

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

---

**Charakterisierung der Punktmutante E449A in der DNA-Bindedomäne  
des humanen Transkriptionsfaktors STAT1**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Jannis Christian Schiffmann  
aus  
Göttingen

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent/in Prof. Dr. mult. T. Meyer

Ko-Referent/in: Prof. Dr. S. Lutz

Drittreferent/in: .....

Datum der mündlichen Prüfung: 23.06.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Charakterisierung der Punktmutante E449A in der DNA-Bindedomäne des humanen Transkriptionsfaktors STAT1" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den ..... ..

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Material .....</b>	<b>13</b>
2.1 Humane Zelllinien.....	13
2.2 Chemikalien.....	13
2.3 Radiochemikalien .....	15
2.4 Puffer, Lösungen und Medien.....	15
2.5 Antikörper .....	15
2.6 Reaktionskits .....	16
2.7 Enzyme und deren Inhibitoren.....	17
2.8 Zytokine.....	17
2.9 Plasmide.....	17
2.10 Oligonukleotide .....	18
2.11 Bakterienstämme und Medien.....	20
2.12 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
<b>3 Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.1 Zellkulturmethoden .....	22
3.1.1 Kultivierung von Säugerzellen.....	22
3.1.2 Zellpassage.....	22
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	22
3.2.1 Mutagenese.....	22
3.2.2 Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien.....	23
3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien.....	23
3.2.4 Sequenzierung.....	24
3.2.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA .....	24
3.2.6 Transfektion von U3A-Zellen mit Plasmid-DNA .....	24
3.2.7 Stimulation von U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen mit IFN $\gamma$ und Behandlung mit Staurosporin .....	24
3.2.8 Präparation von Gesamtproteinextrakten aus U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen .....	24
3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	25
3.2.10 Western-Blotting .....	25
3.2.11 Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA) .....	26
3.2.12 Reportergen-Assay .....	27

---

3.2.13	Messung der Luciferase-Aktivität .....	28
3.2.14	Messung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität .....	28
3.2.15	Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	28
3.2.16	Immunfärbung.....	29
3.2.17	Hoechstfärbung.....	29
3.2.18	RNA-Isolation .....	29
3.2.19	Synthese von cDNA aus RNA.....	29
3.2.20	qRT-PCR .....	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1	Homologie von E449 im Sequenzvergleich der STAT-Isoformen.....	31
4.2	Ähnliche Phosphorylierungskinetiken von STAT1-E449A und WT- STAT1.....	32
4.3	Vergleichbare Kernakkumulation der STAT1-E449A-Mutante zum STAT1-WT .....	33
4.4	Regelmäßige Zielgenaktivierung der E449A-Mutante verglichen zum STAT1-WT.....	34
4.5	Die STAT1-E449A-Mutante zeigt eine regelmäßige Bindefähigkeit zu einfachen GAS-Bindestellen .....	35
4.6	Normale Dissoziation von einfachen GAS-Bindestellen der STAT1-E449A-Mutante .....	37
4.7	Regelmäßige Bindung der MCP1-nat-Sonde von STAT1-E449A.....	38
4.8	Die STAT1-E449A-Mutante ist zur kooperativen DNA-Bindung fähig.....	39
4.9	Normales transkriptionelles Aktivitätsmuster der STAT1-E449-Mutante in der RT-PCR.....	40
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>50</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Domänenstruktur des STAT1-Proteins.....	2
Abbildung 2: Kristallstruktur eines an DNA gebundenen, trunkierten STAT1-Dimers.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des JAK/STAT-Signalweges. ....	5
Abbildung 4: Kein Unterschied in der <i>In-vivo</i> -Phosphorylierungskinetik zwischen der E449A-Mutante und dem Wildtyp-Molekül.....	32
Abbildung 5: Vergleichbare Kernakkumulation von STAT1 im Wildtyp-Molekül und der E449A-Mutante.....	33
Abbildung 6: Ähnliche Zielgenaktivierung von STAT1-WT im Vergleich zum STAT1-E449A mit Nutzung der Reporterplasmide 3xLy6E, pIC-339 und pIC-1352. ....	35
Abbildung 7: Ähnliche DNA-Bindefähigkeit von GFP-Fusionsproteinen für die E449A-Mutante im Vergleich zum WT.....	36
Abbildung 8: Normale DNA-Bindefähigkeit der E449A-Mutante im Vergleich zum WT gezeigt als unmarkierte STAT1-Proteine. ....	36
Abbildung 9: Regelmäßige Dissoziation der STAT1-GFP-E449A-Mutante von der M67-Sonde.....	37
Abbildung 10: Normale Dissoziationskinetik der E449A-Mutante von M67-Sonde im Vergleich zum Wildtyp. ....	38
Abbildung 11: Regelmäßige Bindung der MCP1-nat-Sonde von E449A-Mutante.....	39
Abbildung 12: Die E449A-Mutante ist zur kooperativen DNA-Bindung fähig. ....	40
Abbildung 13: Normales transkriptionelles Aktivitätsmuster von endogenen STAT1-Zielgenen durch die E449A-Mutante.....	41
Abbildung 14: Negativ geladene Oberflächenstruktur innerhalb der DNA-Bindedomäne von STAT1.....	42
Abbildung 15: An Importin $\alpha$ 5 gebundenes STAT1-Dimer.....	43
Abbildung 16: Kristallstruktur des monomeren Importin $\alpha$ 5-Proteins.....	44
Abbildung 17: An Importin $\alpha$ 5 gebundenes STAT1-Dimer mit Darstellung des negativ geladenen Bindemotivs.....	45

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Partielle Sequenzhomologie an AS-Position E449 von STAT1.....	31
--	----

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure(-rest)
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	Coiled-Coil-Domäne
CRM1	<i>chromosomal region maintenance 1</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsNLS	dimerspezifisches nukleäres Lokalisationssignal
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay
FBS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>gamma IFN-activated sequence</i>
GBP	guanylatbindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinoethansulfonsäure
IBB	Importin $\beta$ -Bindedomäne
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
IFN $\alpha$	Interferon-alpha
IL	Interleukin
IRF1	IFN-regulatorischer Faktor 1
IRF9	IFN-regulatorischer Faktor 9

---

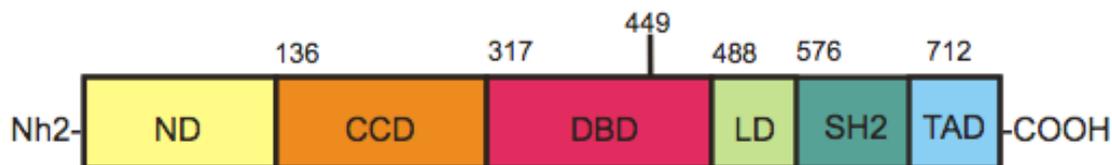
ISRE	<i>interferon-stimulated response elements</i>
JAK	Janus-Kinase
LD	Linker-Domäne
ND	aminoterninale Domäne
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NPC	nukleärer Porenkomplex
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIAS	Protein-Inhibitor von aktiviertem STAT
Poly-dIdC	Poly-Desoxyinosin-Desoxycytidyl-Säure
pSTAT1	STAT1-kodierendes pcDNA3.1-Plasmid
pSTAT1-GFP	STAT1-kodierendes pEGFP-N1-Plasmid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Real-Time-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src-homology-Domäne
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription
Stauro	Staurosporin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS-T	trisgepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-Base	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid

## 1 Einleitung

Durch den JAK/STAT-Signalweg (Janus-Kinase/Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription) reagieren eukaryotische Zellen auf extrazelluläre Signal-Proteine, wie Zytokine, Interleukine oder Hormone, über Rezeptoren ihrer Zelloberfläche mit einer Änderung der Genaktivierung. Die Signale werden über Mitglieder der STAT-Protein-Familie in den Nukleus fortgeleitet (Darnell et al. 1994). Über diese pleiotropen Liganden werden für die zelluläre Homöostase wichtige Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose, gesteuert. In der Folge werden physiologische Vorgänge, wie die angeborene und erworbene immunologische Abwehr, die Brustentwicklung und Laktation sowie Adipogenese und Hämatopoese, maßgeblich beeinflusst (O’Shea et al. 2002; Rawlings et al. 2004).

Bei den STAT-Proteinen handelt es sich um eine zytokinabhängige und evolutionär hochkonservierte Familie von Signal-Transduktoren und Transkriptionsfaktoren, die aus sieben Mitgliedern besteht: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Außerdem verfügen STAT1, STAT3, STAT5a und STAT5b noch über  $\beta$ -Isoformen, welche durch alternatives Spleißen bedingt sind. Dank eines trunkeierten carboxyterminalen Endes fehlt ihnen der überwiegende Teil der Transaktivierungsdomäne, inklusive Serin an Position 727, wodurch die Bindung von transkriptionellen Kofaktoren wie CBP/p300 gestört ist (Müller et al. 1993; Shuai et al. 1993; Zakharova et al. 2003). Daher sind sie transkriptionell inaktiv und üben vermutlich eine regulatorische Funktion durch Konkurrenz mit der  $\alpha$ -Isoform aus (Baran-Marszak et al. 2004).

Alle STAT-Proteine sind überwiegend im Zytoplasma lokalisiert und werden durch transmembranrezeptorenassoziierte Janus-Kinasen mittels Phosphorylierung aktiviert. Sie üben je nach Art der Aktivierung gezielt Genkontrolle aus. Dazu dienen ihnen ISRE- (*IFN-stimulated response element*) und GAS-Bindestellen (*gamma IFN-activated sequence*) in der DNA (Lew et al. 1989; Decker et al. 1991). Die Gene, welche die unterschiedlichen Mitglieder der STAT-Familie kodieren, sind auf drei verschiedenen Chromosomen lokalisiert (Copeland et al. 1995). Die Gene von STAT1 und STAT4 sind auf Chromosom 2 (Banden q12 bis q33), die von STAT3, STAT5A, und STAT5B auf Chromosom 12 (Banden q13 bis q14-1) und jene von STAT2 und STAT6 auf Chromosom 17 (Banden q11-1 bis q22) verortet (Darnell 1997). Die Länge der STAT-Moleküle variiert zwischen 750 und 850 Aminosäuren, das Molekulargewicht zwischen 80 und 113 kDa (Darnell et al. 1994, Levy und Darnell 2002). Obwohl die STAT-Proteine nur eine Sequenzhomologie von 28-40% innerhalb der ersten 700 Aminosäurereste aufweisen, besitzen sie doch den gleichen Domänenaufbau (Schindler und Darnell 1995; Levy und Darnell 2002). Am carboxyterminalen Ende sitzt die Transaktivierungsdomäne (TAD), gefolgt von der Src-homology-Domäne (SH2), der Linker-Domäne (LD), der DNA-Bindedomäne (DBD), der Coiled-coil-Domäne (CCD) und schließlich der aminoterminalen Domäne (ND).



**Abbildung 1: Domänenstruktur des STAT1-Proteins.**

ND: Aminoterminal Domäne, CCD: Coiled-Coil-Domäne, DBD: DNA-Bindedomäne, LD: Linker-Domäne, SH2: Src-Homology-Domäne; TAD: Transaktivierungsdomäne.

Die carboxymal gelegene Transaktivierungsdomäne von STAT1 beinhaltet die beiden phosphorylierbaren Aminosäurereste Ser727 und Tyr701. Darnell und Koautoren konnten zeigen, dass die Phosphorylierung am Tyrosinrest 701 essentiell für die Dimerisierung ist (Darnell et al. 1994). Die Phosphorylierung am Serinrest 727 ermöglicht die maximale transkriptionelle Aktivität durch Bindung von essentiellen Kofaktoren. STAT1-Proteine, welche an Ser727 mutiert sind, können nur schlecht mit BRCA1 interagieren, wie Toru Ouchi und Koautoren 2000 beschrieben (Ouchi et al. 2000).

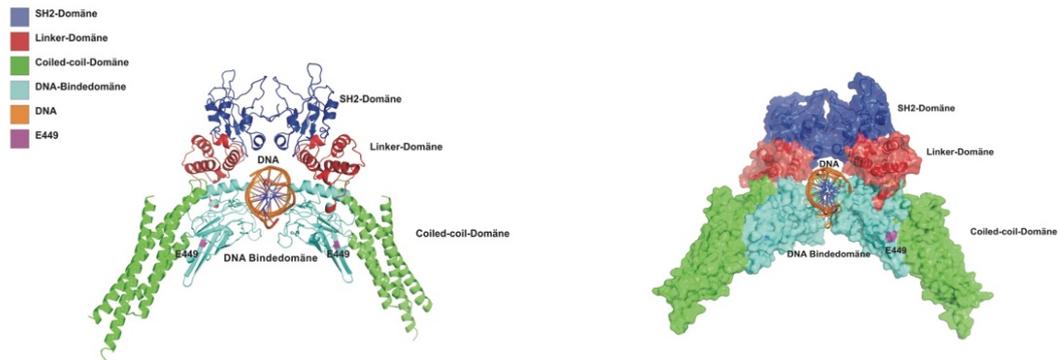
Der Bereich der Src-Homology-Domäne ist am höchsten konserviert innerhalb der STAT-Familie (Schindler und Darnell 1995). Durch sie erfolgt die Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinresten in anderen Protein-Molekülen, so beispielsweise zwischen STAT-Monomeren zur Bildung von Dimeren und den nichtkovalent gebundenen Janus-Kinasen, die ebenfalls über eine SH2-Domäne verfügen (Darnell 1997).

Die hoch konservierte Linker-Domäne verbindet die DNA-Bindedomäne mit der SH2-Domäne und beinhaltet bei STAT1 die Aminosäuren 488 bis 575 (Chen et al. 1998; Levy und Darnell 2002). Lange Zeit war die eindeutige Funktion dieser Domäne unklar, bis Yang und Koautoren die Mutante STAT1-K544A/E545A beschrieben, welche zwar eine normale Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung, eine regelhafte Kernakkumulation und eine hohe Affinität zu STAT-Bindestellen innerhalb der DNA bei Gelshift-Versuchen aufwies, doch zeigte die Mutante in Antwort auf IFN $\gamma$ -Stimulation, bei der STAT1-Homodimere gebildet werden, keine transkriptionelle Aktivität (Yang et al. 2002). Aber die Mutante imponierte in Antwort auf IFN $\alpha$ -Exposition, bei der sich STAT1/STAT2-Heterodimere in Kooperation mit ISGF-2/p48/IRF-9 formen, mit Genaktivität. Der Grund dafür ist eine substanziell reduzierte Verweildauer der STAT1-Homodimere an DNA-Bindestellen (Yang et al. 2002). Außerdem scheint die Linker-Domäne eine entscheidende Rolle bei der transporterunabhängigen, nukleozytoplasmatischen Translokation von unphosphorylierten STAT1-Monomeren zu spielen. Marg und Koautoren alkylierten den Aminosäurerest Cys543 innerhalb der Linker-Domäne, woraufhin STAT1-Moleküle nicht mehr die Kernmembran überqueren konnten (Marg et al. 2004).

Die DNA-Bindedomäne, von AS 317 bis 487, beinhaltet eine immunglobulinähnliche Struktur, aufgebaut aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Damit weist sie eine hohe Ähnlichkeit zum strukturellen Aufbau der DNA-Bindedomänen der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B oder p53 auf. Bis auf diese Ähnlichkeit sind die Proteine allerdings nicht miteinander verwandt. Um DNA binden zu können, müssen sich zunächst parallele STAT-Dimere bilden, wodurch die jeweiligen DNA-Bindedomänen entgegengesetzte palindromische DNA-Sequenzen binden und sich nicht berühren. Die Aminosäurereste N460 und K336 eines jeden Monomers berühren die große Furche, der Aminosäurerest E421 hingegen die kleine Furche der DNA (Chen et al. 1998). Kawata und Koautoren beschrieben eine Homologie von STAT im Bereich der DNA-Bindedomäne und der SH2-Region des Menschen im Vergleich zum Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, was einen alten evolutionären Ursprung dieser Proteinfamilie nahelegt (Kawata et al. 1997).

Die Coiled-Coil-Domäne ist in Protein-Protein-Interaktionen einbezogen (Horvath et al. 1996). Sie besteht aus vier Helices und beinhaltet die Aminosäurereste 136 bis 316. Begitt und Koautoren zeigten, dass es leucinreiche Abschnitte in der vierten Helix der CCD gibt, die ein nukleäres Export-Signal (NES) bilden, welches essentiell für den effizienten nukleären Export ist (Begitt et al. 2000). Die Mutation von zwei Leucinresten in dieser Helixstruktur reichte für eine Verminderung der nukleären Exportrate aus, was mit einer reduzierten transkriptionellen Antwort auf IFN $\gamma$ -Stimulation einherging, da die nukleozytoplasmatische Translokation insgesamt beeinträchtigt war. Außerdem ist die CCD auch an der Bindung von transkriptionellen Kofaktoren, wie etwa p48, beteiligt. Der IFN-regulatorische Faktor 9 (p48) dient zur Bildung des ISGF-3-Transkriptionskomplexes, der sich normalerweise in Antwort auf IFN $\alpha$  bildet (Shuai 2000). Schließlich wird durch die CCD die antiparallele Dimerform stabilisiert, wie von mehreren Autoren gezeigt wurde (Mao et al. 2005; Mertens et al. 2006).

Die aminoterminal Domäne umfasst die ersten 135 Aminosäurereste und dient wie die CCD auch der Protein-Protein-Interaktion. Sie beeinflusst Rezeptorinteraktion sowie Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse (Shuai et al. 1996; Murphy et al. 2000). Außerdem bindet sie transkriptionelle Kofaktoren und vermittelt die kooperative DNA-Bindung von STAT-Dimeren (Vinkemeier et al. 1998; Xu et al. 1996; Zhang et al. 1996; Zhang und Darnell 2001). Die Struktur von isolierten aminoterminalen Domänen zeigt ausschließlich Helixstrukturen. In Lösung isoliert vorliegend formen sie über zwei alternative Bindungsoberflächen jeweils stabile Dimere, wobei eine dieser Oberflächen für die Tetramerisierung verantwortlich ist. Selbige ist auch für die Interaktion mit der Phosphatase TC45 zuständig (Meyer et al. 2004). Meyer und Koautoren konnten anhand der generierten STAT1-F77A-Mutante zudem zeigen, dass die Tetramerisierung keine multiplen GAS-Bindestellen erfordert und dass sie für eine maximale transkriptionelle Aktivität benötigt wird. Die aminoterminal Domäne von STAT1 interagiert mit PIAS1, einem Inhibitor der STAT-Proteine (Shuai 2000).



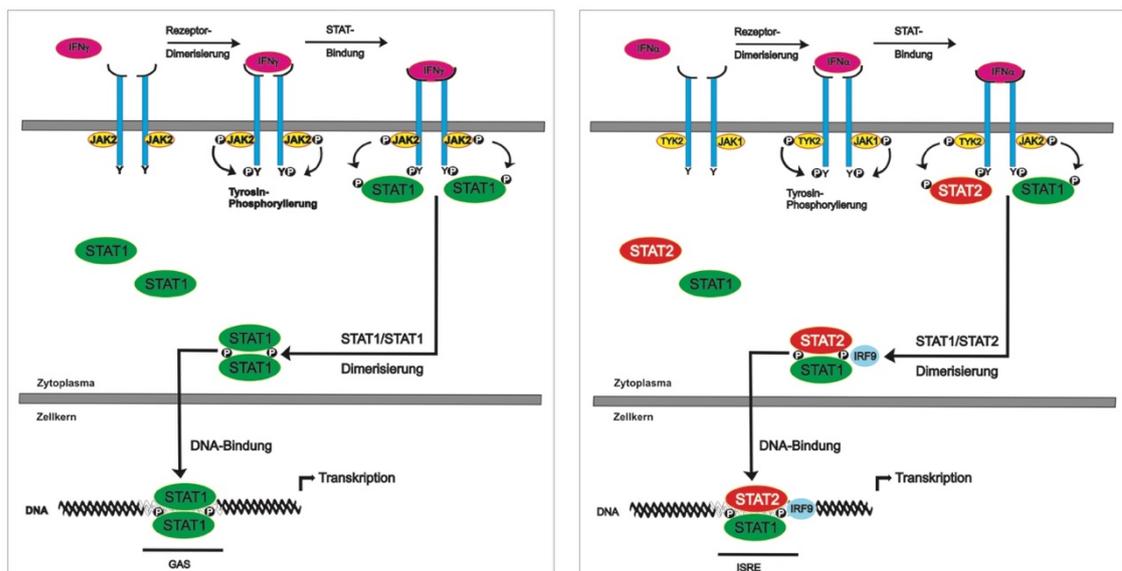
**Abbildung 2: Kristallstruktur eines an DNA gebundenen, trunkierten STAT1-Dimers.**

Links ist die Tertiärstruktur eines DNA-gebundenen, trunkierten STAT1-Dimers mit  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen, rechts eine Oberflächenstruktur präsentiert. Dargestellt ist jeweils die SH2-Domäne in Lila, die Linker-Domäne in Rot, die DNA-Bindedomäne in Hellblau und die Coiled-Coil-Domäne in Grün mit der DNA-Doppelhelix in Orange. Der der Arbeit zugrundeliegende Aminosäurerest E449 ist in Pink dargestellt.

Die Zelle kann auf extrazelluläre Polypeptid-Signale durch die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges mit Genexpression reagieren (Mertens und Darnell 2007). Mit am besten untersucht wurde der Ablauf der STAT-Aktivierung durch Interferone. Hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus wird zwischen der Aktivierung durch die Typ-I-Interferone  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  und  $\tau$ , durch das Typ-II-Interferon  $\gamma$  und durch das Typ III-Interferon  $\lambda$  unterschieden (Platanias 2005). Im Folgenden werden die IFN $\alpha$ -abhängige und die IFN $\gamma$ -abhängige Dimerisierung der STAT-Moleküle erläutert. Als Beispiel-Interferon für Typ-I-IFN soll im Weiteren IFN $\alpha$  dienen. IFN $\alpha$  bindet an der Zelloberfläche seinen Rezeptor, den Typ-I-IFN-Rezeptor (Langer und Pestka 1988). Dieser besteht aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2. IFNAR1 interagiert mit der nicht-kovalent gebundenen Tyrosinkinase 2 (TYK2), wohingegen IFNAR2 mit der nicht-kovalent gebundenen Janus-Kinase 1 (JAK1) assoziiert ist (Darnell et al. 1994; Ihle 1995; Platanias 2003; Chen et al. 2004). Liganden-abhängig dimerisieren die Untereinheiten des Typ-I-IFN-Rezeptors, und es kommt zur Autophosphorylierung und zur Transphosphorylierung von JAK1 und TYK2. Diese wiederum aktivieren mit ihrer Kinaseaktivität sowohl die carboxyterminalen, intrazellulären Rezeptorbestandteile, welche als Zielstruktur für SH2-Domänen der STAT-Proteine fungieren, als auch die STAT1-Moleküle selbst durch Tyrosinphosphorylierung an Position 701 (Shuai et al. 1993; Stark et al. 1998). Phosphoryliert werden sowohl STAT1-, als auch STAT2-Moleküle. Die jeweiligen SH2-Domänen von STAT1 und STAT2 können nun über den Phosphotyrosinrest des Partners parallele Heterodimere bilden (Levy und Darnell 2002). Über die IFN $\alpha$ -Stimulation bilden sich sowohl STAT1/STAT2-Heterodimere, als auch STAT1/STAT1-Homodimere aus (Platanias 2005). Letztere werden nachfolgend bei der Erläuterung der IFN $\gamma$ -Aktivierung näher beschrieben. Auch wenn nicht durch IFN stimuliert sind nicht-phosphorylierte STAT-Proteine wahrscheinlich in der Lage, Dimere beziehungsweise höhere

Ordnungsformen in Form von Oligomere auszubilden (Ndubuisi et al. 1999; Haan et al. 2000). STAT1/STAT2-Heterodimere bilden mit dem IFN-regulatorischen Faktor 9, kurz IRF9, welcher keiner Phosphorylierung zur Aktivierung bedarf, den ISGF3-Komplex (*IFN-stimulated gene* (ISG) factor 3) (Veals et al. 1992; Schindler et al. 1992). Dieser bindet, einmal in den Nukleus transloziert, ISRE-Bindestellen und initiiert Genexpression (Reich et al. 1987).

IFN $\gamma$  bindet seinen aus den beiden Untereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 bestehenden Typ-II-IFN-Rezeptor, dieser dimerisiert analog zum oben beschriebenen Typ-I-IFN-Rezeptor, und es folgt eine Auto- und Transphosphorylierung des Rezeptors und der assoziierten Janus-Kinasen (Platanias 2005). In durch IFN $\gamma$  stimulierte Zellen wird nur STAT1 phosphoryliert, es bilden sich folglich nur STAT1-Homodimere aus (Schindler und Darnell 1995). Die STAT1-Homodimere gelangen in den Nukleus, binden ihre IFN $\gamma$ -abhängigen Promotoren (GAS-Bindestellen) und sorgen so für Genexpression (Lew et al. 1989; Decker et al. 1991).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des JAK/STAT1-Signalweges.**

Links: Typ-II-IFN-abhängige Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges. IFN $\gamma$  bindet den aus den Untereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 bestehenden Typ-II-IFN-Rezeptor. Dieser dimerisiert, gefolgt von der Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors und der assoziierten Janus-Kinasen JAK1 und JAK2. Nachfolgend werden STAT1-Proteine phosphoryliert, und es bilden sich STAT1-Homodimere. Die STAT1-Homodimere gelangen in den Nukleus, binden IFN $\gamma$ -abhängigen Promotoren und aktivieren die Genexpression.

Rechts: Typ-I-IFN-abhängige Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges. IFN $\alpha$  bindet den aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 bestehenden Typ-I-IFN-Rezeptor, worauf dieser dimerisiert. Durch Auto- und Transphosphorylierung des Typ-I-IFN-Rezeptors werden die assoziierte Tyrosinkinase 2 (TYK2) und JAK1 aktiviert. Sie phosphorylieren STAT1 und STAT2, es bilden sich STAT1/STAT2-Heterodimere aus. Die STAT1/STAT2-Heterodimere binden IRF9, translokieren in den Kern und bilden an den *IFN-stimulated response elements* (ISRE) den IFN-stimulated-Gene-Factor-3-Komplex (ISGF3-Komplex) aus.

Die Kernmembran stellt für Proteine über einem Molekulargewicht von 40 kDa ein Hindernis dar, kleinere Proteine hingegen können frei zwischen Zytoplasma und Kern hin und her diffundieren (Paine und Feldherr 1972). Da STAT-Proteine eine Molekülmasse von weit

über diesem Grenzwert aufweisen, müssen sie auf andere Weise in den Nukleus gelangen. Man unterscheidet zwischen transporterabhängiger und transporterunabhängiger nukleozytoplasmatischer Translokation. Während der transporterabhängige Kernimport bzw. -export von STAT-Dimeren nur unter Zytokin-Stimulation suffizient ablaufen kann, werden unphosphorylierte STAT-Moleküle bei der transporterunabhängigen Variante ununterbrochen zwischen Nukleus und Zytoplasma ausgetauscht. Im Folgenden werden beide möglichen Transportwege erläutert. STAT1-Proteine unterlaufen im Zytoplasma in Antwort auf eine IFN $\gamma$ -Stimulation und unter Vermittlung von JAK1 und JAK2 einer Phosphorylierung am Tyrosinrest 701, sie dimerisieren und bilden nun ein Ziel für Importine (Sekimoto et al. 1997). Importine und Exportine gehören zur Superfamilie der Karyopherine, welche den Transport von Proteinen durch Kernporenkomplexe (NPC, *nuclear pore complexes*) vermitteln (Fahrenkrog et al. 2004; Fernandez-Martinez und Rout 2012). Karyopherine erkennen und binden ihre Substrate, genannt Cargos. Diese enthalten mehr oder minder konservierte Motive auf Proteinoberflächen, welche entweder Import- oder Exportsignale darstellen. Ein Importsignal, auch nukleäres Lokalisationssignal (NLS, *nuclear localization signal*) genannt, ist üblicherweise reich an basischen Aminosäureresten, wie Arginin und Lysin, wohingegen ein Exportsignal eher hydrophobe Reste aufweist, wie beispielsweise die von Leucin (Mattaj und Englmeier 1998). STAT1-Proteine weisen nur in Dimerform ein dimerspezifisches NLS (dsNLS) auf, welches sich in der DNA-Bindedomäne des Dimers befindet und von dem Importin $\alpha$ 5-Protein, einem STAT-spezifischen Karyopherine, erkannt wird (Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002). Auch Aminosäurereste in der CCD und im Aminoterminus scheinen den STAT-Importin $\alpha$ 5-Komplex für STAT3 zu stabilisieren (Ma et al. 2003). STAT1-Mutanten, denen der Aminoterminus fehlte, zeigten keinerlei Kernakkumulation auf und waren aufgrund der zytoplasmatischen Retention hyperphosphoryliert (Strehlow und Schindler 1998). Die Bindung von STAT1-Dimeren an Importin $\alpha$ 5 im Zytoplasma geschieht bei einer hohen Konzentration von RanGDP, welche durch die Hydrolyse von RanGTP durch die RanGAP, einem Enzym mit RanGTPase-Aktivität, entsteht. Unter diesen Umständen können Exportine ihre Substrate auch wieder entladen (Mattaj und Englmeier 1998). Der STAT1-Importin $\alpha$ 5-Komplex bindet mit Hilfe der N-terminal im Importin $\alpha$ -Molekül befindlichen Importin $\beta$ -Bindedomäne (IBB) Importin $\beta$ , so dass der Transport in den Kern ablaufen kann (Sekimoto et al. 1996; Sekimoto et al. 1997; Nardozzi et al. 2010a). Der Transportkomplex legt schätzungsweise eine Strecke von 200 nm durch das NPC zurück (Nardozzi et al. 2010b). Im Kern sorgen hohe RanGTP-Konzentrationen, generiert durch das Enzym RCC1, für die Entladung der Importine. Gleichzeitig wird dadurch die Beladung der Exportine mit unphosphorylierten STAT1-Monomeren katalysiert (Mattaj und Englmeier 1998). Im Falle von STAT1 handelt es sich bei den Exportinen um ein Protein namens *chromosomal region maintenance 1* (CRM1). CRM1 nimmt STAT1-Monomere bei hohen RanGTP-Konzentrationen auf und schleust diese durch den NPC. Im Zytoplasma sorgt die Hydrolyse von RanGTP wiederum für die Entladung des Transporters. Die

nukleozytoplasmatische Translokation mit Hilfe von Importinen und Exportinen ist dementsprechend energieabhängig.

Transporterunabhängig gelangen nur unphosphorylierte STAT1-Moleküle in den Kern. Meyer und Koautoren zeigten, dass Loss-of-function-Mutanten von STAT1 im Bereich des dsNLS nicht in der Lage waren, phosphoryliert in den Kern zu gelangen. Nichtsdestotrotz konnten signifikante Mengen von unphosphorylierten STAT1-Mutanten im Nukleus von unstimulierten Zellen amplifiziert werden, sodass es einen interferon- und transporterunabhängigen Weg in den Nukleus geben muss (Meyer et al. 2002b). Diese Beobachtungen wurden auch für andere Mitglieder der STAT-Familie und für STAT1-Mutanten mit Punktmutationen an Position 701 oder innerhalb der SH2-Domäne gemacht (Chatterjee-Kishore et al. 2000; Meyer et al. 2002a). Auch in Versuchen, in denen digitoninpermeabilisierte Zellen zusammen mit rekombinantem STAT1 verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass nur unphosphorylierte STAT1-Proteine die Kernmembran überqueren konnten (Adam et al. 1990). Anscheinend übernimmt die Linker-Domäne eine entscheidende Aufgabe beim transporterunabhängigen Import in den Nukleus, wie Versuche von Marg und Koautoren nahelegten (Marg et al. 2004). An einer unspezifischen Position innerhalb der Linker-Domäne alkylierte STAT1-Moleküle konnten die Kernmembran nicht überqueren.

Um den transporterunabhängigen Kernexport zu untersuchen, wird der CRM1-Inhibitor Leptomycin B verwendet. In unstimulierten Zellen kam es daraufhin nicht zu einer Kernakkumulation von STAT1, sodass man fälschlich zunächst davon ausging, es gäbe keine nukleozytoplasmatische Translokation in unstimulierten Zellen (McBride et al. 2000). Doch werden Zellen mit Interferon stimuliert und nachfolgend mit Leptomycin B inkubiert, wurde der nukleäre Export zwar erniedrigt, doch nicht vollständig blockiert, was für einen transporterunabhängigen und leptomycin-B-insensitiven nukleären Exportmechanismus spricht (Begitt et al. 2000). Schließlich konnte gezeigt werden, dass STAT1-Moleküle über direkte Interaktion mit den Nukleoporinen zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her gelangen (Marg et al. 2004).

Während Interferonstimulation durchläuft STAT1 kontinuierlich Zyklen von Aktivierung durch Phosphorylierung, Kernakkumulation, Transkription, Dephosphorylierung und Nukleusexport. Um nach der Transkription die Kernmembran zurück in das Zytoplasma überqueren zu können, muss das parallele STAT1-Dimer zunächst von der Ziel-DNA dissoziieren und dephosphoryliert werden. Die Sequenzspezifität der DNA-Bindestelle bestimmt die Affinität des STAT-Dimers und beeinflusst so maßgeblich die Dissoziationsrate der STAT1-Proteine (Meyer und Vinkemeier 2004).

Das parallele Phospho-STAT1-Dimer kann nicht direkt Ziel einer nukleären Phosphatase wie TC45 oder SHP2 sein (Mertens und Darnell 2007). Dazu müssen sich wahrscheinlich erst die reziproken SH2-Phosphotyrosin-Verbindungen lösen (Kawata et al. 1997). Wie genau diese Dissoziation abläuft, bleibt bisher unbekannt (Zhong et al. 2005). Verschiedene Autoren haben bereits von unphosphorylierten STAT-Dimeren in Zellextrakten berichtet

(Lackmann et al. 1998; Novak et al. 1998; Ndubuisi et al. 1999; Braunstein et al. 2003). Dies lässt den Schluss zu, dass phosphorylierte STAT-Proteine nur in Dimerform Ziel von Phosphatasen sind. Zudem vermuteten Mertens und Koautoren anhand epitopmarkierter Moleküle, dass diese während der Dephosphorylierung zusammenbleiben, was gegen eine Dissoziation des Dimers zu Monomere spricht (Mertens et al. 2006).

Anhand von Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass es zwei verschiedene Strukturmöglichkeiten von STAT-Dimeren gibt. Entweder in einer parallelen Konformation, bei der sich die beiden Aminotermini in der Mitte beider Monomere treffen, oder in einer antiparallelen Form, wo es Wechselwirkungen zwischen den Coiled-Coil-Domänen und der DNA-Bindedomänen der Monomere untereinander gibt. Die beiden Aminotermini sind in der antiparallelen Form analog zur isolierten Form in Lösung miteinander verbunden (Vinkemeier et al. 1998; Chen et al. 2003). Zudem gibt es lockere Bindungen der Aminotermini mit den DNA-Bindedomänen der beiden Protomere (Mao et al. 2005). Mao und Koautoren schlossen daraus, dass unphosphorylierten Dimer in Lösung existieren könnten.

Zhong und Koautoren stellten verschiedene Möglichkeiten vor, wie sich die Konfiguration von parallelen Phospho-STAT-Dimeren nach der Dissoziation von der Ziel-DNA verändern müsste, damit STAT-Proteine Ziel der Phosphatase werden können (Zhong et al. 2005). Die erste Möglichkeit besteht darin, dass sich die beiden Aminotermini des Dimers nach der Dissoziation von der DNA miteinander verbinden und die SH2-Phosphotyrosin-Interaktionen gelöst werden. In dieser neuen Konfiguration wäre das STAT-Dimer Angriffsziel der Phosphatase. Die Erkenntnisse aus Versuchen mit der F77A-Mutante von STAT1 könnten diese Theorie stützen. Die zweite Möglichkeit baut auf der ersten auf, indem sich zunächst wieder ein paralleles und an den Aminotermini verbundenes STAT-Dimer bildet, das keine SH2-Phosphotyrosininteraktion mehr aufweist. Nun rotiert das eine Protomer über die flexiblen Aminotermini um  $180^\circ$ , sodass sich das antiparallele Dimer ausbilden kann, welches die phosphorylierten Tyrosinreste an Position 701 in entgegengesetzter Richtung exponiert. Dieses Dimer wäre ein leichtes Ziel für die Phosphatase (Zhong et al. 2005).

In Experimenten mit STAT1-Varianten mit Mutationen in der CCD/DBD beziehungsweise der ND, welche nicht eine unphosphorylierte, antiparallele STAT-Dimer-Konformation ausbilden können, konnten Zhong und Koautoren zeigen, dass diese STAT1-Mutanten hyperphosphoryliert waren und zudem eine Phosphatase-Resistenz aufwiesen. Die Menge an unphosphorylierten STAT-Dimeren in Lösung war bei diesen Mutanten signifikant herabgesetzt. Da die genannten Mutationen in Bereichen eingeführt wurden, welche für die antiparallele Form maßgeblich sind, kamen Zhong und Koautoren zu dem Schluss, dass es eine Umlagerung vom parallelen Phospho-Dimer zum antiparallelen Phospho-Dimer von STAT1 geben müsse. Würde die erste Möglichkeit zutreffen, so hätte nur die STAT1-Mutante in der ND eine Phosphatase-Resistenz gezeigt, nicht hingegen die CC/DBD-Mutante, sodass die zweite Möglichkeit favorisiert wird. In der antiparallelen Konfiguration würde das Exportsignal von Aminosäurerest 302 bis 314 exponiert sein, während das dsNLS zumindest

partiell versteckt wäre (Begitt et al. 2000; McBride et al. 2000; Fagerlund et al. 2002; McBride et al. 2002; Meyer et al. 2002b; Meyer et al. 2003).

Einen einfachen Weg für die Suppression der STAT-Proteine stellen die zytoplasmatischen Phosphatasen dar. Diese dephosphorylieren Interferon-Rezeptoren, Janus-Kinasen und STAT-Proteine. Inzwischen sind einige von ihnen bekannt, doch die SHP (SH2-containing-Protein-Tyrosine-Phosphatase-Proteine) sind wohl am besten charakterisiert (Rawlings et al. 2004). SHP-Moleküle wurden bei der Analyse von motheaten Mäusen entdeckt. Diese Mäuse haben eine Mutation im *Hcph*-Genlocus, welcher für das SHP-1-Protein kodiert (Shultz et al. 1993; Tsui et al. 1993). In der Folge kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation und Einwanderung von Makrophagen und Neutrophilen in Haut- und Lungengewebe. Dieser immunologische Defekt führt zu schwerwiegenden Pneumonien und gibt den betroffenen Mäusen ein mottenzerfressenes Aussehen (Shultz et al. 1997; Zhang et al. 2000). Die konstitutiv exprimierten SHP-Proteine besitzen zwei aufeinanderfolgende SH2-Domänen am N-Terminus und eine Tyrosin-Phosphatase-Domäne am C-Terminus (Wormald und Hilton 2004).

Protein-Inhibitoren von aktiviertem STAT (PIAS) werden ebenfalls konstitutiv exprimiert, können aber nur aktivierte STAT-Dimere binden und benötigen dementsprechend Interferon-Stimulation zur Inhibition von STAT-Proteinen (Liu et al. 1998). Mit STAT1-Proteinen interagieren PIAS1, PIAS3, PIASx und PIASy. Die PIAS-STAT1-Komplexe sind nicht in der Lage, GAS- oder ISRE-Bindestellen (PIAS1 und PIAS3) oder transkriptionelle Kofaktoren (PIASx und PIASy) zu binden (Liu et al. 1998; Liu et al. 2001). Darüber hinaus wurde berichtet, dass PIAS1, PIAS3 und PIASx durch ihre SUMO-Ligase-Aktivität die SUMOylierung von STAT1-Molekülen an K703 bewirkt (Rogers et al. 2003). SUMOylierung ist ein zu Ubiquitinierung analoger Prozess, ebenfalls bestehend aus Aktivierung, Konjugation und Ligation, der der Degradation von Proteinen durch Proteasomen dient (Shuai 2006).

*SOCS*-Gene (*suppressor of cytokine signaling*) sind Zielgene des JAK/STAT-Signalweges, sodass eine negative Rückkopplung entsteht (Naka et al. 1999). Anhänger der SOCS-Familie besitzen eine zentral gelegene SH2-Domäne, flankiert durch eine aminoternale Domäne und eine 40 Aminosäuren lange C-terminale SOCS-Box (Starr und Hilton 1998). Während SOCS2, SOCS3 und CIS phosphorylierte Aminosäurereste von Zytokin-Rezeptoren binden und so die Rekrutierung der STAT-Proteinen behindern, interagiert SOCS1 mit Janus-Kinasen und inhibiert spezifisch deren Kinaseaktivität (Yoshimura et al. 1995; Endo et al. 1997; Schmitz et al. 2000; Greenhalgh et al. 2002).

Eine dritte Möglichkeit der Negativregulation des JAK/STAT-Signalweges liegt in der SOCS-Box begründet. Diese formt mit Elongins B, Elongins C, Cullin-5 und Rbx1 einen E3-Ubiquitin-Ligasekomplex und vermittelt so die proteasomale Degradierung der gebundenen Partner, wie beispielsweise JAK2 (Kamura et al. 2001).

STAT1 $\beta$  als carboxyterminal gekürzte STAT1-Splicing-Form weist keine transkriptionelle Aktivität in Antwort auf eine IFN $\gamma$ -Stimulation auf. Nichtsdestotrotz kann es als Teil des

ISGF3-Komplexes bei beispielsweise IFN $\alpha$ -Stimulation Genexpression auslösen. Bei Überexpression von trunkierten STAT-Proteinen tritt ein dominant-negativer Effekt auf, wohingegen es bei einer Knockout-Maus von STAT3 $\beta$  zu einer beeinträchtigten Erholung bei Endotoxin-Schock kommt (Yoo et al. 2002). Daher ist davon auszugehen, dass die balancierte Translation von STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$  zu einer modulierten Expression von Zielgenen beiträgt (Levy und Darnell 2002).

STAT1-Proteine spielen eine wichtige Rolle als Tumorsuppressoren. Sie können bei IFN $\gamma$ -abhängiger Aktivierung Apoptose entweder über vermehrte Transkription von pro-apoptischen Proteinen wie Caspase 1, Caspase 8 und Bak oder Inhibition der Transkription von anti-apoptischen Molekülen wie BCL-2 oder BCL-xL steuern. Sie regulieren zudem die Transkription und Expression von verschiedenen zellzyklusregulierenden Genen wie p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und Cyclin D1 (Bernabei et al. 2001; Fulda und Debatin 2002; Zhang et al. 2014). Auch durch direkte Protein-Protein-Interaktionen mit p53 sind STAT1-Moleküle in der Lage, Apoptoseprozesse zu initiieren (Townsend et al. 2004).

STAT1-Proteine regulieren zudem die Expression von MHC Klasse I in zytotoxischen T-Zellen und ermöglichen so dem Immunsystem, Tumorabwehr zu betreiben. In Melanomzellen konnte eine positive Korrelation zwischen STAT1-Phosphorylierung und dem Expressionsgrad von MHC Klasse I gezeigt werden (Rodríguez et al. 2007). Als möglichen Mechanismus für eine erniedrigte STAT1-Phosphorylierung und damit einhergehende MHC-Klasse-I-Erniedrigung auf der Zelloberfläche ließ sich eine Hochregulierung von SHP-2-Proteinen als Negativregulator von STAT1 in Kopf- und Halstumoren nachweisen (Leibowitz et al. 2013). Aktiviertes STAT1-Protein ist zudem in der Lage, die Expression von pro-angiogenetischen Molekülen, wie dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF/VPF, *vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor*) und den Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP-2, MMP-9), zu inhibieren (Huang et al. 2002). Dieser Effekt konnte auch in nicht-kleinzelligen-Bronchialkarzinomen bei IL-27-Stimulierung nachgewiesen werden (Kachroo et al. 2013). Somit hemmen aktivierte STAT1-Proteine Angiogenese und damit verbunden das Wachstum von Tumoren. Die Hemmung von Tumorsuppressoren spielt eine Schlüsselrolle in der Onkogenese von Tumoren. Reduzierte Expressionslevel beziehungsweise verminderte Aktivierung von STAT1 wurde in mehreren Tumorarten nachgewiesen, darunter in Mamma-Karzinomen, Adenokarzinomen des Ösophagus, in kolorektalen Karzinomen, in Bronchialkarzinomen, Melanomen und Magenkarzinomen (Adámková et al. 2007; Chen et al. 2015; O'Shea et al. 2015; Meissl et al. 2017). Demgegenüber zeigte sich eine positive Korrelation zwischen STAT1-Expressionslevel und der Krankheitsprognose von onkologischen Patienten (Chen et al. 2013; Gordziel et al. 2013; Zhang et al. 2014).

Auch wenn der überwiegende Anteil der gegenwärtigen Publikationen die Rolle von STAT1 als Tumorsuppressor unterstützt, zeigen sich zunehmend auch Hinweise bezüglich eines

modulierend onkogenen Potentials. Aberrante Aktivierung von STAT1-Proteinen wurde in Mamma-Karzinomen, Kopf und Hals-Tumoren, Pleuramesotheliomen sowie Lymphomen nachgewiesen (Buettner et al. 2002; Arzt et al 2014). Ebenso zeigten sich schlechtere klinische Prognosen bei onkologischen Patienten mit höheren unphosphorylierten bzw. phosphorylierten STAT1-Konzentrationen (Duarte et al. 2012). Diese Beobachtung wurde auch in Patienten mit Mamma-Karzinomen auf Ebene der STAT1-mRNA bestätigt (Tymoszuk et al. 2014). Es konnte zudem gezeigt werden, dass renale Tumorzellen durch verminderte Translation von STAT1 mittels siRNA empfindlicher gegenüber Chemo- und Radiotherapie wurden (Hui et al. 2009; Zhu et al. 2012).

Polymorphismen beziehungsweise Mutationen im Gen von STAT1 können zu aberanten Phänotypen im IFN $\gamma$ -abhängigen JAK/STAT-Signalweg führen. Gain-of-function-Mutationen (GOF), beschrieben in der Coiled-Coil-, der DNA-Binde- oder in der SH2-Domäne von STAT1-Molekülen, können eine Hyperphosphorylierung und reduzierte Dephosphorylierung zur Folge haben (Liu et al. 2011; Smeekens et al. 2011; Yamazaki et al. 2014; Meesilpavikkai et al. 2017). Bei Überaktivität von STAT1 kommt es zu einer reziproken Hemmung von STAT3, welche zum jetzigen Stand noch nicht vollständig verstanden ist. Dadurch ist die STAT3-abhängige Differenzierung von Th17-Zellen reduziert, was eine fehlerhafte Abwehr von Pilzinfektionen bedingen kann. Eine der häufigsten klinischen Phänotypen dieser monogenetisch bedingten Erkrankungen ist die chronische mukokutane Candidiasis. Jedoch zeigen Patienten mit GOF-Mutationen von STAT1-Proteinen auch eine erhöhte Anfälligkeit für andere Pilz-, Virus- oder bakteriell bedingte Infektionen (Kaleviste et al. 2019). Loss-of-function-Mutationen (LOF) führen hingegen zu einer fehlerhaften bakteriellen Abwehr, insbesondere zu einer reduzierten Abwehr gegenüber mykobakteriellen Infektionen. Klinisch manifestieren sich beispielweise rekurrende und disseminierte Infektionen des normalerweise apathogenen Bacillus-Calmette-Guérin-Stammes (BCG) (O'Shea et al. 2015).

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung für die Genese von autoimmunen, onkologischen und infektiösen Erkrankungen bietet der JAK/STAT-Signalweg auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade potentielle Angriffspunkte zur therapeutischen Intervention. Rekombinant hergestellte Interferone als direkte Liganden der Typ-I-IFN-Rezeptoren werden als Eskalationstherapie der schubförmig remittierende multiple Sklerose oder in der onkologischen Therapie bei verschiedenen Krebsformen, darunter Melanome, Nierenzellkarzinome oder Kaposi-Sarkome, genutzt (González-Navajas et al. 2012).

Auf Ebene der Janus-Kinasen wurden Jakinibs entwickelt. Jakinibs der ersten Generation blockieren spezifisch die ATP-Bindung der Kinase-Domäne der Janus-Kinasen mit Ausnahme von TYK2 und führen so zu einer verminderten Phosphorylierung von STAT-Molekülen. Einsatz finden diese in Phase II- beziehungsweise III-Studien in der Therapie von autoimmunen Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis oder der Colitis

ulcerosa. Ebenso wurden positive Effekte bei der Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation beobachtet (Schwartz et al. 2016).

Prinzipiell können auch STAT-Moleküle Angriffsziele einer therapeutischen Intervention darstellen. Konzeptionell könnte diese über eine Inhibition der Phosphorylierung, über die Blockierung der SH2-Domänen, welche für die Bindung von an Tyrosin phosphorylierten Rezeptoren oder die Dimerisierung verantwortlich sind, über die Hemmung des Kerntransports oder eine Blockade der DNA-Bindung der STAT-Proteine erfolgen (O’Shea et al. 2015). Ebenso möglich wäre eine Inhibierung der Genexpression der STAT-Moleküle selbst. Ersterer Mechanismus wurde mit Hilfe der Jakinibs bereits umgesetzt. Des Weiteren wurden bislang verschiedene auf oligonukleotidbasierende direkte STAT-Inhibitoren, insbesondere auf STAT3-Proteine zielend, entwickelt. Diese binden STAT-Moleküle im Bereich der DNA-Bindedomäne und verhindern so die Expression der Zielgene (Sen et al. 2012). Als komplementäre Antisense-RNA-Oligonukleotide können sie zudem für STAT-Proteine kodierende mRNA binden und somit die Proteinbiosynthese auf Ebene der Translation hemmen (Hong et al. 2015). Eine weitere Möglichkeit besteht durch eine selektive Hemmung von phosphorylierten STAT-Proteinen durch Intrabodies. Diese chimären Kanninchen-/Human-Antikörperfragmente (FAB) wurden bereits für STAT3-Moleküle entwickelt und zeigen eine selektive Hemmung von an Tyrosin705 phosphorylierten STAT3-Molekülen. Dabei werden an Serin727 phosphorylierte oder unphosphorylierte STAT3-Proteine nicht inhibiert (Koo et al. 2014). Herausforderungen im Gebiet der STAT-Inhibitoren stellen bislang die geringe Bioverfügbarkeit, die niedrige In-Vivo-Effektivität und die häufig fehlende Selektivität innerhalb der STAT-Familie dar (O’Shea et al. 2015).

## 2 Material

### 2.1 Humane Zelllinien

HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms aus etablierter, permanenter Zelllinie (bezogen von Prof. Dr. U. Vinkemeier)
U3A	aus 2fTGH entstandene STAT1-defiziente Zelllinie (bezogen von Prof. Dr. U. Vinkemeier)

### 2.2 Chemikalien

Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Borsäure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Acros Organics
Ethylenglycol-bis(Ethylennitrilo)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Ficoll-Paque Plus	Amersham Bioscience, Freiburg
Formaldehyd	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth

---

Glycylglycin	Sigma-Aldrich
N-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazi- noethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
IGEPAL-CA-360	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	Carl Roth
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	Carl Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natrium-ortho-Vanadat	Sigma-Aldrich
ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyra- nosid	Sigma-Aldrich
Pefabloc SC	Roche, Grenzach
2-Propanol	Carl Roth
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Carl Roth
Rotiphorese	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
Staurosporin	Sigma-Aldrich

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypton	Carl Roth
Tween-20	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid	Carl Roth

### 2.3 Radiochemikalien

Die  $\alpha$ -[ $^{33}\text{P}$ ]-markierten Desoxynukleotide wurden vor Ablauf ihrer Halbwertszeit eingesetzt und besaßen eine spezifische Aktivität von 111 Tbq/mmol (Hartmann Analytic, Braunschweig).

### 2.4 Puffer, Lösungen und Medien

Zur Herstellung aller Puffer, Lösungen und Medien wurde entionisiertes Wasser mit Hilfe der Millipore-Anlage Milli-Q (Millipore, Schwalbach) generiert. Die Porengröße des Molekulfilters der Anlage betrug 0,22  $\mu\text{m}$ . Der pH-Wert einzelner Lösungen wurde mit Hilfe des pH-Meters Seven Easy (Mettler Toledo, Gießen) eingestellt. Bei Bedarf konnten einzelne Lösungen über 0,2  $\mu\text{m}$ -Filter steril filtriert werden.

### 2.5 Antikörper

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

Anti-STAT1 $\alpha$ -p91 (C-24)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-STAT1 $\alpha$ -p91 (E-23)	Santa Cruz Biotechnology
Cy3-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

Mit Hilfe der polyklonalen Antikörper Anti-STAT1 $\alpha$ -p91(C-24) und Anti-Phospho-STAT1 (Tyr 701) als Primärantikörper, welche 1:1000 in 4% BSA mit Tris-gepufferter Salzlösung mit 0,05% Tween (TBS-T; 0,05% Tween-20, 137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) verdünnt waren, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt. Dabei diente das polyklonale IRDye 800CW Anti-Kaninchen-Immunglobulin-G (IgG) aus Ziege als Sekundärantikörper. Dieser wurde auf 1:10.000 in 4% BSA mit TBS-T verdünnt. Bei Supershift-Reaktionen in elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) wurden Anti-STAT1 $\alpha$ -p91 (C-24) und Anti-STAT3 (H190) als polyklonale Primärantikörper genutzt. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:20 in PBS verdünnt. Immunhistochemische Untersuchungen wurden mit Hilfe des Primärantikörpers Anti-STAT1 $\alpha$ -p91 (C-24) durchgeführt, welcher 1:1000 in 25% FBS mit PBS verdünnt wurde. Hier diente an Cy3-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, welches 1:500 in 25% FBS in PBS verdünnt wurde, als Sekundärantikörper.

## 2.6 Reaktionskits

Absolute-Blue-QPCR-SYBR-Green-Mix	Thermo Scientific, Dreieich
Luciferase-Assay-System	Promega, Mannheim
peqGold-Plasmid-Miniprep-Kit	Peqlab
peqGold-total-RNA-Kit Safety-Line	Peqlab
QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis-Kit	Agilent Technologies
Verso-cDNA-Kit	Thermo Fisher Scientific Langenselbold

## 2.7 Enzyme und deren Inhibitoren

Complete-Mini Protease Inhibitoren	Roche, Grenzach
DNA-Polymerase I (Klenow-Enzym)	New England Biolabs, Schwalbach
Dpn I-Endonuklease und PfuUltra-HF	Stratagene, La Jolla, USA
PfuTurbo DNA-Polymerase	Agilent Technologies
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Pasching, Österreich

## 2.8 Zytokine

Es wurde humanes IFN $\gamma$  der Firma Biomol (Hamburg) für die Stimulation der Zellen eingesetzt. IFN $\gamma$  wurde, wenn nicht anders abgegeben, in der Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l verwendet.

## 2.9 Plasmide

pEGFP-N1	4,7 kb langer, optimierter Vektor mit verbesserten Fluoreszenz zur Expression von N-terminalen GFP-Fusionsplasmiden in Säugerzellen	Clontech, Mountain View, USA
pSTAT1 $\alpha$ -GFP	Humane STAT1 $\alpha$ -cDNA (AS 1- 747) in pEGFP-N1	Begitt et al. 2000
pSTAT1 $\alpha$ (E449A)-GFP	durch sequenzspezifische Mutation entstandenes Derivat von STAT1 $\alpha$ -GFP1, verwendetes Primerpaar: E449AF/E449AR	die vorliegende Arbeit
pcDNA3.1	5,4 kb langer, eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3.1-STAT1 $\alpha$	humane STAT1 $\alpha$ -cDNA kloniert in pcDNA3.1	Dr. James E. Darnell, New York, USA
pcDNA3.1-STAT1 $\alpha$ (E449A)	durch sequenzspezifische Mutation entstandenes Derivat von	die vorliegende Arbeit



GAS-nonGAS F	5'-ttttcgtttccccgaaattgacggattacccaac-3'
GAS-nonGAS R	5'-ttttgtggggtaaatccgtcaatttcggggaaacg-3'
2xGAS F	5'-ttttgtttccccgaaattgacggattccccgaaac-3'
2xGAS R	5'-ttttgtttcggggaaatccgtcaatttcggggaaac-3'
2xnonGAS F	5'-ttttcgtttacccaatgacggattacccaac-3'
2xnonGAS R	5'-ttttgtggggtaaatccgtcaatttcggggtaaacg-3'

### Primer für die RT-PCR

Die angegebenen Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

hGAPDH F	5'-gaaggtgaaggtcggagtc-3'	hSTAT1 F	5'-ccgttttcatgacctcctgt-3'
hGAPDH R	5'-gaagatggatgggatttc-3'	hSTAT1 R	5'-tgaatattccccgactgagc-3'
hIRF1 F	5'-agctcagctgtgcgagtga-3'	hMCP1 F	5'-ccagtcacctgctgtataac-3'
hIRF1 R	5'-tagctgctgtggtcatcagg-3'	hMCP-1 R	5'-tggaatcctgaaccacttct-3'
hGBP1 F	5'-ggtccagttgctgaaagagc-3'	hCXC10 F	5'-gtgagaagagatgtctgaatc-3'
hGBP1 R	5'-tgacaggaaggctctgtct-3'	hCXC10 R	5'-gtccatccttgaagcactgc-3'
hMIG1 F	5'-ccaccgagatccttatcgaa-3'	hSTAT3 F	5'-cccttgattgagagtcaaga-3'
hMIG1 R	5'-ctaaccgacttgctgcttc-3'	hSTAT3 R	5'-aagcggctatactgctggtc-3'

## 2.11 Bakterienstämme und Medien

E.coli DH5 $\alpha$  Genotyp: *F- $\phi$ 80dlacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-mk+) pboA supE44 lthi-1 gyrA96 relA1* von Stratagene, La Jolla, (USA)

E.coli XL1-Blue Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]* von Stratagene

Für die Anzucht der Bakterien wurden LB-Flüssigmedium, SOC-Medium oder LB-Agarplatten verwendet, deren Komponenten sich wie folgt zusammensetzten:

LB-Medium	LB-Agar	SOC-Medium
1% Trypton	1% Trypton	2% Trypton
0,5% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt
1% NaCl	1% NaCl	10 mM NaCl
	1,5% Agar-Agar	2,5 mM KCl
pH 7,0 (eingestellt durch NaOH)	pH 7,0 (eingestellt durch NaOH)	20 mM MgSO <sub>4</sub> pH 7,5

Die LB-Agarplatten und die LB-Flüssigmediums wurden für eine 30 min bei 1,5 bar und 121°C autoklaviert. Anschließend dienten Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) oder Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) als Selektionsmarker. Die Autoklavierung des SOC-Mediums lief für 20 min bei 121°C ab. Anschließend wurde dem Medium 20 mM steril gefilterte Glucose hinzugefügt.

## 2.12 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die Geräte und Verbrauchsmaterialien dieser Arbeit entstammen folgender Firmen:

Biometra	(Göttingen)	Nunc	(Roskilde, Dänemark)
B. Braun AG	(Melsungen)	PEQLAP	(Erlangen)
Carl Roth	(Karlsruhe)	Sarstedt	(Nümbrecht)

---

Eppendorf	(Hamburg)	Thermo-Fisher	(Dreieich)
Greiner Bio-One	(Frickenhausen)	VWR	(Darmstadt)

Falls erforderlich wurden diese in den jeweiligen Kapiteln detaillierter beschrieben.

## 3 Methoden

Die genutzten gentechnischen Methoden sind etablierte Verfahren zur Konstruktion und Charakterisierung von Mutanten zu untersuchender Proteine wie des STAT1-Moleküls. Im Folgenden werden die verwendeten Protokolle beschrieben, z.T. angelehnt an publizierte Dissertationsschriften der eigenen Arbeitsgruppe für Molekulare Psychokardiologie (Staab 2011; Bolten 2013; Naegeler 2014; Grebe 2016; Hüntelmann 2017).

### 3.1 Zellkulturmethoden

#### 3.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

In dieser Arbeit wurden U3A- und HeLa-S3-Zellen verwendet. Die Behandlung der Zellen erfolgte in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen) unter Sicherheitswerkbänken (HeraSafe K2, Thermo Scientific, Dreieich). Die U3A-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM, Biochrom, Berlin) kultiviert, welches 10% FCS (Biochrom) enthält. Außerdem wurden dem Medium 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Österreich) und 0,04 g/l Puromycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) hinzugegeben. Die HeLa-S3-Zellen hingegen wurden in Quantum 101 HeLa-Medium (PAA) mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAA) gehalten. Die Kultivierung geschah bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Luftanteil im Brutschrank (Heraeus, Thermo Scientific).

#### 3.1.2 Zellpassage

Alle zwei bis drei Tage erfolgte das Passagieren der Zellen. Dazu wurde den Zellen das Medium entfernt, sie einmal mit PBS gewaschen und ihnen für 5 min bei 37 °C 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,2 g/l EDTA) (Biochrom) hinzugegeben. Die Trypsinisierung wurde durch die Zugabe von 3–6 ml Medium wieder gestoppt. Nun konnte die entstandene Zellsuspension je nach zuvor beobachtetem Wachstumsgrad im Verhältnis 1:6 – 1:8 mit Medium verdünnt und erneut ausplattiert werden.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Mutagenese

Für die Mutagenese wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien) herangezogen. Als Matrizen dienten die Plasmide pcDNA3.1-STAT1 beziehungsweise pSTAT1 $\alpha$ -GFP. Als Primer dienten die Oligonukleotide E449A (FM) 5'-ggtttgtaattgacctc**gcg**acgacacctctgcccgttg-3' und E449A (RM) 3'-caacgggcagagaggtcgt**gcg**aggtcaattaccaacc-5'.

Die PCR-Reaktion für den Thermocycler (T3000 Thermocycler von Biometra) wurde mit 5  $\mu$ l 10 $\times$  Reaktionspuffer, 50 ng Matrizen-DNA, 125 ng 5'-Primer E449A (FM), 125 ng 3'-Primer E449A (RM), 1  $\mu$ l dNTP Mix, 1  $\mu$ l PfuUltra HF DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) und ddH<sub>2</sub>O zum Erreichen des Reaktionsvolumens von 50  $\mu$ l präpariert. Nach einer 30-sekündigen initialen Denaturierungsphase (95°C) folgten 12 Zyklen, bestehend aus einer 30-sekündigen Denaturierungsphase (95°C), einem 1-minütigen Annealing (55°C) und einer 14-minütigen Elongation. Nach einer 2-minütigen Abkühlung auf Eis auf folgte der Dpn-I-Verdau mit 10 U des Enzyms für 1 h bei 37°C (225 rpm). Dadurch wurde die parentale methylierte Matrizen-DNA abgebaut.

### **3.2.2 Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien**

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E.coli-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  bzw. in superkompetente XL1-blue E.coli-Zellen erfolgte mit Hilfe der Hitzeschock-Behandlung. Dazu wurden 100  $\mu$ l der DH5 $\alpha$ - bzw. 50  $\mu$ l der XL1-blue-Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit einem der mit Dpn I verdauten Vektor-DNA für 30 min auf Eis gelagert. Die Hitzeschock-Behandlung der DH5 $\alpha$ -Zellen erfolgte über 30 Sekunden bzw. der XL1-blue-Zellen über 45 Sekunden bei 42°C. Darauf folgte eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Nach Überführung der transformierten Zellsuspension in 0,5 ml SOC-Medium und anschließender Inkubation für 1 h bei 37°C (225 rpm) erfolgte die mehrstündige kulturelle Anzucht über Nacht und antibiotische Selektion. Die pcDNA-Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenz, die GFP-DNA-Plasmide eine solche für

### **3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien**

Für die Minipräparationen von Plasmid-DNA wurden 2 ml der über Nacht inkubierten Bakterienkultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Aus dem entstandenen Zellpellet wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) nach Herstellerangaben isoliert und zur Sequenzierung verwendet. Für Maxipräparationen einer größeren Menge an reiner Plasmid-DNA wurden 2 ml der transformierten Bakterienstämme einer Übertagkultur in 100 ml antibiotikumhaltigen LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation. Entsprechend den Herstellerangaben des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA. Die mit DNase-freies Wasser eluierte DNA wurde nach Bestimmung der Konzentration auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 3.2.4 Sequenzierung

Der Sequenzierungsansatz, bestehend aus 6  $\mu\text{l}$  Minipräp-DNA, 1  $\mu\text{l}$  Sequenzierungsprimer und 8  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , wurde nach Sanger von Sequence Laboratories (Göttingen) untersucht und die jeweilige Mutation bestätigt.

### 3.2.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA

Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde photometrisch (BioPhotometer Plus, Eppendorf) mit einer 70- $\mu\text{l}$ -UV-Küvette (Brand, Wertheim) bestimmt. Dazu diente 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  als Blindwert. Die Formel für die DNA-Konzentration in [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] lautete:  $A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ . Die Reinheit der Plasmid-DNA wurde durch Messung der Extinktion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  und der Berechnung des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt. Dieser Quotient sollte  $\sim 1,8$  nicht übersteigen. Für das GFP-DNA-Konstrukt des für die Mutante kodierenden Plasmids lag beispielsweise der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  bei 1,55, für das pcDNA-Plasmid bei 1,52.

### 3.2.6 Transfektion von U3A-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Gewinnung von Gesamtzelextrakten für Western-Blot- oder EMSA-Versuchen wurden tags zuvor ausplattierte U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen mit Wildtyp-STAT1-Vektoren für pcDNA und GFP-DNA bzw. den Vektoren pcDNA3.1-STAT1 $\alpha$ E449A und pSTAT1 $\alpha$ E449A-GFP für die Mutante nach Herstellerangaben transfiziert. Als Transfektionsreagenzien dienten Megatran (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA), Plasmid-DNA und NaCl. Für eine 6-Loch-Platte wurden 1,6  $\mu\text{g}$  DNA, für einen 8-Kammer-Objektträger 0,1  $\mu\text{g}$  DNA und für eine 48-Loch-Platte je Loch 0,25  $\mu\text{g}$  DNA verwendet. Das NaCl hatte eine Molarität von 150 M. Das Transfektionsreagenz wurde gevortext, 10 Min bei Raumtemperatur stehengelassen und auf die Zellen gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation für eine Nacht im Inkubator bei 37°C.

### 3.2.7 Stimulation von U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen mit IFN $\gamma$ und Behandlung mit Staurosporin

Am Tag zuvor transfizierte U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen wurden, wenn nicht anders vorgesehen, mit IFN $\gamma$  der Konzentration 0,5 ng/ $\mu\text{l}$  stimuliert. Zum Beenden der Stimulation diente der Kinaseinhibitor Staurosporin, der in einer Konzentration von 1 ng/ $\mu\text{l}$  verwendet wurde.

### 3.2.8 Präparation von Gesamtproteinextrakten aus U3A- bzw. HeLa-S3-Zellen

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden alle erforderlichen Arbeiten auf Eis ausgeführt; eingesetzte Puffer waren stets gekühlt. Zunächst wurde den Zellen 50  $\mu\text{l}$  Cytosolischer Puffer (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM

$\text{Na}_3\text{VO}_4$ , pH 7,4) hinzugefügt. Einem Volumen von 2 ml des Puffers wurden zuvor noch 20  $\mu\text{l}$  Complete, 6  $\mu\text{l}$  1 M DTT, 2  $\mu\text{l}$  0,4 M Pefabloc und 2  $\mu\text{l}$  Igepal beigemischt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Untergrund gelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 30 min bei  $16,1 \times 10^3$  rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß überführt, dieses erneut für 5 min bei  $16,1 \times 10^3$  rpm zentrifugiert und der Überstand dann in ein korrekt beschriftetes, neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das Pellet im ersten Eppendorf-Gefäß wurde mit 50  $\mu\text{l}$  Nukleären Puffer (20 mM HEPES, 420 mM KCl, 20 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , pH 7,4) versehen und 30 min auf Eis gelagert. Einer Menge von 1 ml Nukleärem Puffer wurden 10  $\mu\text{l}$  der Complete-Stocklösung, 3  $\mu\text{l}$  1 M DTT und 1  $\mu\text{l}$  0,4 M Pefabloc zugesetzt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei  $16,1 \times 10^3$  rpm für 15 min. Nun wurde der Überstand zum Eppendorf-Gefäß hinzugefügt. Falls die Extrakte ausschließlich für Western-Blot-Versuche vorgesehen waren, wurden sie mit einem Siebtel ihres Volumens mit SDS-Puffer (350 mM Tris-HCl, 8% SDS, 30% Glycerin, 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenolblau) 3 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend bei -20°C eingefroren. Für Gelshift-Experimente wurden die Extrakte hingegen sofort bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel zwischen beide Glasplatten eingefüllt (Minigel-Twin, Biometra, Göttingen). Die Kante wurde mit Isopropanol geglättet, das Gel polymerisierte 20 min. Das Trenngel bestand aus 10% (v/v) Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1), 0,03% APS, 0,16% TEMED und 4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Hydrochlorid, 0,04% SDS, pH 8,8). Nun wurde das Isopropanol verworfen, das Sammelgel mit dem Kamm eingebracht und 20 min belassen. Das Sammelgel bestand aus 5% Rotiphorese 30, 0,06% APS, 0,2% TEMED und 4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-Hydrochlorid, 0,4% SDS, pH 6,8). Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach Gewicht und Ladung wurde SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycerin, 0,1% SDS, pH 8,6) verwendet. Jede Bahn wurde mit 16  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt-SDS-Puffer-Mix versehen. Als Laufkontrolle diente 8  $\mu\text{l}$  SDS-Puffer mit Molekulargewichtsmarkern. Die Spannung betrug pro Gel 11 mA, die Laufzeit 2 bis 2,5 h.

### 3.2.10 Western-Blotting

Mittels Semi-Dry-Blot (Fastblot B44, Biometra, Göttingen) wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Schwalbach/Ts) aufgetragen. Dazu wurde die PVDF-Membran zuerst 5 min in 100% Methanol aktiviert, in Transferpuffer (100 ml 10 x Transferpuffer (30,29 g Tris-Base (25 mM) plus 113 g Glycerin (150 mM)), 100 ml Methanol und 800 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) zwischengelagert und mit Hilfe von zwei Whatman-Papieren für etwa 1,5 h bei 80 mA pro Gel geblottet. Zur Darstellung von phosphoryliertem STAT1 bzw. Gesamt-STAT1 wurde die PVDF-Membran

mit den Primärantikörpern pTyr701, pSer727 oder C24 behandelt und durch einen fluoreszierenden Sekundärantikörper (IRDye-gekoppelt) für das LI-COR Odyssey SS Imaging System (Bioscience, Bad Homburg) sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran kurz in TBS-T (1x TBS, 0,05% (v/v) Tween-20) vorgelegt, um dann für 1 h mit 5 ml 4% BSA in TBS-T-Lösung auf dem Schüttler blockiert zu werden. Danach erfolgte die Behandlung mit dem Primärantikörper (1/1000 in 4% BSA in TBS-T) für eine Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C. Am nächsten Tag erfolgte als erstes ein 5 mal 5-minütiger TBS-T-Waschschritt, bevor der Zweitantikörper (1/10 x 10<sup>3</sup> in 4% BSA in TBS-T) für 1 h unter Lichtabdeckung hinzugegeben wurde. Anschließend erfolgten wiederum ein 5 mal 5-minütiger TBS-T-Waschschritt sowie eine einzige 5-minütige TBS-Waschung. Nun konnte die PVDF-Membran mit dem Odyssey-Sa-Imaging-System eingelesen werden. Zur Darstellung eines weiteren Primärantikörpers wurde die PVDF-Membran für 1 h mit dem Ablösepuffer (2% SDS, 0,7%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8) bei 60 °C gestriipt, einmal 15-minütig mit 10 ml TBS-T und dreimal 15-minütig mit 5 ml TBS-T gewaschen, bevor sie für 1 h mit 5 ml 4% BSA in TBS-T-Lösung auf dem Schüttler blockiert werden konnte. Die weitere Präparation des Sekundärantikörpers erfolgte analog zum ersten.

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

#### 3.2.11.1 Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente

DNA-STAT1-Interaktionen wurde mittels EMSA-Verfahren untersucht. Dazu dienten radioaktiv markierte Doppelstrang-Oligonukleotide. Als Motive für die Sonden wurden verwendet: eine einfache (M67), eine zweifache (2xGAS), zwei degenerierte (2xnonGAS) sowie eine kanonische mit einer degenerierten GAS-Bindestelle (GASnonGAS). Als erstes wurden die teilweise komplementären Oligonukleotide zu Doppelstrang-DNA-Fragmenten hybridisiert, indem man sie bei 95°C für 5 min in Oligo-Puffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) inkubierte, abkühlen ließ und dann zur weiteren Verwendung bei -20°C lagerte. Die radioaktive Markierung erfolgte mittels 3'-Endmarkierung mit  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-dATP. Dazu verwendete wurde das Klenow-Fragment, ein Proteinfragment der DNA-Polymerase 1 aus *E. coli*, welches am 5'-Ende überstehende Basen mit ihrer 5'→3' Polymerase-Aktivität am Gegenstrang auffüllt. Fünf Einheiten des Klenow-Fragments wurden mit 0,1 ng Oligonukleotiden, 6  $\mu$ l des radioaktiven dATP und 5 ml 10 x Eco-Pol-Puffer (New England, Biolabs, Frankfurt am Main) vermischt und 25 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Beendet wurde die Markierung durch eine 5-minütige Zugabe an unmarkiertem dATP im Überschuss und anschließender Zugabe von 1  $\mu$ l 0,5 molarer EDTA-Lösung. Die Menge der freien Nukleotide wurde chromatographisch mittels Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen (GE Healthcare, München) bei 700 g für 3 min reduziert.

### 3.2.11.2 EMSA-Reaktionen

Für eine EMSA-Reaktion wurden 4  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5  $\mu\text{l}$  Poly-dI/dC (2 mg/ml), 2,5  $\mu\text{l}$  5x Gelshift-Puffer (100 mM Hepes, 200 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20% Ficoll, pH 7,9), 0,2  $\mu\text{l}$   $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ -markierte Sonde und 1,3  $\mu\text{l}$  DTT (100 mM) zu einem Mastermix angesetzt. 4,5  $\mu\text{l}$  der Gesamtzellproteinextrakte und 8,5  $\mu\text{l}$  des Mastermixes ergaben die Beladung pro Bande. Für Supershifts wurden zu diesem Ansatz noch 2  $\mu\text{l}$  Anti-STAT1-Antikörper (STAT1 $\alpha$ p91, 1/100 in PBS (8% NaCl, 0,2% KCl, 1,5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )) bzw. Anti-STAT3-Antikörper (STAT3(H-190), 1/100 in PBS), beide von Santa Cruz erworben, hinzugefügt. Diese Reaktionen wurden dann für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle eines Kompetitionsversuches wurde dem Ansatz entweder für 0, 5 oder 10 min 2  $\mu\text{l}$  radioaktiv unmarkierte 2xGAS-Sonde im 750-fach molaren Überschuss auf Eis hinzugegeben. Dazu nutze man Gesamtzellextrakte aus Zellen, die zuvor 45 min mit  $\text{IFN}\gamma$  (0,5 ng/ $\mu\text{l}$ ) stimuliert wurden. Zwei Gele für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Protein-Komplexen wurden mit 61 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 3,6 ml 5x TBE (20 ml 0,5 M EDTA, 54 g Tris, 27,5 g Borsäure auf 1 l), 9 ml Rotiphorese (Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)), 1,5 ml 10% APS und 7,5  $\mu\text{l}$  TEMED gegossen und für 2 h bei 400 V in 0,25 x TBE-Laufpuffer bei 4°C präequilibriert. Die beladenen Gele liefen schließlich ca. 3 h bei 400 V und 4°C ebenfalls mit 0,25 x TBE-Laufpuffer. Auf Whatman-Papier (Albet Lab Science, Dassel) übertragen wurden die Gele bei 85°C für etwa 1 h vakuumgetrocknet. Anschließend wurden sie auf eine Phosphor-Imager-Folie über Nacht bzw. auch mehrere Tage übertragen und schließlich mit Hilfe des Fujifilm FLA-5100 Scanners (Fuji, Düsseldorf) eingelesen.

### 3.2.12 Reporteragen-Assay

Durch Kopplung des Luciferase-Gens mit Promotoren für STAT1 wurde die Zielgenaktivierung des Transkriptionsfaktors bestimmt. Dazu wurden die Reporter-Konstrukte 3xLy6E, pIC-339 und pIC-1352 verwendet. 3xLy6E ist ein Plasmid, bestehend aus einer 3-fachen GAS-Bindestelle gefolgt vom Luciferasegen. pIC-339 und pIC-1352 sind Konstrukte aus dem ICAM-1-Promotor, ebenfalls gefolgt vom Luciferasegen. Zunächst wurden U3A-Zellen in je 12 Wells einer 48-Lochplatte mit den DNA-Plasmiden pSTAT1 $\alpha$ -GFP bzw. pSTAT1 $\alpha$ E449A-GFP transfiziert. Der Ansatz für 13 Wells wurde gebildet durch 650  $\mu\text{l}$  150 mM NaCl, 6,5  $\mu\text{g}$  GFP-DNA-Vektor, 3  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Galactosidase-Reporterplasmid, 1  $\mu\text{g}$  3xLy6E-Plasmid bzw. pIC-339-Plasmid oder des pIC-1352-Plasmid und 20,3  $\mu\text{g}$  Megatran. Der Ansatz wurde 10 Sekunden gevortext, 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen und zu je 50  $\mu\text{l}$  pro Well aufgetragen. Die transfizierten Wells wurden für eine Nacht bei 37°C inkubiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte am folgenden Tag mit  $\text{IFN}\gamma$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), verdünnt auf 1:1000 in Vollmedium, für 6 h bei 37°C. Die 48-Lochplatte wurde mit PBS (Gibco) gewaschen und auf Eis trocken pipettiert. Nun wurden 5 ml Triton-Glycylglycin-Lysepuffer (25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 1% Triton X-100, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM EGTA) mit 15  $\mu\text{l}$  DTT, 5  $\mu\text{l}$  Pefabloc und 50  $\mu\text{l}$  Complete angesetzt und 100  $\mu\text{l}$  davon auf je ein Loch der 48-

Lochplatte gegeben. Die Zellen wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspensionen wurden für 15 min bei  $13 \times 10^3$  rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert.  $20 \mu\text{l}$  des Überstandes wurden zur Luciferase-Aktivitätsmessung auf eine Mikrotiterplatte überführt und weitere  $20 \mu\text{l}$  kamen in ein Eppendorf-Gefäß zur Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.

### 3.2.13 Messung der Luciferase-Aktivität

Die Aktivität der Luciferase wurde mit Hilfe des Luminometer Centro XS3 LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) bestimmt, indem in jedes Loch  $50 \mu\text{l}$  des Luciferase-Assay-Puffers injiziert wurden und die Aktivität gemessen wurde. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm MikroWin, Version 4.41.

### 3.2.14 Messung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

Als Kontrolle diente ein STAT1-unabhängiges, konsekutiv exprimiertes Gen für die  $\beta$ -Galactosidase, welches in Plasmidform in den Zellen kotransfiziert wurde. Es diente zur Normierung von transfektionellen und pipettiertechnischen Schwankungen. Dazu wurden jeder  $20 \mu\text{l}$  Probe insgesamt  $66 \mu\text{l}$  ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid ( $4 \text{ mg/ml}$  ONPG in  $100 \text{ mM Na}_3\text{PO}_4$ , pH 7,1),  $3 \mu\text{l}$   $100 \times \text{Mg}$  ( $100 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $4,5 \text{ mM } \beta$ -Mercaptoethanol) und  $211 \mu\text{l}$  Phosphat-Puffer ( $100 \text{ mM Na}_3\text{PO}_4$ , pH 7,1) hinzugefügt und es wurde gewartet, bis eine leichte Gelbfärbung auftrat. Nun wurde die Reaktion mit jeweils  $500 \mu\text{l}$  Stopp-Pufferlösung ( $0,5 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ ) beendet.  $150 \mu\text{l}$  des Ansatzes wurden nun mit Hilfe des Infinite 200 PRO (TECAN, Männedorf, Schweiz) photometrisch bei einer Wellenlänge von  $420 \text{ nm}$  gemessen. Abschließend wurde die Luciferase-Aktivität durch die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität-Aktivität dividiert und die Standardabweichungen und Mittelwerte dieser Quotienten zur Normierung aus Sechsfach-Messungen gebildet. Hierzu dienten die Computerprogramme Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) und Sigmablot (Systat Software, Erkrath).

### 3.2.15 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Zur Analyse der subzellulären Verteilung wurden zunächst U3A-Zellen für die direkte Fluoreszenzmikroskopie oder HeLa-Zellen für Immunfärbungen auf 8-Kammer-Chamberslides (Lab-Tek Chamber Slides, Thermo Fisher Scientific) ausplattiert, kultiviert und am Folgetag mit  $20 \mu\text{l}$  Mastermix (je  $1,6 \mu\text{g}$  der DNA-Konstrukte pSTAT1 $\alpha$ -GFP oder pSTAT1 $\alpha$ E449A-GFP,  $2,4 \mu\text{l}$  Megatran und  $80 \mu\text{l}$   $150 \text{ mM NaCl}$ ) transfiziert. Nach einer Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht wurden die Zellen stimuliert. Für die Immunfärbung wurden sie entweder nicht, für 45 min mit IFN $\gamma$  ( $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ), für 45 min mit IFN $\gamma$  und 30 min mit Staurosporin ( $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) oder für 45 min mit IFN $\gamma$  und 1 h mit Staurosporin stimuliert. Für die Hoechstfärbung wurden sie entweder nicht, für 45 min mit IFN $\gamma$ , für 45 min mit IFN $\gamma$  und 1 h mit Staurosporin oder für 45 min mit IFN $\gamma$  und 2 h mit Staurosporin stimuliert.

### 3.2.16 Immunfärbung

Nach der Stimulation erfolgte eine 15-minütige Methanolfixierung mit 200  $\mu$ l pro Well bei  $-20$  °C. Es erfolgten ein einmaliger Waschschrift mit PBS, danach eine 20-minütige Permeabilisierung mit 1% Triton-X 100 in PBS auf dem Schüttler und ein zweifacher Waschschrift mit PBS. Danach wurde der Ansatz für 45 min mit 200  $\mu$ l 25% FCS in PBS blockiert. Nun konnte der erste Antikörper C24 (200  $\mu$ l, 1:1000 in 25% FCS) für 45 min bei Raumtemperatur inkubieren. Nach der Inkubation des ersten Antikörpers erfolgten drei Waschschriffe mit PBS, bevor der Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (200  $\mu$ l, 1:5000) für abermals 45 min bei Raumtemperatur einwirken konnte. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend erfolgte die Kernfärbung nach Hoechst (siehe unten).

### 3.2.17 Hoechstfärbung

Falls noch keine Methanolfixierung erfolgt war (Immunfärbung), wurden die Zellen zunächst je Loch mit 300  $\mu$ l 4-prozentigem Formalin fixiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS und einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nun erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit 300  $\mu$ l pro Loch Hoechstlösung (Hoechst 33258 (Sigma Aldrich), 1:5000 in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren PBS- und einem H<sub>2</sub>O-Waschschrift erfolgte die blasenfreie Eindeckung mit Hilfe des Fluoromount-G-Eindeckmediums. Zur immuncytochemischen Detektion diente ein Axiovert-200M-Mikroskop (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen). Die Bildaufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (Intas, Science Imaging Instruments, Göttingen) erstellt. Zur GFP-Detektion diente die Wellenlänge von 480 nm, für die Aufnahme der Zellkerne nach Hoechst diente die Wellenlänge von 280 nm. Zur weiteren Bildbearbeitung wurde das Programm ImageJ 1.48v (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) verwendet.

### 3.2.18 RNA-Isolation

U3A-Zellen wurden zunächst in Vollmedium auf 6-Loch-Platten ausplattiert. Nach einem Tag erfolgte ein Wechsel auf Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), welchem 1% fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt worden war, und die Transfektion mit pcDNA-Konstrukten (Wildtyp und E449A-Mutante). Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder nicht oder für 6 bis 8 h mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem peqGOLD-Total-RNA-Kit (PEQLAB) nach Herstellerangaben.

### 3.2.19 Synthese von cDNA aus RNA

Zur Synthese von cDNA aus RNA diente das Verso-cDNA-Kit von Thermo Fisher Scientific. Dazu wurde folgender Mastermix pro 8  $\mu$ l Probe benutzt. 4  $\mu$ l 5 x Puffer, 2  $\mu$ l dNTP

Mix, 1  $\mu$ l RNA Primer, 1  $\mu$ l RT Enhancer, 1  $\mu$ l Verso Enzymmix und 3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Für die qRT-PCR wurde der T3000-Thermocycler von Biometra verwendet. Dazu fand erst eine 30-minütige cDNA-Synthese bei 42°C statt, gefolgt von einer 2-minütigen Erhitzung auf 95°C. Die Lagerung der cDNA erfolgte abschließend bei -20°C.

### 3.2.20 qRT-PCR

Zunächst wurden die Mastermixe anhand des Kits Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix von Thermo Scientific pro zu untersuchendem Primerpaar hergestellt. Folgende Primer wurden verwendet: GAPDH F und R, STAT1 F und R, IRF1 F und R, GBP1 F und R, MIG1 F und R, CXCL10 F und R, MCP1 F und R und STAT3 F und R (Sigma Aldrich). Dazu wurden 76  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, je 2,5  $\mu$ l Primer F und R und 90  $\mu$ l SYBR-Green für einen 9-fachen Mastermix zusammengefügt. Aufgetragen wurde jeweils eine Doppelprobe von je 1  $\mu$ l aus RNA-Isolaten von STAT1-WT-exprimierenden, unstimulierten U3A-Zellen. Weitere Proben enthielten Extrakte von STAT1-WT-exprimierenden Zellen mit 6- bis 8-stündiger IFN $\gamma$ -Stimulation (0,5 ng/ $\mu$ l), unstimulierte STAT1-E449A exprimierende Zellen und IFN $\gamma$ -stimulierte, STAT1-E449A-exprimierende Zellen. Zur Normierung der Ergebnisse diente das konstitutiv exprimierte *GAPDH*-Gen. Gemessen wurde der jeweilige C<sub>t</sub>-Wert jeder Probe. Für die Analyse wurden wiederum die Programme SigmaPlot und Microsoft Office-Excel verwendet. Es wurden die vier möglichen Differenzen von untersuchter Probe und GAPDH-Wert sowie deren Mittelwerte ermittelt. Die Unterschiede der Mittelwerte zu den Differenzen wurden anschließend zur Basis 2 potenziert und graphisch als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

## 4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde mittels gentechnischer Methoden eine Mutante mit der Punktmutation E449A innerhalb der Aminosäuresequenz des humanen STAT1-Moleküls generiert. Einfachheitshalber werden im Weiteren die Formulierungen E449A-Mutante bzw. STAT1-E449A verwendet. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der spezifischen Eigenschaften jener Mutante. Darunter fielen die Phosphorylierungskinetik, die induzierbare Kernakkumulation, die Zielgenaktivierung, das DNA-Bindevverhalten und die transkriptionelle Aktivität. Die Aminosäuresequenz, in dem die Punktmutation eingefügt worden ist, wurde zuvor in Hinblick auf eine mögliche Homologie innerhalb aller bekannten humanen STAT-Proteine analysiert. Es ist davon auszugehen, dass das Ausmaß der Homologie mit dem Grad der evolutionären Konservierung innerhalb dieser Proteinfamilie positiv korreliert.

### 4.1 Homologie von E449 im Sequenzvergleich der STAT-Isoformen

Zur Untersuchung einer möglichen Sequenzhomologie innerhalb der humanen Familienmitglieder von STAT wurde die NCBI-Datenbank für Proteine herangezogen. Die Entscheidung, den Aminosäurerest E449 für die Mutagenese von STAT1 zu verwenden, hat mehrere Gründe. Der negativ geladene Glutaminsäurerest an Position 449 von STAT1 ist relativ gut innerhalb der unterschiedlichen STAT-Proteine konserviert. Zudem ist anhand der verfügbaren Kristallstruktur von Chen und Koautoren ersichtlich, dass diese Position oberflächlich innerhalb einer  $\beta$ -Faltblattstruktur gelegen ist (Chen et al. 1998). Zusammen mit der Tatsache, dass es sich bei der Glutaminsäure um eine negativ geladene Aminosäure handelt, ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass diesem Aminosäurerest eine spezifische Funktion zukommen könnte.

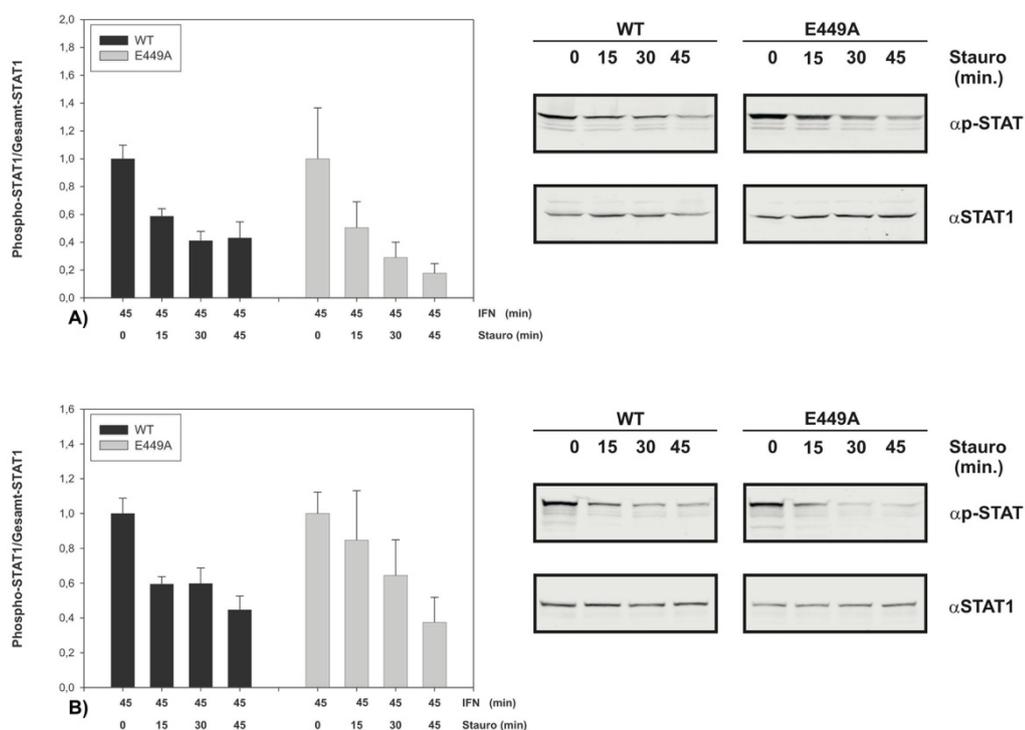
STAT1	431	HLSLFETQLC	QPGLVIDLET	TSLPVVVISN	461
STAT2	429	HIISFTVKYT	YQGLKQELKT	DTLPVVIISN	459
STAT3	437	HLITFETEVY	HQGLKIDLET	HSLPVVVISN	467
STAT4	428	HSITFETQIC	LYGLTIDLET	SSLPVMVISN	458
STAT5a	440	FTVLFESQFS	VGSNELVFQV	KTLSPVVVI	470
STAT5b	440	FTILFESQFS	VGGNELVFQV	KTLSPVVVI	470
STAT6	384	CAVLFSASFT	LGPGKLPQL	QALSLPLVVI	414

**Tab.1: Partielle Sequenzhomologie an AS-Position E449 von STAT1.**

Der negativ geladene Glutaminsäurerest (E) an Position 449 von STAT1 ist vergleichsweise gut konserviert innerhalb der verschiedenen humanen STAT-Proteine. Der Aminosäurerest an Position 449 von STAT1 ist in Rot geschrieben und gelb hervorgehoben. Die Sequenzen stammen aus der NCBI-Datenbank für Proteine (STAT1: NCBI Reference Sequence: NP\_009330.1; STAT2: GenBank: AAA98760.1; STAT2: GenBank: AAA98760.1; STAT3: NCBI Reference Sequence: NP\_644805.1; STAT4: GenBank: AAH31212.1; STAT5a: GenBank: AAB06589.1; STAT5b: GenBank: AAC50485.2; STAT6: NCBI Reference Sequence: NP\_001171550.1)

## 4.2 Ähnliche Phosphorylierungskinetiken von STAT1-E449A und WT- STAT1

Um die Phosphorylierungskinetik der E449A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersuchen zu können, wurden U3A-Zellen ausplattiert, am nächsten Tag mit pcDNA- bzw. GFP-DNA-Plasmiden, kodierend für die Mutante E449A bzw. den Wildtyp, transfiziert und schließlich für 45 min mit IFN $\gamma$  (1 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Die Stimulation wurde mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin (1 ng/ $\mu$ l) in U3A-Vollmedium entweder nicht, für 15 min, für 30 min oder für 45 min gestoppt. Hinsichtlich der Phosphorylierungskinetik konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der E449A-Mutante und dem Wildtyp-Protein von STAT1 festgestellt werden.



**Abbildung 4: Kein Unterschied in der *In-vivo*-Phosphorylierungskinetik zwischen der E449A-Mutante und dem Wildtyp-Molekül.**

**A)** U3A-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3.1-STAT1 $\alpha$ , kodierend für den Wildtyp, oder pcDNA3.1-STAT1 $\alpha$ E449A, kodierend für die E449A-Mutante, transfiziert und 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) in U3A-Vollmedium stimuliert. Die Stimulation wurde mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin (1 ng/ $\mu$ l) in U3A-Vollmedium entweder nicht, für 15 min, für 30 min oder für 45 min gestoppt. Es erfolgte eine Präparation der Gesamtzell-extrakte und eine Analyse mittels Western-Blotting. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Phospho-STAT1/Gesamt-STAT1-Menge (Phosphorylierungsniveau bei 0 min Staurosporin auf 1 genormt) aus mindestens drei Versuchen. Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied im Phosphorylierungsverhalten zwischen Wildtyp und E449A-Mutante vor. **B)** U3A-Zellen wurden mit den Plasmiden pSTAT1 $\alpha$ -GFP, kodierend für den Wildtyp, oder pSTAT1 $\alpha$ E449A-GFP, kodierend für die E449A-Mutante, transfiziert und 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l in U3A-Vollmedium) stimuliert. Die Stimulation wurde mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin (1 ng/ $\mu$ l) entweder nicht, für 15 min, für 30 min oder für 45 min gestoppt. Es erfolgte eine Präparation der Gesamtzell-extrakte und deren Analyse mittels Western-Blotting. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der Phospho-STAT1/Gesamt-STAT1-Menge (Phosphorylierungsniveau bei 0 min Staurosporin auf 1 genormt) aus mindestens drei Versuchen. Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied im Phosphorylierungsverhalten zwischen dem Wildtyp-Molekül und der E449A-Mutante vor.

### 4.3 Vergleichbare Kernakkumulation der STAT1-E449A-Mutante zum STAT1-WT

Zur Untersuchung der Kernakkumulation von STAT1 wurden je nach Färbemethode HeLa-S3-Zellen oder U3A-Zellen ausplattiert, mit pEGFP-N1- bzw. pcDNA3.1-Plasmiden, kodierend für den Wildtyp oder die E449A-Mutante, transfiziert und schließlich für unterschiedliche Zeiten mit IFN $\gamma$  (1 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Die Stimulation wurde, wenn es erforderlich war, mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin (1 ng/ $\mu$ l) gestoppt. Bei Einsatz des GFP-Fusionsproteins wurde von einer verringerten konstitutiven Exportrate gegenüber unmarkierten, unphosphorylierten STAT1-Proteinen berichtet (Meyer et al. 2007). Daher wurden zur Untersuchung der zytokininduzierbaren Kernakkumulation der E449A-Mutante und des Wildtyps von STAT1 sowohl Plasmide, kodierend für das GFP-Fusionsproteine, als auch Plasmide, kodierend für unmarkierte Proteine, verwendet. Bei den unstimulierten Zellen sieht man eine panzelluläre Verteilung von STAT1 (jeweils oberste Reihe). Nach 45-minütiger IFN $\gamma$ -Stimulation kommt es zur Akkumulation von Phospho-STAT1 im Nukleus (jeweils zweite Reihe). Nach 30-minütiger (A, dritte Reihe) bzw. 60-minütiger (B, dritte Reihe) Inkubation mit Staurosporin, welches die JAKs hemmt, kommt es zur Umverteilung von STAT1 in das Zytoplasma. Dieser Effekt wird nach weiteren 30 (A, letzte Reihe) bzw. 60 (B, letzte Reihe) min noch verstärkt. In Bezug auf die Kernakkumulation zeigt die E449A-Mutante ein vergleichbares Verhalten im Vergleich zum Wildtyp von STAT1.

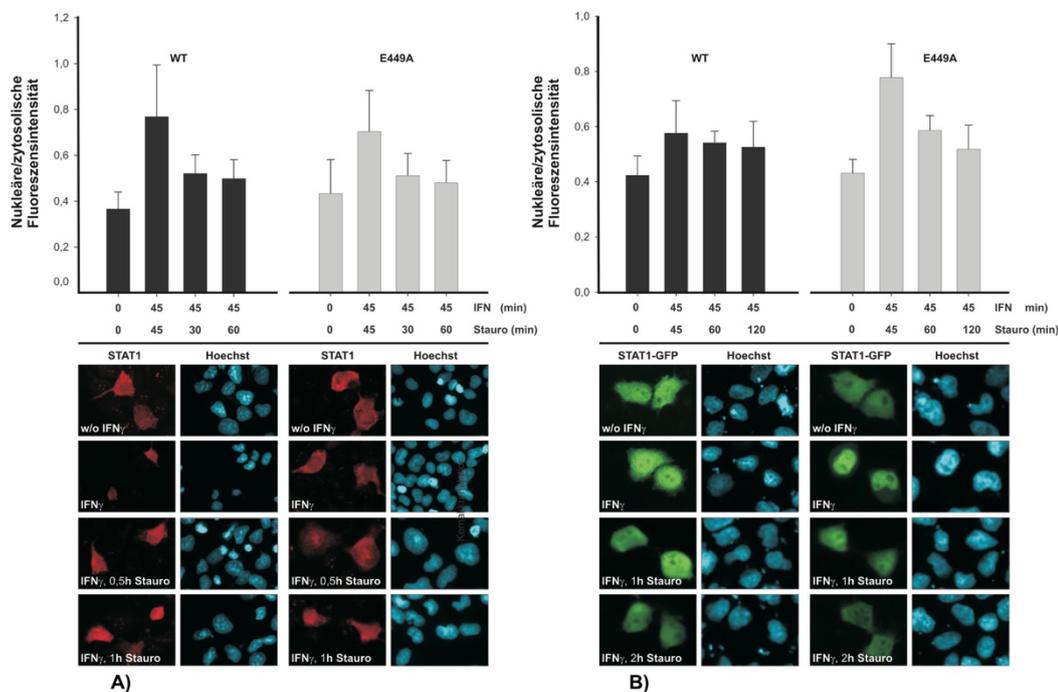
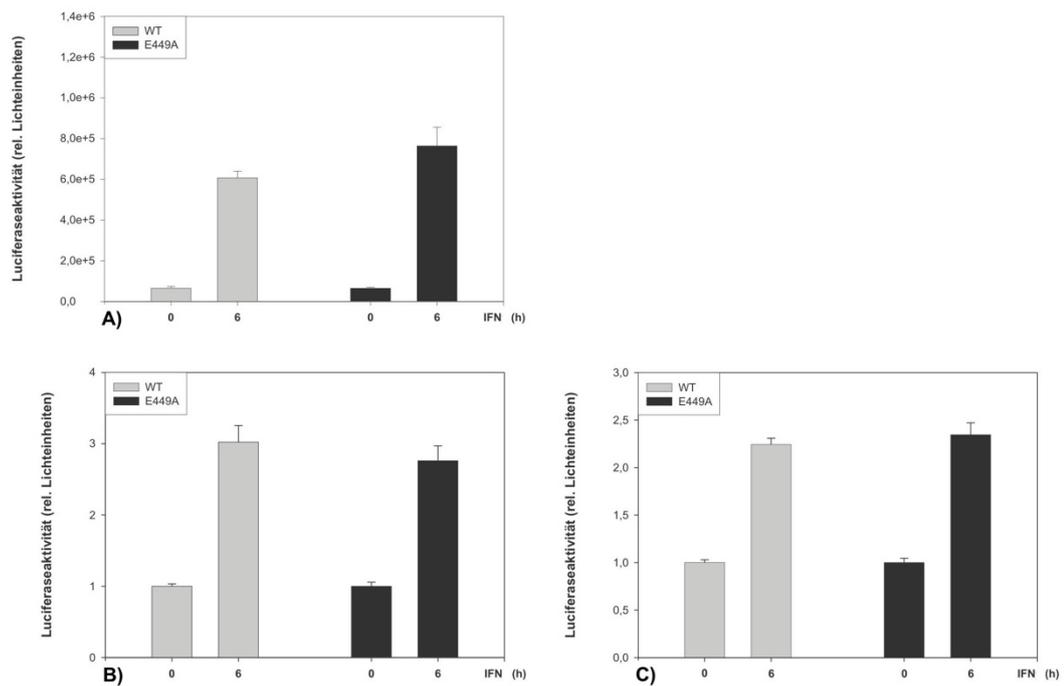


Abbildung 5: Vergleichbare Kernakkumulation von STAT1 im Wildtyp-Molekül und der E449A-Mutante.

**A)** Dargestellt ist die Immunfärbung mit anschließender Hoechst-Färbung. HeLa-S3-Zellen wurden mit GFP-DNA-Plasmiden, kodierend für den Wildtyp und die E449A-Mutante, transfiziert. Sie wurden am folgenden Tag nicht, für 45 min mit IFN $\gamma$  (1 ng/ $\mu$ l), für 45 min mit IFN $\gamma$  und 30 min mit Staurosporin (1 ng/ $\mu$ l) oder für 45 min mit IFN $\gamma$  und 1 h mit Staurosporin behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und E449A-Mutante bezüglich der Kernakkumulation von Phospho-STAT1. **B)** Dargestellt sind die Ergebnisse der direkten Fluoreszenzmikroskopie von STAT1-markierten U3A-Zellen. U3A-Zellen wurden mit pcDNA-Plasmiden, kodierend für den Wildtyp und die E449A-Mutante, transfiziert. Am folgenden Tag wurden sie entweder nicht, für 45 min mit IFN $\gamma$  (1 ng/ $\mu$ l), für 45 min mit IFN $\gamma$  und 1 h mit Staurosporin (1 ng/ $\mu$ l) oder für 45 min mit IFN $\gamma$  und 2 h mit Staurosporin behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede im Kernakkumulationsverhalten ausmachen.

#### 4.4 Regelhafte Zielgenaktivierung der E449A-Mutante verglichen zum STAT1-WT

Um die Zielgenaktivierung der E449A-Mutante von STAT1 im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen, wurden an das Luciferasegen gekoppelte Promotoren verwendet, die von STAT1 während der IFN $\gamma$ -Stimulation erkannt werden. Darunter fielen pIC-339 und pIC-1352, Promotoren mit einfacher GAS-Bindestelle für das ICAM-1-Protein (*intercellular adhesion molecule-1*), und 3xLy6E, ein Promotor mit dreifacher GAS-Bindestelle aus dem Gen für das Lymphozytenantigen-6E-Protein (Khan et al. 1993). U3A-Zellen wurden mit Plasmiden, kodierend für die E449A-Mutante und den Wildtyp von STAT1 und den Vektoren für die oben beschriebenen Promotoren pIC-339, pIC-1352 und 3xLy6E sowie dem  $\beta$ -Galactosidase-Reporterplasmid transfiziert und am Folgetag für 6 h mit IFN $\gamma$  (1 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Aus den aufgearbeiteten Gesamtzelllysaten wurde photometrisch die Luciferaseaktivität bestimmt. Zur Normierung diente die Aktivität der konsekutiv exprimierten  $\beta$ -Galactosidase. Dazu wurde eine Farbreaktion mit Hilfe von ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid durchgeführt und die Extinktion des entstandenen Farbstoffes ebenfalls photometrisch gemessen. Für die Promotoren pIC-339, pIC-1352 und 3xLy6E konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der E449A-Mutante und dem Wildtyp-Molekül von STAT1 bei der Zielgenerkennung von Promotorelementen aus dem Gen für ICAM-1 bzw. dem Lymphozytenantigen 6E festgestellt werden.

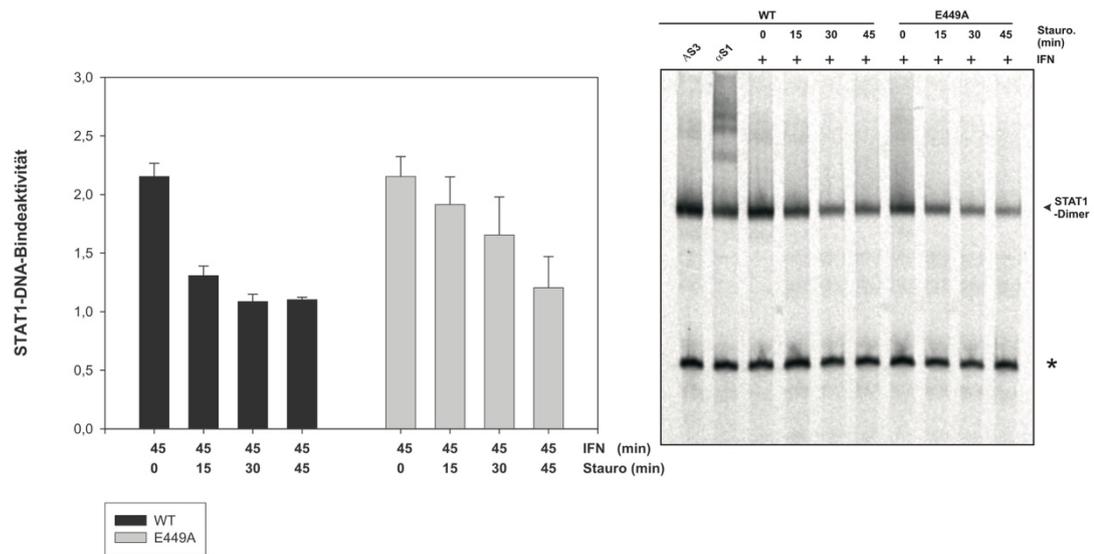


**Abbildung 6: Ähnliche Zielgenaktivierung von STAT1-WT im Vergleich zu STAT1-E449A mit Nutzung der Reporterplasmide 3xLy6E (Abb. A), pIC-339 (Abb. B) und pIC-1352 (Abb. C).**

U3A-Zellen wurden mit GFP-DNA-Plasmiden für den Wildtyp bzw. die Mutante E449A von STAT1 und dem **A)** 3xLy6E-, **B)** pIC-339- bzw. **C)** pIC-1352-Plasmid kotransfiziert und am Folgetag entweder nicht oder für 6 h mit IFN $\gamma$  (1 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Zu sehen ist die Luciferase-Aktivität normiert auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität-Aktivität vor oder nach 6-stündiger Stimulation. Es dienten vier unabhängige Messungen als Grundlage, deren Standardabweichungen und Mittelwerte hier dargestellt sind. Die Werte der unstimulierten Zellen wurden auf 1 normiert. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zielgenaktivierung des Wildtyps im Vergleich zur Mutante E449A bei Zuhilfenahme des Reporterplasmide 3xLy6E, pIC-339 und pIC-1352 feststellen.

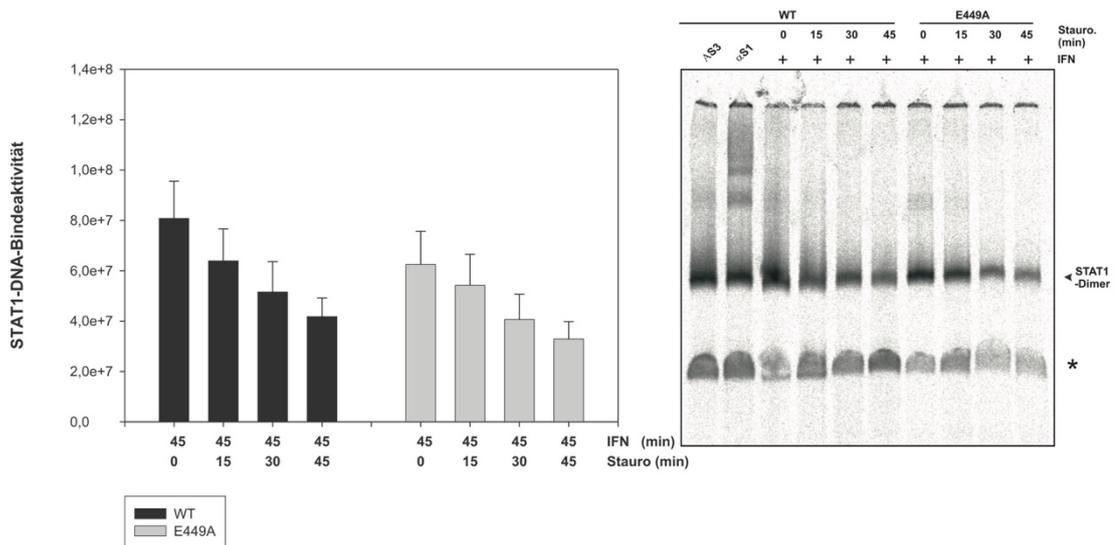
#### 4.5 Die STAT1-E449A-Mutante zeigt eine regelhafte Bindefähigkeit zu einfachen GAS-Bindestellen

Um die DNA-Bindefähigkeit der E449A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp von STAT1 untersuchen zu können, wurden U3A-Zellen, die mit Vektoren, kodierend für die E449A-Mutante oder den Wildtyp von STAT1, transfiziert wurden, 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Je nach Erfordernis wurde die Stimulierungsperiode der Zellen nach 0, 15, 30 oder 45 min lang mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin gestoppt. Aus den Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und für die EMSA-Reaktion genutzt. Als Sonde diente radioaktiv markierte M67-Sonde. Supershifts wurden mit Anti-STAT1-Antikörper bzw. als Kontrolle Anti-STAT3-Antikörper durchgeführt, bevor die elektrophoretische Auftrennung folgte. Wurden GFP-DNA-Plasmide genutzt, zeigte die E449A-Mutante eine geringere Abnahme der DNA-Bindeaktivität im Vergleich zum Wildtyp (vergleiche Abb. 7). Dieser Unterschied ließ sich bei Verwendung von pcDNA-Plasmiden und im Übrigen gleichartigem Versuchsprotokoll nicht reproduzieren (Abb. 8).



**Abbildung 7: Ähnliche DNA-Bindefähigkeit von GFP-Fusionsproteinen für die E449A-Mutante im Vergleich zum WT.**

U3A-Zellen wurden mit GFP-DNA-Plasmiden, kodierend für den Wildtyp bzw. die Mutante E449A, transfiziert und am Folgetag für 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Es wurde entweder nicht oder für 15, 30 bzw. 45 min Stausporin (1 ng/ $\mu$ l) hinzugegeben. Gesamtzell-extrakte wurden für die EMSA-Reaktionen genutzt. Als Sonde fungierte radioaktiv markierte M67-DNA. Es dienten vier unabhängige Versuche als Grundlage für die graphische Aufarbeitung. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler. Bahn 1 und Bahn 2 dienten als Supershift-Kontrolle zum Nachweis von STAT1. Genutzt wurden die Antikörper Anti-STAT3 (STAT3, H-190) und Anti-STAT1 (STAT1 $\alpha$ p91, C24). Bahnen 3 bis 6 zeigen eine Stausporin-abhängige Abnahme der phosphorylierten STAT1-WT-Dimere gebunden an M67, Bahnen 7 bis 10 für die E449A-Mutante ebenfalls. Es lässt sich bei Bahnen neun und zehn eine geringere Abnahme der DNA-Bindeaktivität der E449A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp von STAT1 nachweisen.



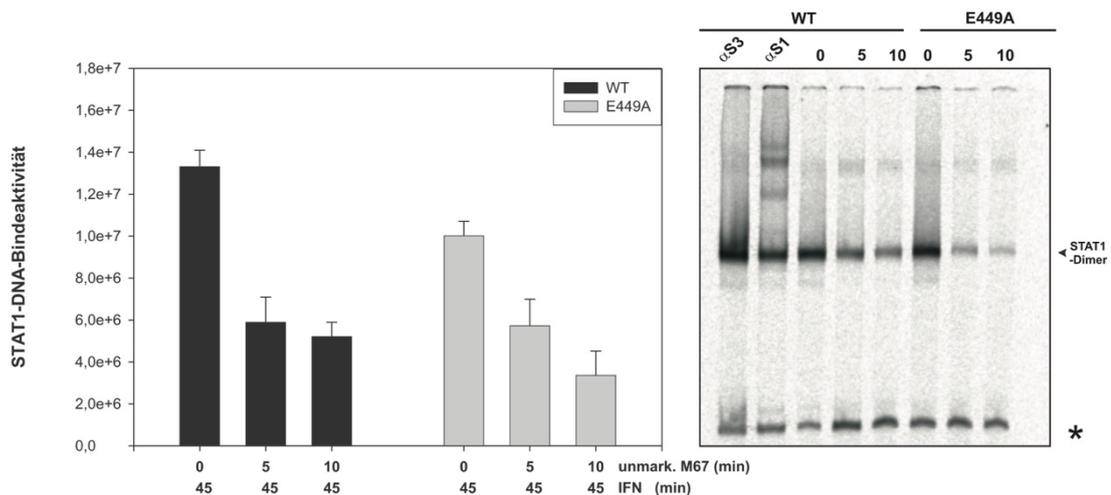
**Abbildung 8: Normale DNA-Bindefähigkeit der E449A-Mutante im Vergleich zum WT gezeigt als unmarkierte STAT1-Proteine.**

U3A-Zellen wurden mit pcDNA-Plasmiden, kodierend für das Wildtyp-Protein bzw. die Mutante E449A, transfiziert und am Folgetag für 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Es wurde für 0, 15, 30 bzw. 45 min Stausporin (1 ng/ $\mu$ l) hinzugegeben. Gesamtzell-extrakte wurden für die EMSA-Reaktion genutzt. Als Sonde wurde radioaktiv markierte M67-DNA eingesetzt. Vier unabhängige Versuche wurden durchgeführt; dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler. Es lässt sich kein Unterschied im DNA-Bindevverhalten von STAT1-Wildtyp im Vergleich zum STAT1-E449A feststellen. Bahnen 1 und 2 dienten als Supershift-Kontrolle zum Nachweis der STAT1-Identität.

Genutzt wurden die Antikörper Anti-STAT3 (STAT3, H-190) und Anti-STAT1 (STAT1 $\alpha$ p91, C24). Bahnen 3 bis 6 zeigen eine Staurosporin-abhängige Abnahme der phosphorylierten STAT1-Dimer-DNA-Interaktion des Wildtyps, Bahnen 7 bis 10 für die E449A-Mutante.

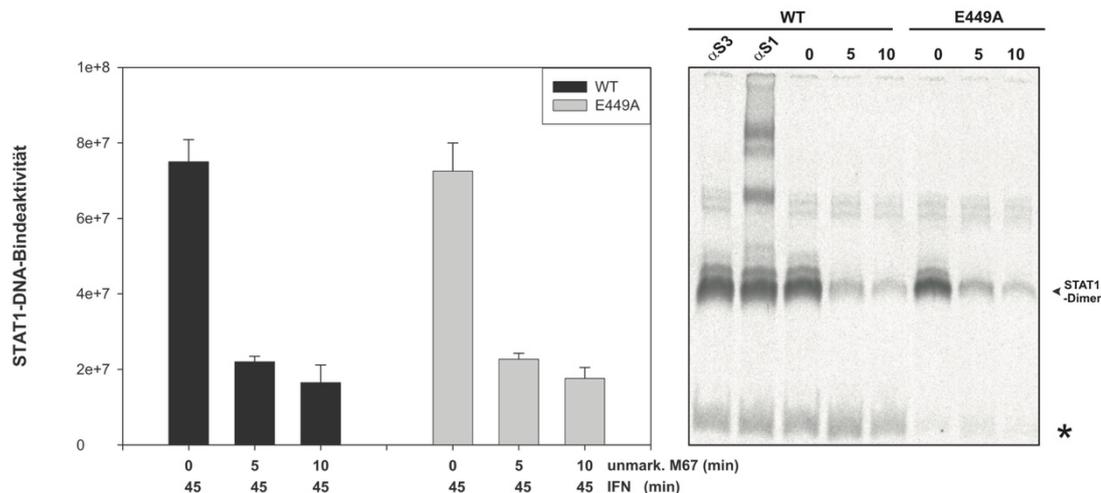
#### 4.6 Normale Dissoziation von einfachen GAS-Bindestellen der STAT1-E449A-Mutante

Gesamtzellextrakte wie im Kapitel 3.2.6 beschrieben wurden für EMSA-Reaktionen genutzt. Als Sonde diente ebenfalls eine radioaktiv markierte M67-Sonde mit einfacher GAS-Bindestelle. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gesamtzellextrakte für 0, 5 bzw. 10 min auf Eis mit unmarkierter M67-DNA im 750-fachen molaren Überschuss inkubiert, um die Dissoziation der STAT-Proteine von der einfachen GAS-Bindestelle darstellen zu können. Die radioaktiv markierte und die unmarkierte M67-DNA konkurrieren um die E449A-Mutante bzw. das Wildtyp-Dimer von STAT1. Es zeigte sich ein vergleichbares DNA-Dissoziationsverhalten der E449A-Mutante gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sowohl für die verwendeten GFP-Fusionsproteine (Abb. 9) wie auch für die entsprechenden nicht-markierten Varianten (Abb. 10).



**Abbildung 9: Regelhafte Dissoziation der STAT1-GFP-E449A-Mutante von der M67-Sonde.**

U3A-Zellen wurden mit pEGFP-N1-Konstrukten, kodierend für die E449A-Mutante bzw. das Wildtyp-Protein, transfiziert und am Folgetag für 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden für die EMSA-Reaktionen genutzt. Neben radioaktiv markierter, spezifischer M67-Sonde wurde unmarkierte M67-Sonde im 750-fachen molaren Überschuss für 0, 5 oder 10 min auf Eis zu den Gesamtzellextrakten hinzugegeben. Da es sich um eine spezifische Protein/DNA-Interaktion handelte, nahm die Signalintensität der Bande in Gegenwart von spezifischer Kompetitor-DNA ab. Es dienten vier unabhängige Versuche als Grundlage der graphischen Aufarbeitung, deren Standardabweichungen und Mittelwerte hier dargestellt sind. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied im Wettbewerbsversuch zwischen Wildtyp und E449A-Mutante von STAT1 nachweisen. Bahnen 1 und 2 dienten als Supershift-Kontrolle zum Nachweis von STAT1. Genutzt wurden die Antikörper Anti-STAT3 (STAT3(H-190)) und Anti-STAT1 (STAT1 $\alpha$ p91, C24). Bahnen 3 bis 5 zeigen den Wettbewerbsversuch mit dem Wildtyp-Dimer, Bahnen 6 bis 8 den der Mutante E449A.

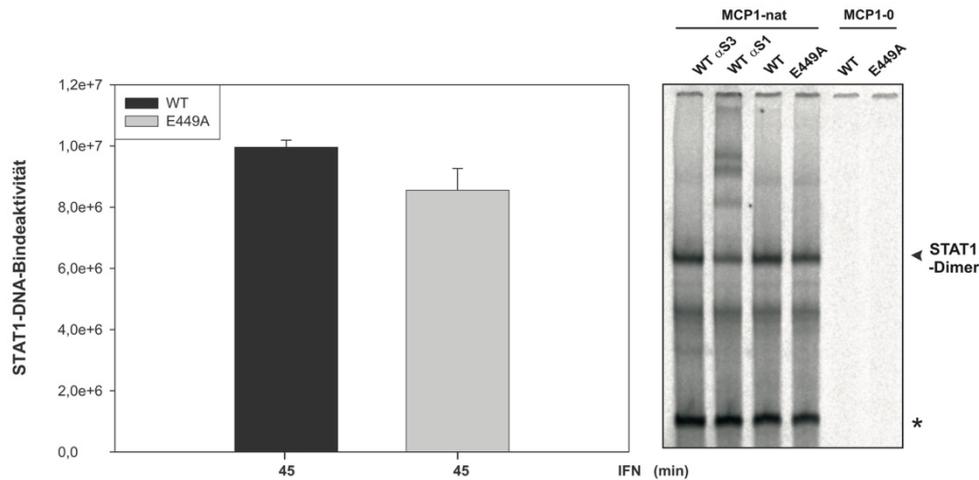


**Abbildung 10: Normale Dissoziationskinetik der E449A-Mutante von M67-Sonde im Vergleich zum Wildtyp.**

U3A-Zellen wurden mit pcDNA-Plasmiden transfiziert, kodierend für die STAT1-Proteine E449A bzw. den Wildtyp, und am Folgetag für 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden für die EMSA-Reaktion genutzt. Neben radioaktiv markierter, spezifischer M67-Sonde wurde unmarkierte M67-Sonde im hochmolaren Überschuss (750 x) für 0, 5 oder 10 min auf Eis zu den Gesamtzellextrakten hinzugegeben. Da es sich um eine spezifische Protein/DNA-Interaktion handelte, nahm die Signalintensität der Banden in Gegenwart von spezifischer Kompetitor-DNA ab. Es dienten vier unabhängige Versuche als Grundlage der graphischen Aufarbeitung, deren Standardabweichungen und Mittelwerte hier dargestellt sind. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied im Wettbewerbsversuch zwischen Wildtyp und E449A-Mutante von STAT1 nachweisen. Bahnen 1 und 2 dienten als Supershift-Kontrolle zum Nachweis von STAT1. Genutzt wurden die Antikörper Anti-STAT3 (STAT3, H-190) und Anti-STAT1 (STAT1 $\alpha$ p91, C24). Bahnen 3 bis 5 zeigen den Wettbewerbsversuch mit dem Wildtyp-Dimer, Bahnen 6 bis 8 den der Mutante E449A.

#### 4.7 Regelmäßige Bindung der MCP1-nat-Sonde von STAT1-E449A

Zur Bestätigung der Experimente, die mit der M67-Sonde durchgeführt wurden, wurden im Weiteren zusätzlich die native Sonde MCP1-nat sowie die mutierte MCP1-0 mit fehlender GAS-Bindestelle eingesetzt. Bis auf die Verwendung der Sonden MCP1-nat und MCP1-0 war die Durchführung der Versuche analog zum oben beschriebenen Vorgehen. Die E449A-Mutante und das Wildtyp-Protein von STAT1 binden regelmäßig an die MCP1-nat-Sonde. Ist die GAS-Bindestelle allerdings durch Mutation dysfunktional, liegt sowohl von der E449A-Mutante als auch vom Wildtyp-Molekül keinerlei detektierbare Bindungsaffinität mehr vor (Abb. 11).

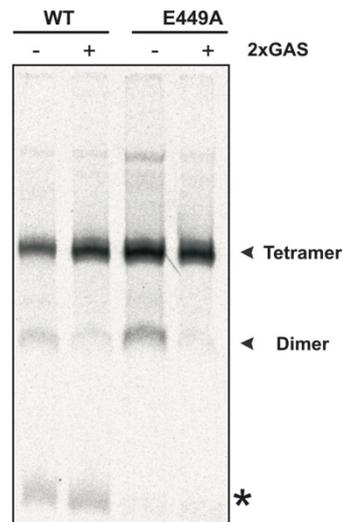


**Abbildung 11: Regelhafte Bindung der MCP1-nat-Sonde von E449A-Mutante.**

Transfizierte U3A-Zellen, die das Wildtyp- bzw. STAT1-E449A-Protein exprimierten, wurden am Folgetag für 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden für die EMSA-Reaktionen genutzt. Als Sonde diente radioaktiv markierte MCP1-nat- oder MCP1-0-Sonde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der autoradiographisch ermittelten Bindeaktivitäten von vier unabhängigen Versuchen, die für die quantitative Auswertung analysiert wurden. Die Bindefähigkeit der E449A-Mutante an die MCP1-nat-Sonde unterscheidet sich nicht signifikant vom unmutierten STAT1-Protein. Bei Nutzung der MCP1-0-Sonde binden weder die E449A-Mutante noch das Wildtyp-Protein. Die Bahnen 1 und 2 dienen als Supershift-Kontrolle zum Nachweis von Identität des STAT1-Dimers. Genutzt wurden die Antikörper Anti-STAT3 (H-190)) und Anti-STAT1 (C24). Bahnen 3 und 4 zeigen die Bindung vom Wildtyp-Protein bzw. der E449A-Mutante an die MCP1-nat-Sonde, Bahnen 5 und 6 stellen die fehlende Bindung beider STAT1-Varianten an die MCP1-0-Sonde dar.

#### 4.8 Die STAT1-E449A-Mutante ist zur kooperativen DNA-Bindung fähig

Um die Tetramerisierung der E449A-Mutante von STAT1 untersuchen zu können, wurden gleiche Zellzahlen von U3A-Zellen mit Plasmiden kodierend für die beiden STAT1-Varianten in getrennten Ansätzen transfiziert und am Folgetag für 45 min mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) stimuliert. Aus den Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und für die EMSA-Reaktionen genutzt. Zu den Gesamtzellextrakten wurde radioaktiv markierte 2xGAS-Sonde inkubiert und nach 15 min 2xGAS-Sonde im hochmolaren Überschuss für entweder 0 min (ohne Konkurrenz) oder 20 min (mit Konkurrenz) hinzugegeben. Auf der Abbildung 12 ist zu sehen, dass bei Zugabe der kalten 2xGAS-DNA die Menge der an die Sonde gebundenen STAT1-Dimere beträchtlich abnimmt bzw. nicht mehr nachweisbar ist, während die der DNA-gebundenen STAT1-Tetramere entsprechend nicht abnimmt. Diese Beobachtung wurde sowohl für die E449A-Mutante wie auch für das Wildtyp-Protein von STAT1 gemacht. Die E449A-Mutante weist demzufolge kein Defizit im Tetramerisierungsverhalten auf (Abb. 12).

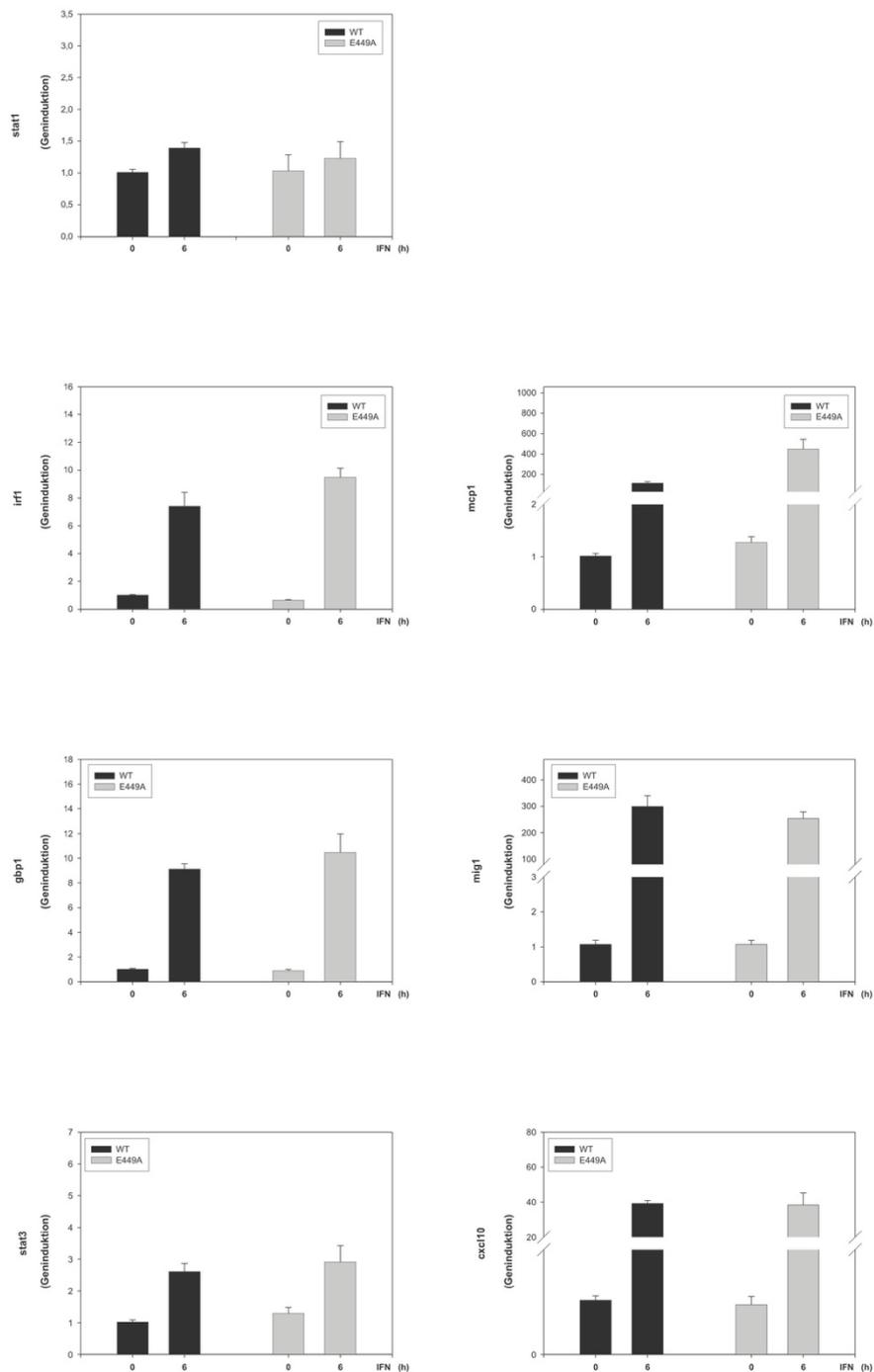


**Abbildung 12: Die E449A-Mutante ist zur kooperativen DNA-Bindung fähig.**

Mit STAT1-GFP-kodierenden Plasmiden transfizierte U3A-Zellen wurden am Folgetag nach der Transfektion für 45 min mit dem Zytokin IFN $\gamma$  in der Konzentration 0,5 ng/ $\mu$ l stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden für die EMSA-Reaktionen verwendet. Zu den Lysaten wurde radioaktiv markierte 2xGAS-Sonde hinzugefügt und nach 15-minütiger Inkubation einem 750-fachen molaren Überschuss von nicht-markierten 2xGAS-Oligonukleotiden ausgesetzt. Unter Kompetitionsbedingungen (+ 2xGAS) nahm die Menge an dimerischem STAT1 dramatisch ab, während die Mengen an tetramerischen STAT1-Komplexen als Folge der erhaltenen kooperativen DNA-Bindung und unabhängig vom Vorliegen der E449A-Mutation nicht reduziert waren.

#### 4.9 Normales transkriptionelles Aktivitätsmuster der STAT1-E449-Mutante in der RT-PCR

Um die Genexpressionsmuster der STAT1-E449A-Mutante und seines Wildtyp-Proteins miteinander vergleichen zu können, wurden U3A-Zellen analog zu den Western-Blotting-Versuchen ausplattiert und transfiziert. Statt U3A-Vollmedium wurde U3A-Hungermedium verwendet. Am Folgetag wurden die Zellen für 6 h mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) in U3A-Hungermedium stimuliert. Nach anschließender RNA-Isolation und Synthese von cDNA wurde eine RT-PCR angeschlossen. Folgende Primerpaare wurden verwendet: GAPDH F und R, STAT1 F und R, IRF1 F und R, GBP1 F und R, MIG1 F und R, CXCL10 F und R, MCP1 F und R sowie STAT3 F und R. Das *GAPDH*-Gen diente als Haushaltsgen zur Normierung der jeweiligen Doppelbestimmungen. Die Analyse wurde mit den Computerprogrammen SigmaPlot und Microsoft Office-Excel durchgeführt. Wie in Abb. 13 ersichtlich, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genexpressionsmustern der E449A-Mutante und dem Wildtyp-Protein nachweisen. Die Mutante E449A von STAT1 weist eine regelhafte transkriptionelle Aktivität auf.

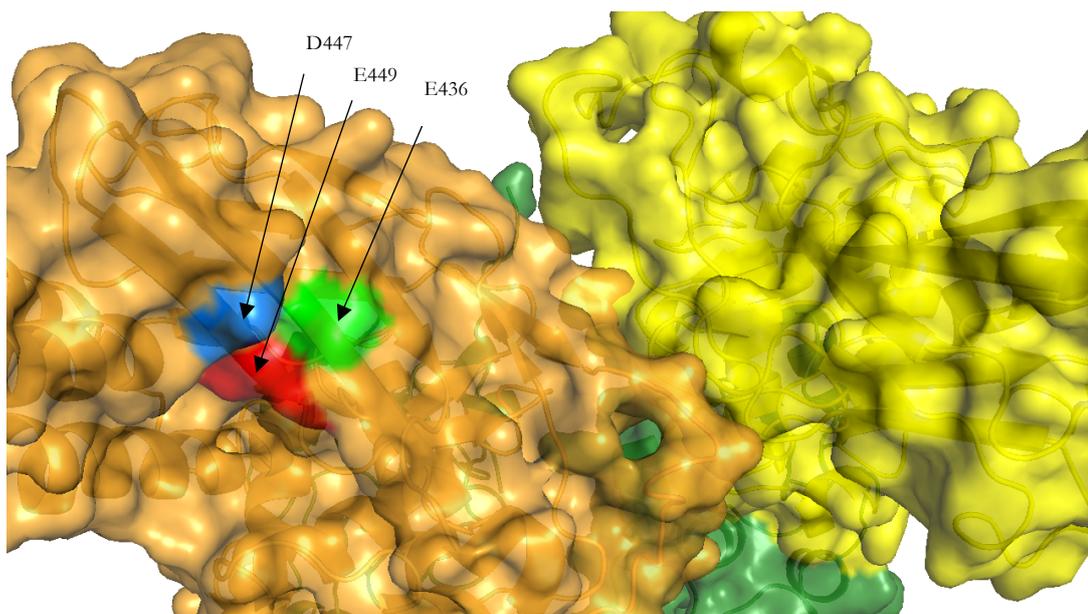


**Abbildung 13: Normales transkriptionelles Aktivierungsmuster von endogenen STAT1-Zielgenen durch die E449A-Mutante.**

Adhärente U3A-Zellen wurden am Folgetag nach der Ausplattierung mit Vektoren, die die E449A-Mutante oder das Wildtyp-Protein exprimierten, in U3A-Hungermedium transfiziert und nachfolgend mit IFN $\gamma$  (0,5 ng/ $\mu$ l) in U3A-Hungermedium für 0 h (unstimuliert) oder 6 h (stimuliert) behandelt. Nach RNA-Isolation und Synthese von cDNA erfolgte die RT-PCR. Folgende Gene wurden untersucht: *STAT1*, *IRF1*, *GBP1*, *MIG1*, *CXCL10*, *MCP1* und *STAT3*. Das *GAPDH*-Gen diente zur Normierung für die Doppelbestimmungen. Die Analyse wurde mit den Programmen SigmaPlot und Microsoft Office-Excel durchgeführt.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde der negativ geladene Aminosäurerest E449, welcher oberflächlich innerhalb der DNA-Bindedomäne von STAT1 lokalisiert ist (Chen et al. 1998), zu Alanin mutiert und die so generierte Punktmutante mittels zellbiologischer Methoden charakterisiert. Diese STAT1-Mutante wurde hinsichtlich der Phosphorylierungskinetik, der Kernakkumulation, der Zielgenaktivierung, der DNA-Bindefähigkeit, des Dissoziationsverhaltens von DNA, der Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindefähigkeit und des transkriptionellen Aktivitätsmusters mit dem Wildtyp-Protein von STAT1 verglichen. Wie im Ergebnisteil ersichtlich, zeigte die E449A-Mutante von STAT1 in ihren untersuchten Eigenschaften weitgehend keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Geringfügige Unterschiede wurden in den Ergebnissen beschrieben und werden im Fortlauf dieser Dissertation an anderer Stelle diskutiert. Anhand von verfügbaren Kristallstrukturen offenbarten sich in der DNA-Bindedomäne von STAT1 die oberflächlich gelegenen und negativ geladenen Aminosäurereste E436, D447 und E449, welche zusammen als negativ geladenes Motiv eine weitere, bislang unbekannte Bindestelle für das Importin $\alpha$ 5 darstellen könnten (Chen et al. 1998).



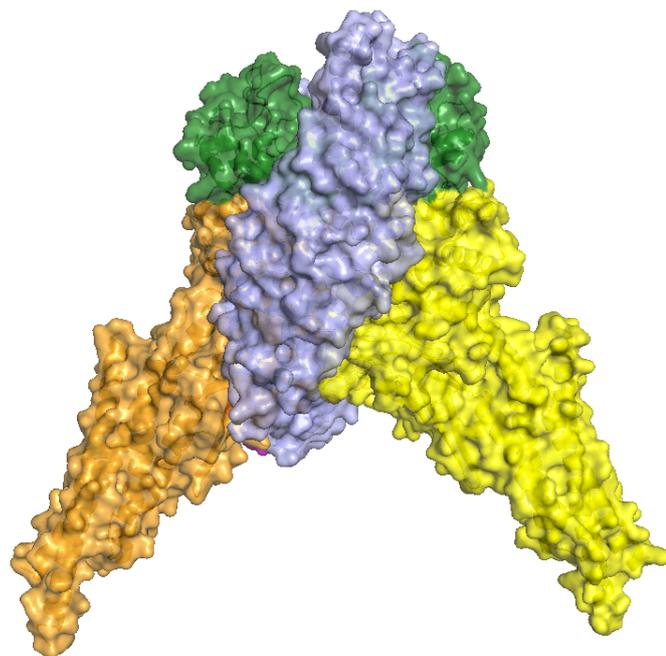
**Abbildung 14: Negativ geladene Oberflächenstruktur innerhalb der DNA-Bindedomäne von STAT1.**

Ausbildung eines negativ geladenen Motivs durch die Aminosäurereste E449 (rot), D447 (blau) und E436 (hellgrün) innerhalb des STAT1-Dimers (SH2 und TA-Domänen in Grün, restliche Proteinstruktur in Orange bzw. Gelb dargestellt).

Wie in der gegenwärtigen Literatur vermutet wird, bindet das STAT1-spezifische Importin $\alpha$ 5, dessen Tertiärstruktur aus zehn repetitiv angeordneten Armadillo-Repeats (ARM) mit je drei  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist, ein zum klassischen NLS abweichendes dimerspezifisches NLS (dsNLS) von parallelen Phospho-STAT1-Proteinen (Fagerlund et al. 2002; Mélen et al. 2003; Nardozi et al. 2010a). Dieses dsNLS bildet sich erst als Folge der Konformation der parallel orientierten Phospho-STAT1-Dimere und befindet sich jeweils in der DNA-

Bindedomäne von STAT1 innerhalb der Aminosäuresequenz der Aminosäureresten 400 bis 413 (Meyer et al. 2002b; Nardozzi et al. 2010a). Nardozzi und Koautoren stellten das bislang einzige Strukturmodell zur Bindung von Importin $\alpha$ 5 an parallelen Phospho-STAT1 auf, welches sich auf eine verfügbare Kristallstruktur der Influenza-Virus-RNA-Polymerase PB2 gebunden an ein-Protein bezieht (Tarendeau et al. 2007; Nardozzi et al. 2010a). Dieses Modell wird im Weiteren erläutert und anschließend durch dieser Dissertation zugrundeliegender und eingangs beschriebener Hypothese ergänzt.

Bisher sind aktivierte STAT1-Dimere, EBNA1 und die virale RNA-Polymerase PB2 als Bindungspartner des Importin $\alpha$ 5 bekannt (Kitamura et al. 2006; Tarendeau et al. 2007). Diesem aktuellen Modell gemäß, bindet sich ein Importin $\alpha$ 5-Molekül asymmetrisch zwischen zwei dimerisch angeordnete STAT1-Moleküle im stöchiometrischen Verhältnis von 1:2. Dabei interagieren die ARM1 bis ARM4 mit dem dsNLS innerhalb der DNA-Bindedomäne von einem Phospho-STAT1-Molekül, wobei die exakten an der Interaktion beteiligten Aminosäurereste zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund von fehlenden definitiven Kristallstrukturen von an STAT1-Dimeren gebundene Importin $\alpha$ 5-Proteine fehlen. Sie befinden sich in einer Position, die normalerweise von der DNA besetzt ist und verdecken gleichzeitig das zweite dsNLS-Oberflächenareal des anderen STAT1-Monomers (Chen et al. 1998). Konservierte Asparaginsäure- und Tryptophanreste im Bereich der ARM2 bis 6 lassen zudem den Schluss zu, dass diese Untereinheiten des Karyopherins ebenfalls an der Bindung mit den basischen Aminosäureresten eines STAT1-Protomers beteiligt sein könnten (Fagerlund et al. 2002).

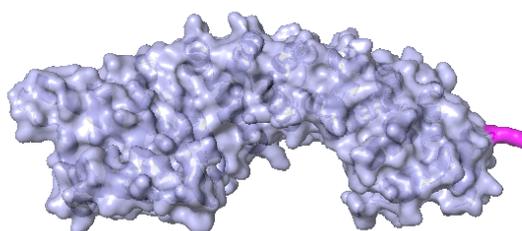


**Abbildung 15: Modell eines an Importin $\alpha$ 5 gebundenen STAT1-Dimer.**

Das hypothetische Strukturmodell eines an Importin $\alpha$ 5 gebundenen STAT1-Dimer richtet sich in Position und Stöchiometrie nach Nardozzi et al. (2010a). Das Importin $\alpha$ 5 ist in Hellgrau, die SH2- und TA-Domänen der STAT1-Monomere jeweils in Dunkelgrün, die restliche Proteinstruktur in Gelb bzw. Orange dargestellt.

Das am carboxyterminalen Ende gelegene ARM10 umgreift mit seinen drei Helices H1, H2 und H3 die SH2-Domäne des kontralateralen Phospho-STAT1-Protomers. Dabei können die Untereinheiten H2 und H3 über den beweglichen Tyrosinrest an Position 476 ihre Position ändern, sodass sie aufklappen und in unmittelbarer Nähe zur SH2-Domäne des Phospho-STAT1-Moleküls zum Liegen kommen. Punktmutanten von Importin $\alpha$ 5 mit einer Aminosäuresubstitution von Tyrosin zu Glycin an Position 476 wiesen in thermodynamischen Versuchen im Vergleich zum Wildtyp-Molekül eine signifikant höhere Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}} = 0.289\text{s}^{-1}$  versus  $0.0183\text{s}^{-1}$ ) von Phospho-STAT1 auf, was diese Bindehypothese bekräftigt. Durch Interaktion mit dem Karyopherin bewegt sich ein  $\beta$ -Faltblatt innerhalb der SH2-Domäne von Aminosäure-Position 651 bis 666 um einige Ångström und kommt dadurch in unmittelbarer Nähe zu den Aminosäuren 402 und 406 im ARM9 zu liegen (Nardozi et al. 2010a). Diese zeigten sich essentiell für die Komplexbildung von Importin $\alpha$ 5 und phosphorylierten STAT1-Dimeren (Melén et al. 2003).

Eine Beteiligung von Phospho-Tyrosinrest 701 des aktivierten STAT1-Monomers als direkte Bindedeterminante ist für die direkte Interaktion mit Importin $\alpha$ 5-Proteinen augenscheinlich nicht notwendig, sondern ist essentiell für die Ausrichtung des Dimers in paralleler Orientierung. In isothermen Titrationskalorimetrie-Versuchen zur Determination einer Interaktion zwischen Importin $\alpha$ 5-Proteinen und isolierten Phospho-STAT1-Peptidsequenzen von Aminosäurerest 695 bis 708 ließ sich keine signifikante Erhöhung der Enthalpie als Zeichen einer solchen nachweisen (Nardozi et al. 2010a). Wahrscheinlich führt also die Phosphorylierung von Tyrosinresten an Position 701 bei STAT1-Dimeren lediglich zu einer Erhöhung der Gleichgewichtskonstante zugunsten der Ausbildung von parallelen, anstatt von antiparallelen STAT1-Dimeren, was letztlich eine erhöhte DNA-Bindefähigkeit von aktivierten STAT1 und somit den transporterabhängigen Kerntransport bedingt (Wenta et al. 2008).

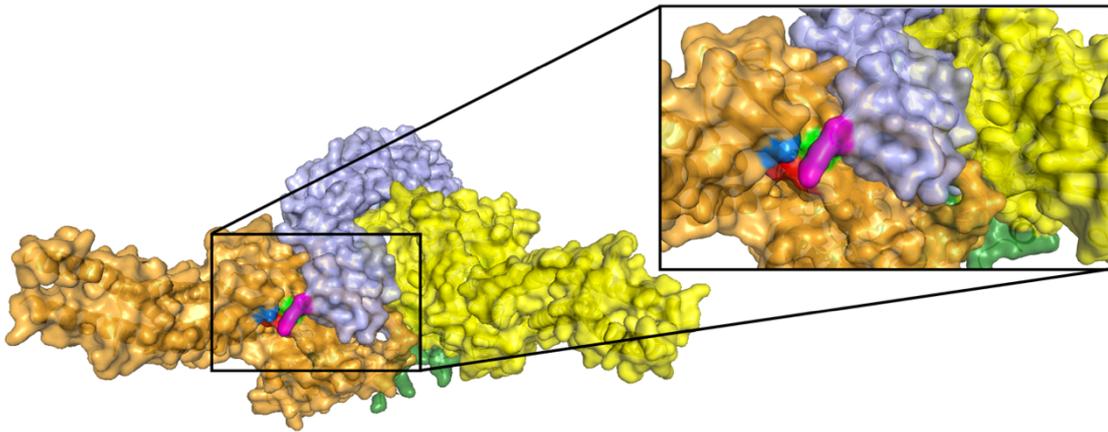


**Abbildung 16: Kristallstruktur des monomerischen Importin $\alpha$ 5-Proteins.**

Proteinstruktur von Importin $\alpha$ 5 (grau) mit Darstellung des exponierten Aminosäurerestes K94 (magenta).

Wie in Abbildung 15 ersichtlich, weist das Importin $\alpha$ 5-Protein einen Lysinrest an Position 94 auf, welcher schlüsselartig aus der Tertiärstruktur des Moleküls herausragt. Dieser Aminosäurerest mit der positiv geladenen Seitenkette könnte durch seine räumliche Nähe elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Tasche, bestehend aus den

Aminosäureresten E436, D447 und E449, eingehen und würde demgemäß neue Bindedeterminante nach dem Strukturmodell nach Nardozi für Importin $\alpha$ 5-Proteinen und Phospho-STAT1-Dimeren darstellen. Durch diese Ergänzung würde das bestehende Bindemodell ergänzt werden.



**Abbildung 17: An Importin $\alpha$ 5 gebundenes STAT1-Dimer mit Darstellung des negativ geladenen Bindemotivs.**

Importin $\alpha$ 5 (hellgrau) mit Darstellung der fingerähnlichen Struktur des exponierten Aminosäurerestes K94 (magenta), gebunden an ein STAT1-Dimer. SH2- und TA-Domänen jeweils in Dunkelgrün, die restliche Proteinstruktur ist Gelb bzw. Orange dargestellt. Das hypothetische Modell zeigt die Ausbildung eines negativ geladenen Motivs durch die Aminosäuren E449 (rot), D447 (blau) und E436 (hellgrün) innerhalb des STAT1-Dimers mit Darstellung der Lokalisation des positiven Lysinrests in der dort vermuteten Oberfläche von Importin $\alpha$ 5.

Die generierte Glutaminsäure-zu-Alanin-Mutante E449A zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Phosphorylierungskinetik im Vergleich zum Wildtyp-Protein von STAT1. Gemäß der eingangs postulierten Hypothese wäre eine erhöhte Phosphorylierung denkbar gewesen, da der transporterabhängige Kerntransport bei einer erniedrigten Bindeaffinität zwischen STAT1 und Importin $\alpha$ 5 inhibiert wäre, was letztlich zu einer zytoplasmatischen Retention der STAT1-Mutante hätte führen würde. Eine verringerte Kernakkumulation bedingt eine erhöhte Menge an Substrat für die zytoplasmatisch lokalisierten Janus-Kinasen, was zu einer vermehrten Phosphorylierung führt. Ein solches Phosphorylierungsverhalten zeigen jene Mutanten, die an der Ausbildung des dsNLS innerhalb der Aminosäuresequenz von Aminosäurerest 400 bis 413 beteiligt sind (Meyer et al. 2002b). Auch eine verminderte Sensibilität für Phosphatasen, wie bei der von Meyer und Koautoren beschriebenen F77A-Mutante, könnte zu vermehrten Mengen an phosphorylierten STAT1-Molekülen in der Zelle führen (Meyer et al. 2004).

Eine verminderte Phosphorylierung würde dagegen beispielsweise eintreten, wenn die Punktmutation von E449A innerhalb der für die Interaktion mit den Janus-Kinasen verantwortlichen Aminosäuresequenz liegen würde. Auch eine erhöhte Affinität zu zytoplasmatischen Phosphatasen könnte ein Grund für eine verminderte Menge an phosphoryliertem STAT1 darstellen.

Mittels immuncytochemischer Fluoreszenzmikroskopie wurde die Kernakkumulation von STAT1-E449A-Molekülen im Vergleich zum Wildtyp-Protein von STAT1 untersucht. Wäre es, wie initial vermutet, zu einem erniedrigten Importin $\alpha$ 5-abhängigen Kerntransport gekommen, so hätte die beschriebene Mutante von STAT1 eine erniedrigte Kernakkumulation beziehungsweise erhöhte Retention im Zytoplasma aufweisen müssen. Diese Vermutung konnte bei vergleichbarer Kernakkumulation zwischen dem Wildtyp-Protein und der Mutante E449A allerdings nicht bestätigt werden.

Um die Zielgenaktivierung der E449A-Mutante von STAT1 im Vergleich zum Wildtyp-Molekül messen zu können, wurde das etablierte Reportergen Luciferase genutzt. Wie in den Ergebnissen (Abb. 6) ersichtlich, zeigte die generierte Mutante quantitativ keinen wesentlichen Unterschied in Bezug auf die Expression von IFN $\gamma$ -induzierten Zielgenen von STAT1. Verfolgt man die Überlegungen der eingangs beschriebenen Hypothese bezüglich des aberanten IFN $\gamma$ -abhängigen Kerntransports, so ließe sich eine reduzierte Zielgenaktivierung vermuten. Voraussetzung für diese Vermutung wäre allerdings eine lineare Beziehung zwischen nukleozytoplasmatischer Translokation und Zielgenaktivierung von STAT1. Doch anscheinend reichen bereits geringe Mengen an nukleär gelegenem phosphoryliertem STAT1-Protein aus, um eine maximale Zielgenaktivierung zu generieren, wie Leitner und Koautoren nachweisen konnten (Leitner et al. 2014). Sie generierten ein durch Doxycyclin induzierbares, mit FLAG-Protein markiertes STAT1-Expressionssystem in STAT1-defizienten Mäusen. Dadurch waren sie in der Lage, die STAT1-Expression zeit- und dosisabhängig *in vitro* und *in vivo* durch Gabe von Doxycyclin zu steuern. Den Autoren gelang der Nachweis, dass bereits geringste Mengen an STAT1 in aus Knochenmark entnommenen Makrophagen für eine maximale und suffiziente Expression von IFN $\gamma$ -induzierten Genen ausreichend waren (Leitner et al. 2014). Dementsprechend würde ein reduzierter transporterabhängiger Kerntransport nicht unmittelbar in einer reduzierten Zielgenaktivierung wiederspiegelt werden, und die vorliegende vergleichbare Zielgenaktivierung zwischen der E449A-Mutante und dem Wildtyp-Protein von STAT1 wäre mit der Hypothese vereinbar.

Die Punktmutation der Mutante mit der Substitution von Glutamin zu Alanin an Position 449 der Aminosäuresequenz wurde im Bereich der DNA-Bindedomäne von STAT1 generiert. Daher lag im Fortschreiten der Charakterisierung das Augenmerk insbesondere auch auf der Untersuchung der DNA-Dimer-Interaktion. Wie in Abb. 7 ersichtlich, zeigt die E449A-Mutante im Vergleich zum unmutierten STAT1 eine verlängerte DNA-Bindeaktivität nach 45-minütiger IFN $\gamma$ -Stimulierung und 15-minütiger bzw. 30-minütiger Behandlung mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin. Dieses Phänomen wurde allerdings nur bei Verwendung von STAT1-GFP-exprimierenden Plasmiden beobachtet und konnte dementsprechend bei Einsatz von pcDNA-Plasmiden nicht reproduziert werden. Des Weiteren müsste eine verlängerte DNA-Bindung der aktivierten STAT1-Dimere zu einer verminderten Menge an Edukten für die nukleär gelegenen Phosphatasen führen, sodass es zu einer Hyperphosphorylierung und erhöhten Kernakkumulation käme (Meyer et al. 2003). Hinweise auf ein

solches Verhalten der E449A-Mutante ließen sich in den eingangs beschriebenen Experimenten aber nicht finden. Außerdem zeigte die E449A-Mutante in Kompetitions-Gelretardations-Experimenten kein verändertes Dissoziationsverhalten von einfachen GAS-Bindestellen im Vergleich zum Wildtyp-Protein von STAT1 (siehe Abb. 9 und 10). In der Zusammenschau sprechen die vorliegenden Ergebnisse daher gegen eine veränderte DNA-Dimer-Interaktion der E449A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Molekül von STAT1.

Die dieser Dissertation zugrundeliegende Punktmutationsmutante ist in der Lage, kooperative DNA-Bindungen einzugehen, wie Abb. 12 zeigt. Meyer und Koautoren beschrieben eine Mutante von STAT1 mit einer Substitution des Aminosäurerestes Phenylalanin zu Alanin an Position 77 innerhalb der aminoterminalen Domäne von STAT1 (Meyer et al. 2004). Diese war unfähig zur kooperativen DNA-Bindung und zeigte eine signifikant erniedrigte Interaktion mit nukleären Phosphatasen, was in der Folge zu prolongierter Kernakkumulation und Hyperphosphorylierung führte (Meyer et al. 2004). Wäre die hier beschriebene E449A-Mutante nicht in der Lage, kooperative DNA-Bindungen einzugehen, so hätte sich dies in einer erhöhten Kernakkumulation sowie einer Hyperphosphorylierung zeigen müssen. Die vorliegenden regelrechten Eigenschaften der E449A-Mutante von STAT1 sprechen gegen einen ähnlichen Tetramerisierungsdefekt, der überdies durch Konkurrenzexperimente ausgeschlossen werden konnte.

Mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-PCR (RT-PCR) können spezifische RNA-Sequenzen in einen komplementären DNA-Strang transkribiert und in der Folge quantitativ amplifiziert werden. Im Vergleich zu RNA-Nachweisverfahren, wie der Northern-Blot-Analyse, ist die Sensitivität der RT-PCR erheblich höher. Selbst geringste Mengen an RNA-Molekülen können so nachgewiesen werden (Veres et al. 1987). Die vorliegende Mutante E449A zeigte im Vergleich zum Wildtyp-Protein keinen signifikanten Unterschied im Genaktivitätsmuster bei den folgenden zytokinregulierten Zielgenen von STAT1: *IRF1*, *GBP1*, *MIG1*, *CXCL10*, *MCP1*, *STAT1* und *STAT3* sowie der Kontrolle *GAPDH* (Abb. 13).

In der Literatur wurden mehrere Ursachen für eine verminderte Genexpression beschrieben. Ein Grund läge beispielsweise in einem erniedrigten Phosphorylierungsniveau, wie es für die Mutante STAT1-K525A beschrieben wurde (Staab 2011). Desweiteren könnte auch eine verminderte Rekrutierung von Kofaktoren einen ähnlichen Effekt bedingen (Ramana et al. 2000). Auch eine dysfunktionale kooperative DNA-Bindung, wie bei der F77A-Mutante beschrieben, könnte zu einer verminderten Genexpression führen (Meyer et al. 2004). Yang und Koautoren beschrieben zudem eine Mutante, deren Dissoziationsrate von DNA-Bindestellen derart erhöht war, dass sie in der Folge eine reduzierte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Molekül aufwies (Yang et al. 2002). Aufgrund der regelrechten Genexpression ist es aber unwahrscheinlich, dass die untersuchte Mutante E449A einen solchen Defekt wie oben beschrieben aufweist. Die Ergebnisse einer unveränderten Genexpression sprechen aber nicht unbedingt gegen die Hypothese eines eingeschränkten

transporterabhängigen Kerntransports, wie bereits bei der Diskussion der Ergebnisse bezüglich der Zielgenaktivierung erläutert (Abb. 6).

Anhand der vorliegenden, diskutierten Ergebnisse konnte die dieser Dissertation vorliegende Hypothese eines weiteren Bindemotivs, bestehend aus den innerhalb der DNA-Bindedomäne in der Quartärstruktur nah beieinander liegenden Aminosäureresten E449, D447 und E436, bei der biochemischen Charakterisierung der Einfachmutante E449A von STAT1 nicht bestätigt werden. Aufgrund der hohen Konservierung der drei Aminosäurereste innerhalb der Aminosäuresequenz und der kristallografisch darstellbaren schlüssigen Morphologie des Bindemotivs erscheint die Hypothese nichtsdestotrotz durchaus möglich. Gegebenenfalls reicht eine einfache Substitution des negativ geladenen Aminosäurerestes an Position 449 nicht aus, um das postulierte Bindemotiv derart zu destabilisieren, als dass die vermutete Interaktion mit dem Importin $\alpha$ 5-Protein gestört worden wäre. Um die Hypothese abschließend zu entkräften, wäre es ratsam, weitere Mutagenesestudien durchzuführen. So könnten einerseits weitere Einfach-Mutanten von STAT1 mit Substitutionen der negativ geladenen Aminosäurereste E436 oder D447 zu neutralen oder positiven Aminosäureresten generiert werden. Andererseits bestünde die Möglichkeit der Generierung von Zweifach- oder Dreifach-Mutanten mit Punktmutationen der Aminosäurereste E436, D447 und E449. Desweiteren sollte in Betracht gezogen werden, jene vorgeschlagenen Mutagenesestudien mit Versuchen von an Position K94 mutiertem Importin $\alpha$ 5-Protein zu kombinieren. Jene Mutanten von STAT1 müssten aufgrund des gestörten transportertabhängigen Kerntransports eine Hyperphosphorylierung, eine verminderte Kernakkumulation sowie eine verringerte transkriptionelle Aktivität aufweisen und somit die eingangs vermutete Hypothese der Importin $\alpha$ 5-K94-Bindedeterminante von STAT1 untermauern.

## 6 Zusammenfassung

STAT-Proteine als zentrale Spieler im JAK/STAT-Signalweg (Janus-Kinase/Signaltansduktor und Aktivator der Transkription) ermöglichen seit ihrer Entdeckung vor über 20 Jahren vorlaufend neue Erkenntnisse über das komplexe Zusammenspiel aus Signaltransduktion, Genaktivierung und Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Diese Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren stellen für das Verständnis von Mechanismen auf zellulärer Ebene seit jeher ein paradigmatisches Beispiel dar. Mit Hilfe von Mutagenesestudien einzelner Mitglieder der siebenköpfigen STAT-Familie können strukturbedingte Funktionen jener Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Die evolutionär konservierten, negativ geladenen Aminosäurereste E436, D447 und E449 liegen innerhalb der DNA-Bindedomäne des STAT1-Proteins in unmittelbarer Nähe zueinander und könnten eine neue Bindeterminante für das Importin $\alpha$ 5-Molekül darstellen. Aufgrund modellhafter, kristallografischer Darstellungen offenbart sich eine mögliche Interaktion zwischen jenem Bindemotiv und dem positiven Lysinrest an Position 94 des Karyopherins. Durch Substitution des konservierten Aminosäurerestes Glutamin zu Alanin an Position 449 des STAT1-Proteins sollte es hypothetisch zu einem aberranten IFN $\gamma$ -induzierten, transporterabhängigen Kerntransport kommen. Dadurch müsste die E449A-Mutante von STAT1 eine zytoplasmatische Retention, eine Hyperphosphorylierung sowie eine verminderte transkriptionelle Aktivität ausweisen. Diese postulierten Eigenschaften konnten experimentell bei der Untersuchung der Phosphorylierungskinetik, der Kinetik der induzierbaren Kernakkumulation, der Zielgenaktivierung, der DNA-Interaktion sowie der durch IFN $\gamma$ - ausgelösten Genexpression nicht bestätigt werden. Vermutlich reicht eine einzelne Punktmutation an Position E449 des STAT1-Moleküls nicht aus, um die vermutete Interaktion zwischen dem postulierten Bindemotiv von STAT1 und dem positiv geladenem Lysinrest an Position 94 des Carrier-Protein zu destabilisieren. Um die Hypothese abschließend zu falsifizieren, sollten weitere Mutagenesestudien mit Generierung von Zweifach- oder Dreifach-Mutanten mit Punktmutationen der Aminosäurereste E436, D447 und E449 von STAT1 durchgeführt werden. Desweiteren sollte in Betracht gezogen werden, jene vorgeschlagenen Mutagenesestudien mit Versuchen von an Position K94 mutiertem Importin $\alpha$ 5-Protein zu kombinieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adam SA, Marr RS, Gerace L (1990): Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* 111, 807-816
- Adámková L, Součková K, Kovařík J (2007): Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer. *Folia Biol (Praha)* 53, 1–6
- Arzt L, Kothmaier H, Halbwedl I, Quehenberger F, Popper HH (2014): Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) acts like an oncogene in malignant pleural mesothelioma. *Virchows Arch* 465, 79-88
- Baran-Marszak F, Feuillard J, Najjar I, Clorennec C Le, Bechet JM, Dusanter-Fourt I, Bornkamm GW, Raphael M, Fagard R (2004): Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells. *Blood* 104, 2475–2483
- Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U (2000): Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10418-10423
- Bernabei P, Coccia EME, Rigamonti L, Bosticardo M, Forni G, Pestka S, Krause CD, Battistini A, Novelli F (2001): Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J Leukoc Biol* 70, 950–960
- Bolten J: Die Rolle der Linker-Domäne von STAT1 bei der Regulation transkriptioneller Antworten im Interferon-Signalweg. Med. Diss. Göttingen 2013
- Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C (2003): STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation. *J Biol Chem* 278, 34133–34140
- Buettner R, Mora LB, Jove R (2002): Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 8, 945–954
- Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark GR (2000): How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J* 19, 4111–4122
- Chen G, Wang H, Xie S, Ma J, Wang G (2013): STAT1 negatively regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncol Rep* 29, 2303–2310
- Chen J, Baig E, Fish EN (2004): Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* 24, 687–98
- Chen J, Zhao J, Chen L, Dong N, Ying Z, Cai Z, Ji D, Zhang Y, Dong L, Li Y et al. (2015): STAT1 modification improves therapeutic effects of interferons on lung cancer cells. *J Transl Med* 13, 1–10
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Kuriyan J (1998): Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827–839
- Chen X, Bhandari R, Vinkemeier U, Van Den Akker F, Darnell JE, Kuriyan J (2003): A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal domains of STATs. *Protein Sci* 12, 361–365
- Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN et al. (1995): Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29, 225–228
- 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
- Decker T, Lew DJ, Mirkovitch J, Darnell JE (1991): Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J* **10**, 927–932
- Duarte CW, Willey CD, Zhi D, Cui X, Harris JJ, Vaughan LK, Mehta T, McCubrey RO, Khodarev NN, Weichselbaum RR et al. (2012): Expression signature of IFN/STAT1 signaling genes predicts poor survival outcome in glioblastoma multiforme in a subtype-specific manner. *PLoS One* **7**: e29653
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H et al. (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
- Fahrenkrog B, Köser J, Aebi U (2004): The nuclear pore complex: A jack of all trades? *Trends Biochem Sci* **29**, 175–182
- Fernandez-Martinez J, Rout MP (2012): A jumbo problem: mapping the structure and functions of the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 92–99
- Fulda S, Debatin KM (2002): IFN-gamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* **21**, 2295–2308
- González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E (2012): Immunomodulatory functions of type I IFN. *Nat Rev Immunol* **12**, 125–135
- Gordziel C, Bratsch J, Moriggl R, Knösel T, Friedrich K (2013): Both STAT1 and STAT3 are favourable prognostic determinants in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* **109**, 138–146
- Grebe J: Charakterisierung von Punktmutanten in der Linker-Domäne des humanen STAT1-Proteins. Med. Diss. Göttingen 2016
- Greenhalgh CJ, Metcalf D, Thaus AL, Corbin JE, Uren R, Morgan PO, Fabri LJ, Zhang JG, Martin HM, Willson TA et al. (2002): Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem* **277**, 40181–40184
- Haan S, Kortylewski M, Behrmann I, Müller-Esterl W, Heinrich PC, Schaper F (2000): Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation. *Biochem J* **345**, 417–421
- Hong D, Kurzrock R, Kim Y, Woessner R, Younes A, Nemunaitis J, Fowler N, Zhou T, Schmidt J, Jo M et al. (2015): AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. *Sci Transl Med* **7**, 1–23
- Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE (1996): Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol* **16**, 6957–6964
- Huang S, Bucana CD, Van Arsdall M, Fidler IJ (2002): Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene* **21**, 2504–2512
- Hui Z, Tretiakova M, Zhang Z, Li Y, Wang X, Zhu JX, Gao Y, Mai W, Furge K, Qian CN et al. (2009): Radiosensitization by inhibiting STAT1 in renal cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**, 288–295
- Hüntelmann B: Molekulare Determinanten zur sequenzspezifischen DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors STAT1. Med. Diss. Göttingen 2017

- Ihle JN (1995): The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol* 60, 1–35
- Kachroo P, Lee MH, Zhang L, Baratelli F, Lee G, Srivastava MK, Wang G, Walser TC, Krysan K, Sharma S et al. (2013): IL-27 inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenic factor production in a STAT1-dominant pathway in human non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 32, 1–14
- Kaleviste E, Saare M, Leahy TR, Bondet V, Duffy D, Mogensen TH, Jørgensen SE, Nurm H, Ip W, Davies EG et al. (2019): Interferon signature in patients with STAT1 gain-of-function mutation is epigenetically determined. *Eur J Immunol* 49, 790–800
- Kamura T, Burian D, Yan Q, Schmidt SL, Lane WS, Querido E, Branton PE, Shilatifard A, Conaway RC, Conaway JW et al. (2001): MUF1, A Novel Elongin BC-interacting Leucine-rich Repeat Protein That Can Assemble with Cul5 and Rbx1 to Reconstitute a Ubiquitin Ligase. *J Biol Chem* 276, 29748–29753
- Kawata T, Shevchenko A, Fukuzawa M, Jermyn KA, Totty NF, Zhukovskaya NV, Sterling AE, Mann M, Williams JG (1997): SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell* 89, 909–916
- Khan KD, Shuai K, Lindwall G, Maher SE, Darnell JE, Bothwell AL (1993): Induction of the Ly-6A/E gene by interferon alpha/beta and gamma requires a DNA element to which a tyrosine-phosphorylated 91-kDa protein binds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6806–6810
- Kitamura R, Sekimoto T, Ito S, Harada S, Yamagata H, Masai H, Yoneda Y, Yanagi K (2006): Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential. *J Virol* 80, 1979–1991
- Koo MY, Park J, Lim JM, Joo SY, Shin SP, Shim HB, Chung J, Kang D, Woo HA, Rhee SG et al. (2014): Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 6269–6274
- Lackmann M, Harpur AG, Oates AC, Mann RJ, Gabriel A, Meutermaans W, Alewood PF, Kerr IM, Stark GR, Wilks AF et al. (1998): Biomolecular interaction analysis of IFN gamma-induced signaling events in whole-cell lysates: prevalence of latent STAT1 in high-molecular weight complexes. *Growth Factors* 16, 39–51
- Langer JA, Pestka S (1988): Interferon receptors. *Immunol Today* 9, 393–400
- Leibowitz MS, Srivastava RM, Andrade Filho PA, Egloff AM, Wang L, Seethala RR, Ferrone S, Ferris RL (2013): SHP2 is overexpressed and inhibits pSTAT1-mediated APM component expression, T-cell attracting chemokine secretion, and CTL recognition in head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res* 19, 798–808
- Leitner NR, Lassnig C, Rom R, Heider S, Bago-Horvath Z, Eferl R, Müller S, Kolbe T, Kenner L, Rüllicke T et al. (2014): Inducible, dose-adjustable and time-restricted reconstitution of Stat1 deficiency in vivo. *PLoS One* 9, e86608
- Levy DE, Darnell JE (2002): Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651–662
- Lew DJ, Decker T, Darnell JE (1989): Alpha interferon and gamma interferon stimulate transcription of a single gene through different signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 9, 5404–5411
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K (1998): Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626–10631

- Liu B, Gross M, ten Hoeve J, Shuai K (2001): A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad U S A* 98, 3203–3207
- Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P et al. (2011): Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 208, 1635–1648
- Ma J, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Tan AL, Cao X (2003): A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation. *J Biol Chem* 278, 29252–29260
- Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE, Chen X et al. (2005): Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* 17, 761–771
- Marg A, Shan Y, Meyer T, Meissner T, Brandenburg M, Vinkemeier U (2004): Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* 165, 823–833
- Mattaj JW, Englmeier L (1998): Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265–306
- McBride KM, McDonald C, Reich NC (2000): Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 19, 6196–6206
- 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
- Meesilpavikkai K, Dik WA, Schrijver B, Nagtzaam NMA, van Rijswijk A, Driessen GJ, van der Spek PJ, van Hagen PM, Dalm VASH (2017): A Novel Heterozygous Mutation in the *STAT1* SH2 Domain Causes Chronic Mucocutaneous Candidiasis, Atypically Diverse Infections, Autoimmunity, and Impaired Cytokine Regulation. *Front Immunol* 8: 274
- Meissl K, Macho-Maschler S, Müller M, Strobl B (2017): The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine* 89, 12–20
- Mélen K, Fagerlund R, Franke J, Kohler M, Kinnunen L, Julkunen I (2003): Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* 278, 28193–28200
- Mertens C, Darnell JE (2007): SnapShot: JAK-STAT Signaling. *Cell* 131, 612
- Mertens C, Zhong M, Krishnaraj R, Zou W, Chen X, Darnell JE (2006): Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev* 20, 3372–3381
- Meyer T, Vinkemeier U (2004): Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem* 271, 4606–4612
- Meyer T, Gavenis K, Vinkemeier U (2002a): Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res* 272, 45–55
- Meyer T, Begitt A, Lödige I, van Rossum M, Vinkemeier U (2002b): Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J* 21, 344–354
- Meyer T, Marg A, Lemke P, Wiesner B, Vinkemeier U (2003): DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev* 17, 1992–2005
- Meyer T, Hendry L, Begitt A, John S, Vinkemeier U (2004): A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J Biol Chem* 279, 18998–19007

- Meyer T, Begitt A, Vinkemeier U (2007): Green fluorescent protein-tagging reduces the nucleocytoplasmic shuttling specifically of unphosphorylated STAT1. *FEBS J* 274, 815–826
- Müller M, Laxton C, Briscoe J, Schindler C, Imbrota T, Darnell JE, Stark GR, Kerr IM (1993): Complementation of a mutant cell line: central role of the 91 kDa polypeptide of ISGF3 in the interferon- $\alpha$  and - $\gamma$  signal transduction pathways. *EMBO J* 12, 4221–4228
- Murphy TL, Geissal ED, Farrar JD, Murphy KM (2000): Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 20, 7121–7131
- Naegeler J: Charakterisierung von Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne des humanen Transkriptionsfaktors STAT1. Med. Diss. Göttingen 2014
- Naka T, Fujimoto M, Kishimoto T (1999): Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends Biochem Sci* 24, 394–398
- Nardozzi J, Wenta N, Yasuhara N, Vinkemeier U, Cingolani G (2010a): Molecular basis for the recognition of phosphorylated STAT1 by importin  $\alpha$ 5. *J Mol Biol* 402, 83–100
- Nardozzi JD, Lott K, Cingolani G (2010b): Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal* 8, 1-17
- Ndubuisi MI, Guo GG, Fried VA, Etlinger JD, Sehgal PB (1999): Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem* 274, 25499–25509
- Novak U, Ji H, Kanagasundaram V, Simpson R, Paradiso L (1998): STAT3 forms stable homodimers in the presence of divalent cations prior to activation. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 558–563
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD (2002): Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109, 121–131
- O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino A V., Gadina M, McInnes IB, Laurence A (2015): The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 66, 311–328
- Ouchi T, Lee SW, Ouchi M, Aaronson SA, Horvath CM (2000): Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN- $\gamma$  target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5208–5213
- Paine PL, Feldherr CM (1972): Nucleocytoplasmic exchange of macromolecules. *Exp Cell Res* 74, 81–98
- Platanias LC (2003): The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol Ther* 98, 129–142
- Platanias LC (2005): Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375–386
- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR (2000): Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19, 2619-2627
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004): The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281–1283
- Reich N, Evans B, Levy D, Fahey D, Knight E, Darnell JE (1987): Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6394–6398

- Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, Jiménez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2007): Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 7, 34
- Rogers RS, Horvath CM, Matunis MJ (2003): SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem* 278, 30091–30097
- Schindler C, Darnell JE (1995): Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621–651
- Schindler CC, Fu XY, Improtta T, Aebersold R, Darnell JE (1992): Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7836–7839
- Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F (2000): SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 275, 12848–12856
- Schwartz DM, Bonelli M, Gadina M, O'Shea JJ (2016): Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol* 12, 25–36
- 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
- Sen M, Thomas SM, Kim S, Yeh JI, Ferris RL, Johnson JT, Duvvuri U, Lee J, Sahu N, Joyce S et al. (2012): First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer Discov* 2, 694–705
- Shuai K (2000): Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638–2644
- Shuai K (2006): Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* 16, 196–202
- Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE (1993): A single phosphorylation residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 361, 1744–1746
- Shuai K, Liao J, Song MM (1996): Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol Cell Biol* 16, 4932–4941
- Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, Yi T, Ihle JN, Matthews RJ, Thomas ML, Beier DR (1993): Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (*Hcpb*) gene. *Cell* 73, 1445–1454
- Shultz LD, Rajan TV, Greiner DL (1997): Severe defects in immunity and hematopoiesis caused by SHP-1 protein- tyrosine-phosphatase deficiency. *Trends Biotechnol* 15, 302–307
- Smekens SP, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Heinhuis B, Hoischen A, Joosten LAB, Arkwright PD, Gennery A, Kullberg BJ, Veltman JA et al. (2011): STAT1 hyperphosphorylation and defective IL12r/IL23r signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *PLoS One* 6, e29248
- Staab J: Molekulare Determinanten der Dephosphorylierung und Genaktivierung des Signaltransduktors und Aktivators der Transkription 1. Nat. wiss. Diss. Marburg 2011

- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998): How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227–264
- Starr R, Hilton DJ (1998): SOCS: Suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1081–1085
- Strehlow I, Schindler C (1998): Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem* 273, 28049–28056
- Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J (2007): Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 14, 229–233
- Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A (2004): STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279, 5811–5820
- Tsui HW, Siminovitch KA, de Souza L, Tsui FW (1993): Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* 4, 124–129
- Tymoszuk P, Charoentong P, Hackl H, Spilka R, Müller-Holzner E, Trajanoski Z, Obrist P, Revillion F, Peyrat JP, Fiegl H (2014): High STAT1 mRNA levels but not its tyrosine phosphorylation are associated with macrophage infiltration and bad prognosis in breast cancer. *BMC Cancer* 14, 257
- Veals SA, Schindler C, Leonard D, Fu XY, Aebersold R, Darnell JE, Levy DE (1992): Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 12, 3315–3324
- Veres G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT (1987): The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237, 415–417
- Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Kuriyan J (1998): Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279, 1048–1052
- Wenta N, Strauss H, Meyer S, Vinkemeier U (2008): Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9238–9243
- Wormald S, Hilton DJ (2004): Inhibitors of Cytokine Signal Transduction. *J Biol Chem* 279, 821–824
- 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
- Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N (2014): Two novel gain-of-function mutations of STAT1 responsible for chronic mucocutaneous candidiasis disease: impaired production of IL-17A and IL-22, and the presence of anti-IL-17F autoantibody. *J Immunol* 193, 4880–4887
- Yang E, Henriksen MA, Schaefer O, Zakharova N, Darnell JE (2002): Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J Biol Chem* 277, 13455–13462
- Yoo JY, Huso DL, Nathans D, Desiderio S (2002): Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell* 108, 331–344
- Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A (1995): A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein

that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* 14, 2816–2826

Zakharova N, Lymar ES, Yang E, Malik S, Zhang JJ, Roeder RG, Darnell JE (2003): Distinct transcriptional activation functions of STAT1alpha and STAT1beta on DNA and chromatin templates. *J Biol Chem* 278, 43067-43073

Zhang J, Somani AK, Siminovitch KA (2000): Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol* 12, 361-378

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

Zhang Y, Molavi O, Su M, Lai R (2014): The clinical and biological significance of STAT1 in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 14, 791

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

Zhu H, Wang Z, Xu Q, Zhang Y, Zhai Y, Bai J, Liu M, Hui Z, Xu N (2012): Inhibition of STAT1 sensitizes renal cell carcinoma cells to radiotherapy and chemotherapy. *Cancer Biol Ther* 13, 401–407

## Danksagung

Die Zeit meiner experimentellen Promotion war von Menschen geprägt, die es verstanden, wissenschaftliches Arbeiten mit einem kollegialen, harmonischen und offenen Miteinander zu verbinden. Dafür bin ich sehr dankbar. Mein Dank geht allen voran an Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer, der mir mit seiner offenen Art, seiner Geduld und seinem Sinn für Humor die Freude an der Forschung näherbrachte. Man konnte sich seiner Hilfe und seines guten Rates immer sicher sein und er zeigte uns Doktoranden, querzudenken und Dinge zu hinterfragen. Ich danke Herrn Prof. Dr. Hermann-Lingen, durch ihn erhielten wir Doktoranden einen strukturierten und allumfassenden Einstieg in die experimentelle Laborarbeit. Ich danke Frau Anke Gregus und Frau Heike Hühne, die mir mit ihrer Fröhlichkeit, ihrem Engagement und ihrer Hilfsbereitschaft die experimentellen Methoden näherbrachten. Ohne ihre Hilfe wären manche Experimente wohl nicht zu retten gewesen. Mein Dank geht an Dr. Julia Staab, sie tauchte mit mir bei Planung, Aufbau oder statistischer Auswertung von Versuchen inhaltlich in die Tiefe und bewies bei ihrer Kompetenz immer eine herzliche Gelassenheit. Frau Dr. Theresa Riebeling danke ich für ihre zahlreichen Hilfestellungen – sei es in der Theorie oder der Praxis. Mein Dank gebührt zudem Frau Wieners, die mir mit ihrer Verlässlichkeit, Ruhe und Teamfähigkeit imponierte.

## Lebenslauf

Mein Name ist Jannis Christian Schiffmann, geboren wurde ich am 30.08.1991 in Göttingen. Nach meinem Abitur mit der Note *sehr gut* (1,4) am Max-Planck-Gymnasium Göttingen, an dem ich unter anderem Verantwortung sowohl als Initiator und Redakteur der Schülerzeitung als auch als Gründer einer Schul-AG übernahm, begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes.

Dort arbeitete ich neben dem Regelstudium als studentischer Tutor im Fach „Chemie für Mediziner“. Im Jahr 2013 konnte ich in Homburg/Saar das erste Staatsexamen M1 mit der Note *sehr gut* (1,5) ablegen und wechselte zur Georg-August-Universität in meine Geburtsstadt.

Dort belegte ich das Wahlfach Schmerzmedizin. Im Jahr 2014 entschied ich mich für eine experimentelle Dissertationsarbeit unter Prof. Dr. mult. Thomas Meyer, für die ich das Wintersemester 2016/17 aussetzte.

Nach dem Abschluss des zweiten Staatsexamens M2 mit der Note *gut* (2) begann ich das erste Tertial des Praktischen Jahres in den chirurgischen Abteilungen im Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende. Darauf folgte das Wahlfach Neurologie im St. Bernward Krankenhaus in Hildesheim, welches mich nachhaltig prägen sollte. Das dritte Tertial der Inneren Medizin durchlief ich im Bethesda Krankenhaus Bergedorf bei Hamburg.

Das dritte Staatsexamen M3 konnte ich mit der Note *sehr gut* (1) abschließen. Nach erfolgreicher Beendigung des Studiums trat ich im September 2018 eine Assistenzarzt-Stelle der Klinik für Neurologie und Klinische Neurophysiologie im St. Bernward Krankenhaus in Hildesheim an.