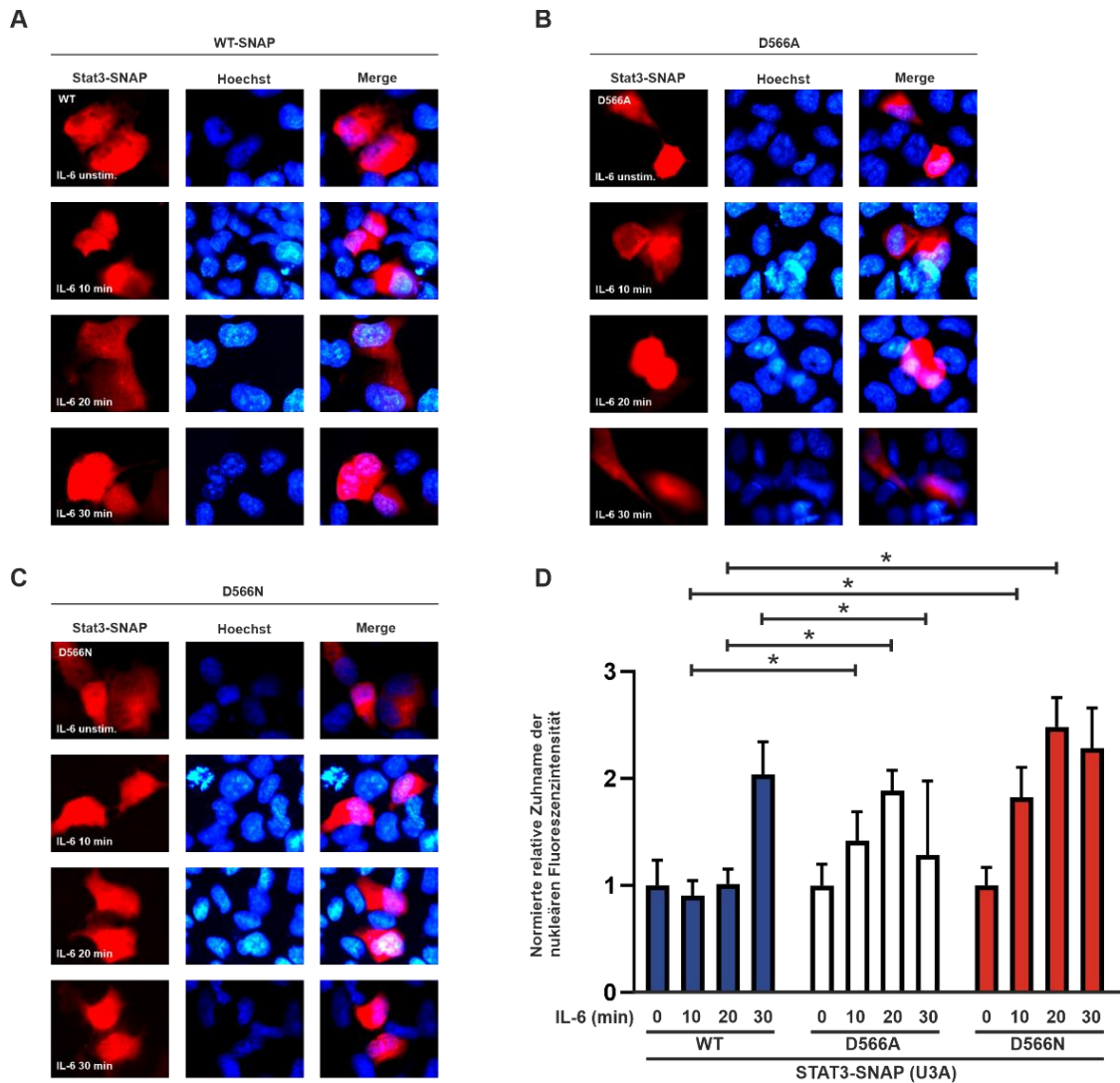




**Abbildung 16: Kein Unterschied im Akkumulationsverhalten von STAT3-D566A, STAT3-D566N und STAT3-WT-Molekül nach IFN $\gamma$ -Stimulation in U3A-Zellen.** SNAP-Fusionsproteine der STAT3-Konstrukte D566A, D566N oder WT wurden in STAT1-defiziente U3A-Zellen transfiziert und am folgenden Tag für 0, 10, 20 und 30 min mit IFN $\gamma$  (50 ng/ml) stimuliert. (A) zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des markierten STAT3-WT-Proteins zu den unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten. Das STAT3-D566N-Konstrukt zeigt in (B) nach Stimulation keine Veränderung in der nukleozytoplasmatischen Verteilung. Die Punktmutation D566N weist in (C) keinen signifikanten Unterschied im Akkumulationsverhalten zum STAT-WT auf. Das Balkendiagramm in (D) veranschaulicht die Quantifikation aus drei verschiedenen Transfektionsansätzen, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden.



**Abbildung 17: Keine nachweisbare Zunahme der Kernakkumulation der STAT3-Mutanten nach IL-6-Stimulation in transient transfizierten U3A-Zellen.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden kultiviert, ausplattiert und mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für die GFP-markierten STAT3-Konstrukte WT, D566A oder D566N kodierte. Am Folgetag wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 10, 20 bzw. 30 min mit dem Zytokin IL-6 (50 ng/ml) stimuliert. (A) zeigt die diskrete zeitabhängige Veränderung der nukleozytoplasmatischen Verteilung des STAT3-WT-Moleküls nach IL-6-Stimulation. Für die STAT3-D566A-Punktmutation konnte in (B) keine Zunahme der Kernakkumulation nachgewiesen werden. Das STAT3-D566N-Molekül ließ keine veränderte nukleäre Verteilung nach Stimulation erkennen (C). Die mikroskopische Beobachtung dreier voneinander unabhängiger Experimente konnte durch die in Teilabbildung (D) in Form eines Balkendiagramms visualisierte Quantifizierung bestätigt werden.



**Abbildung 18: Nukleozytoplasmatische Verteilung von SNAP-markierten STAT3-Mutanten nach IL-6-Stimulation in transient transfizierten U3A-Zellen.** Die für die SNAP-Fusionsproteine kodierende Plasmid-DNA des STAT3-WT oder der Punktmutationen D566A und D566N wurde in STAT1-defiziente U3A-Zellen transfiziert, die zuvor kultiviert und ausplattiert worden waren. Am nächsten Tag wurden diese Zellen für 0, 10, 20 und 30 min mit IL-6 (50 ng/ml) stimuliert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. (A) zeigt eine Zunahme der Kernakkumulation des Wildtyp-Moleküls nach 30-minütiger Stimulation mit IL-6. Das STAT3-D566A-Konstrukt zeigte ebenfalls eine diskrete Zunahme des nukleozytoplasmatischen Verhältnisses nach Stimulation (B). Die Punktmutation D566N in (C) weist ebenfalls eine vermehrte nukleäre Akkumulation nach IL-6-Stimulation auf. Sternchen in (D) markieren signifikante Unterschiede in der Quantifizierung dreier unterschiedlicher Transfektionsansätze.

Mithilfe der fluoreszenzmikroskopischen Messungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Akkumulationsverhalten des STAT3-WT-Moleküls und den beiden Punktmutationen D566A und D566N festgestellt werden. Die unbehandelt belassenen Zellen dienten der Beurteilung der panzellulären Verteilung der jeweiligen STAT3-Konstrukte und als Referenzwerte für die beobachteten Verteilungsmuster nach Stimulation. In den HeLa-S3-Zellen zeigte sich eine diskrete Zunahme des nukleozytoplasmatischen

Verhältnisses nach Stimulation mit dem Zytokin IFN $\gamma$  bzw. IL-6 (Abb. 11–14). Jedoch konnte kein Unterschied in der Zunahme dieses Verhältnisses im Vergleich zum WT ausgemacht werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich in den Experimenten mit STAT1-defizienten U3A-Zellen (Abb. 15–18). In den meisten Fällen kam es nach Stimulation innerhalb der beobachteten Zeit bis 30 min nicht zu einer sichtbaren Kernakkumulation der STAT3-Konstrukte und es ließ sich auch kein wesentlicher Unterschied zwischen dem WT-Molekül und den erzeugten STAT3-Punktmutanten nachweisen. Diese Beobachtung war unabhängig von der Verwendung der Zytokine IFN $\gamma$  bzw. IL-6.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, den Einfluss zweier Punktmutationen in der Linker-Domäne des STAT3-Moleküls bezüglich ihrer Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs nach Stimulation mit den Zytokinen Interleukin-6 und Interferon- $\gamma$  zu beschreiben. Dazu erfolgte die genaue Charakterisierung dieser zwei Punktmutationen im STAT3-Molekül in Bezug auf ihre Phosphorylierungskinetik, die DNA-Bindefähigkeit, ihr Kernakkumulationsverhalten und die Zielgenaktivierung. Für die Experimente wurden zwei verschiedene Zellpopulationen verwendet, zum einen HeLa-S3-Zellen und zum anderen U3A-Zellen. Als Referenzgröße diente in jedem Versuch das STAT3-Wildtyp-Konstrukt. Für die Auswahl der von mir genauer charakterisierten Punktmutationen D566A und D566N spielten mehrere Überlegungen eine Rolle.

Zum einen sind eine Vielzahl von Mutationen in der Linker-Domäne des STAT3-Proteins mit onkogenen oder immunpathologischen Prozessen assoziiert (Holland et al. 2007; Minegishi et al. 2007), weshalb ein großes klinisches Interesse an der Erforschung der pathogenetischen Relevanz dieser Mutanten besteht, da sich hieraus möglicherweise zielgerichtete Therapien ableiten können. So wurde die von mir untersuchte STAT3-Mutante D566A mittels gentechnischer Analysen bei Patienten gefunden, die unter dem Hyper-IgE-Syndrom leiden, während die Punktmutation STAT3-D566N bei einer LGL-Leukämie beschrieben wurde. Zum anderen wurde die funktionelle Bedeutung der Linker-Domäne bereits in Experimenten im STAT1-Molekül deutlich, da Hüntelmann et al. (2014) sowie Yang et al. (2002) gezeigt haben, dass Mutationen in der Linker-Domäne in STAT1 grundsätzlich dazu geeignet sind, die DNA-Bindung des STAT-Proteins zu beeinflussen. Einerseits sind kritische Aminosäuren, z.B. K567, bekannt, deren Mutation infolge einer räumlichen Fehlanordnung des STAT-Moleküls zur DNA zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust der transkriptionellen Aktivität des STAT1-Moleküls führen kann. Andererseits sind bestimmte Aminosäuren, z.B. E559 und E563, für die korrekte Dissoziation des STAT-Moleküls von der DNA verantwortlich.

Aus einer veränderten transkriptionellen Aktivität eines in der LD mutierten STAT1-Moleküls folgt allerdings nicht automatisch eine Auswirkung auf die nukleozytoplasmatische Verteilung der STAT1-Moleküle. So zeigte die STAT1-Doppelmutante KE544-545AA zwar eine verminderte transkriptionelle Aktivität, jedoch ein normales Phosphorylierungsniveau, eine normale nukleäre Akkumulation und eine normale DNA-Bindung (Yang et al. 1999).

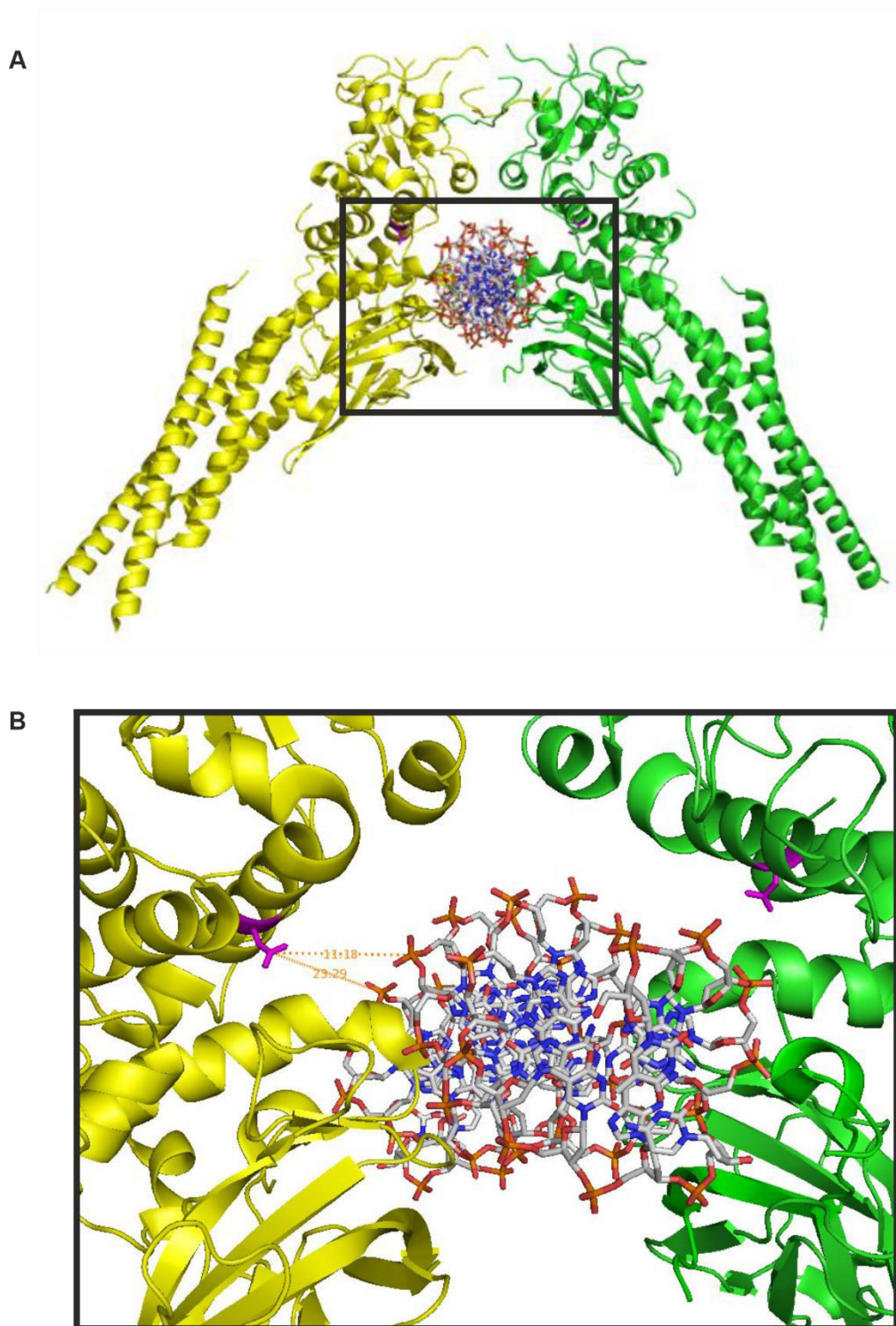
Diese Experimente unterstreichen die Notwendigkeit einer intakten Linker-Domäne für die Funktionsfähigkeit des STAT1-Proteins. Aufgrund der ausgeprägten evolutionären Konservierung funktionell bedeutsamer Bereiche innerhalb der STAT-Familie wird die Linker-Domäne vermutlich auch in den anderen STAT-Proteinen für ihre jeweilige Funktion unverzichtbar sein (Abb. 19).

STAT1	557	W	I	E	S	I	L	E	L	K	K	K
STAT2	556	W	L	D	K	I	L	E	L	V	H	D
STAT3	564	W	L	D	N	I	I	D	L	V	K	K
STAT4	554	W	L	E	A	I	L	D	L	I	K	K
STAT5a	573	W	F	D	G	V	M	E	V	L	K	K
STAT5b	573	W	F	D	G	V	M	E	V	L	K	K
STAT6	517	W	F	D	G	V	L	D	L	T	K	R

**Abbildung 19: Abbildung homologer Aminosäuren in Teilen der Linker-Domäne in allen bekannten humanen STAT-Proteinen.** Alle zu STAT3-D566 homologen Aminosäuren sind rot markiert. In allen STAT-Proteinen bis auf STAT1 und STAT4 ist an dieser Position ebenfalls ein Asparaginsäure-Rest vorhanden. In STAT1 und STAT4 liegt ein Glutamat-Rest vor, der aufgrund seiner gleichfalls negativen Ladung der Asparaginsäure elektrostatisch ähnelt.

Der in der Abb. 19 dargestellte Vergleich homologer Bereiche in allen sieben humanen STAT-Proteinen veranschaulicht, dass es sich bei diesem Bereich der Linker-Domäne um eine evolutionär hoch konservierte Sequenz handelt. Dieses hohe Maß an Konservierung legt eine funktionelle Relevanz für diesen Teil des STAT-Proteins nahe. Dies bestätigt sich in der Beobachtung, dass die STAT1-Mutante KE544-545AA einen Verlust der transkriptionellen Aktivität zeigt (Yang et al. 1999). Nach eingehender Analyse der Kristallstruktur des an einen DNA-Strang gebundenen STAT3-Dimers ist aufgrund der geringen räumlichen Distanz ( $\sim 11 \text{ \AA}$ ) der ausgewählten Mutation an Stelle 566 vom DNA-Doppelstrang von einer Funktion während der DNA-Bindung des STAT3-Dimers auszugehen (Abb. 20).



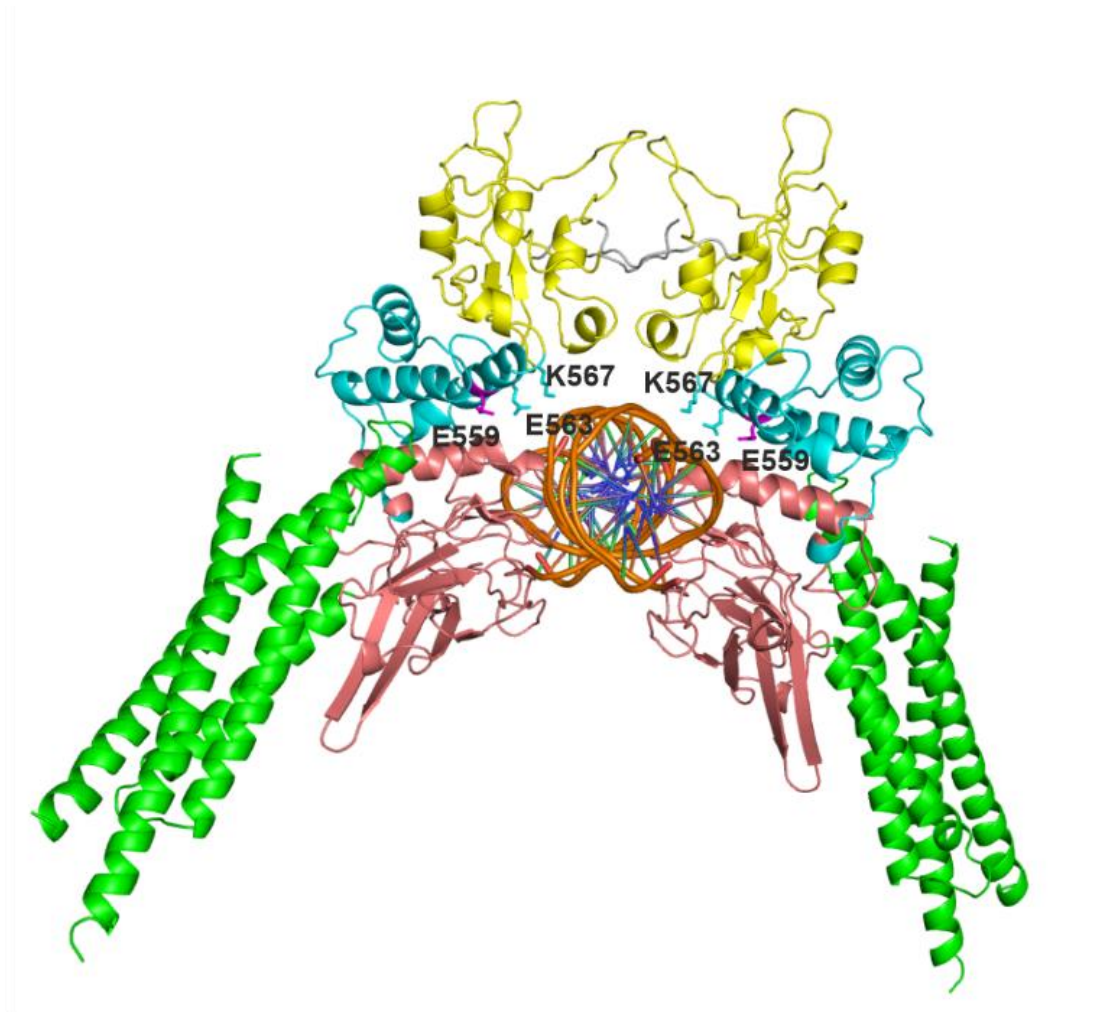


**Abbildung 20: Lokalisation und Orientierung des Aminosäurerests D566 in der Linker-Domäne zur DNA eines an eine GAS-Bindestelle gebundenen STAT3-Dimers.** (A) Die kristallographische Übersichtsdarstellung zeigt die interagierenden Strukturen eines STAT3-Dimers, das über eine GAS-Bindestelle an die DNA-Doppelhelix gebunden ist. In (B) sind die Lokalisation und die räumliche Orientierung zur DNA der hervorgehobenen Asparaginsäure an Position 566 (lila) in Vergrößerung dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die  $\alpha$ -Helix des entsprechenden Abschnitts der Linker-Domäne annähernd parallel zur DNA orientiert ist. Der Abstand der Asparaginsäure zum Rückgrat des DNA-Stanges beträgt ca. 11 Å.

Die zu den in dieser Arbeit untersuchten STAT3-Mutanten homologen Punktmutationen im STAT1-Protein weisen eine phänotypische Veränderung gegenüber dem Wildtyp auf (Hüntelmann et al. 2014). Die von mir charakterisierte STAT3-D566-Mutante befindet sich an homologer Position zu der in der Literatur vorbeschriebenen E559-Mutante im STAT1-Molekül (Abb. 21). Die zu STAT3-D566 homologe Aminosäure Glutamat in STAT1 erwies sich als essenziell für die Dissoziation des STAT1-Moleküls von der DNA. Die Mutation zu Alanin führte nach IFN $\gamma$ -Stimulation zu einer verlängerten nukleären Akkumulation und außerdem zu einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1. Das veränderte biochemische Verhalten wird hauptsächlich mit der Substitution der elektrisch negativ geladenen Glutaminsäure durch das elektrisch neutrale Alanin erklärt, welches infolge der fehlenden elektrischen Abstoßung durch den ebenfalls elektronegativen DNA-Strang möglicherweise länger an diesen gebunden bleibt. In Folge der hohen Konservierung der STAT-Proteine besteht in diesem Teil der Linker-Domäne eine ausgeprägte Homologie im Sequenzvergleich zwischen STAT1 und STAT3 und es wäre ein ähnliches Verhalten dieser in Ladung und Polarität gleichen Aminosäuren, nämlich der STAT3-D566- und der STAT1-E599-Punktmutation zu erwarten gewesen.

Aufgrund dieser in der Literatur beschriebenen Ergebnisse in STAT1 wählten wir genau diese Position in der Linker-Domäne des STAT3-Moleküls aus, da wir hier ebenfalls ein verändertes biochemisches Verhalten vermuteten. Die STAT3-D566A-Mutante zeigte in der Arbeit von Mertens et al. (2015) sowohl eine Hyperphosphorylierung als auch eine erhöhte transkriptionelle Aktivität in Ruhe im Vergleich zum WT, jedoch eine verminderte Transkriptionsrate nach IL-6-Stimulation. Wir entschlossen uns daher, diese Stelle des STAT3-Moleküls in Bezug auf ihre funktionelle Bedeutung eingehend zu charakterisieren. Der Aminosäurerest Asparaginsäure an Position 566 wurde somit ausgewählt und sowohl durch Alanin (D566A) als auch durch Asparagin (D566N) mittels sequenzspezifischer Mutagenese substituiert. Der Aminosäurerest D566 ist Teil einer  $\alpha$ -Helix des STAT3-Moleküls, die annähernd parallel zum gebundenen DNA-Strang verläuft und räumlich in Richtung der DNA orientiert ist (Abb. 20).





**Abbildung 21: Parallele Konformation eines an einem DNA-Doppelstrang gebundenen STAT1-Moleküls.** Kristallographische Darstellung zweier an die axiale DNA gebundener STAT1-Moleküle unter besonderer Hervorhebung der Aminosäuren E559, E563 und K567 (siehe Beschriftung). Die unterschiedlichen STAT-Domänen sind farblich wie folgt markiert: CCD – grün, DBD – rot, LD – türkis, SH2-Domäne – gelb. Die zur untersuchten STAT3-Mutante homologe Aminosäure E559 ist magentafarben hervorgehoben.

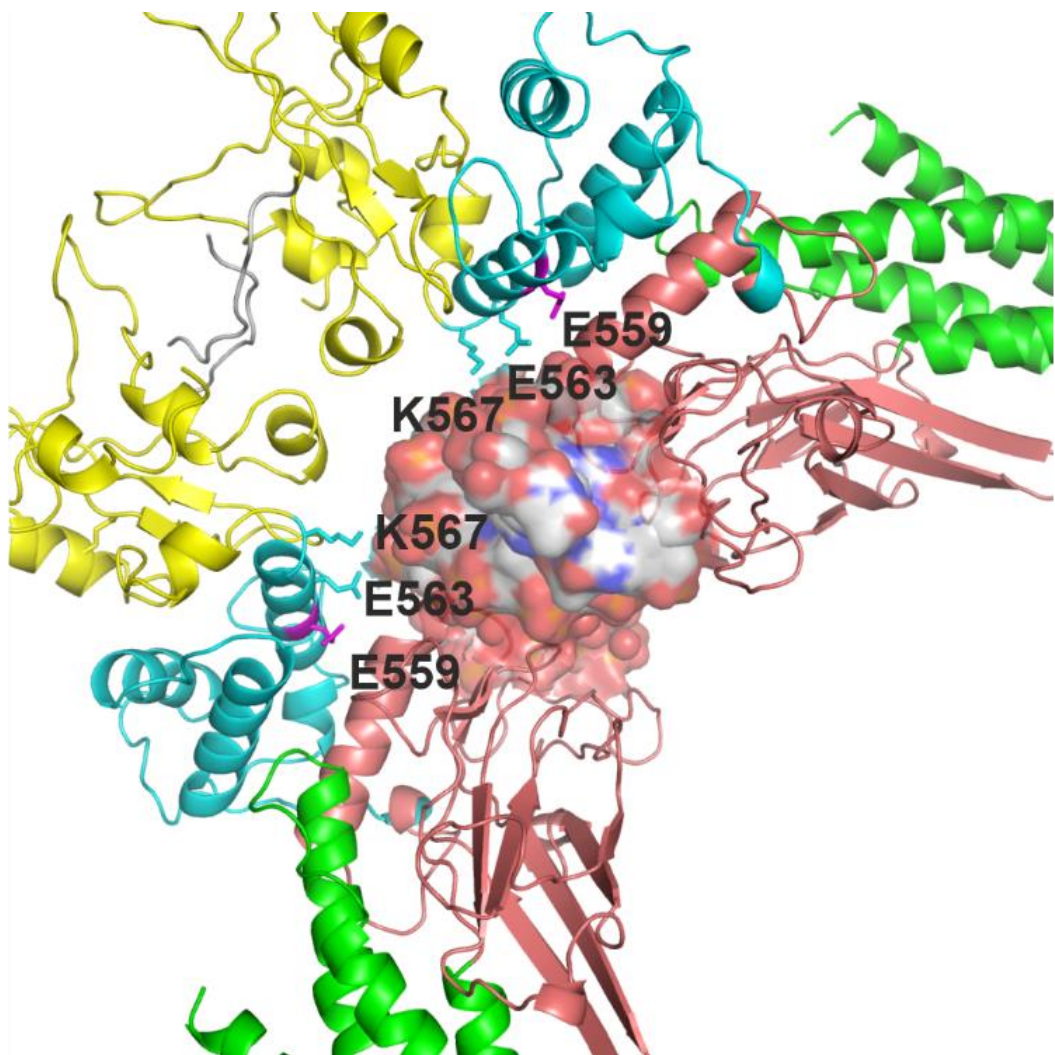
Einen ersten Hinweis auf ein phänotypisch auffälliges Verhalten kann eine möglicherweise vorliegende Hyper- oder Hypophosphorylierung liefern, da die Phosphorylierung des Tyrosin-Rests an Position 705 von STAT3 das Maß des nukleären Imports und damit die Grundvoraussetzung für eine transkriptionelle Aktivität von STAT3 bestimmt. Die beiden Punktmutationen D566A und D566N zeigten in den Western-Blot-Experimenten (Abb. 3–6) zu keiner Kondition eine signifikant gesteigerte Phosphorylierungsrate im Vergleich zum WT-Molekül. Konsistent zu dieser Beobachtung konnte keine veränderte subzelluläre Verteilung in Folge einer gesteigerten Kernakkumulation der STAT3-Mutanten in der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Somit gelang auch kein indirekter Nachweis einer Hyperphosphorylierung (Abb. 11–18).

Im Luziferase-Reportergen-Assay zeigten die beiden Punktmutationen D566A und D566N eine erhöhte transkriptionelle Aktivität nach IFN $\gamma$ -Stimulation (Abb. 9). Um diese Beobachtung zu bestätigen, ermittelten wir die DNA-Affinität der STAT3-Moleküle mit Hilfe eines elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays. Die Summe aller DNA-Bindeaktivität zeigte ein diskret erhöhtes Niveau im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 7). Im Konkurrenzexperiment deutete sich eine verzögerte DNA-Dissoziation der STAT3-Mutanten an (Abb. 8), was ebenfalls auf eine dezent erhöhte DNA-Affinität hinweist, die allerdings mutmaßlich nicht stark genug erhöht ist, um sie im direkten EMSA eindeutig nachzuweisen. Konsistent zur erhöhten Luziferase-Aktivität fiel die IFN $\gamma$ -induzierte Aktivierung der typischen STAT3-Zielgene *bSocs3*, *bJunB* und *bMCP1* etwas verstärkt aus (Abb. 10).

Um die Ergebnisse dieser Experimente einordnen zu können, wurden die Charakteristika der STAT3-Punktmutanten mit ihren homologen Mutationen im STAT1-Protein (E599) und den benachbarten Mutationen in STAT3 (D570) verglichen. Die Vermutung, dass sich die STAT3-Mutanten bezüglich ihrer Phosphorylierungskinetik analog zu der von Hüntelmann et al. (2014) untersuchten homologen STAT1-Mutante E559A verhielten, ließ sich nur zum Teil bestätigen. Die homologe STAT1-Mutante E559A zeigte zwar auch eine differenzielle Erhöhung der Genexpression, jedoch keine verstärkte Aktivität des Luziferase-Enzyms. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen korrespondieren eher mit denen von Mertens et al. (2015), deren STAT3-Mutante D570A sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu meiner Punktmutation befindet und ebenfalls eine normale Phosphorylierungskinetik bei erhöhter Luziferase-Aktivität in Ruhe aufwies. An dieser Stelle unterscheiden sich allerdings sowohl meine Mutationen in Position 566 als auch jene in Position D570, welche zwar eine prolongierte DNA-Bindung und eine vermehrte Genexpression zeigten, jedoch ebenfalls eine normale Luziferase-Aktivität aufwiesen (Jäggle et al. 2020). Jäggle und Koautoren spekulieren darüber, dass diese Mutation eine größere Bandbreite an Genen transkribiert und daher entsprechend seltener das Luziferase-Gen aktiviert.

Aus der Arbeit von Hüntelmann et al. (2014) geht hervor, dass bestimmte Aminosäurereste ihre Funktion dadurch ausüben, dass sie den dimeren Transkriptionsfaktor und den DNA-Doppelstrang in einer bestimmten räumlichen Orientierung zueinander ausrichten bzw. diese Orientierung elektrostatisch begünstigen. Da die LD die räumliche Orientierung der DNA-Bindedomäne zum DNA-Doppelstrang beeinflussen kann, könnte folglich eine Punktmutation in der LD grundsätzlich zu einer veränderten DNA-Affinität des STAT3-

Moleküls führen. Für die von mir beobachtete verstärkte transkriptionelle Aktivität trotz nur gering erhöhter DNA-Bindeaktivität sind verschiedene Mechanismen denkbar. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Punktmutanten bevorzugt tetramere Komplexe anstelle von Dimeren bilden und dass diese tetrameren Komplexe eine höhere Stabilität als der dimere Komplex aufweist und es somit zu einer verlängerten STAT3-induzierten Transkription kommt. Grundsätzlich ist der Mechanismus der GAS-Erkennung noch nicht eindeutig geklärt; es wird sowohl ein „Hit-and-run“-Mechanismus als auch ein „Scanning“ der DNA diskutiert, wobei Hüntelmann et al. (2014) der zweiten Hypothese aufgrund einer guten Vereinbarkeit mit ihren Daten den Vorzug geben. Zur abschließenden Klärung dieser Fragestellung bedarf es noch weiterer, ausführlicherer Experimente.



**Abbildung 22: Kristallographische Darstellung eines STAT1-Dimers, das an einen DNA-Doppelstrang gebunden ist.** Die unterschiedlichen Domänen sind farblich hervorgehoben. Visualisierung der Positionen ausgewählter Aminosäurereste eines an die DNA gebundenen STAT1-Proteins. Die in der Linker-Domäne (türkis) lokalisierten Aminosäurereste an den Positionen 559, 563 und 567 sind in Richtung der DNA-Doppelhelix orientiert. Der Aminosäurerest E559 ist farblich hervorgehoben (magenta) und die geringe Distanz zu den funktionellen Gruppen der Aminosäurereste in den Positionen 563 und 567 wird

ersichtlich. Die verschiedenen STAT-Domänen sind farblich wie folgt markiert: CCD – grün, DBD – rot, LD – türkis, SH2-Domäne – gelb.

Es stellt sich die Frage, wieso sich die STAT3-Mutanten nicht in der gleichen Weise präsentieren, wie es bei den homologen Mutanten in STAT1 der Fall ist. Hier sind verschiedene Erklärungen vorstellbar. Aus den Experimenten von Hüntelmann et al. (2014) ist bekannt, dass der Einfluss verschiedener Aminosäurereste im STAT1-Molekül auf die DNA-Bindung trotz enger räumlicher Nachbarschaft unterschiedlich ausfallen kann. So konnte für die mutierten Aminosäurereste E559 und E563 eine signifikant erhöhte DNA-Bindung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, nicht jedoch für die ganz ähnlich positionierte K567 (Abb. 22). Andere Mutanten in der Linker-Domäne von STAT1, wie etwa die Doppelmutante KE544-545AA von Yang et al. (2002), zeigen hingegen eine verminderte transkriptionelle Aktivität bei normaler Phosphorylierungskinetik und regelrechtem Akkumulationsverhalten. Möglicherweise genügen trotz ausgeprägter Homologie kleinste Unterschiede zwischen dem STAT1- und dem STAT3-Molekül, um nicht identisches biochemisches Verhalten zu induzieren. Außerdem wäre denkbar, dass bei dem Aminosäurerest STAT3-D566 schon geringe Verschiebungen der elektrischen Ladung zu einer vergleichsweise starken Veränderung des Dissoziations-Gleichgewichts von der DNA führt.

Ein zu meinem STAT1-STAT3-Paar ganz ähnliches Bild zeigt sich, wenn man die STAT3-Mutante D570A (Mertens et al. 2015) und ihre homologe Mutation in STAT1, D563A (Hüntelmann et al. 2014), betrachtet. Die STAT3-D570A zeigt eine erhöhte transkriptionelle Aktivität in Ruhe im Vergleich zum WT-Molekül, während die Phosphorylierungskinetik der des WT entspricht. Die dazu homologe Punktmutation STAT1-D563A zeigte hingegen eine Hyperphosphorylierung und eine unveränderte Luziferase-Aktivität verglichen mit dem Wildtyp. Es sieht also danach aus, dass es bestimmte homologe Paare in STAT1 und STAT3 gibt, bei denen sich der gleichartige Austausch von Aminosäuren nicht in einem identischen Verhalten niederschlägt, vor allem in Hinblick auf die transkriptionelle Aktivität. Die Arbeit von Mertens et al. (2015) wirft zudem die Frage auf, ob STAT3-Mutationen in der LD eher in einer Hyperaktivierung oder einer Inhibition von STAT3 münden und welche Rolle dabei die Ruheaktivität des STAT3-Moleküls spielt.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Experimenten deuten darauf hin, dass der Einfluss der Aminosäure D566 zu gering ist, um mit quantitativ wenig sensitiven Methoden wie der Western-Blot-Analyse oder der Fluoreszenzmikroskopie feine Unterschiede *in vivo* erfassen zu können. Dieses ist unter anderem durch die generell im Vergleich zu STAT1 deutlich

geringer ausfallende zelluläre Aktivierung des STAT3-Signalwegs zu erklären. *In vitro* gibt es Hinweise, dass es dezente Unterschiede zwischen dem WT-Molekül und den Punktmutanten gibt. Eine leicht gesteigerte DNA-Bindung ist gut mit der dezent erhöhten Zielgenaktivierung in Einklang zu bringen. Ein Hinweis auf ein unterschiedliches Verhalten zwischen der Asparaginsäure-zu-Alanin- und der Asparaginsäure-zu-Asparagin-Mutation ergab sich trotz der damit einhergehenden unterschiedlichen Ladung und Polarisierung nicht. Da auch bei allen anderen Mitgliedern der STAT-Familie an der jeweiligen homologen Stelle zu STAT3-D566 eine negativ geladene Aminosäure vorhanden ist, wäre es interessant, die Rolle dieser Aminosäure in den verbleibenden STAT-Molekülen zu erforschen. Allerdings könnten in keinem der verschiedenen Mitglieder der STAT-Familie die Unterschiede zwischen den jeweiligen Mutanten und dem Wildtyp-Protein so eindeutig ausfallen wie in STAT1.

Aufgrund der eigenen, hier dargestellten Ergebnisse erscheint eine tragende Rolle der STAT3-D566-Punktmutation in der Entstehung beispielsweise des Hyper-IgE-Syndroms eher unwahrscheinlich, da die Punktmutanten nur geringe Unterschiede in ihren phänotypischen Veränderungen *in vivo* aufweisen. Die von mir untersuchten beiden Punktmutanten zeigten eine regelhafte Phosphorylierung und nur geringe Unterschiede in ihren transkriptionellen Aktivitäten. Zur weiteren Klärung dieser Fragestellung wären zunächst zusätzliche STAT3-Sequenzierungen von Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom notwendig, um weitere potentiell pathogene Mutationen zu identifizieren.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle zweier Missense-Mutationen in Position 566 des humanen Transkriptionsfaktors STAT3 (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription) in Bezug auf die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs nach Zytokinstimulation untersucht. STAT3 ist physiologischerweise unter anderem in die Modulation von Immunantworten sowie der Zellproliferation eingebunden. Mutationen in Mitgliedern der STAT-Familie sind mit diversen pathologischen Prozessen vergesellschaftet, wobei Mutationen im STAT3-Protein insbesondere mit dem Hyper-IgE-Syndrom assoziiert sind. Aufgrund großer struktureller Ähnlichkeiten zwischen dem STAT1- und dem STAT3-Protein wurde bei bereits bekanntem Phänotyp der homologen STAT1-E559A-Punktmutation der Einfluss der Aminosäure Asparaginsäure in Position 566 im STAT3-Molekül auf dessen Phosphorylierungskinetik, Kernakkumulation, DNA-Bindeaffinität und die transkriptionelle Aktivität untersucht. Es wurden mittels sequenzspezifischer Mutagenese die Missense-Mutationen D566A und -D566N in die Linker-Domäne des STAT3-Moleküls eingebracht. Beide Substitutionsmutanten zeigten keine Veränderung bezüglich ihrer Phosphorylierungskinetik und keine prolongierte Kernakkumulation. Ebenso konnte mittels einer radioaktiv markierten, hochaffinen GAS-Sequenz ein weitgehend regelhaftes DNA-Bindevverhalten der STAT3-D566A sowie -D566N beobachtet werden. Allein in der Real-time PCR konnte eine dezent erhöhte Zielgenaktivierung nachgewiesen werden. In Zusammenschau der Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass sowohl STAT3-D566A wie auch STAT3-D566N keine signifikanten phänotypischen Veränderungen gegenüber dem STAT3-Wildtyp aufweisen, was eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Hyper-IgE-Syndroms eher unwahrscheinlich werden lässt.

## 6 Literaturverzeichnis

Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, Asghari F, Salari F, Rahim F (2015): STATs: An old story, yet mesmerizing. *Cell J* 17, 395–411

Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, Modlin RL, Shuai K (2003): PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278, 21327–21330

Barilà G, Teramo A, Calabretto G, Vicenzetto C, Gasparini VR, Pavan L, Leoncin M, Vedovato S, Frigo AC, Facco M, Semenzato G, Zambello R (2020): Stat3 mutations impact on overall survival in large granular lymphocyte leukemia: a single-center experience of 205 patients. *Leukemia* 34, 1116–1124

Becker S, Groner B, Müller CW (1998): Three-dimensional structure of the STAT3 $\beta$  homodimer bound to DNA. *Nature* 394, 145–151

Begitt A, Droscher M, Meyer T, Schmid CD, Baker M, Antunes F, Knobloch KP, Owen MR, Naumann R, Decker T, Vinkemeier U (2014): STAT1-cooperative DNA binding distinguishes type 1 from type 2 interferon signaling. *Nat Immunol* 15, 168–176

Chakraborty A, Twardy DJ (1998): Granulocyte colony-stimulating factor activates a 72-kDa isoform of STAT3 in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 64, 675–680

Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Kuriyan J (1998): Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827–839

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K (1997): Specific inhibition of STAT3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803–1805

Cui W, Liu Y, Weinstein JS, Craft J, Kaech SM (2011): An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD<sup>8+</sup> T cells. *Immunity* 35, 792–805

Cui X, Zhang L, Luo J, Rajasekaran A, Hazra S, Cacalano N, Dubinett SM (2007): Unphosphorylated STAT6 contributes to constitutive cyclooxygenase-2 expression in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* 26, 4253–4260

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 Mendoza A, Sebé-Pedrós A, Šestak MS, Matejčić M, Torruella G, Domazet-Lošo T, Ruiz-Trillo I (2013): Transcription factor evolution in eukaryotes and the assembly of the regulatory toolkit in multicellular lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, E4858–E4866
- Decker T, Kovarik P (2000): Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628–2637
- Dewilde S, Vercelli A, Chiarle R, Poli V (2008): Of alphas and betas: distinct and overlapping functions of STAT3 isoforms. *Front Biosci* 13, 6501–6514
- Domoszlai T, Martincuks A, Fahrenkamp D, Schmitz-Van de Leur H, Küster, Gerhard Müller-Newen (2014): Consequences of the disease-related L78R mutation for dimerization and activity of STAT3. *J Cell Sci* 127, 1899–1910
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiyama S, Yoshimura A (1997): A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921–924
- Fagerlund R, Mélen K, Kinnunen L, Julkunen I (2002): Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin  $\alpha$ 5. *J Biol Chem* 277, 30072–30078
- Flanagan SE, Haapaniemi E, Russell MA, Caswell R, Allen HL, De Franco E, McDonald TJ, Rajala H, Ramelius A, Barton J, Heiskanen K, Heiskanen-Kosma T, Kajosaari M, Murphy NP, Milenkovic T, Seppänen M, Lernmark Å, Mustjoki S, Otonkoski T, Kere J, Morgan NG, Ellard S, Hattersley AT (2014): Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nat Genet* 46, 812–814
- Friedbichler K, Hoelbl A, Li G, Bunting KD, Sexl V, Gouilleux F, Moriggl R (2011): Serine phosphorylation of the STAT5a C-terminus is a driving force for transformation. *Front Biosci* 16, 3043–3056
- Gotthardt D, Putz EM, Straka E, Kudweis P, Biaggio M, Poli V, Stöbl B, Müller M, Sexl V (2014): Loss of STAT3 in murine NK cells enhances NK cell-dependent tumor surveillance. *Blood* 124, 2370–2379
- Haapaniemi EM, Kaustio M, Rajala HL, van Adrichem AJ, Kainulainen L, Glumoff V, Doffinger R, Kuusanmäki H, Heiskanen-Kosma T, Trotta L, Chiang S, Kulmala P, Eldfors



- S, Katainen R, Siitonen S, Karjalainen-Lindsberg ML, Kovanen PE, Otonkoski T, Porkka K, Heiskanen K, Hänninen A, Bryceson YT, Uusitalo-Seppälä R, Saarela J, Seppänen M, Mustjoki S, Kere J (2015): Autoimmunity, hypogammaglobulinemia, lymphoproliferation, and mycobacterial disease in patients with activating mutations in STAT3. *Blood* 125, 639–648
- Hevehan DL, Miller WM, Papoutsakis ET (2002): Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood* 99, 1627–1637
- Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schäffer AA, Puck JM, Grimbacher B. (2007): STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 357, 1608–1619
- Horvath CM, Wen Z, Darnell JE (1995): A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9, 984–994
- Hu X, Ivashkiv LB (2009): Cross-regulation of signaling pathways by interferon- $\gamma$ : Implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* 31, 539–550
- 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
- Jäggle S, Heeg M, Grün S, Rensing-Ehl A, Maccari ME, Klemann C, Jones N, Lehmborg K, Bettoni C, Warnatz K, Grimbacher B, Biebl A, Schauer U, Hague R, Neth O, Mauracher A, Pachlopnik Schmid J, Fabre A, Kostyuchenko L, Führer M, Lorenz MR, Schwarz K, Rohr J, Ehl S (2020): Distinct molecular response patterns of activating STAT3 mutations associate with penetrance of lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Immunol* 210, 108316
- Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, Koskela H, Leblanc F, Peng Ng K, Olson T, Przychodzen B, Afable M, Gomez-Segui I, Guinta K, Durkin L, Hsi ED, McGraw K, Zhang D, Wlodarski MW, Porkka K, Sekeres MA, List A, Mustjoki S, Loughran TP, Maciejewski JP (2012): STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 120, 3048–3057

- Kane A, Deenick EK, Ma CS, Cook MC, Uzel G, Tangye SG (2014): STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr Opin Immunol* 28, 49–57
- Kershaw NJ, Murphy JM, Liao NP, Varghese LN, Laktyushin A, Whitlock EL, Lucet IS, Nicola NA, Babon JJ (2013): SOCS3 binds specific receptor/JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20, 469–476
- 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 tyrosinephosphorylated 91-kDa protein binds. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6806–6810
- Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, van Adrichem AJ, Kuusanmäki H, Andersson EI, Lagström S, Clemente MJ, Olson T, Jalkanen SE, Majumder MM, Almusa H, Edgren H, Lepistö M, Mattila P, Guinta K, Koistinen P, Kuittinen T, Penttinen K, Parsons A, Knowles J, Saarela J, Wennerberg K, Kallioniemi O, Porkka K, Loughran TP Jr, Heckman CA, Maciejewski JP, Mustjoki S (2012): Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 366, 1905–1913
- Kovarik P, Stoiber D, Novy M, Decker T (1998): STAT1 combines signals derived from IFN- $\gamma$  and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J* 17, 3660–3668
- Kovarik P, Mangold M, Ramsauer K, Heidari H, Steinborn R, Zotter A, Levy DE, Müller M, Decker T (2001): Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *EMBO J* 20, 91–100
- Lehtonen A, Matikainen S, Julkunen I (1997): Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *J Immunol* 159, 794–803
- Levy DE, Darnell JE (2002): STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651–662
- Linossi EM, Babon JJ, Hilton DJ, Nicholson SE (2013): Suppression of cytokine signaling: The SOCS perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 24, 241–248
- Linossi EM, Nicholson SE (2015): Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: Resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunol Rev* 266, 123–133
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K (1998): Inhibition of STAT1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10626–10631

- Liu L, McBride KM, Reich NC (2005): STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- $\alpha$ 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 8150–8155
- 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
- Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A (1997): CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89, 3148–3154
- 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
- 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
- Mertens C, Haripal B, Klinge S, Darnell JE (2015): Mutations in the linker domain affect phospho-STAT3 function and suggest targets for interrupting STAT3 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 14811–14816
- Meyer T, Vinkemeier U (2007): STAT nuclear translocation: Potential for pharmacological intervention. *Expert Opin Ther Targets* 11, 1355–1365
- Meyer T, Begitt A, Lödige I, van Rossum M, Vinkemeier U (2002a): Constitutive and IFN- $\gamma$ -induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J* 21, 344–354
- Meyer T, Gavenis K, Vinkemeier U (2002b): Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res* 272, 45–55
- Meyer T, Marg A, Lemke P, Wiesner B, Vinkemeier U (2003): DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev* 17, 1992–2005
- Meyer T, Hendry L, Begitt A, John S, Vinkemeier U (2004): A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of STAT transcription factors. *J Cell Biol* 279, 18998–19007

- Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K, Schindler U (1996): Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of STAT6. *Mol Cell Biol* 16, 5811–5820
- Milner JD, Vogel TP, Forbes L, Ma CA, Stray-Pedersen A, Niemela JE, Lyons JJ, Engelhardt KR, Zhang Y, Topcagic N, Roberson ED, Matthews H, Verbsky JW, Dasu T, Vargas-Hernandez A, Varghese N, McClain KL, Karam LB, Nahmod K, Makedonas G, Mace EM, Sorte HS, Perminow G, Rao VK, O'Connell MP, Price S, Su HC, Butrick M, McElwee J, Hughes JD, Willet J, Swan D, Xu Y, Santibanez-Koref M, Slowik V, Dinwiddie DL, Ciaccio CE, Saunders CJ, Septer S, Kingsmore SF, White AJ, Cant AJ, Hambleton S, Cooper MA (2015): Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood* 125, 591–599
- Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H (2007): Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 448, 1058–1062
- Mogensen TH (2013): STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: Clinical presentation, genetic origin, pathogenesis, novel findings and remaining uncertainties. *JAKSTAT* 2, e23435
- Morinobu A, Gadina M, Strober W, Visconti R, Fornace A, Montagna C, Feldman GM, Nishikomori R, O'Shea JJ (2002): STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN- $\gamma$  production but not for cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12281–12286
- Nast R, Staab J, Meyer T (2019): Gene Activation by the Cytokine-Driven Transcription Factor STAT1. *Gene Regulation*, IntechOpen, <https://doi.org/10.5772/intechopen.82699>
- Ng IHW, Ng DCH, Jans DA, Bogoyevitch MA (2012): Selective STAT3- $\alpha$  or - $\beta$  expression reveals spliceform-specific phosphorylation kinetics, nuclear retention and distinct gene expression outcomes. *Biochem J* 447, 125–136
- Pfeffer SR, Fan M, Du Z, Yang CH, Pfeffer LM (2017): Unphosphorylated STAT3 regulates the antiproliferative, antiviral, and gene-inducing actions of type I interferons. *Biochem Biophys Res Commun* 490, 739–745
- 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, 119–124
- Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE (1992): Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 257, 809–813

- Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Darnell JE, Stein RB, Rosen J (1995): Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3041–3045
- Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M (2017): The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal* 15, 23
- Sekimoto T, Nakajima K, Tachibana T, Hirano T, Yoneda Y (1996): Interferon- $\gamma$ -dependent nuclear import of STAT1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem* 271, 31017–31020
- 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
- Shao H, Quintero AJ, Tweardy DJ (2001): Identification and characterization of cis elements in the STAT3 gene regulating STAT3  $\alpha$  and STAT3  $\beta$  messenger RNA splicing. *Blood* 98, 3853–3856
- Shuai K (2006): Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* 16, 196–202
- Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE (1992): Activation of transcription by IFN- $\gamma$ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258, 1808–1812
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE (1994): Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821–828
- Staab J, Herrmann-Lingen C, Meyer T (2013): A rapid conformational rearrangement of STAT1 dimers is required for termination rather than for amplification of interferon- $\gamma$  signaling. *JAKSTAT* 2, e23576
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S (1999): Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39–49
- Tangye SG, Cook MC, Fulcher DA (2009): Insights into the role of STAT3 in human lymphocyte differentiation as revealed by the hyper-IgE syndrome. *J Immunol* 182, 21–28

- Testoni B, Völlenklee C, Guerrieri F, Gerbal-Chaloin S, Blandino G, Levrero M (2011): Chromatin dynamics of gene activation and repression in response to interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) reveal new roles for phosphorylated and unphosphorylated forms of the transcription factor STAT2. *J Biol Chem* 286, 20217–20227
- Varinou L, Ramsauer K, Karaghiosoff M, Kolbe T, Pfeffer K, Müller M, Decker T (2003): Phosphorylation of the STAT1 transactivation domain is required for full-fledged IFN- $\gamma$ -dependent innate immunity. *Immunity* 19, 793–802
- Verdier F, Chrétien S, Muller O, Varlet P, Yoshimura A, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P (1998): Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated CIS protein. *J Biol Chem* 273, 28185–28190
- 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 NH<sub>2</sub>-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 15, 5616–5626
- Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Kuriyan J (1998): Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT4. *Science* 279, 1048–1052
- Visconti R, Gadina M, Chiariello M, Chen EH, Stancato LF, Gutkind JS, O’Shea JJ (2000): Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* 96, 1844–1852
- Vogel TP, Milner JD, Cooper MA (2015): The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *J Clin Immunol* 35, 615–623
- Wang Y, Levy DE (2012): Comparative evolutionary genomics of the STAT family of transcription factors. *JAKSTAT* 1, 23–33
- 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
- Xu X, Sun YL, Hoey T (1996): Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, 794–797

- 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 Jr (2002): Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J Biol Chem* 277, 13455–62
- Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR (2007): Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev* 21, 1396–1408
- Yang J, Stark GR (2008): Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 18, 443–451
- Yu H, Pardoll D, Jove R (2009): STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9, 798–809
- Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R (2014): Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer* 14, 736–746
- Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE (1996): Two contact regions between STAT1 and CBP/p300 in interferon- $\gamma$  signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 15092–15096
- Zhang X, Darnell JE (2001): Functional importance of STAT3 tetramerization in activation of the  $\alpha_2$ -macroglobulin gene. *J Biol Chem* 276, 33576–33581
- Zhong M, Henriksen MA, Takeuchi K, Schaefer O, Liu B, ten Hoeve J, Ren Z, Mao X, Chen X, Shuai K, Darnell JE Jr (2005): Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 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

An dieser Stelle möchte ich mich für die tollen Erfahrungen, die ich während meiner Arbeit im Labor für Molekulare Psychokardiologie sammeln konnte, bedanken. Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. mult. Thomas Meyer für die durchgängig hervorragende Unterstützung sowie Hilfe mit Rat und Tat bedanken. Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Susanne Lutz für die Zweitbetreuung dieser Arbeit. Ich habe viel Neues lernen und erfahren können und bin für die tatkräftige Unterstützung im Labor von Anke Gregus, Julia Staab, Sana Muntaz und Priyanka Menon sehr dankbar. Dank ihnen war diese Arbeit stets von guter Laune geprägt.

Für das Lektorat meiner Dissertation möchte ich mich bei meiner Mutter, Susanne Bohne, bedanken, die jedem grammatischen Fehler auf die Schliche gekommen ist.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Lena Behrendsen. Durch ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation hat sie zu dieser Arbeit in ganz außergewöhnlicher Weise beigetragen und nicht nur während dieser Zeit mein Leben tagtäglich bereichert.