

Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung auf die Selbstassoziation des Transkriptionsfaktors STAT1

DISSERTATION

**zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Nikola Wenta
aus Berlin**

Berlin, im November 2008

Die vorliegende Arbeit habe ich unter der Leitung von Dr. Uwe Vinkemeier von Oktober 2004 bis Juni 2007 in der Arbeitsgruppe Zelluläre Signalverarbeitung am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch und von Juni 2007 bis Mai 2008 in der School of Biomedical Sciences der University of Nottingham, UK, durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger (Freie Universität Berlin)
Prof. Dr. Uwe Vinkemeier (University of Nottingham, UK)

Datum der Disputation: 23. Februar 2009

*Dir ein Bild sind sie gegeben,
Rastlos vorwärts mußt du streben.*

*Nie ermüdet stille stehn,
Willst du die Vollendung sehn.
Mußt in's Breite dich entfalten,
Soll sich dir die Welt gestalten.*

*In die Tiefe mußt du steigen,
Soll sich dir das Wesen zeigen.*

*Nur Beharrung führt zum Ziel,
Nur die Fülle führt zur Klarheit,
Und im Abgrund wohnt die Wahrheit.*

Friedrich Schiller, Sprüche des Konfuzius

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zytokine und Interferone	1
1.2 Der JAK/STAT-Signalweg	3
1.3 STAT-Proteine	4
<i>Aminoternale Domäne</i>	6
<i>Coiled-Coil-Domäne</i>	6
<i>DNS-bindende Domäne</i>	7
<i>Linker-Domäne</i>	8
<i>SH2-Domäne</i>	9
<i>Transaktivierungsdomäne</i>	10
1.4 STAT-Selbstassoziation	10
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien	15
2.1.2 Laborchemikalien	15
2.1.3 Radiochemikalien	15
2.1.4 Antikörper	15
2.1.5 Enzyme	16
2.1.6 Reaktionschemikaliensätze	16
2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.8 Plasmide	17
2.1.9 Primer und Oligonukleotide	17
2.1.10 Bakterienstämme	19
2.1.11 Eukaryontische Zelllinien	19
2.1.12 Wissenschaftliche Computerprogramme	19
2.2 Methoden	21
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1 Photometrische Bestimmung von DNS-Konzentrationen	21
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion	21

2.2.1.3 Restriktionsverdau von DNS	21
2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNS-Fragmenten	22
2.2.1.5 Ligation von DNS-Fragmenten	22
2.2.1.6 Transformation und Amplifikation rekombinanter DNS in Bakterien	22
2.2.1.7 Isolation rekombinanter DNS aus Bakterien	23
2.2.1.8 Sequenzierung rekombinanter DNS	24
2.2.1.9 Einführung von Punktmutationen in STAT1-kodierende Plasmide	24
2.2.1.10 Klonierung von Expressionsplasmiden	24
2.2.2 Methoden der Zellkultur	26
2.2.2.1 Kultivierung von Säugetierzellen	26
2.2.2.2 Kultivierung von Sf9-Insektenzellen	27
2.2.3 Biochemische, zellbiologische und biophysikalische Methoden	27
2.2.3.1 Transfektion von Säugetierzellen	27
2.2.3.2 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie	28
2.2.3.3 Herstellung von Zellextrakten	29
2.2.3.4 Polyakrylamid-Gelelektrophorese von Proteingemischen	29
2.2.3.5 Coomassie- und Silberfärbung von Proteinen in Polyakrylamidgelen	30
2.2.3.6 Western Blot und immunchemische Proteindetektion	31
2.2.3.7 Expression von Proteinen in Bakterienzellen	31
2.2.3.8 Expression von Proteinen in Sf9-Insektenzellen	32
2.2.3.9 Reinigung rekombinanter Strep-markierter STAT-Proteine	33
2.2.3.10 Präparation des EGF-Rezeptors	34
2.2.3.11 Präparation von Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor	34
2.2.3.12 Alkylierung und Phosphorylierung rekombinanter STAT1-Proteine	34
2.2.3.13 Affinitätschromatographische Reinigung von phosphoryliertem STAT1	35
2.2.3.14 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen	36
2.2.3.15 Massenspektrometrische Analysen	36
2.2.3.16 Nachweis von Protein:DNS-Interaktionen durch EMSA-Experimente	37
2.2.3.17 Analytische Ultrazentrifugation	39
2.2.3.17.1 Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente	41
2.2.3.17.2 Sedimentationsgleichgewichts-Experimente	41

2.2.3.18 Kovalente Vernetzung von Proteinen mit Glutaraldehyd	42
2.2.3.19 Dynamische Lichtstreuung	42
2.2.3.20 Präparative und analytische Grössenausschluss-Chromatographie	43
2.2.3.21 Hydrodynamische Modellierungen und Ermittlung von Assoziationsraten	43
3 Ergebnisse	45
3.1 Charakterisierung der STAT1-T327R- und H406A-Mutanten	45
3.1.1 Subzelluläre Verteilung von STAT1 in HeLa-S3-Zellen	45
3.1.2 Expression, Phosphorylierung und Reinigung von STAT1tc-WT und -Mutanten	46
3.1.3 Eigenschaften der DNS-Bindung von STAT1tc-WT und -Mutanten	50
3.1.4 Stabile Expression der Mutanten in STAT1-defizienten U3A-Zellen	58
3.2 Untersuchung der Selbstassoziation von STAT-Proteinen	60
3.2.1 Expression, Phosphorylierung und Reinigung von STAT-Proteinen	60
3.2.2 Charakterisierung von STAT-Selbstassoziationen	60
<i>Einfluss der Phosphorylierung auf die STAT1-Selbstassoziation</i>	70
<i>Selbstassoziation der N-Domänen</i>	70
3.2.3 Koexistenz der STAT1-Dimere in paralleler und antiparalleler Konformation	73
3.2.4 Kinetische Stabilität der parallelen und antiparallelen STAT1-Dimere	81
3.2.5 Die K_d entspricht der Konzentration von STAT1 in lebenden Zellen	82
4 Diskussion	84
<i>Die verlängerte Kernretention der T327R-Mutante beruht auf unspezifischer DNS-Bindung</i>	84
<i>Verlängerte Kernretention und erhöhte transkriptionelle Aktivität der H406A-Mutante sind unabhängig von der DNS-Bindung</i>	85
<i>Unphosphoryliertes STAT1 benötigt die N-Domäne zur Bildung stabiler Dimere</i>	88
<i>STAT1-Dimere sind vor und nach Phosphorylierung gleich stabil</i>	88
<i>Die Dimerisierung der N-Domänen ist in der STAT-Familie nicht konserviert</i>	91
<i>Die Tyrosin-Phosphorylierung reguliert die Koexistenz von STAT1-Dimeren in der parallelen und antiparallelen Konformation</i>	92
<i>Die zeitliche Stabilität beider Dimer-Konformationen hat eine physiologische Bedeutung bei der Inaktivierung von STAT1</i>	97

5 Zusammenfassung	101
Summary	102
6 Literaturverzeichnis	103
7 Abkürzungen	123
8 Anhang	130
Eigene Publikationen	130
Lebenslauf	131
Danksagung	132
Eidesstattliche Erklärung	134

1 Einleitung

1.1 Zytokine und Interferone

Bei der Kommunikation zwischen Zellen in höheren Eukaryonten stellen die Zytokine eine wichtige Gruppe von Botenstoffen dar, die ihre Wirkung meist lokal entweder auf die sezernierenden (autokrin) oder auf benachbarte Zellen (parakrin) entfalten. In der Regel sind Zytokine funktionell redundant, da verschiedene Zytokine an gemeinsame Rezeptoren binden und so ähnliche Reaktionen auslösen können (Nicola, 1994). Andererseits sind Zytokine jedoch auch pleiotrop und entfalten auf verschiedene Zelltypen unterschiedliche Wirkungen (Paul, 1989). Bei Zytokinen handelt es sich um kleine (ca. 30 kDa) Proteine (Schooltink und Rose-John, 2002), die an spezifische Zytokin-Rezeptoren binden können. Alle Zytokin-Rezeptoren besitzen einen gemeinsamen Aufbau, bestehend aus einer extrazellulären Amino-terminalen Domäne, an der die Ligand-Bindung erfolgt, einer die Zellmembran nur einmal durchquerenden Transmembran-Domäne, sowie einer intrazellulären Carboxy-terminalen Domäne. Die Klasse I-Zytokin-Rezeptoren besitzen in der extrazellulären Domäne eine konservierte Aminosäuresequenz, die bei Zytokin-Rezeptoren der Klasse II nicht enthalten ist (Bazan, 1989). Nach Bindung des Zytokins an den Rezeptor erfolgt oftmals die Dimerisierung oder Oligomerisierung der Rezeptor-Untereinheiten, die den Rezeptorkomplex aktiviert und die Weiterleitung des Signals bewirkt.

Zytokine sind phylogenetisch nicht verwandt, jedoch lassen sie sich aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeit in verschiedene Familien einteilen (Thomson, 1998). Die Hämatoopoetin-Familie umfasst die meisten Mitglieder, die allesamt als Haupt-Strukturelement ein 4-Helix-Bündel enthalten. Neben den meisten Interleukinen (IL) umfasst diese Familie auch zahlreiche Wachstumsfaktoren und ist massgeblich an der Zell-Proliferation und -Differenzierung, sowie der Koordination der Funktionen des Immunsystems beteiligt. Eine weitere wichtige Familie innerhalb der Zytokine bilden die für diese Arbeit bedeutsamen Interferone (IFN), die ihren Namen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interferenz mit Virusinfektionen erhalten haben (Isaacs und Lindenmann, 1957). Die IFN-Familie umfasst drei strukturell nicht verwandte Untergruppen: die Typ I-Interferone α , β , ω und τ , sowie das einzige Typ II-Interferon, $\text{IFN}\gamma$ und das einzige Typ III-Interferon, $\text{IFN}\lambda$. Die Vertreter der Typ I-Interferone, die beim Menschen allesamt auf Chromosom 9 kodiert sind und in Leukozyten und Fibroblasten

produziert werden, binden an einen gemeinsamen Klasse II-Zytokin-Rezeptor, der auf der Oberfläche sämtlicher Kern-haltiger Zellen exprimiert wird (Novick *et al.*, 1994). IFN γ hingegen ist auf Chromosom 12 kodiert und wird nur in T-Zellen und zytotoxischen Lymphozyten produziert. Es bindet an einen eigenen Klasse II-Zytokin-Rezeptor, der ebenfalls auf der Oberfläche sämtlicher Kern-haltigen Zelltypen mit Ausnahme von Erythrozyten exprimiert wird (Langer und Pestka, 1988). Über die Signalwege von Typ III-Interferonen (IFN λ) ist bisher wenig bekannt; sie scheinen jedoch nicht an die klassischen IFN-Rezeptoren zu binden.

Die Hauptfunktion der Interferone liegt in der Induktion der Transkription von Komponenten des Immunsystems. Zur Abwehr von Virusinfektionen sind dabei verschiedene Mechanismen bekannt, die auf der Erkennung viraler RNS beruhen. Ein Weg verläuft über die transkriptionelle Aktivierung der GTPase Mx, die durch Inhibition der Transkription viraler RNS die Virusreplikation erschwert (Frese *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1996). Ein weiterer Weg führt über die Induktion der Expression von 2'-5'-Oligoadenylat-Synthasen, die kurze 2'-5'-Oligoadenylat-Fragmente produzieren, die an RNase L binden und sie so aktivieren. Letztendlich kommt es so zur Zerstörung jeglicher einzelsträngiger RNS in der Zelle (Cirino *et al.*, 1997; Diaz-Guerra *et al.*, 1997). Ein dritter Weg involviert die Zytokin-abhängige Expression der RNS-abhängigen Proteinkinase R (PKR). Nach ihrer Aktivierung durch Phosphorylierung phosphoryliert sie ihrerseits die α -Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors eIF2 und bewirkt so dessen Inaktivierung und damit eine effiziente Inhibition der Translation viraler Proteine (Meurs *et al.*, 1992). Da virale und bakterielle Infektionen zur Synthese von Interferonen führen, kann ausserdem über verschiedene Signalwege Kontrolle über den Zellzyklus, beispielsweise durch Suppression der Expression von Cyclin D3 und c-Myc (Tiefenbrun *et al.*, 1996) oder durch Auslösung von Apoptose ausgeübt werden. Als eine weitere Funktion der Interferone ist die Regulation der Expression von Bestandteilen des MHC (*Major Histocompatibility Complex*) zu nennen. Während dies für den MHC I über einen von IRF (*Interferon Response Factor*)-1 abhängigen Weg durch Typ I- und Typ II-Interferone geschieht (Chang *et al.*, 1992), wird der Aufbau des MHC II ausschliesslich durch IFN γ über CIITA (*MHC Class II Transactivator*) gesteuert (Mach *et al.*, 1996; Boehm *et al.*, 1997). Ausserdem reguliert IFN γ die Expression von Proteinen des Proteasoms wie z.B. LMP (*Low molecular Mass Polypeptide*)-2 und -7, die Antigene zu Peptiden prozessieren (York und Rock, 1996). Diese werden dann wiederum durch die ebenfalls über IFN γ induzierten TAP (*Transporter Associated with Antigene Processing*)-1

und -2 zum MHC I transportiert (Epperson *et al.*, 1992). Weiterhin aktiviert IFN γ in Makrophagen die Produktion zytotoxischer reaktiver Sauer- und Stickstoff-Spezies (MacMicking *et al.*, 1997) und induziert die Differenzierung von T-Helferzellen, die neben zytotoxischen Lymphozyten als einzige Zelltypen IFN γ produzieren. In B-Zellen, die für die Produktion von Immunglobulinen (Ig) zuständig sind, hat IFN γ entscheidenden Einfluss auf deren Entwicklung, sowie auf die Antikörpersekretion und -spezifität (Snapper und Paul, 1987).

1.2 Der JAK/STAT-Signalweg

Der Weg eines extrazellulären Signals in Form eines Zytokins von der Detektion durch einen Rezeptor bis hin zur spezifischen Reaktion der Zelle beinhaltet viele Etappen aus Signalumwandlung und -weiterleitung und wird als Signaltransduktion bezeichnet. Ein sehr gut untersuchter Mechanismus der Signaltransduktion als Reaktion auf Zytokinstimulation besteht in einem hochkonservierten Signalweg (Abb. 1.1), der die Phosphorylierung von Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) durch Rezeptor-assoziierte Kinasen beinhaltet (Darnell *et al.*, 1994).

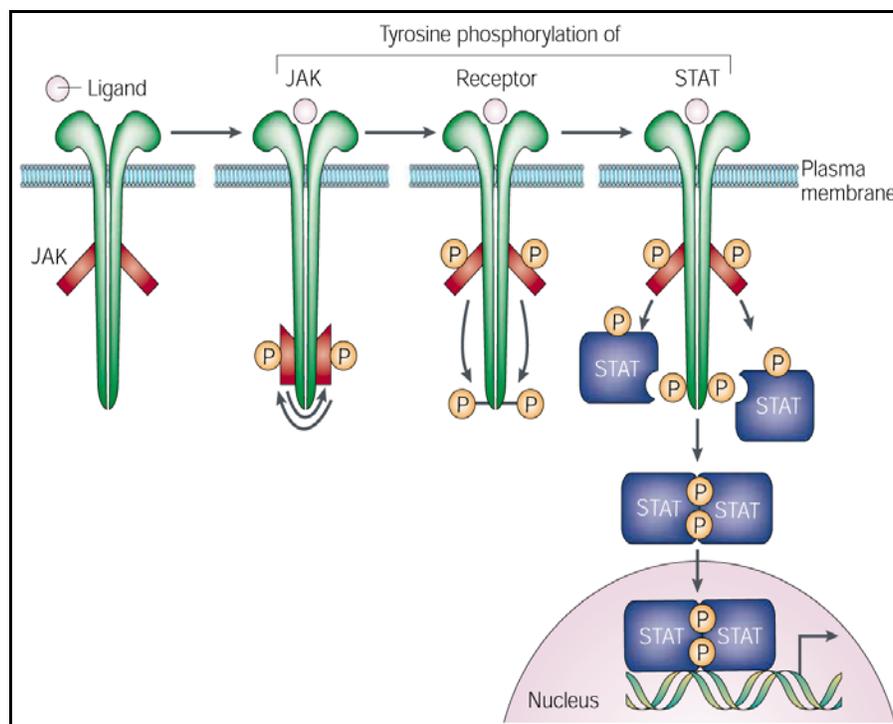


Abb. 1.1 JAK/STAT-Signalweg. Nach Ligandbindung an den Rezeptor und dessen Dimerisierung wird eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die letztendlich zur Phosphorylierung des invarianten Tyrosinrests von STAT-Proteinen führt. Daraufhin dimerisieren diese und translozieren in den Zellkern, wo sie durch Bindung an spezifische Promotor-Elemente Zielgene aktivieren. Entnommen aus: Levy und Darnell (2002).

Nach Bindung des dimeren Zytokins an beide Rezeptoruntereinheiten erfolgt die Dimerisierung des Rezeptors. Es kommt dadurch zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen (JAKs) und zur Transphosphorylierung des Rezeptors und der JAKs. Unphosphorylierte STAT-Proteine binden mit ihrer SH2 (*Src Homology 2*)-Domäne an einen Phosphotyrosinrest des Rezeptors. Daraufhin werden die STATs durch JAKs an einem in der STAT-Familie invarianten Tyrosinrest in der Carboxy-terminalen SH2-Domäne phosphoryliert (Shuai *et al.*, 1993). Dies führt zur Dimerisierung von phosphorylierten STAT-Monomeren (Shuai *et al.*, 1994), die daraufhin in wenigen Minuten im Nukleus akkumulieren (Melen *et al.*, 2001; Fagerlund *et al.*, 2002). Der Import erfolgt nach STAT-Bindung an Importine über einen durch Ran-GTPasen angetriebenen Prozess (Ma und Cao, 2004). Im Zellkern wird dann durch Bindung an spezifische Promotorregionen die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen bewirkt (Decker *et al.*, 1997; Stark *et al.*, 1998). Nach beendeter DNS-Bindung kann durch die Phosphatase TC45 (ten Hoeve *et al.*, 2002) die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der STATs und daraufhin der Export ins Zytoplasma erfolgen.

1.3 STAT-Proteine

Die Familie der STAT-Proteine ist seit dem evolutiven Übergang von einzelligen zu vielzelligen Eukaryonten in sämtlichen tierischen Organismen, jedoch nicht in Pflanzen und Pilzen konserviert (Darnell, 1997). Bisher wurden STATs in Schleimpilzen, Nematoden und Insekten (Liu *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1996; Kawata *et al.*, 1997; Barillas-Mury *et al.*, 1999), sowie Vertebraten (Oates *et al.*, 1999; Pascal *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2003) nachgewiesen. Beim Menschen sind 7 Mitglieder der STAT-Familie bekannt: STAT1, -2, -3, -4, die durch zwei verschiedene Gene kodierten -5A und -5B, sowie STAT6. Die Gene für STAT1 und STAT4 sind beim Menschen auf Chromosom 2, für STAT3, -5A und -5B auf Chromosom 17 und für STAT2 und STAT6 auf Chromosom 12 lokalisiert (Copeland *et al.*, 1995). Alle STATs weisen identische Tertiär- und Domänenstrukturen auf und enthalten in der SH2-Domäne einen invarianten Tyrosinrest, der in phosphorylierter Form für die STAT-Dimerisierung benötigt wird (Schindler *et al.*, 1992; Shuai *et al.*, 1992; Shuai *et al.*, 1993).

Viele Erkenntnisse über die Zusammenhänge von zytokinspezifischer Rezeptoraktivierung und den Funktionen der STATs wurden durch spezifische Gendelektions-Experimente von STAT- bzw. Rezeptor-Genen in Mäusen gewonnen (Übersichtsartikel: Akira, 1999). Durch IFN γ oder

EGF aktiviertes STAT1 (Chin *et al.*, 1996; Bromberg *et al.*, 1998) spielt demnach ebenso wie STAT2 (Park *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007) eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen, indem es über IRF1 oder p21 das Zellwachstum inhibiert. Weiterhin kann STAT1 durch TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)- α oder IFN γ aktiviert werden und durch Regulation der basalen Expression von Kaspasen Apoptose auslösen (Chin *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1997). Ebenfalls beschrieben ist die Beteiligung von STAT1 am Fas-abhängigen Apoptoseweg (Lee *et al.*, 2000; Ouchi *et al.*, 2000). Hingegen wirken STAT3 (Fukada *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1998), -4, -5A und -5B (Fujii *et al.*, 1995; Chretien *et al.*, 1996; Friedmann *et al.*, 1996), sowie STAT6 (Kaplan *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996) überwiegend proliferativ und antiapoptotisch. Bemerkenswert ist dabei die strikte gegenseitige Regulation zwischen den pro- und antiapoptotischen STATs. Insbesondere das Zusammenspiel zwischen STAT1 und STAT3 ist ein gut untersuchtes Beispiel dafür. Einerseits entscheidet die Interaktion der Spleiss-Varianten STAT3 α und des dominant-negativen STAT3 β (Caldenhoven *et al.*, 1996), ob sich die pro- oder antiapoptotische bzw. pro- oder antiproliferative Wirkung des aktivierten STAT3 entfaltet (Skov *et al.*, 1998). Andererseits kann bei der Regulation der p53-abhängigen Apoptose STAT1 über das Onkogen Mdm2 die Induktion von p53-responsiven proapoptotischen Genen wie Noxa, Bax und Fas auslösen und so der Funktion des antiapoptotischen Faktors STAT3 entgegenwirken (Townsend *et al.*, 2004). Wird jedoch die STAT1-Funktion durch SOCS oder PIAS inhibiert, kann STAT3 seinerseits die Apoptose unterdrücken und somit die Zellproliferation fördern. Im Folgenden werden die Funktionen der einzelnen Domänen im STAT-Protein (Abb. 1.2) detailliert beschrieben.

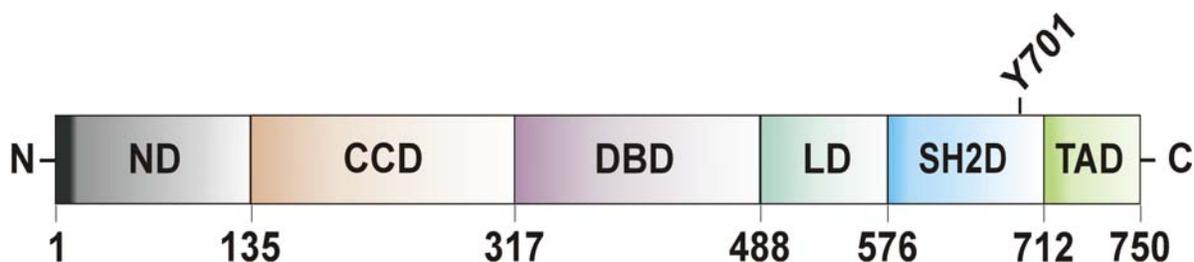


Abb. 1.2 Die innerhalb der STAT-Familie konservierte Domänenstruktur besitzt, hier für STAT1 dargestellt, eine N-terminale Domäne (ND, 135 AS), an die sich das 4-Helix-Bündel ("Coiled-Coil"-Domäne, CCD, 182 AS) und die DNS-Bindedomäne (DBD, 171 AS) anschliessen. Diese ist über eine kurze Linker-Domäne (LD, 78 AS) mit der SH2-Domäne (SH2D, 136 AS) verbunden, die den invarianten phosphorylierbaren Tyrosin⁷⁰¹-Rest enthält. Am extremen Carboxy-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD, 38 AS), die in der Spleiss-Variante STAT1 β nicht vorhanden ist. Modifiziert übernommen aus Vinkemeier (2004).

Aminoterminaler Domäne

Die Aminoterminaler Domäne (ND) ist nach der SH2-Domäne die am besten konservierte Domäne innerhalb der STAT-Familie (Abb. 1.3). Die Hauptfunktion der bei den verschiedenen STATs 124-145 AS langen ND scheint in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktion zu liegen. Sie erstreckt sich auf die bereits in der Kristallstruktur der isolierten STAT4-ND gezeigte Fähigkeit zur Homodimerisierung (Vinkemeier *et al.*, 1998), die bei der Bindung an benachbarte GAS-Stellen durch ND:ND-Interaktion zwischen den DNS-gebundenen Dimeren die Stabilität der DNS-Bindung erhöht (Vinkemeier *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Vinkemeier *et al.*, 1998). Ausserdem konnten für STAT1 in der ND Interaktionsoberflächen mit PIAS1 (Liao *et al.*, 2000), CBP/p300 (Horvath, 2000) und Zytokinrezeptoren (Leung, 1996; Murphy 2000) identifiziert werden. Weiterhin enthält die ND von STAT1 ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localisation Signal*), das den Kernimport des phosphorylierten STAT-Dimers durch Interaktion mit Importinen ermöglicht (Meissner *et al.*, 2004). Letztlich befindet sich im C-terminalen Bereich der ND ein flexibler Bereich, der zur *Coiled-Coil*-Domäne überleitet.

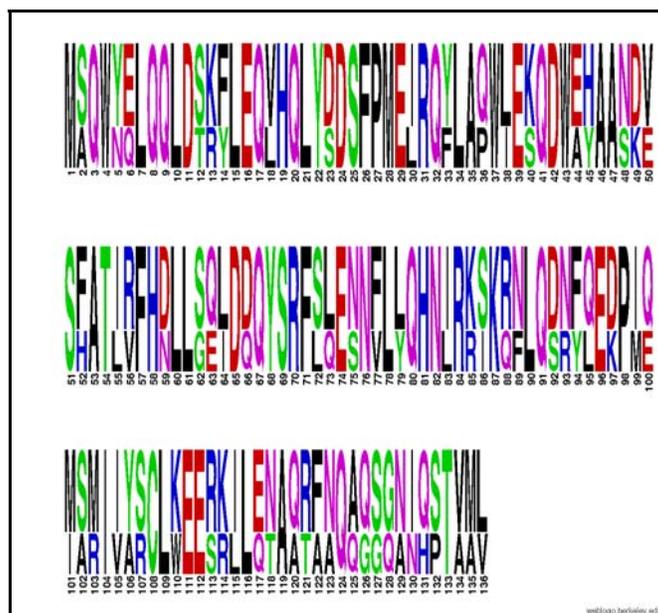


Abb. 1.3 Konservierung der Aminosäuresequenzen der N-terminalen Regionen von STAT1, -3 und -4. Die Darstellung des Sequenzvergleichs wurde mit Weblogo (Crooks *et al.*, 2004) erstellt. Konservierte positiv geladene Aminosäuren sind in blau, negativ geladene in rot, polare in grün und aliphatische in schwarz hervorgehoben.

Coiled-Coil-Domäne

Die mit der ND flexibel verbundene, als *Coiled-Coil*-Domäne (CCD) bezeichnete Untereinheit enthält als strukturelles Hauptelement 4 α -Helizes. Sie ist 149-187 AS lang und für die Bindung

an Zytokinrezeptoren verantwortlich (Zhang *et al.*, 2000). Weiterhin enthält sie bei STAT3 und STAT5 ein NLS (Liu *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2002), sowie bei STAT1 ein Kernexportsignal (Begitt *et al.*, 2000). Ausserdem vermittelt die CCD bei STAT3 über ihre hydrophile Oberfläche Protein:Protein-Interaktionen mit IRF9 (Zhang *et al.*, 2002), c-Jun (Zhang *et al.*, 1999), Importin $\alpha 3$ (Ma und Cao, 2006) und GRIM19 (Lufei *et al.*, 2003).

DNS-bindende Domäne

Die DNS-bindende Domäne (DBD) von STAT1 (172 AS) hat eine Immunglobulin-ähnliche Tertiärstruktur, die der von NF- κ B (Kernfaktor κ B) und p53 ähnelt (Chen *et al.*, 1998). Die Hauptfunktion der DBD liegt in der Vermittlung sehr starker Protein:DNS-Interaktionen (Wegenka *et al.*, 1993; Sadowski *et al.*, 1993) mit nanomolaren Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (Vinkemeier *et al.*, 1996), bei denen jedes phosphorylierte Monomer eine halbe palindromische GAS-Stelle bindet. Zu den Zielgenen gehören bei allen STATs Regulatoren, die über negative Rückkopplung die STAT-Funktion inhibieren können, wie z.B. SOCS-Proteine (Starr *et al.*, 1997). Weiterhin induziert STAT1 die Expression zahlreicher Gene, die in der Immunantwort oder Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Horvath, 2000). Durch STAT3 wird hingegen vor allem die Transkription von Akut-Phase-Genen (Wegenka *et al.*, 1993), Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin D1, sowie antiapoptotisch wirkender Proteine wie Bcl-X_L (Bromberg *et al.*, 1999) und McI1 (Puthier *et al.*, 1999; Epling-Burnette *et al.*, 2001) induziert. Durch Interaktion mit IRF9, CBP/p300 oder c-Jun kann die Transaktivierung einiger STAT-Zielgenen weiter gesteigert werden. Ausserdem vermittelt die DBD via Importin α (McBride *et al.*, 2002; Ma und Cao, 2006) den Kernimport, da sie ein NLS besitzt (Meyer *et al.*, 2002). Sie enthält darüber hinaus zwei für diese Arbeit relevante Aminosäurereste, die durch rationale Mutagenese erzeugt wurden und interessante Effekte auf die DNS-Bindung und die damit verbundene Retention im Zellkern und Dephosphorylierung der Mutanten haben (Abb. 1.4). Die Mutation T327R ist Bestandteil der „DNS^{plus}“-Mutante, in der die drei Aminosäurereste T327, V426 und T427, die Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphat-Rückgrat der DNS eingehen, zu positiv geladenen Aminosäuren mutiert wurden (Meyer *et al.*, 2003). Diese Mutante zeichnet sich durch unspezifische und im Gegensatz zum Wildtyp (WT) verlängerte DNS-Bindung an Nicht-GAS-Elemente aus. Damit verbunden ist ein Defekt in der Tyrosin-Dephosphorylierung, der vermutlich auf sterische Hinderung der Bindung der Phosphatase TC45

an das STAT-Molekül im DNS-gebundenen Zustand zurückzuführen ist, sowie eine verlängerte Retention im Nukleus. Dennoch ist diese Mutante, die besser als der Wildtyp an DNS binden kann, nicht in der Lage, STAT-Zielgene transkriptionell zu aktivieren. Die „DNS^{minus}“-Mutante mit den Mutationen V426D und T427D hingegen kann weder Sequenz-spezifisch noch -unspezifisch an DNS binden. Als Konsequenz ist sie im Gegensatz zum Wildtyp und auch zur DNS^{plus}-Mutante nicht in der Lage, im Zellkern zu akkumulieren. Die zweite relevante Mutante, bei der die Aminosäure H406 durch Alanin ersetzt wurde, zeichnet sich ebenfalls durch Resistenz gegen Dephosphorylierung und vor allem durch eine höhere transkriptionelle Aktivität als STAT1-WT aus (Dr. Thomas Meyer, persönliche Kommunikation).

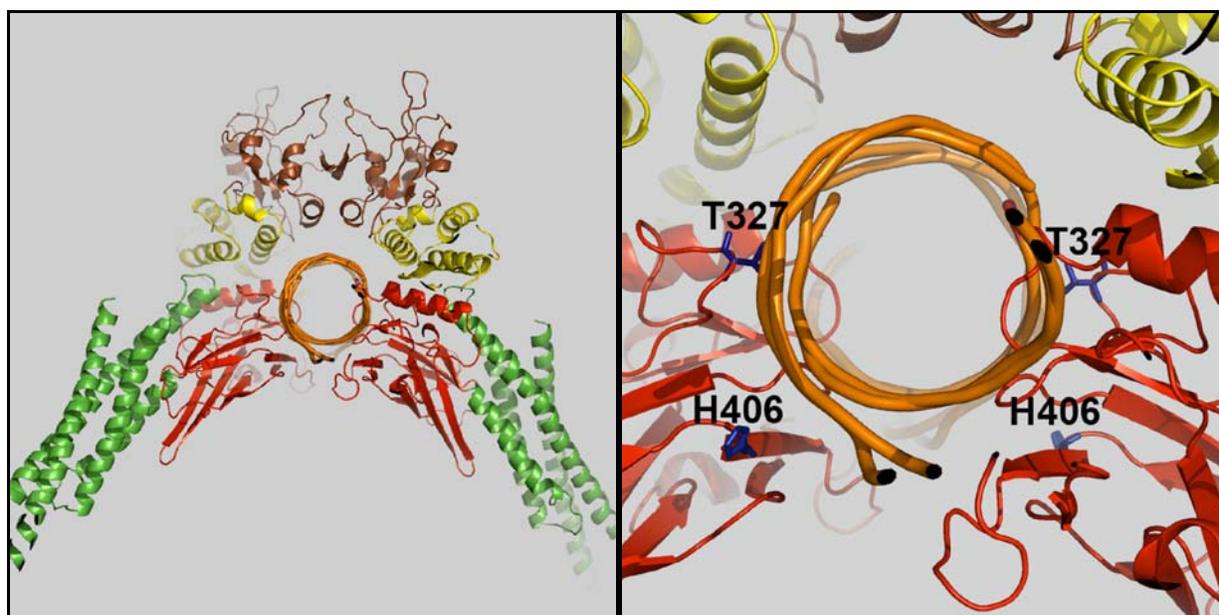


Abb. 1.4 Kristallstruktur von DNS-gebundenem P-STAT1tc (links) und vergrößerter Ausschnitt (rechts) der die DNS (orange) kontaktierenden Aminosäurereste T327 und H406 (als Stabmodell) in der DNS-Bindedomäne (rot). Die Abbildung wurde mit Pymol anhand des Protein Data Bank (PDB)-Koordinatendatensatzes 1BF5 erstellt.

Linker-Domäne

Die 88-95 AS lange *Linker-Domäne* (LD) verbindet DB- und SH2-Domäne. Sie vermittelt bei STAT3 die Interaktion mit dem proapoptischen Faktor GRIM19 (Lufe *et al.*, 2003) und ist bei STAT1 an der Regulation der transkriptionellen Aktivität beteiligt (Yang *et al.*, 1999), indem sie durch strukturelle Änderungen in der SH2-Domäne die DNS-Bindung induziert (Chen *et al.*, 1998). Weiterhin scheint sie für die Bindung von STAT1 an den Kernporen-Komplex und somit für die Regulation des Kernimports notwendig zu sein (Marg *et al.*, 2004).

SH2-Domäne

Die SH2-Domäne (SH2D) ist die am stärksten konservierte Domäne innerhalb der STAT-Familie. Sie ermöglicht den STATs die Bindung an Phosphotyrosin-Reste von Zytokin-Rezeptoren (Greenlund *et al.*, 1995; Schindler *et al.*, 1995), sowie die Interaktion mit anderen STATs (Shuai *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996). Die Homo- und Heterodimerisierung erfolgt durch die reziproke Interaktion der SH2-Domäne mit einem invarianten phosphorylierten Tyrosinrest des anderen STAT-Moleküls (Shuai *et al.*, 1993). Obwohl sich die SH2-Domäne der STAT-Proteine deutlich in ihrer Primär- und Sekundärstruktur von SH2-Domänen anderer Proteinen unterscheidet (Darnell, 1997; Kawata *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2004), ist der Mechanismus der Phosphotyrosin:SH2-Interaktion in beiden Fällen sehr ähnlich (Kuriyan und Cowburn, 1997). Die Erkennung der Phosphatgruppe des Phosphotyrosinrests 701 von STAT1 erfolgt durch einen in sämtlichen bekannten SH2-Domänen konservierten Argininrest, der bei STAT1 an Position 602 lokalisiert ist (Abb. 1.5).

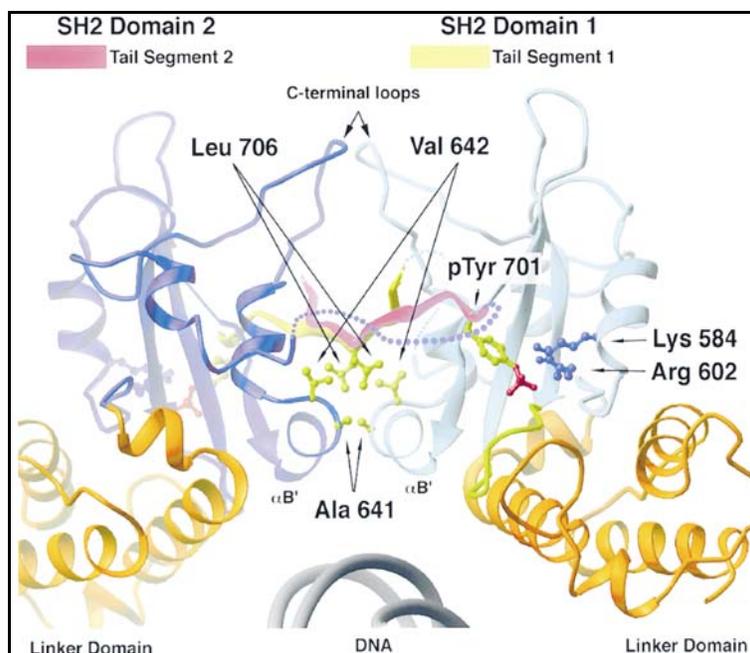


Abb. 1.5 Vergrößerter Ausschnitt der Phosphotyrosin:SH2-Interaktionsoberfläche im DNS-gebundenen STAT1-Dimer. Der phosphorylierte Tyrosinrest 701 (pTyr 701) wird durch Arg 602 erkannt und durch Lys 584 koordiniert. Stabilisiert wird die SH2-Domänen-Interaktion durch Leuzin 706, das in eine durch Alanin 641 und Valin 642 gebildete hydrophobe Bindungstasche hineingreift. Entnommen aus: Chen *et al.* (1998).

Die Koordination der Phosphatgruppe erfolgt durch einen nur in STAT-Proteinen konservierten Lysinrest (bei STAT1: Lys⁵⁸⁴). In der prototypischen SH2-Domäne der v-Src-Tyrosinkinase wird diese Funktion hingegen durch einen weiteren Argininrest ausgeübt (Waksman *et al.*, 1992). Bei

Experimenten mit Phosphopeptiden stellte sich ausserdem heraus, dass die SH2-Interaktion fast ausschliesslich durch die Aminosäurereste 701-708 vermittelt wird (Shuai *et al.*, 1994). Dabei interagiert der Leuzinrest 706 mit einer hydrophoben Bindungstasche, die von Ala⁶⁴¹ und Val⁶⁴² gebildet wird. Ausserdem vermittelt die SH2-Domäne die Interaktion mit Janus-Kinasen (Gupta *et al.*, 1996; Barahmand-Pour *et al.*, 1998). Kürzlich wurde bei STAT3 entdeckt, dass in einer Konsensussequenz (G[S]K_{x3-5}P) der Lysinrest 685 reversibel azetyliert werden kann (Yuan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Für die Funktion von STAT3 scheint diese Modifikation kritisch zu sein, da sie möglicherweise die Dimerisierung und damit auch die DNS-Bindung und die Aktivierung von Zielgenen reguliert (Yuan *et al.*, 2005).

Transaktivierungsdomäne

Die Transaktivierungsdomäne (TAD) ist mit einer Länge von 38 AS bei STAT1 und 195 AS bei STAT6 die am wenigsten konservierte Domäne innerhalb der STAT-Familie. Wahrscheinlich trägt diese Tatsache zur Zielgenspezifität der verschiedenen STATs bei. Darüber hinaus vermittelt sie Protein:Protein-Interaktionen mit CBP/p300 (Zhang *et al.*, 1996), MCM5 (Zhang *et al.*, 1998), BRCA1 (Ouchi *et al.*, 2000) und NCoA1 (Litterst und Pfizner, 2001). Ausserdem enthält die TAD von STAT1, -3, -4, sowie -5A und -5B einen invarianten Serinrest, der für die maximale transkriptionelle Aktivierung einiger Gene phosphoryliert werden muss (Wen *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Decker und Kovarik, 2000). Durch alternatives Spleissen entstehen Carboxy-terminal verkürzte β -STAT-Varianten, die zwar weiterhin nach Tyrosin-Phosphorylierung dimerisieren und DNS binden können, jedoch unfähig zur Transaktivierung von Zielgenen sind und somit als dominant-negative Regulatoren der Volllänge-Proteine (α -STATs) auftreten können.

1.4 STAT-Selbstassoziation

Bisherige Forschungsarbeiten haben die Vorstellung geprägt, dass nur phosphorylierte STAT-Proteine (P-STATs) zu Dimerisierung, Translokation in den Zellkern, DNS-Bindung und transkriptioneller Aktivierung von Zielgenen befähigt sind. Neue Forschungsergebnisse haben jedoch das Bild der molekularen Funktion insbesondere der unphosphorylierten STATs (U-STATs) in wichtigen Punkten gewandelt (Sehgal, 2008). Aus den Resultaten von Gradientenzentrifugations-, Gelfiltrations- und Immunpräzipitations-Experimenten wurde der

Schluss gezogen, dass STAT-Dimere oder höheren Oligomere bereits vor ihrer Aktivierung durch Tyrosin-Phosphorylierung existieren (Stancato *et al.*, 1996; Novak *et al.*, 1998; Ndubuisi *et al.*, 1999; Haan *et al.*, 2000; Braunstein *et al.*, 2003). Mittlerweile liegen ausserdem Kristallstrukturen von unphosphorylierten STATs vor. (Mao *et al.*, 2005; Neculai *et al.*, 2005). Diese zeigen, dass unphosphoryliertes STAT1 β (Abb. 1.6) und STAT5Atc Dimere bilden können.

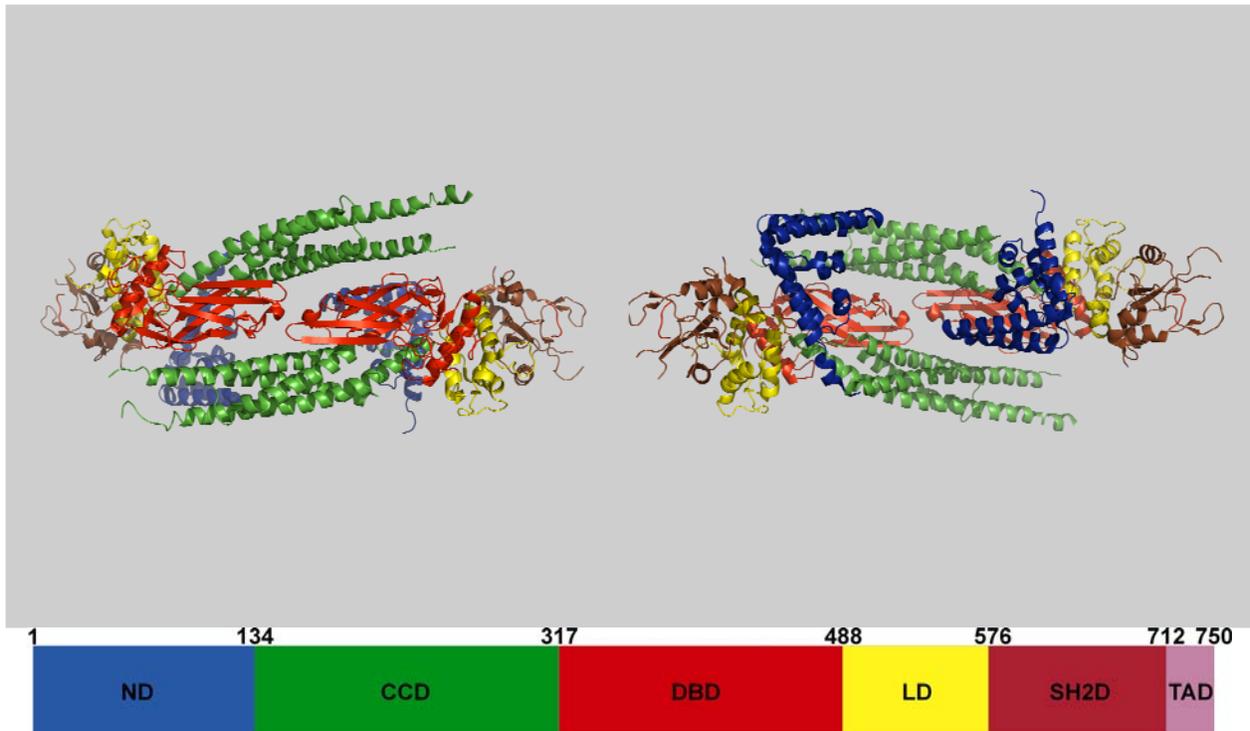


Abb. 1.6 Kristallstruktur des humanen unphosphorylierten STAT1 β aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. Die Domänen sind farbkodiert (unten): Die N-Domänen (ND) sind blau, die 4-Helix-Bündel sind grün, die DNS-Bindedomänen (DBD) rot, die Linkerdomänen (LD) gelb und die SH2-Domänen braun hervorgehoben. Die Transaktivierungsdomänen (TAD) sind nicht in den Kristallstrukturen enthalten. Die Abbildungen wurden mit Pymol anhand des PDB-Koordinatendatensatzes 1YVL erstellt.

Im Kristall nehmen die unphosphorylierten STAT-Dimere eine sogenannte antiparallele Konformation ein, die durch ND:ND- und reziproke DBD:CCD-Interaktionen stabilisiert wird. Bei der letzteren Interaktion greift bei STAT1 der Benzyl-Rest von F172 in der *Coiled-Coil*-Domäne des einen Monomers in eine Bindungstasche in der DNS-bindenden Domäne des anderen Monomers hinein (Mao *et al.*, 2005). In dieser antiparallelen Konformation erscheint aufgrund der räumlichen Anordnung der DNS-Bindedomänen zueinander keine mit dem Phospho-Dimer vergleichbare Bindung an palindromische doppelsträngige DNS möglich zu sein. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass U-STAT1 im Komplex mit IRF1 (Chatterjee-

Kishore *et al.*, 1998) und U-STAT3 im Komplex mit NF- κ B Zielgene transkriptionell aktivieren kann (Yang *et al.*, 2007).

Im Zuge der Phosphorylierung der STATs am Rezeptor muss eine dramatische Konformations-Veränderung der Dimere stattfinden, da sich die Kristallstrukturen des phosphorylierten (Abb. 1.7) und des unphosphorylierten Dimers (s. Abb. 1.6) deutlich voneinander unterscheiden.

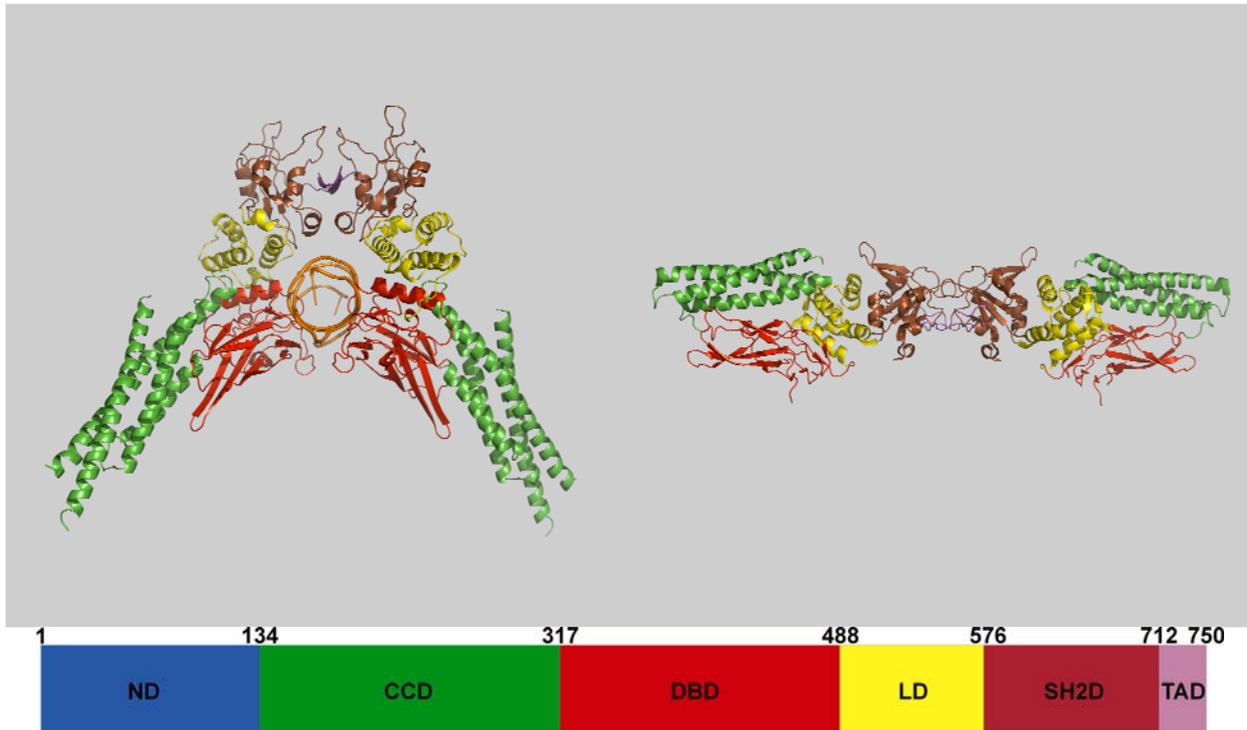


Abb. 1.7 Kristallstrukturen von phosphoryliertem DNS-gebundenem STAT1 (links) und -ungebundenem Dictyostelium-STAT (rechts). Die Domänen sind farbkodiert (unten): Die N-Domänen (ND) sind, ebenso wie die Transaktivierungsdomänen (TAD), nicht in den Kristallstrukturen enthalten. Die 4-Helix-Bündel sind grün, die DNS-Bindedomänen (DBD) rot, die Linkerdomänen (LD) gelb und die SH2-Domänen braun hervorgehoben. Die doppelsträngige DNS ist orange dargestellt. Die Abbildungen wurden mit Pymol anhand der PDB-Koordinatendatensätze 1BF5 bzw. 1UUR erstellt.

Die phosphorylierten Dimere werden nunmehr durch reziproke SH2:Phosphotyrosin-Interaktionen stabilisiert, die in Abschnitt 1.3 bereits detailliert beschrieben wurden. Diese SH2-vermittelte Konformation wird als parallele Konformation bezeichnet und hat zur Konsequenz, dass die N-Domänen zwischen den Monomeren nicht mehr miteinander interagieren können. Allerdings können auf DNS bei benachbarten STAT-Bindestellen die Phospho-Dimere über ihre N-Domänen miteinander interagieren und dadurch Tetramere oder sogar höhere Oligomere bilden (Vinkemeier *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996). Wie Kristallstrukturen von isolierten N-Domänen belegen, ist für deren Dimerisierung der Aminosäure-Rest F77 verantwortlich (Chen *et al.*, 2003). Bei funktionalen Experimenten mit der Punktmutante F77A stellte sich heraus, dass

beim phosphorylierten STAT1 die Tetramere auf DNS destabilisiert werden. Ausserdem führt die Mutation F77A auch zur einer Destabilisierung der unphosphorylierten STAT1-Dimere. Daher scheint interessanterweise dieselbe Interaktionsoberfläche sowohl für die Oligomerisierung des phosphorylierten STAT1 auf DNS als auch für die Dimerisierung des unphosphorylierten STAT1 verantwortlich zu sein.

Die Tyrosin-Phosphorylierung ist eine reversible Modifikation und kann durch Dephosphorylierung wieder rückgängig gemacht werden. Überraschenderweise führen Mutationen (u.a. F77A, F172W), die die antiparallele Dimer-Konformation destabilisieren, zu einem Dephosphorylierungs-Defekt. Daraus kann gefolgert werden, dass vor der Dephosphorylierung eine erneute Umlagerung stattfindet, diesmal jedoch des phosphorylierten parallelen Dimers in die antiparallele Konformation. In dieser Konformation liegen die Phosphotyrosin-Reste in den SH2-Domänen nunmehr exponiert vor und könnten so ohne sterische Hinderungen von Phosphatasen dephosphoryliert werden, wie die Kristallstruktur des unphosphorylierten STAT1-Dimers (s. Abb. 1.6) nahelegt. Auf der Basis der vorgestellten Erkenntnisse wurde von Darnell und Mitarbeitern ein faszinierendes Modell entwickelt, das die Umlagerungsreaktionen bei Phosphorylierung und Dephosphorylierung beschreibt. Laut Modell wird es für möglich gehalten, dass die N-Domänen während der Umlagerungsreaktionen verbunden bleiben können, während sich der C-terminale Bereich des STAT-Moleküls umlagert, da die N-Domäne über einen flexiblen Bereich mit dem Rest des STAT-Moleküls verbunden ist (Zhong *et al.*, 2005; Mertens *et al.*, 2006).

1.5 Zielsetzung

Die neuen Erkenntnisse über die Mechanismen der Dimerisierung von STAT-Proteinen deuten darauf hin, dass die Tyrosin-Phosphorylierung einen entscheidenden Einfluss auf die dabei ablaufenden Umlagerungsreaktionen hat. Obwohl diese Prozesse weitaus komplexer sind als bislang angenommen wurde, liegen noch keine quantitativen Daten über die Dynamik der STAT-Selbstassoziation vor. Deshalb soll in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung auf die Oligomerisierung eines STAT-Proteins untersucht werden. Quantitative Daten aus der analytischen Ultrazentrifugation sollen dabei Aufschluss über den Oligomerisierungszustand und die thermodynamische Stabilität der Oligomere vor und nach Tyrosin-Phosphorylierung liefern. Weiterhin soll durch Deletionsmutanten der Beitrag der

einzelnen Interaktionsoberflächen zur Stabilisierung der Oligomere untersucht werden. Dies würde möglicherweise auch Aufschluss über die Konformationen der Dimere geben. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob und in welchem Ausmass die verschiedenen Dimer-Konformationen vor und nach Phosphorylierung koexistieren. Damit geht die bedeutsame Frage einher, ob auch unphosphorylierte STAT1-Dimere an DNS binden können. Diese Untersuchungen würden ebenfalls Rückschlüsse auf die Konformation(en) der unphosphorylierten STAT-Dimere erlauben. Ausserdem soll der Mechanismus der Dimer-Umlagerungen untersucht werden. Insbesondere gilt es dabei zu prüfen, ob die Umlagerung tatsächlich durch die Interaktion der N-Domänen vermittelt wird oder stattdessen ausschliesslich durch die Dissoziation der Dimere und Reassoziaton der Monomere in einer anderen Konformation erfolgt. Die Geschwindigkeit, mit der die Umlagerungsreaktionen ablaufen, ist unbekannt. Da diese Frage jedoch von grosser physiologischer Bedeutung ist, wird die Kinetik der Umlagerungsprozesse hier ebenfalls untersucht. Überdies soll in dieser Arbeit die DNS-Bindung zweier STAT1-Varianten mit Mutationen in der DNS-Bindedomäne studiert werden. Hier ist zu klären, ob ihre in Vorversuchen beobachtete verzögerte Dephosphorylierung und verlängerte Kernakkumulation auf eine veränderte DNS-Bindung zurückzuführen ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Sämtliche Puffer, Lösungen und Medien wurden mit entionisiertem und durch Milli Q-Filter mit 0,2 µm Porengröße (Millipore, Bedford, MA) sterilisiertem Wasser hergestellt und der pH-Wertes gegebenenfalls mit dem pH-Meter 540 GLP (WTW, Weilheim) eingestellt. Bei Bedarf wurden sie zusätzlich für 20 Min. bei 120 °C autoklaviert. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien ist in den entsprechenden Sektionen (2.2) angegeben.

2.1.2 Laborchemikalien

Sämtliche Standard-Laborchemikalien waren von Analyse-Reinheitsgrad und wurden bei Arcos Organics (Geel, Belgien), J. T. Baker (Deventer, Niederlande), Calbiochem (San Diego, CA), Eurobio (Les Ulis Cedex, Frankreich), Fisher Scientific (Loughborough, UK), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.3 Radiochemikalien

Die α -³²P-markierten Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurden mit spezifischen Aktivitäten von 370 MBq/ml bei GE Healthcare Lifesciences (Freiburg) bezogen.

2.1.4 Antikörper

Der polyklonale Antikörper C-24, ein gegen den C-Terminus von humanem STAT1 α gerichtetes Immunglobulin G (IgG) aus Kaninchen, wurde von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) erworben. Für die immunchemische Detektion wurde er 1:800 in TBS-T (Tris-gepufferte Kochsalzlösung, TBS: 137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 0,05% (v/v) Tween-20) verdünnt. Als Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Analysen wurde von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA) erworbenes und 1:7000 in TBS-T verdünntes Cy3-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege verwendet. Für immunchemische Analysen wurde 1:2000 in TBS-T verdünntes, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, *Horse-raddish Peroxidase*) gekoppeltes Anti-Maus-IgG aus Schwein von DAKO (Glostrup, Dänemark) verwendet. Die Strep-Markierung von Strep-Fusionsproteinen wurde mit murinen monoklonalen,

2 Material und Methoden

1:3000 in TBS-T verdünnten Anti-Strep-Tag II Classic-IgG (IBA GmbH, Göttingen) detektiert. Als Sekundärantikörper wurden 1:2000 in TBS-T verdünnte HRP-gekoppelte Anti-Maus-IgG (DAKO) oder 1:2000 in TBS-T verdünnte IR800-gekoppelte Anti-Maus-IgG von LI-COR Biosciences (Lincoln, NE) verwendet.

2.1.5 Enzyme

Sämtliche Restriktions-Endonukleasen wurden mit den dazugehörenden Puffersystemen und ggf. benötigten BSA-Lösungen von New England BioLabs (NEB; Schwalbach) bezogen. Ebenfalls von NEB stammten alkalische Kälberdarm-Phosphatase, T4 DNS-Ligase mit zugehörigem Puffer und Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I mit zugehörigem Puffer. PfuUltra High-Fidelity DNS-Polymerase wurde von Stratagene (La Jolla, CA), RNase A von Sigma-Aldrich und Lysozym von Eurobio erworben.

2.1.6 Reaktionschemikaliensätze

Die folgenden Reaktionschemikaliensätze (*Kits*) wurden nach Angaben der Hersteller verwendet. Die für DNS-Sequenzierungsreaktionen verwendete ABI Prism BigDye Terminator-Mischung v3.1 wurde von Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen. Die immunchemische Detektion von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte durch Substratreaktion mit dem Western Lightning ECL-Kit von Perkin Elmer (Rodgau-Jürgesheim). PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Für die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract II-System (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Isolation rekombinanter DNS aus 100 ml Bakterienkulturen erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) unter Verwendung der mitgelieferten Ionenaustausch-Säulen. Die Puffer des Plasmid Maxi Kits wurden auch für die Isolation rekombinanter Bacmide aus kompetenten Max Efficiency DH10Bac-Zellen (Invitrogen, Pailsley, UK) genutzt. Transfektionen von Säugetier- und Sf9-Insektenzellen wurden mit Lipofektamin und Plus-Reagenz (Invitrogen) durchgeführt.

2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den entsprechenden Methoden-Sektionen (2.2) nachgewiesen. Alle anderen Verbrauchsmaterialien

2 Material und Methoden

wurden von Eppendorf (Hamburg), WCP (Berlin), Falcon (Heidelberg), Schleicher & Schuell (Dassel), Bio-Rad (Brüssel, Belgien), B. Braun AG (Melsungen), Biochrom AG (Berlin), Greiner (Finkenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark), Nalgene (Heidelberg), Beckman-Coulter (Fullerton, CA), Millipore (Bedford, MA), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Greenwich (Chicago, IL) bezogen.

2.1.8 Plasmide

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit selbst oder von anderen Personen hergestellten und in dieser Arbeit genutzten Plasmide sind in Tabelle 2.1 beschrieben.

Tabelle 2.1. Beschreibung von in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden.

Plasmid	Beschreibung	Hersteller/Referenz
pcDNA3.1	Säugetierzell-Expressionsplasmid	Invitrogen (Inchinnan, UK)
pEGFP-N1	Säugetierzell-Expressionsplasmid zur Fusion an den N-Terminus von GFP	Clontech (Palo Alto, CA)
pASK-IBA3	Bakterielles Expressionsplasmid zur C-terminalen Fusion an die Strep-Aufreinigungsmarkierung	IBA GmbH (Göttingen)
pBabe	Säugetier-Kotransfektionsplasmid, enthält eine Puromycin-Resistenzkassette	Morgenstern und Land. (1990)
pFastBac1	Bakterielles Plasmid zur Generierung rekombinanter Baculovirus-Transferplasmide (Bacmide)	Invitrogen (Inchinnan, UK)
pCDNA3.1-hSTAT1 α	humanes STAT1 α Wildtyp in pCDNA3.1	Dr. Uwe Vinkemeier
pCDNA3.1-hSTAT1 α -T327R	humanes STAT1 α mit H406A in pCDNA3.1	Dr. Thomas Meyer
pCDNA3.1-hSTAT1 α -H406A	humanes STAT1 α mit T327R in pCDNA3.1	Dr. Thomas Meyer
pEGFP-N1-hSTAT1 α	humanes STAT1 α -GFP Wildtyp	Begitt <i>et al.</i> (2000)
pEGFP-N1-hSTAT1 α -F172W	humanes STAT1 α -GFP mit F172W	Dr. Thomas Meyer
pEGFP-N1-hSTAT1 α -T327R	humanes STAT1 α -GFP mit T327R	Dr. Thomas Meyer
pEGFP-N1-hSTAT1 α -H406A	humanes STAT1 α -GFP mit H406A	Dr. Thomas Meyer
pEGFP-N1-hSTAT1 α -H406D	humanes STAT1 α -GFP mit H406D	Dr. Thomas Meyer
pEGFP-N1-hSTAT1 α -H406R	humanes STAT1 α -GFP mit H406R	Dr. Thomas Meyer
pASK-IBA3-hSTAT1 α	humanes STAT1 α -Strep Wildtyp	Dr. Uwe Vinkemeier
pASK-IBA3-hSTAT1 Δ N	humanes STAT1 Δ N-Strep Wildtyp	Dr. Uwe Vinkemeier
pASK-IBA3-hSTAT1tc	humanes STAT1tc-Strep Wildtyp	Dr. Uwe Vinkemeier
pASK-IBA3-hSTAT1tc-F172W	humanes STAT1tc-Strep mit F172W	diese Arbeit
pASK-IBA3-hSTAT1tc-T327R	humanes STAT1tc-Strep mit T327R	Dr. Thomas Meyer
pASK-IBA3-hSTAT1tc-H406A	humanes STAT1tc-Strep mit H406A	Petra Lemke
pASK-IBA3-hSTAT1tc-Y701A	humanes STAT1tc-Strep mit Y701A	diese Arbeit
pASK-IBA3-hSTAT1tc-Y701R	humanes STAT1tc-Strep mit Y701R	diese Arbeit
pASK-IBA3-hSTAT1-ND	humane STAT1-ND-Strep	Manuela Peucker
pASK-IBA3-hSTAT3-ND	Maus-STAT3-ND-Strep	Manuela Peucker
pASK-IBA3-hSTAT4-ND	humane STAT4-ND-Strep	Manuela Peucker
pFastBac1-hSTAT1 α -Strep	humanes STAT1 α -Strep in pFastBac1	Dr. Uwe Vinkemeier
pFastBac1-hSTAT1 β -Strep	humanes STAT1 β -Strep in pFastBac1	diese Arbeit
pFastBac1-hSTAT1 Δ N-Strep	humanes STAT1 Δ N-Strep in pFastBac1	diese Arbeit
pFastBac1-hSTAT1tc-Strep	humanes STAT1tc-Strep in pFastBac1	Lödige <i>et al.</i> (2005)
pFastBac1-hSTAT1-ND-Strep	humane STAT1-ND-Strep in pFastBac1	Manuela Peucker
pFastBac1-mSTAT3-ND-Strep	Maus-STAT3-ND-Strep in pFastBac1	Manuela Peucker

2.1.9 Primer und Oligonukleotide

Sämtliche für diese Arbeit benötigten oder von anderen Personen zur Herstellung von in dieser Arbeit genutzten Plasmiden verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) oder

2 Material und Methoden

Biotez (Berlin) erworben und sind in Tabelle 2.2 beschrieben. Sie wurden für Klonierungen durch PCR, Mutagenesen, Sequenzierungsreaktionen und für EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)-Experimente eingesetzt.

Tabelle 2.2 Beschreibung der verwendeten Oligonukleotide für Mutagenesen, EMSA-Experimente, Sequenzierungsreaktionen und Klonierungen durch PCR. Für EMSA-Oligonukleotide sind die GAS-Stellen unterstrichen. Für PCR-Klonierungsprimer ist die Restriktionsstelle unterstrichen und die erste bzw. letzte kodierte Aminosäure fett und unterstrichen angegeben. Für Mutageneseprimer sind die für die mutierten Aminosäurereste kodierenden mutierten Nukleotide fett angegeben.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Beschreibung	Verwendung
436	GCCCTGCATGCCAAGGCACCTCAGAGGCC	hSTAT1 T327R, vorwärts	Mutagenese
437	GGCTCTGAGGGTGCCTTGGCATGCAGGGC	hSTAT1 T327R, revers	Mutagenese
465	ACGTCGACATTTCCCGTAAATCTG	M67-GAS, vorwärts	EMSA
466	CAGTCAGATTTACGGGAAATGTCTG	M67-GAS, revers	EMSA
465 TTC-TTA	ACGTCGACATTTACCGTAAATCTG	mutierte M67-GAS, vorwärts	EMSA
466 TTC-TTA	CAGTCAGATTTACGGTAAATGTCTG	mutierte M67-GAS, revers	EMSA
514	AGGTCGTTTCCCGGAAATGACGGATTTCCCGGAAAC	2x GAS, vorwärts	EMSA
515	AGGTCGTTTCCCGGAAATCCCGTCAATTTCCCGGAAAC	2x GAS, revers	EMSA
722	GGCTGAATTTCCGGACCTGCAATTGAAAG	hSTAT1 H406D, vorwärts	Mutagenese
723	CTTTCAATTCAGAGTCCCGAAATTCAGCC	hSTAT1 H406D, revers	Mutagenese
724	GGCTGAATTTCCGGCCCTGCAATTGAAAG	hSTAT1 H406A, vorwärts	Mutagenese
725	CTTTCAATTCAGAGGCCCGGAAATTCAGCC	hSTAT1 H406A, revers	Mutagenese
887	GGCTGAATTTCCGGCCCTGCAATTGAAAG	hSTAT1 H406R, vorwärts	Mutagenese
888	CTTTCAATTCAGAGGCCCGGAAATTCAGCC	hSTAT1 H406R, revers	Mutagenese
930	AAGTCGTTTCCCGGAAATAGAAAGATTATTATCATTAT	1x GAS und 1x Nicht-GAS, vorwärts	EMSA
931	AAGTCATAATGATAATAATCTTCTATTTCCCGGAAAC	1x GAS und 1x Nicht-GAS, revers	EMSA
B84	GATCATCCTTCTGGGAATTC	a2-Makroglobulin-GAS, vorwärts	EMSA
B85	GTCAGGAATCCAGAAAGGAT	a2-Makroglobulin-GAS, revers	EMSA
B86	GATCCAAATCCTGTAAATCA	CAEV-LTR-GAS, vorwärts	EMSA
B87	GTCATGATTTACAGGAATTTG	CAEV-LTR-GAS, revers	EMSA
B88	GATCCCACTTCTGATAAGCA	CIITA-GAS, vorwärts	EMSA
B89	GTCATGCTTTATCAGAAGTGG	CIITA-GAS, revers	EMSA
B90	GATCCATATTACTTAAATCC	GBP1-GAS, vorwärts	EMSA
B91	GTCAGGATTTAGAGTAATATG	GBP1-GAS, revers	EMSA
B90 TTA-TTC	GATCCATATTCTCTAAATCC	mutierte GBP1-GAS, vorwärts	EMSA
B91 TTA-TTC	GTCAGGATTTAGAGGAATATG	mutierte GBP1-GAS, revers	EMSA
B92	GATCAGGTTTCCGGGAAAGCA	ICAM1-GAS, vorwärts	EMSA
B93	GCATTGCTTTCCCGGAAACCT	ICAM1-GAS, revers	EMSA
B94	GATCCGCTTTCCCGTAAATGG	TAP1-GAS, vorwärts	EMSA
B95	GCATCCATTTAGGGGAAAGCG	TAP1-GAS, revers	EMSA
B258	CAAGATGAATATGACTGGAAATGCAAAACCTTGC	hSTAT1 F172W, vorwärts	Mutagenese
B259	GCAAGGTTTGCATTTCCAGTCAATTCATCTTG	hSTAT1 F172W, revers	Mutagenese
B317	ATTTTAGAATTTCTCTCAGTGGTACGAACTTC	hSTAT1 AS 1-124, EcoRI, vorwärts	PCR
B318	ATTTTAGAATCCCTGATTAATCTCTGGGCG	hSTAT1 AS 1-124, BamHI, revers	PCR
B321	ATTTTAGAATTCGCTCAGTGGAAACAGCTGCAG	mSTAT3 AS 1-124, EcoRI, vorwärts	PCR
B322	ATTTTAGGATCCCTGGGCTGCCGTGGCTGCCG	mSTAT3 AS 1-124, BamHI, revers	PCR
B323	ATTTTAGAATTTCTCTCAGTGGAAATCAAGTCC	mSTAT4 AS 1-124, EcoRI, vorwärts	PCR
B324	ATTTTAGGATCCCTGGATAGGCATGTTGGCTG	mSTAT4 AS 1-124, BamHI, revers	PCR
B380	GACCGCGTCCCGAATTCATGTCTCAGTGGTACGAA	hSTAT1-ND, EcoRI	PCR
B381	GACCGCGTCCCGAATTCATGGCTCAGTGGAAACAG	mSTAT3-ND, EcoRI	PCR
B382	GACCGCGTCCCGAATTCATGTCTCAGTGGAAATCAA	hSTAT4-ND, EcoRI	PCR
B385	CACAGGTCAAGCTTATATTTTTCGAACTGCCGGTGGCTCC	C-Terminus pASK-IBA3, HindIII	PCR
B594	CAACTCAGTCTTGATAGCTCCAGTTCCCTTAGG	hSTAT1 Y701A, vorwärts	Mutagenese
B595	CCTAAAGGAAGTGGAGCTATCAAGACTGAGTTG	hSTAT1 Y701A, revers	Mutagenese
B599	CCTAAAGGAAGTGGACGTATCAAGACTGAGTTG	hSTAT1 Y701R, vorwärts	Mutagenese
B600	CAACTCAGTCTTGATACGTCCAGTTCCCTTAGG	hSTAT1 Y701R, revers	Mutagenese
M13 (-40), vorwärts	GTTTCCCAAGTACGAC	Bakmid-Sequenzierprimer, vorwärts	Sequenzierung
M13, revers	CAGGAAACAGCTATGAC	Bakmid-Sequenzierprimer, revers	Sequenzierung
pASK-IBA3, vorwärts	AGTAGCCGTTAAACGGCGAACA	pASK-IBA3-Sequenzierprimer, vorwärts	Sequenzierung
pASK-IBA3, revers	CAGTGATAGAGAAAAGTGAA	pASK-IBA3-Sequenzierprimer, revers	Sequenzierung
pCDNA3.1, revers	TAGAAGCCACAGTCGAGG	pCDNA3.1-Sequenzierprimer, revers	Sequenzierung
pEGFP-N1, vorwärts	GTGGGAGTCTATATAAGCAG	pEGFP-N1-Sequenzierprimer, vorwärts	Sequenzierung
pEGFP-N1, revers	GTCGCCGTCCAGCTCGACAGG	pEGFP-N1-Sequenzierprimer, revers	Sequenzierung
pFastBac1, vorwärts	AAATGATAACCATCTCGC	pFastBac1-Sequenzierprimer, vorwärts	Sequenzierung
pFastBac1, revers	CCTTACAAAATGTGGTATGG	pFastBac1-Sequenzierprimer, revers	Sequenzierung

2.1.10 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit zur Plasmid-Amplifikation, Proteinexpression und Generierung von rekombinanten Bacmiden verwendeten Bakterienstämme sind mit ihren Genotypen in Tabelle 2.3 angegeben.

Tabelle 2.3. Verwendete Bakterienstämme mit ihren Genotypen.

Bakterienstamm	Genotyp	Verwendung
BL21 (DE3) pLysS (Merck, Darmstadt)	pLysS, F ⁻ , ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm λ(DE3) [pLysS Cam ^R]	Proteinexpression
DH5α (Invitrogen, Paisley, UK)	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	DNS-Amplifikation
XL2-Blue (Stratagene, La Jolla, CA)	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F ⁻ ::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15 Amy Cam ^R] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	DNS-Amplifikation
Max Efficiency DH10Bac (Invitrogen, Paisley, UK)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG [pMON7124 (bom ⁺ , tra ⁻ , mob ⁻)]	Generierung rekombinanter Bakmide

2.1.11 Eukaryontische Zelllinien

Die in dieser Arbeit zur Proteinexpression verwendeten eukaryontischen Zelllinien sind in Tabelle 2.4 angegeben.

Tabelle 2.4. Verwendete eukaryontische Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle
HeLa-S3	humane Zervix-Karzinoma-Zellen	DSMZ, Braunschweig (ACC: 161)
2fTGH	humane Fibrosarkoma-Zellen; Parental-Zelllinie von U3A	G. Stark, Lerner Research Institute, USA
U3A	STAT1-defiziente humane Fibrosarkoma-Zellen	G. Stark, Lerner Research Institute, USA
A431	humane Plattenepithel-Karzinoma; Überexpression des EGF-Rezeptors	DSMZ, Braunschweig (ACC: 91)
mAB108	Maus-Hybridoma-Zellen; Überexpression von anti-EGFR-IgG	LGC Promochem, Wesel
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9-Insektenzellen	Invitrogen (Paisley, UK)

2.1.12 Wissenschaftliche Computerprogramme

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit Axiovision 3.0 von Zeiss (Oberkochen) angefertigt. Quantifizierungen der Autoradiogramme aus EMSA-Experimenten wurden mit ImageQuant 5.1 von GE Healthcare Lifesciences durchgeführt. Weblogo (Crooks *et al.*, 2004) wurde zur Darstellung konservierter Aminosäuren der N-Domänen von STAT1, -3 und -4 verwendet. Statistische Analysen von EMSA-Resultaten und immunchemischen

2 Material und Methoden

Proteindetektionen wurden mit Prism 4.0 von Graphpad (San Diego, CA) und Kurvenanpassungen zur Ermittlung von DNS:STAT1-Interaktionszeitreihen mit Origin 7.1 von OriginLab (Northampton, MA) erstellt. Genetool von Biotools (Edmonton, Kanada) wurde zur Ermittlung geeigneter Primer verwendet. EasyWin32 von Herolab GmbH (Wiesloh) wurde zur Dokumentation von Agarosegelen und Silverfast von LaserSoft Imaging (Kiel) für die Dokumentation von Coomassie- und Silber-gefärbten Polyakrylamid-Gelen verwendet. Die immunchemische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen erfolgte mit LumiAnalyst 3.0 (Roche, Mannheim) oder Odyssey 2.1 (LI-COR Biosciences). Die Programmierung von analytischen Ultrazentrifugations-Sedimentationsexperimenten und die Dokumentation von Sedimentationsprofilen erfolgte mit dem zur analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-I mitgelieferten Computerprogramm (Beckman-Coulter). Die Analyse der Sedimentationsprofile auf Einstellung eines Sedimentationsgleichgewichts erfolgte mit dem Computerprogramm WinMatch 0.99 (<http://www.biotech.uconn.edu/auf>), programmiert an der Analytical Ultracentrifugation Facility, Biotechnology Center der University of Connecticut (Storrs, CT). Zur Analyse von Sedimentationsgeschwindigkeits-Profilen wurden SedFit 9.3 (Schuck, 2000), SedPhat 4.1 (Schuck, 2003) und Ultrascan 9.1 und 9.3 (Demeler, 2005) verwendet. Zur Analyse von Sedimentationsgleichgewichts-Profilen, für hydrodynamische Korrekturen der für analytische Ultrazentrifugations-Experimente verwendeten Puffer und für Berechnungen der partiellen spezifischen Proteinvolumina anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung wurde ebenfalls Ultrascan verwendet. Monte Carlo-Analysen zur Ermittlung von 95%-Konfidenzintervallen der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten und Molekulargewichte wurden mithilfe des UltraScan LIMS-Portals (<http://uslims.uthscsa.edu>) des UTHSCSA (University of Texas Health Sciences Center at San Antonio, TX) auf Supercomputern der Fakultät für Bioinformatik durchgeführt. Die Simulation von Sedimentationsprofilen zur Ermittlung von Assoziationsraten von STAT1-Homodimeren wurde mit dem in Ultrascan 9.5 integrierten ASTFEM-Modul (Cao und Demeler, 2008) durchgeführt. Die Darstellung von Kristallstrukturen erfolgte mit dem seit 2002 von W. L. DeLano programmierten Visualisierungsprogramm PyMol (<http://www.pymol.org>) anhand von in der Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) hinterlegten Kristallstrukturdatensätzen. Die Berechnung der Hydrodynamischen Parameter von Proteinen anhand ihrer Kristallstrukturen wurde mit HydroPro 7c (de la Torre *et al.*, 2000) durchgeführt. Zur Auswertung von Daten aus

dynamischen Lichtstreuungs-Experimenten wurde Dynamics 4.0 von Protein Solutions (Charlottesville, VA) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Photometrische Bestimmung von DNS-Konzentrationen

Die Konzentration von DNS-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge $\lambda=260$ nm im Spektrophotometer Ultrospec 2100 (GE Healthcare Lifesciences) in Quarz-Küvetten oder mit dem Spektrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) bestimmt. Eine Absorption von 1 entsprach für Lösungen doppelsträngiger DNS bei einer optischen Pfadlänge von 1 cm einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

DNS-Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) amplifiziert. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt in 50 μl 1x Pfu-Reaktionspuffer 50 ng Matrizen-DNS, 10 pmol eines jeden der beiden DNS-Primer, 25 pmol eines jeden der 4 Desoxynukleotid-Triphosphate (Bioline, Luckenwalde) und 2,5 Einheiten PfuUltra High-Fidelity DNS-Polymerase (Stratagene). Das Temperaturprogramm des PCR-Automaten GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) wurde wie folgt eingerichtet: nach einer 2-minütigen Denaturierung bei 94 °C wurden 16-20 Zyklen aus 1 Min. Denaturierung bei 94 °C, 30 Sek. Hybridisierung bei 48-56 °C und Elongation bei 72 °C für 2 Min. pro 1000 zu amplifizierenden Basenpaaren durchgeführt. Die Proben wurden nach einer finalen 10-minütigen Elongation bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung in der Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.4) gelagert. Zur Verwendung im Restriktionsverdau (s. 2.2.1.3) wurden Primer und Polymerase nach Herstellerangaben mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) entfernt.

2.2.1.3 Restriktionsverdau von DNS

Analytische Restriktionsansätze enthielten in 20 μl 1x Reaktionspuffer 1 μl gereinigter Minipräp-DNS (aus 2.2.1.7), 0,3 Einheiten des Restriktionsenzym (NEB) und gegebenenfalls 1 μl BSA-Lösung (10 mg/ml; NEB). Präparative Restriktionsansätze enthielten in 50 μl 1x Reaktionspuffer

2 Material und Methoden

entweder 35 µl gereinigtes PCR-Produkt (aus 2.2.1.2), 0,5 µg Akzeptor-Plasmid-DNS oder 2 µg Donor-Plasmid-DNS, 1 Einheit des Reaktionsenzym (NEB) und gegebenenfalls 1 µl BSA-Lösung (10 mg/ml). Nach 1 Stunde Inkubation bei der empfohlenen Reaktionstemperatur wurde die verdaute Akzeptor-Plasmid-DNS gegebenenfalls mit 5 Einheiten alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (NEB) für 30 Min. bei 37 °C dephosphoryliert.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophoretische Auftrennung und Gelextraktion von DNS-Fragmenten

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten aus PCR- oder Restriktionsreaktionen erfolgte in 0,8-1,2%-igen (w/v) Agarosegelen in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 M Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3 eingestellt mit Essigsäure) bei 100 V in einer horizontalen Owl B1A-Elektrophoresevorrichtung (Thermo Scientific). Mit 30 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung (Eurobio) versetzte analytische Agarosegele wurden mit Agarose NEEO Ultraqualität (Carl Roth GmbH) und präparative Agarosegele mit bei niedriger Temperatur schmelzender Agarose (Carl Roth GmbH) zubereitet. Die aufzutrennende DNS-Proben wurden mit 10x DNS-Probenpuffer (30% (w/v) Glycerin, 0,05% (v/v) Bromphenolblau in 1x TAE-Puffer) versetzt. Als Molekulargewichts-Standard wurde ein 1 kb DNS-Marker (Invitrogen) verwendet. Interessierende DNS-Fragmentbanden wurden im UV-Licht (312 nm) eines Transilluminators (Herolab GmbH) aus dem Gel geschnitten und mit dem NucleoSpin Extract II-System (Macherey-Nagel) gemäss den Herstellerangaben extrahiert und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eluiert.

2.2.1.5 Ligation von DNS-Fragmenten

Die durch Extraktion aus Agarosegelen erhalten DNS-Fragmente (s. 2.2.1.4) wurden im molaren Verhältnis von 8:1 (zu inserierende DNS:Plasmid-DNS) in 20 µl 1x T4 DNS-Ligasepuffer (NEB) mit 200 Einheiten T4 DNS-Ligase (NEB) bei 4 °C für mindestens 12 Stunden inkubiert und das Ligationsprodukt entweder bei -20 °C gelagert oder durch Transformation kompetenter Bakterien amplifiziert (s. 2.2.1.6).

2.2.1.6 Transformation und Amplifikation rekombinanter DNS in Bakterien

Zur Amplifikation ligierter Plasmid-DNS (s. 2.2.1.5) wurden *E.coli*-Zellen des XL2 Blue- und zur Reamplifikation bereits gereinigter Plasmid-DNS (s. 2.2.1.7) des DH5α-Stammes verwendet.

2 Material und Methoden

Die Transformation von DH10Bac-Zellen zur Generierung rekombinanter Bacmid-DNS und deren Isolation ist in 2.2.3.8 beschrieben.

Je nach Anwendung wurden 100 µl der benötigten gekauften oder nach der Methode von Cohen *et al.* (1972) chemisch kompetent gemachten Bakterien bei 4 °C aufgetaut, mit 2,5 µl einer 1 M 2-Merkaptoethanol-Lösung versetzt und nach 15 Min. mit 15 µl Ligations- oder Mutageneseprodukten (s. 2.2.1.5 bzw. 2.2.1.9) oder 100 ng gereinigter Plasmid-DNS für weitere 5 Min. bei 4 °C inkubiert. Nach Behandlung bei 42 °C für 45 Sek. wurden die Bakterien dann für weitere 5 Min. auf Eis gelagert und dann in 400 µl autoklaviertem LB-Medium (10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 1 l H₂O, pH 7,0) bei 37 °C für 1 Stunde unter Schütteln inkubiert. Von dieser Suspension wurden 75-500 µl auf mit geeigneten Antibiotika supplementierten LB-Agarplatten (LB-Medium mit 2% (w/v) Agar-Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die benötigten Antibiotika wurden dem LB-Medium in folgenden Endkonzentrationen hinzugefügt: 100 µg/ml Ampizillin (Eurobio) und 50 µg/ml Kanamycin A (Sigma-Aldrich).

2.2.1.7 Isolation rekombinanter DNS aus Bakterien

Zur Isolation rekombinanter DNS aus DH5α- oder XL2 Blue-Zellen im kleinen Masstab (Minipräp) wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 3 ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurden 1,5 ml in einem Eppendorf-Reaktionsgefäss für 1 Min. bei 16100x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und das Sediment in 150 µl TELT-Puffer (50 mM Tris-HCl, 62,5 mM EDTA, 0,4% (v/v) Triton X-100, 1 M LiCl, pH 7,5) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym (25 mg/ml, Eurobio) wurde zunächst für 5 Min. bei RT, dann für 5 Min. bei 95 °C und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 8 Min. bei 16100x g und RT wurde das Sediment verworfen und die Plasmid-DNS im Überstand durch Zugabe von 120 µl Isopropanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit jeweils 200 µl 80% (v/v), 95% (v/v) und schliesslich 100% (v/v) Ethanol durch Zentrifugation für jeweils 5 Min. bei 16100x g und RT gewaschen. Nach Trocknung des Präzipitats bei 37 °C wurde es in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,5 mg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) resuspendiert, für 15 Min. bei 37 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Isolation von rekombinanter DNS im grossen Masstab (Maxipräp) aus der Übernacht-Kultur einer einzelnen Bakterienkolonie, die bei 37 °C in 100 ml mit dem geeigneten Antibiotikum

2 Material und Methoden

supplementiertem LB-Medium inkubiert wurde, erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Das so erhaltene DNS-Präzipitat wurde in TE-Puffer resuspendiert, auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.8 Sequenzierung rekombinanter DNS

Zur Überprüfung von DNS-Sequenzen wurde ein modifiziertes Protokoll der Kettanabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden verwendet. Die Markierungsreaktion enthielt 100 ng der zu sequenzierenden DNS-Matrize, 10 pmol des Sequenzierprimers und 2 µl der ABI Prism BigDye Terminator-Mischung v3.1 (Applied Biosystems) in einem Volumen von 10 µl des 1x BigDye-Sequenzierungspuffers (Applied Biosystems). Nach einer 1-minütigen Denaturierung bei 94 °C wurden 30 Zyklen aus 16 Sek. Denaturierung bei 94 °C, 16 Sek. Hybridisierung bei 52 °C und 2 Min. Elongation bei 60 °C durchgeführt. Die markierte DNS wurde nach Zugabe von 2 µl einer 1,5 M Natriumazetat/250 mM EDTA-Lösung (pH 8,5 mit NaOH eingestellt) und 80 µl 95% (v/v) Ethanol durch Inkubation für 15 Min. auf Eis präzipitiert und für 15 Min. bei 16100x g und RT zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit jeweils 200 µl 80% (v/v), 95% (v/v) und schliesslich 100% (v/v) Ethanol durch Zentrifugation für jeweils 5 Min. bei 16100x g und RT gewaschen. Die DNS-Sequenz des bei 37 °C getrockneten Präzipitats wurde im Kapillar-Sequenzierautomaten ABI Prism 310 von Dr. Eberhard Klauschens (FMP) oder im 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) von Frau Sonia Ouadi (School of Biomedical Sciences) ermittelt.

2.2.1.9 Einführung von Punktmutationen in STAT1-kodierende Plasmide

Gezielte Punktmutationen wurden durch PCR (s. 2.2.1.2) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl unter Einsatz von 50 ng der parentalen Plasmid-DNS mit geeigneten Mutageneseprimern erzeugt. Das gesamte PCR-Produkt wurde gemäss dem Protokoll von Stratagene für 1 Stunde bei 37 °C zum Verdau der bakteriellen methylierten Parental-DNS mit 20 Einheiten DpnI behandelt und davon 5 µl zur Amplifikation durch ultrakompetente XL2 Blue-Bakterien verwendet.

2.2.1.10 Klonierung von Expressionsplasmiden

pCDNA3.1-hSTAT1 α kodiert für das humane Vollelänge-STAT1 (AS 1-750) und wurde von Dr. Uwe Vinkemeier erzeugt. Es wurde über mehrere Zwischenschritte durch PCR generiert und

2 Material und Methoden

enthält am 5'-Ende eine EcoRI- und am 3'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle. Die Mutanten T327R und H406A in pCDNA3.1-hSTAT1 α wurden von Dr. Thomas Meyer durch Mutagenese mit dem Primerpaar 436/437 bzw. 724/725 erhalten. Die Klonierung des Plasmids pEGFP-N1-hSTAT1 α , das das Fusionsprotein aus humanem STAT1 α (AS 1-746) mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) am STAT1-Carboxyterminus kodiert, ist von Begitt *et al.* (2000) beschrieben. Die Mutanten F172W, T327R, H406A, H406D und H406R in pEGFP-N1-hSTAT1 α wurden von Dr. Thomas Meyer durch Mutagenese mit den Primerpaaren B258/B259, 436/437, 724/725, 722/723 bzw. 887/888 erzeugt.

Sämtliche pASK-IBA3-Konstrukte enthalten am 5'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle und einen aus dem Original-Plasmid stammenden, für die 5 Aminosäuren MGDRG kodierenden Bereich. Am 3'-Ende enthalten sie eine BamHI-Schnittstelle und einen ebenfalls aus dem Original-Plasmid stammenden, für die 14 Aminosäuren SLEVDLQGDHGLSA und die Strep-Markierung WSHQPQFEK kodierenden Bereich. Das Plasmid pASK-IBA3-hSTAT1 α wurde von Dr. Uwe Vinkemeier generiert und kodiert für die bakterielle Expression des humanen STAT1 α (AS 1-750) mit C-terminaler Strep-Aufreinigungsmarkierung. Die Plasmide pASK-IBA3-hSTAT1 Δ N (AS 133-750) und pASK-IBA3-hSTAT1tc (AS 133-712) wurden ebenfalls von Dr. Uwe Vinkemeier zur bakteriellen Expression der Fusionsproteine STAT1 Δ N bzw. STAT1tc mit C-terminaler Strep-Aufreinigungsmarkierung durch PCR generiert. Die Mutanten Y701A und Y701R in pASK-IBA3 wurden in dieser Arbeit durch Mutagenese mit den Primerpaaren B595/B596 bzw. B599/B600 generiert. Die Mutante T327R in pASK-IBA3 wurde von Dr. Thomas Meyer und die Mutante H406A von Petra Lemke durch Mutagenese mit den Primerpaaren 436/437 bzw. 724/725 erzeugt. Die Mutante F172W wurde in dieser Arbeit durch Restriktionsverdau von pEGFP-N1-hSTAT1 α -F172W mit EcoRI/SphI und Ligation mit dem geöffneten pASK-IBA3-hSTAT1tc generiert. Die Plasmide pASK-IBA3-hSTAT1- und -hSTAT4-ND bzw. pASK-IBA3-mSTAT3-ND kodieren allesamt für die N-Domänen (AS 1-124) von humanem STAT1, STAT3 bzw. STAT4 und wurden von Manuela Peucker hergestellt. Durch PCR der humanen STAT1- und STAT4-cDNS mit den Primerpaaren B317/B318 bzw. B323/B324 und Maus-STAT3-cDNS (die AS-Sequenzen der murinen und humanen N-Domänen unterscheiden sich nicht) mit dem Primerpaar B321/B322 wurden Restriktionsschnittstellen für EcoRI und BamHI generiert, über die die N-Terminus-kodierenden DNS-Fragmente in das geöffnete pASK-IBA3 ligiert wurden.

2 Material und Methoden

Die pFastBac1-STAT-Strep-Plasmide erlauben nach Transposition in die in DH10Bac-Zellen enthaltenen Bacmide die Generierung rekombinanter Baculoviren. Die Viren wurden nach Amplifikation zur Expression von Fusionsproteinen aus STAT und C-terminaler Strep-Aufreinigungsmarkierung in Sf9-Insektenzellen verwendet. Sämtliche pFastBac1-STAT-Strep-Konstrukte kodieren weiterhin für die bereits für pASK-IBA3-Konstrukte beschriebenen zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäure-Reste. Das Plasmid pFastBac1-hSTAT1 α -Strep (AS 1-750) wurde von Dr. Uwe Vinkemeier über mehrere Zwischenschritte durch PCR generiert und enthält am 5'-Ende eine EcoRI- und am 3'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle. Die Klonierung von pFastBac1-hSTAT1tc-Strep wurde von Lödige *et al.* (2005) beschrieben. Das in dieser Arbeit erzeugte Plasmid pFastBac1-hSTAT1 β -Strep (AS 1-712) wurde generiert, indem das den C-terminalen Bereich von STAT1tc-Strep kodierende DNS-Fragment durch Restriktionsverdau von pFastBac1-hSTAT1tc-Strep mit HindIII ausgeschnitten und in das geöffnete pFastBac1-hSTAT1 α -Strep ligiert wurde. Für das in dieser Arbeit erzeugte Plasmid pFastBac1-hSTAT1 Δ N-Strep (AS 133-750) wurde das den N-terminalen Bereich von STAT1tc-Strep kodierende DNS-Fragment durch Restriktionsverdau von pFastBac1-hSTAT1tc mit BamHI und SmaI (AS 133-608) in das geöffnete pFastBac1-hSTAT1 α -Strep ligiert. Die Plasmide pFastBac1-hSTAT1-ND-Strep und pFastBac1-mSTAT3-ND-Strep wurden von Manuela Peucker generiert, indem die für die N-Termini-Strep kodierenden DNS-Fragmente aus pASK-IBA3-hSTAT1-ND bzw. pASK-IBA3-mSTAT3-ND durch Restriktionsverdau mit EcoRI und HindIII erhalten und in den geöffneten pFastBac1-hSTAT1 α ligiert wurden. Die Identität sämtlicher Konstrukte wurde durch Sequenzierung mit den geeigneten Primern (s. Tabelle 2.2) bestätigt.

2.2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Säugetierzellen

HeLa-S3-, 2fTGH-, U3A-, A431 und mAB108-Zellen wurden bei 37 °C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂ in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert. Das Vollmedium bestand aus Dulbecco-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM; Biochrom AG), das mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FKS; Biochrom AG) und 0,1 g/l Penizillin/Streptomycin (Biochrom AG) supplementiert war. Bei 90% Konfluenz wurden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, *Phosphate buffered saline*; 1,4 mM KH₂PO₄, 4,3 mM

2 Material und Methoden

Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und nach Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG) in Vollmedium verdünnt und auf neue Schalen verteilt.

2.2.2.2 Kultivierung von Sf9-Insektenzellen

Sf9-Insektenzellen wurden bei 27 °C in Rührflaschen auf magnetischen Rührplatten (Integra Biosciences GmbH, Fernwald) bei 75 rpm bis zu einer maximalen Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ /ml oder in Rundkolben (Fisher Scientific, Loughborough, UK) unter orbitalem Schütteln bei 130 rpm bis zu einer maximalen Zelldichte von $8 \cdot 10^6$ /ml kultiviert. Als Medium wurde Insect-Xpress-Medium von Lonza (Basel, Schweiz) verwendet, das mit 1x Pluronic-68 (Invitrogen), 0,1 g/l Penizillin/Streptomycin (Biochrom AG) und 5 mg/l des Fungizids Patrizin (Biochrom AG) supplementiert war. Zur Passagierung wurden die Sf9-Zellen auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml bzw. zur Infektion mit rekombinanten Baculoviren (s. 2.2.3.8) auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml verdünnt und in neue Flaschen oder Kolben aufgeteilt.

2.2.3 Biochemische, zellbiologische und biophysikalische Methoden

2.2.3.1 Transfektion von Säugetierzellen

Zur transienten Expression von Fusionsproteinen aus STAT1 und dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) wurden HeLa-S3-Zellen in 12-Loch-Zellkulturschalen mit 0,4 µg eines pEGFP-N1-Konstruktes transfiziert. Zur stabilen Expression von STAT1-Proteinen hingegen wurden U3A-Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen mit 0,5 µg des als Selektionsmarker eine Puromycinresistenz-Kassette enthaltenden pBabe-Plasmid und 5 µg des STAT1-kodierenden pCDNA-Konstruktes transfiziert. Dazu wurde das Lipofektamin/Plus-Reagenz-System nach Herstellerempfehlungen (Invitrogen) verwendet. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium entfernt und die transient transfizierten HeLa-S3-Zellen in Vollmedium bzw. die stabil transfizierten U3A-Zellen in mit 0,4 µg/ml Puromycin (Invitrogen) supplementiertem Vollmedium für 24 Stunden unter Standardbedingungen weiterkultiviert. Die klonale Selektion von stabil die STAT1-Mutanten exprimierenden U3A-Zellen erfolgte aus einer anfänglichen Expansion der Zellen um den Faktor 100 auf 15 cm-Zellkulturschalen über 4 Wochen unter dreitäglichem Mediumswechsel, bis einzelne Kolonien erkennbar wurden. Diese wurden einzeln in separaten Zellkulturschalen weiter selektiert und positive Klone durch immunchemische Analyse (s. 2.2.3.6) fraktionierter Zellextrakte (s. 2.2.3.3) und

2 Material und Methoden

Immunzytochemie (s. 2.2.3.2) identifiziert. Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, für 5 Min. bei 1000x g und 15 °C sedimentiert und in 0,5 ml mit 20% (v/v) FKS und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösung supplementiertem DMEM resuspendiert. Nach Inkubation der Zellsuspension für 1 Stunde bei 4 °C und danach über Nacht bei -80 °C in Einfrierröhrchen, die in mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehältern (Nalgene, Neerijse, Belgien) gelagert wurden, erfolgte die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff. Bei Bedarf wurden die U3A-Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, für 5 Min. bei 1000x g und RT sedimentiert, in 20% (v/v) FKS enthaltendem DMEM aufgenommen und in einer Zelldichte von $1-2 \cdot 10^6$ /ml ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen Puromyzin-haltiges Vollmedium ausgetauscht und die Zellen in diesem Medium weiter kultiviert.

2.2.3.2 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Überprüfung der Transfektionseffizienz von transient transfizierten HeLa-S3-Zellen erfolgte 24 Stunden nach Transfektion durch direkte fluoreszenzmikroskopische Visualisierung. Für STAT-Proteine stabil exprimierenden U3A-Zellen erfolgte diese Überprüfung durch Immunzytochemie. Dazu wurden die Zellen auf mit 25 mM Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma-Aldrich) beschichteten Deckgläschen in 12-Loch-Zellkulturschalen für die angegebenen Zeiten mit den in der Ergebnis-Sektion genannten Konzentrationen von in 10% (v/v) FKS/DMEM gelöstem rekombinantem humanem IFN γ (Biomol, Hamburg) stimuliert. HeLa-S3-Zellen wurden mit 4% (v/v) Formaldehyd in PBS bei RT und U3A- bzw. 2fTGH-Zellen in Methanol für 20 Min. bei -20 °C fixiert und ihre Zellkerne für 3 Min. bei RT mit 5 μ g/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) in PBS angefärbt. Zur immunzytochemischen Detektion der STAT1-Proteine wurden die U3A- und 2fTGH-Zellen nach der Fixierung zunächst mit 0,2% (v/v) Triton X-100 für 10 Min. bei RT permeabilisiert und unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 25% (v/v) FKS in PBS blockiert. Anschliessend wurden die Zellen unter Schütteln für 45 Min. mit dem 1:800 in 25% (v/v) FKS/PBS verdünnten Anti-STAT1-Antikörper C-24 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte für 45 Min. unter Schütteln die Inkubation mit 1:800 in 25% (v/v) FKS/PBS verdünnten Cy3-gekoppelten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Die Präparate wurden in Fluorescent Mounting Medium (DAKO) eingedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop-System Axioplan 2 (Zeiss,

2 Material und Methoden

Oberkochen) und einer Sensicam CCD-Kamera (PCO, Kehlheim) bei $\lambda=280$ nm das Hoechst-, bei $\lambda=480$ nm das GFP- und bei $\lambda=580$ nm das Cy3-Signal detektiert und fotografiert.

2.2.3.3 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzell-Extrakten (GZE) wurden HeLa-S3-Zellen nach Kultivierung bis zu 90% Konfluenz in 10 cm-Zellkulturschalen mit kaltem PBS gewaschen und pro Schale in 0,5 ml Gesamtzell-Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 280 mM NaCl, 0,5% (v/v) Nonidet P40, 0,2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10% (v/v) Glycerin, 50 mM NaF, 10 mM Glycerinphosphat, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, Complete Protease-Inhibitoren (Roche), pH 7,4) aufgenommen. Nach mechanischer Lyse durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 200 μl -Pipettenspitze (Eppendorf) wurden die Zellen für 30 Min. auf Eis inkubiert und für 5 Min. bei 16100x g und 4 °C sedimentiert. Der den Gesamtzell-Extrakt enthaltene Überstand wurde portioniert und nach Einfrieren auf Trockeneis bei -80 °C gelagert.

Zur Erzeugung zytosolischer und nukleärer Zellextrakte wurden 2fTGH- und stabil transfizierte U3A-Zellen nach Kultivierung bis zu 90% Konfluenz in 10 cm-Zellkulturschalen mit kaltem PBS gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen einer Schale in 0,5 ml hypotonischem Zytosol-Extraktionspuffer (20 mM HEPES, 0,2% (v/v) Nonidet P40, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na_3VO_4 , 1 mM Dithiothreitol (DTT), Complete Protease-Inhibitoren, pH 7,4) erfolgte die Lyse durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 200 μl -Pipettenspitze (Eppendorf) und weitere Inkubation für 5 Min. auf Eis. Anschliessend wurden die lysierten Zellen für 10 Sek. bei 16100x g und 4 °C zur Sedimentierung der Zellkerne zentrifugiert und der cytosolische Überstand portioniert und nach Einfrieren auf Trockeneis bei -80 °C gelagert. Das Zellkernsediment einer 10 cm-Zellkulturschale wurde in 0,5 ml Zellkern-Extraktionspuffer (20 mM HEPES, 20% (v/v) Glycerin, 420 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, Complete Protease-Inhibitoren, pH 7,4) resuspendiert, für 30 Min. auf Eis inkubiert und für 15 Min. bei 16100x g und 4 °C zentrifugiert. Der den nukleären Extrakt enthaltende Überstand wurde portioniert und nach Einfrieren auf Trockeneis bei -80 °C gelagert.

2.2.3.4 Polyakrylamid-Gelelektrophorese von Proteingemischen

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyakrylamid (SDS-PA)-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem

2 Material und Methoden

Mini Protean II (Bio-Rad) oder in denaturierenden NuPAGE 3-8% Tris-Azetat-Gradientengelen (Invitrogen) mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem XCell II Mini (Invitrogen). SDS-PA-Trenngele wurden mit 10% (v/v) oder 15% (v/v) 37,5:0,8 Akrylamid:Bisakrylamid (AA/BA, Carl Roth GmbH), 0,01% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,01% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich) in 1x Trenngelpuffer (375 mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) Natriumdodekylsulfat (SDS), pH 8,8) zubereitet. SDS-PA-Sammelgele wurden mit 4% (v/v) 37,5:0,8 AA/BA, 0,01% (w/v) APS und 0,01% (v/v) TEMED in 1x Sammelgelpuffer (125 mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 6,8) hergestellt. Die Proteinlösungen in 1x SDS-Probenpuffer (58 mM Tris-HCl, 5% (v/v) Glycerin, 1,7% (w/v) SDS, 0,1 M DTT, 0,002% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) wurden für 5 Min. bei 95 °C inkubiert. Nach Beladung des Gels erfolgte die Gelelektrophorese zunächst für 15 Min. bei 120 V und anschliessend für 45 Min bei 180 V in 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glyzin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3). Für die Tris-Azetat-PAGE wurden die Proben in 1x NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) für 5 Min. bei 95 °C inkubiert und anschliessend auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde in 1x NuPAGE SDS-Laufpuffer (Invitrogen) mit 0,4% (v/v) NuPAGE Antioxidant-Reagenz (Invitrogen) für 1 Stunde bei 150 V durchgeführt. Als Molekulargewichts-Standard wurde in beiden Fällen vorgefärbtes SeeBlue Plus2 (Invitrogen) mitgeführt.

2.2.3.5 Coomassie- und Silberfärbung von Proteinen in Polyakrylamidgelen

Die Färbung von Proteinen im PA-Gel mit Coomassie Brilliantblau R 250 (Merck) erfolgte für 30 Min. unter Schütteln in Coomassie-Färbelösung (40% (v/v) Methanol, 1,7 M Essigsäure, 0,1% (w/v) Coomassie) und die Entfärbung des Gels unter wiederholtem Austausch der Coomassie-Entfärbelösung (40% (v/v) Methanol, 1,7 M Essigsäure).

Die Silberfärbung von Proteinen im PA-Gel wurde einem modifizierten Protokoll folgend nach Merril *et al.* (1981) durchgeführt. Nach Inkubation für 1 Stunde bei RT in Fixierlösung (40% (v/v) Ethanol, 1,7 M Essigsäure) wurde das Gel dreimal für 20 Min. in 30% (v/v) Ethanol und einmal für 20 Min. in H₂O gewaschen. Anschliessend folgte die Inkubation des Gels für 1 Min. in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung. Nach dreimaligem kurzem Waschen mit H₂O erfolgte die Inkubation des Gels für 20 Min. mit 0,2% (w/v) Silbernitrat-Lösung. Das mit den Proteinen im Gel komplexierte Silbernitrat wurde dann nach dreimaligem Waschen mit H₂O unter visueller Kontrolle in alkalischer Entwicklungslösung (3% (w/v) Natriumkarbonat, 0,05%

2 Material und Methoden

(v/v) Formaldehyd, 0,0004% (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung) zu elementarem Silber (braune Farbe) reduziert. Anschliessend wurde das Gel zweimal für 1 Min. zur Nachentwicklung in H₂O gewaschen und die Entwicklungsreaktion durch Inkubation für 5 Min. in 0,5% (w/v) Glyzin-Lösung beendet. Danach wurde das Gel 30 Min. mit H₂O gewaschen und in 10% (v/v) Glycerin-Lösung gelagert. Die mit Coomassie und Silber gefärbten Gele wurden mit dem Computerprogramm Silverfast (LaserSoft Imaging) dokumentiert.

2.2.3.6 Western Blot und immunchemische Proteindetektion

Der *Western Blot*-Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-PA-Gelen auf Protran Nitrozellulosemembranen (GE Healthcare) erfolgte im „Halb-Trocken“-Verfahren für 45 Min. bei 18 V und RT mit dem Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell-System (Bio-Rad). Der Western Blot-Transferpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 48 mM Tris, 0,4% (w/v) SDS, 39 mM Glyzin, 20% (v/v) Methanol, pH 7,5. Anschliessend wurde die Membran bei RT für 1 Stunde unter Schütteln zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen in einer 4% (w/v) Milchpulver (Carl Roth GmbH)-Lösung in TBS inkubiert. Die Inkubation mit dem geeigneten Primärantikörper (s. 2.1.4) in TBS-T erfolgte über Nacht bei 4 °C unter Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran dann für 30-60 Minuten bei RT unter Schütteln mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert und danach dreimal mit TBS-T, einmal mit TBS und einmal mit H₂O gewaschen. Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte bei Verwendung HRP-gekoppelter Sekundärantikörper mit dem Western Lightning ECL-Kit (Perkin-Elmer) im Lumi-Imager F1 (Roche) bzw. bei IR800-gekoppelten Sekundärantikörpern im Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR).

2.2.3.7 Expression von Proteinen in Bakterienzellen

Zur Expression von Strep-markierten Proteinen wurde nach Transformation von BL21 (DE3) pLysS-Zellen (s. 2.2.1.6) eine einzelne Bakterienkolonie von der LB-Agarplatte in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampizillin über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag für 10 Min. bei 15000x g und 4 °C sedimentiert und das Sediment zum Entfernen von in der Suspension enthaltener β -Laktamase einmal mit dem gleichen Volumen an LB-Medium gewaschen. Anschliessend wurden die Bakterien in jeweils 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampizillin bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei $\lambda=600$ nm unter

2 Material und Methoden

Schütteln inkubiert und für 10 Min. auf Eis abgekühlt. Nach Induktion der Proteinexpression mit Anhydrotetrazyklin (Arcos Organics)-Lösung in Dimethylsulfoxid bei einer finalen Konzentration von 0,2 µg/ml in LB-Medium wurden die Bakterienzellen bei 20 °C für 15 Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach der Zellernte durch Sedimentation für 10 Min. bei 10000 rpm und 4 °C in einer Avanti J-25-Ultrazentrifuge mit JLA 10.500-Rotor (Beckman-Coulter) wurden die Bakterien in 25 ml BL21-Lysepuffer (150 mM KCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 20 mM DTT, Complete Protease-Inhibitoren) in PBS pro Liter Expressionsvolumen auf Eis resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch drei Zyklen aus Einfrieren auf Trockeneis und Tauen bei 37 °C. Anschliessend wurde erneut für 15 Min. bei 15100x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit einer Endkonzentration von 0,1% (w/v) Polyethylenimin-Lösung versetzt. Die STAT-Proteine wurden nach Zentrifugation für 30 Min. bei 15100x g und 4 °C aus dem Überstand wie in 2.2.3.9 beschrieben gereinigt.

2.2.3.8 Expression von Proteinen in Sf9-Insektzellen

Für die Expression von Strep-markierten STAT-Proteinen wurden Sf9-Insektzellen mit rekombinanten Baculoviren transfiziert. Diese wurden nach Transposition des pFastBac1-STAT-Konstruktes in DH10Bac-Bakterienzellen und Transfektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Bacmiden erhalten. Die Transposition des rekombinanten pFastBac1-Plasmids erfolgte durch Transformation von 100 µl DH10Bac-Zellen mit 1 ng des rekombinanten pFastBac1-Konstrukts wie in 2.2.1.6 beschrieben. Anschliessend wurden die DH10Bac-Zellen in 400 µl LB-Medium für 4 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 100 µl von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 in LB-Medium verdünnten Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Diese waren mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (Carl Roth GmbH), 100 µg/ml X-Gal (Carl Roth GmbH), 50 µg/ml Kanamycin A (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml Tetrazyklinhydrochlorid (Eurobio) und 7 µg/ml Gentamycin (Invitrogen) supplementiert. Bei einer erfolgreichen Transposition des pFastBac1-Konstrukts in das Bacmid wird das LacZ-Gen zerstört, und das Genprodukt kann als Substrat X-Gal nicht mehr zu einem blaufarbenen Produkt metabolisieren. Rekombinante Kolonien sind deshalb farblos. Vereinzelt farblose Kolonien wurden in 1,5 ml des wie oben beschrieben supplementierten LB-Mediums über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die rekombinante Bacmid-DNS wurde mit den

2 Material und Methoden

Puffern des QIAGEN Plasmid Maxi Kits isoliert. Durch Sequenzierung wurde Identität der Bacmide mit den Primern „M13 (-40) vorwärts“ und „M13 revers“ bestätigt.

Zur initialen Virusherstellung wurden Sf9-Zellen bei 80% Konfluenz in 6-Loch-Zellkulturschalen wie in 2.2.3.1 beschrieben mit 0,5 µg rekombinanter Bacmid-DNS transfiziert und das Medium nach 24 Stunden Inkubation bei 27 °C durch supplementiertes Insect-Xpress-Medium ersetzt. Die lytischen Viren werden unter Zerstörung der Sf9-Zellen ins Medium freigesetzt. Zur Virus-Ernte wurden die transfizierten Sf9-Zellen nach 7 Tagen durch Zentrifugation für 2 Min. bei 16100x g und 4 °C sedimentiert. Die Virusamplifikation erfolgte mit dem Virus-haltigen Überstand: 10 ml Sf9-Insektzell-Suspension in Rundkolben wurden bei einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ /ml mit 1 ml des Überstands infiziert und für 7 Tage unter Schütteln bei 130 rpm und 27 °C inkubiert. Anschliessend wurden die Viren erneut wie oben beschrieben geerntet und der Überstand zur weiteren Amplifikation eingesetzt.

Zur Proteinexpression wurden 500 ml Sf9-Suspension bei einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ /ml in Rührflaschen oder Rundkolben mit 20 ml Virus-haltigem Überstand infiziert. Nach Inkubation für 48-72 Stunden bei 27 °C erfolgte die Ernte der Sf9-Zellen durch Zentrifugation für 10 Min. bei 8000x g und 4 °C. Das Sediment wurde in 25 ml Sf9-Lysepuffer (20 mM MES, 100 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM DTT, Complete Protease-Inhibitoren) pro Liter Expressionsvolumen auf Eis resuspendiert und durch 3x 15 Streiche mit einem Pistill-Homogenisator mechanisch lysiert. Nach Zentrifugation für 15 Min. bei 15100x g und 4 °C wurde der Überstand mit einer Endkonzentration von 0,1% (w/v) Polyethylenimin-Lösung versetzt. Die STAT-Proteine wurden nach Zentrifugation für 30 Min. bei 15000x g und 4 °C aus dem Überstand wie in 2.2.3.9 beschrieben gereinigt.

2.2.3.9 Reinigung rekombinanter Strep-markierter STAT-Proteine

Die Reinigung rekombinanter Strep-markierter STAT-Proteine erfolgte mit 1 ml Bettvolumen Strep-Tactin-Sepharose (IBA) pro 10 ml STAT-Protein-haltigem Überstand (enthält ca. 1-2 mg STAT1-Protein) aus 2.2.3.7 und 2.2.3.8 gemäss Herstellerangaben. Die Säule wurde zweimal mit 3 Säulenvolumina Strep-Waschpuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, pH 8,0) gewaschen. Die Protein-Elution erfolgte in 6 Fraktionen zu je 0,5 Säulenvolumina mit 2,5 mM Desthiobiotin in Strep-Waschpuffer. Die Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das STAT1-Protein durch Coomassie-Färbung identifiziert.

2 Material und Methoden

Die STAT1-Proteine wurden durch Zugabe desselben Volumens einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung (in PBS, pH 7,4) präzipitiert und bei 4 °C gelagert.

2.2.3.10 Präparation des EGF-Rezeptors

Die Präparation von EGF-Rezeptoren (EGFR) erfolgte aus A431-Säugetierzellen. Die Zellen einer konfluenten 15 cm-Zellkulturschale wurden in 1 ml A431-Lysepuffer (10 mM HEPES-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM Na₃VO₄, Complete Protease-Inhibitoren, pH 7,5) aufgenommen und durch 3x 15 Streiche mit einem Pistill-Homogenisator mechanisch lysiert. Der EGFR-haltige Überstand wurde nach Zentrifugation für 30 Min. bei 15000x g und 4 °C auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung bei der Phosphorylierung von STAT-Proteinen (s. 2.2.3.12) gelagert.

2.2.3.11 Präparation von Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor

Die Anti-EGFR-IgG werden von mAB108-Hybridomazellen in das Zellkulturmedium sezerniert und wurden mit 313g Ammoniumsulfat pro Liter Vollmedium bei RT mit anderen im Medium enthaltenen Proteinen präzipitiert. Nach Zentrifugation für 10 Min. bei 5000x g und 4 °C wurde das Protein-Präzipitat in 10 ml PBS resuspendiert und für 3 Tage bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Die Reinigung erfolgte über eine Säule aus Protein A-Agarose (RepliGen, Cambridge, MA) mit 2 ml Bettvolumen, die mit 2 ml 0,1 M Glyzin-HCl, pH 3,5 und dann mit 10 ml PBS äquilibriert wurde. Nach Beladung der Säule mit dem Dialysat wurde die Säule mit 10 ml PBS gewaschen und die IgG mit 10 ml 0,1 M Glyzin-HCl, pH 3,5 in 5 Fraktionen eluiert. Das Eluat wurde umgehend mit jeweils 60 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 pro Fraktion neutralisiert. Nach Identifikation der IgG-haltigen Fraktionen in Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gelen wurden die Fraktionen vereinigt und mit VivaSpin 6-Zentrifugalfiltratoren (Ausschlussgröße 30 kDa; Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich) auf ca. 6 mg/ml konzentriert. Nach Einfrieren auf Trockeneis wurden sie bei -80 °C bis zur Verwendung bei der Phosphorylierung von STAT-Proteinen (s. 2.2.3.12) gelagert.

2.2.3.12 Alkylierung und Phosphorylierung rekombinanter STAT1-Proteine

Die Ammoniumsulfat-Präzipitate von jeweils 4 mg STAT-Protein (s. 2.2.3.9) wurden zur Modifikation von Cystein-Resten, die die Aggregation von STAT-Proteinen durch die Bildung

2 Material und Methoden

kovalenter Disulfidbrücken bewirken können (Vinkemeier *et al.*, 1996), alkyliert. Dazu wurden die Präzipitate in Alkylierungspuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,2, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, Complete Protease-Inhibitoren) resuspendiert und mit einer Endkonzentration von 20 mM N-Ethylmaleimid (Sigma-Aldrich) in Alkylierungspuffer zunächst für 15 Min. bei RT und dann für 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Alkylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2-Merkaptoethanol auf die Endkonzentration von 50 mM beendet. Das Protein wurde durch Zugabe desselben Volumens einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung (in PBS, pH 7,4) präzipitiert und bei 4 °C gelagert. Das zu phosphorylierende Proteinpräzipitat wurde in Kinasepuffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,3 mM Na_3VO_4 , 2 mM DTT, pH 8,0) resuspendiert und 500 μl der Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 5 mg/ml je Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. Jeweils 4 ml des EGF-Rezeptor-haltigen Lysats (s. 2.2.3.10) wurden zunächst für 3 Stunden mit 200 μg Anti-EGFR-IgG (s. 2.2.3.11) unter Rotieren bei 4 °C inkubiert. Der resultierende Immunkomplex wurde dann mit 400 μl gesetztem Volumen an Protein A-Agarose (äquilibriert in A431-Lysepuffer) unter Rotieren für weitere 3 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden zunächst dreimal mit A431-Lysepuffer und dann fünfmal mit Kinasepuffer gewaschen. Zur Phosphorylierung wurden 400 μl Immunpräzipitat (gesetztes Volumen) mit 4-5 mg alkyliertem STAT-Protein in Kinasepuffer gemischt und der Reaktionsansatz nach Zugabe von 120 μl 100 mM ATP in Tris-HCl, pH 8,5 und 26 μl 1 M MnCl_2 mit Kinasepuffer auf 2 ml aufgefüllt. Nach der Phosphorylierungsreaktion über Nacht bei 4 °C unter Rotieren wurde der proteinhaltige Überstand durch Zentrifugation für 2 Min. bei 2000x g und 4 °C vom Immunpräzipitat getrennt und bei 4 °C gelagert.

2.2.3.13 Affinitätschromatographische Reinigung von phosphoryliertem STAT1

Das phosphorylierte STAT-Protein wurde durch Affinitätschromatographie mit Hi-Trap Heparin-Säulen (GE Healthcare Lifesciences) vom unphosphorylierten Protein unter Aufzeichnung des Elutionsprofils bei $\lambda=280$ nm mit Hilfe eines FPLC-Systems (GE Healthcare Lifesciences) getrennt. Die Elution des unphosphorylierten STAT-Proteins erfolgte im Gradienten ansteigender KCl-Konzentrationen von 0-500 mM in HA-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). Bei 150 mM KCl wurde das unphosphorylierte und bei 400 mM KCl das phosphorylierte STAT1-Protein eluiert. Die das Phosphoprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Phospho-STAT1 durch Zugabe desselben Volumens einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung

(in PBS, pH 7,4) präzipitiert. Die spezifische Phosphorylierung am Tyrosinrest 701 wurde massenspektrometrisch bestätigt.

2.2.3.14 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Protein-Lösungen bei $\lambda=280$ nm wurde in Quarz-Küvetten im Spektrophotometer Ultrospec 2100 (GE Healthcare Lifesciences) oder mit dem Spektrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) bestimmt. Tabelle 2.5 gibt die anhand der Aminosäurezusammensetzung nach Edelhoch (1967) berechneten molaren Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine bei $\lambda=280$ nm (ϵ_{280}) an.

Tabelle 2.5. Molare Extinktionskoeffizienten bei $\lambda=280$ nm (ϵ_{280}) für STAT1-Proteine und isolierte STAT1-, STAT3- und STAT4-N-Domänenproteine (ND).

Protein	ϵ_{280} [$l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$]
STAT1 α	1,29
STAT1 β	1,36
STAT1 Δ N	1,23
STAT1tc	1,30
STAT1-ND	1,66
STAT3-ND	1,75
STAT4-ND	1,30

2.2.3.15 Massenspektrometrische Analysen

Eine ca. 1 μ g STAT1tc-Phosphoprotein entsprechende Bande wurde aus einem Coomassiegefärbten und fast wieder vollständig entfärbten SDS-PA-Gel ausgeschnitten und durch die Abteilung für Massenspektrometrie am FMP weiter bearbeitet und massenspektroskopisch untersucht. Das Gel wurde ohne Reduktion oder Alkylierung mit 50% (v/v) Azetonitril in 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung gewaschen, mit Azetonitril dehydratisiert und in 20 μ l 5 mM NH_4HCO_3 -Lösung mit 600 ng der Endoprotease AspN (Roche) für 15 Min. inkubiert. Nach 15 Min. wurde die Protein-Fragmentierung unter Zugabe von 10 μ l 5 mM NH_4HCO_3 -Lösung über Nacht bei 37 °C fortgesetzt. Die Peptidfragmente wurden durch Ultraschallbehandlung nach Zugabe von 30 μ l 0,5% (v/v) Trifluoressigsäure extrahiert und im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Peptidfragmente wurden in 10 μ l 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure/5% (v/v) Azetonitril-Lösung in H_2O aufgenommen und durch Nano-Flüssigkeitschromatographie über eine C18 PepMap-Säule in 60% (v/v) Azetonitril/0,3% (v/v) Trifluoressigsäure in H_2O eluiert. Die Analyse erfolgte durch

2 Material und Methoden

Tandem Elektrozerstäubungs-Ionisierung Flugdauer-Massenspektrometrie (Tandem-ESI-TOF-MS, *Tandem Electrospray Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry*) im Quadropol-TOF Ultima API (Waters, Milford, MA). Die MS/MS-Umschaltung erfolgte für doppelt geladene Vorläuferionen, die dem Molekulargewicht eines phosphorylierten STAT1-Peptidfragments (AS 694-704) bei $m/z=608,8$ entsprechen. Das Massenspektrum wurde mit den theoretisch möglichen b- und y-Ionen der durch AspN-Verdau entstehenden Peptidfragmente verglichen.

2.2.3.16 Nachweis von Protein:DNS-Interaktionen durch EMSA-Experimente

Die Interaktion von Proteinen mit DNS kann durch EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)-Experimente nachgewiesen werden. Komplementäre Oligonukleotide mit GAS-Stellen und GATC-Überhängen (s. Tabelle 2.2) wurden in Oligonukleotid-Puffer (10 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) auf eine Konzentration von 50 pmol/ μ l je Oligonukleotid eingestellt. Zur Herstellung der Sonden wurden die Oligonukleotide dann durch Erhitzung für 5 Min. bei 95 °C und langsames Abkühlen auf RT hybridisiert. Die Überhänge wurden mit radioaktiv markierten Nukleotiden durch das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I aufgefüllt. Die Markierungsreaktion enthielt in 50 μ l 1x EcoPol-Puffer (NEB): 5 Einheiten Klenow-Enzym, 1 pmol des doppelsträngigen Oligonukleotids sowie je 8 μ l der mit ^{32}P markierten Desoxynukleotide (dNTP) und wurde für 25 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 μ l einer nicht radioaktiven dNTP-Lösung (6,5 mM eines jeden der 4 Nukleotide) wurde der Reaktionsansatz für 5 Min. bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l einer 0,5 M EDTA-Lösung beendet. Die Entfernung freier Nukleotide erfolgte durch Zentrifugation über die Grössenausschlusschromatographie-Säule Microspin Sephadex-G25 (GE Healthcare Lifesciences) für 1 Min. bei 700x g und RT.

Eine EMSA-Reaktion enthielt 3,6 μ l H_2O , 1,3 μ l 0,1 M DTT, 2,5 μ l 5x EMSA-Probenpuffer (100 mM HEPES, pH 7,9, 20% (w/v) Ficoll, 5 mM $MgCl_2$, 200 mM KCl, 2,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA), 0,1 μ l radioaktiv markierter Sonde (entspr. im Reaktionsansatz von 12 μ l einer Endkonzentration von 0,17 nM) und 4,5 μ l einer Proteinlösung. Die Verdünnung des Proteins auf die in der Ergebnisbeschreibung angegebene Endkonzentration erfolgte mit 0,5 mg/ml BSA-Lösung in PBS (pH 7,4). Vor der Beladung des EMSA-PA-Gels wurde der Reaktionsansatz für 15 Min. bei RT inkubiert.

2 Material und Methoden

Für die Durchführung von in der Ergebnis-Sektion beschriebenen Wettbewerbs- und Salzempfindlichkeits-Experimenten, wurde das Gesamtreaktionsvolumen konstant gehalten und das überschüssige Volumen durch Reduktion des H₂O-Volumens ausgeglichen. Für Wettbewerbs-Experimente wurden Mehrfach-Reaktionsansätze hergestellt, die zusätzlich das Protein enthielten und aus denen zu den angegebenen Zeitpunkten festgelegte Volumina entnommen und auf das Gel geladen wurden. In allen anderen Experimenten wurden hingegen Mehrfach-Reaktionsansätze ohne Protein hergestellt, von denen dann festgelegte Volumina entnommen und Proteinlösungen einzeln hinzugefügt wurden.

Jeweils 6 EMSA-PA-Gele wurden durch Mischen von 205 ml H₂O, 30 ml 29:1 AA/BA und 12 ml 5x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (22 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA, 35 mM Tris-HCl, pH 8,0 eingestellt mit HCl) zubereitet und unter Rühren auf Eis entgast. Anschliessend wurden 5 ml 10% (w/v) APS und 250 µl TEMED hinzugefügt. Nach der Polymerisation wurden die nativen EMSA-PA-Gele bei 400 V bis zu einer Stromstärke I=10 mA pro Gel in 0,25x TBE-Puffer im Kühlraum äquilibriert. Anschliessend wurde das Gel pro Spur mit 10 µl der Reaktionsmischung beladen und die Gelelektrophorese bei 4 °C und 400 V durchgeführt. Anschliessend wurde das Gel im Vakuum bei 80 °C getrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde danach auf Storage Phosphor Screens (Molecular Dynamics) mit dem Phospho-Imager Storm 820 (Molecular Dynamics) detektiert und mit ImageQuant quantifiziert. Zur Auswertung wurden die maximalen Bandenintensitäten auf 100% und die niedrigsten Bandenintensitäten auf 0% normalisiert. Die Ermittlung der apparenten K_d-Werte und der zur DNS-Bindung befähigten Proteinfractionen erfolgte mit dem Computerprogramm Origin durch nichtlineare Kurvenanpassungen der vom unteren (a_i) bis zum oberen Plateau (b_i) ansteigenden DNS-Bindungsisothermen an eine Summe von Boltzmann-Funktionen:

$$f(x) = \sum_{i=0}^{N-1} b_i + \frac{a_i - b_i}{1 + e^{\left(\frac{x - \mu_i}{\tau_i}\right)}} \quad (1)$$

Die Dissoziationsraten k_D wurden durch nichtlineare Regression der Bandenintensitäten für einfache GAS-Stellen an einfache exponentielle Zerfallsfunktionen bzw. für Sonden mit doppelten Bindestellen (2x GAS und GAS/Nicht-GAS) an zweifache exponentielle Zerfallsfunktionen der Form:

$$f(t) = P_1 + A_1 e^{(-k_{D,1} \cdot t)} \left(+ P_2 + A_2 e^{(-k_{D,2} \cdot t)} \right) \quad (2)$$

mit t: Zeit, P: Plateau, A: konstanter Faktor (der zweite Summand in Klammern wird bei einfachen Bindestellen nicht angewendet) mit dem Computerprogramm Origin erhalten. Mit Gleichung 19 wurden aus den Dissoziationsraten k_D die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ erhalten.

2.2.3.17 Analytische Ultrazentrifugation

Im Zentrifugationsfeld stehen Zentrifugal- (F_c), Auftriebs- (F_b) und Reibungskraft (F_f), die gleichzeitig auf ein mit konstanter Geschwindigkeit sedimentierendes Partikel einwirken, im Kräftegleichgewicht:

$$F_c + F_b + F_f = V_p \rho_p \omega^2 r - V_p \rho_s \omega^2 r - f_s \omega^2 r = 0 \quad (3)$$

mit V_p : Volumen des sedimentierenden Partikels p , ρ : Dichte des Partikels bzw. Lösungsmittels s , ω : Winkel-Geschwindigkeit des Rotors, r : Abstand zur Rotationsachse, f : Reibungsfaktor.

Die Masse m des während der Sedimentation verdrängten Lösungsmittels steht mit der Masse des sedimentierenden Partikels in folgender Beziehung:

$$m_s = \rho_s V_p = m_p \bar{v}_p \rho_p \quad (4)$$

mit \bar{v} : partielles spezifisches Partikelvolumen. Die Definition des Sedimentationskoeffizienten s mit der Einheit [1 Svedberg (S) = 10^{-13} s] ergibt sich aus (3) und (4) als:

$$\frac{m_p(1 - \bar{v}_p \rho_s)}{f} \equiv s \quad (5)$$

Der Reibungsfaktor f ist nach Einstein (1905) gegeben als:

$$f = \frac{k_B T}{D} \quad (6)$$

mit k_B : Boltzmann-Konstante, T : Temperatur, D : Diffusionskoeffizient. Durch Kombination von (5) und (6) erhält man nach Umformung die Svedberg-Gleichung, die die Sedimentation einer Masse m im Zentrifugalfeld durch ein Lösungsmittel beschreibt:

$$\frac{s}{D} = \frac{m_p(1 - \bar{v}_p \rho_s)}{k_B T} \quad (7)$$

Nach Stokes (1850) ergibt sich für kugelförmige Partikel des Radius a in einem Lösungsmittel der Viskosität η der Reibungsfaktor als:

$$f = 6 \pi a \eta \quad (8)$$

Aus (6) und (8) erhält man die Stokes-Einstein-Beziehung,

$$D = \frac{k_B T}{6\pi a \eta} \quad (9)$$

die die Berechnung des auftriebskorrigierten Molekulargewichts eines sedimentierenden kugelförmigen Partikels nach der Svedberg-Gleichung (7) ermöglicht:

$$m_p = \frac{s}{D} \frac{6\pi a \eta}{(1 - v_p \rho_s)} \quad (10)$$

Die Rate des Massentransports J_s in einer für analytische Sedimentationsgeschwindigkeits-Ultrazentrifugationsexperimente verwendeten sektorförmigen Zelle der Länge l ergibt sich als:

$$J_s(r) = \frac{dm}{dt} = c \varphi r l s \omega^2 \quad (11)$$

mit c : Konzentration des sedimentierenden Partikels, φ : Sektor-Winkel. Die Diffusionsrate J_d ist gemäss dem 1. Fickschen Gesetz (Fick, 1855) definiert als:

$$J_d(r) = -D \varphi r l \frac{\partial c}{\partial r} \quad (12)$$

Damit ergibt sich als Nettotransportrate J_{tot} :

$$J_{tot} = \varphi r l \left(c s \omega^2 r - D \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (13)$$

und daraus die Lamm-Gleichung (Lamm, 1929), die die zeitliche Veränderung der Konzentration eines gelösten Partikels im Verlauf der Sedimentation beschreibt:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial r} \left[r \left(D \frac{\partial c}{\partial r} - c s \omega^2 r \right) \right] \quad (14)$$

Daten aus Sedimentationsgleichgewichts-Experimenten werden im thermodynamischen Gleichgewicht aus Sedimentation und Diffusion erhalten und liefern, da kein Nettotransport von Partikeln mehr erfolgt, im Gegensatz zu Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimenten, keine kinetischen, sondern thermodynamische Informationen, aus denen das Molekulargewicht der gelösten Partikel und Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_d) abgeleitet werden können.

Man erhält daher $J_{tot}=0$ und $\frac{\partial c}{\partial t} = 0$, sodass sich durch Kombination von (13) und (14) eine

Beschreibung der radialen Konzentrationsverteilung eines Partikels im Gleichgewicht ergibt:

$$c(r) = c(r_m) \exp \left[\frac{s}{D} \frac{\omega^2 (r^2 - r_m^2)}{2} \right] \quad (15)$$

2.2.3.17.1 Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente

Die Überprüfung von Homogenität und Oligomerisierungszuständen der STAT-Proteine erfolgte durch Sedimentationsgeschwindigkeits (SV, *Sedimentation Velocity*)-Experimente. Dazu wurden Sedimentationsprofile bei Geschwindigkeiten von 40000-50000 rpm für STAT1-Varianten und bei 60000 rpm für STAT-ND mit einem AN-60Ti-Rotor in einer Optima XL-I (Beckman-Coulter) am FMP oder am Max Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Potsdam-Golm unter Verwendung von Absorptions- und Interferenzoptik bei 20 °C aufgezeichnet. Für Absorptionsmessungen wurden die sektorförmigen Epon-Kohle-Mittelstücke im Referenzsektor mit 400 µl PBS, pH 7,4 und im Probensektor mit 390 µl Proteinprobe in PBS gefüllt. Die Sedimentationsprofile wurden durch Quarz-Fenster hindurch für jede Zelle alle 4 Minuten mit einer Schrittweite von 0,003 cm aufgezeichnet. Eine Position im Rotor blieb dabei dem Gegengewicht vorbehalten. Für Interferenzmessungen wurden alle vier Mittelstücke im Referenz- und Probensektor mit jeweils 400 µl PBS bzw. Proteinprobe in PBS gefüllt und die Sedimentationsprofile durch Saphir-Fenster hindurch für jede Zelle jede Minute aufgezeichnet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit SedFit 9.3 (Schuck, 2000) durch Analyse von c(s)-Verteilungen und mit Ultrascan 9.1 und 9.3 (Demeler, 2005) durch die van Holde-Weischet-Methode. Nach Regularisierung mit dem *Maximum Entropy*-Algorithmus (Livesey und Skilling, 1985) und Normalisierung der integrierten gemittelten c(s)-Verteilung wurden die Selbstassoziations-Isothermen mit SedPhat 4.1 (Schuck, 2003) berechnet und daraus geeignete Konzentrationsbereiche für den Monomer-Dimer-Übergang ermittelt. Diese Konzentrationsbereiche wurden in SE-Experimenten zur Ermittlung der Molekulargewichte der STAT-Oligomere und deren Gleichgewicht-Dissoziationskonstanten K_d eingesetzt.

2.2.3.17.2 Sedimentationsgleichgewichts-Experimente

SE-Experimente wurden mit den Rotoren AN-60Ti und AN-50Ti (Beckman-Coulter) unter Verwendung von Absorptionsoptik bei 4 °C am FMP durchgeführt. Je 3 Sektoren wurden paarweise mit 120 µl PBS als Referenz bzw. 110 µl Proteinprobe in PBS gefüllt und zunächst Wellenlängenspektren im Bereich von 190-300 nm für jedes Sektorpaar aufgezeichnet. Aus ihnen wurden für jede eingesetzte Proteinkonzentration drei geeignete Wellenlängen mit Absorptionswerten zwischen 0,1 und 0,9 für die Aufzeichnung von Gleichgewichtsprofilen ausgewählt. Die Gleichgewichtsprofile wurden im radialen Schritt-Modus mit Schrittweiten von

0,001 cm und 15 Wiederholungen für jede radiale Position alle 6 Stunden aufgezeichnet. Die Messungen wurden für jeweils 4 dem Molekulargewicht der Proteinkomplexe angemessenen Rotor-Geschwindigkeiten durchgeführt. Die Gleichgewichtseinstellung wurde mit WinMatch verifiziert und die Geschwindigkeit anschliessend erhöht. Die Datenanalyse erfolgte mit Ultrascan 9.1 und 9.3 durch globale nichtlineare Kurvenanpassung der Gleichgewichtsprofile aller Konzentrationen bei allen Wellenlängen und Geschwindigkeiten an verschiedene reversible und nicht-reversible Assoziationsmodelle. Von Modellen, die die Gleichgewichtsprofile am besten beschrieben, wurden Monte Carlo-Analysen zur Ermittlung von 95%-Konfidenzintervallen der K_d -Werte und Molekulargewichte durchgeführt. Dies geschah auf Supercomputern mithilfe des UltraScan LIMS-Portals der University of Texas, Health Sciences Center in San Antonio.

2.2.3.18 Kovalente Vernetzung von Proteinen mit Glutaraldehyd

Die Analyse der Oligomerisierungszustände von phosphorylierten und unphosphorylierten STAT1-Proteine erfolgte bei einer Konzentration von 50 nM in PBS. Dazu wurden 400 μ l Proteinlösung bei RT für die angegebenen Zeiten mit 8 μ l 1% (v/v) Glutaraldehyd inkubiert. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden 80 μ l Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von jeweils 8 μ l 1 M Tris-HCl, pH 6,8 beendet. Die Proben wurden anschliessend mit 24 μ l 6x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Min. bei 95 °C inkubiert. Anschliessend wurden 3-8%-ige Tris-Azetat-PA-Gele mit 22,3 μ l Probenlösung pro Spur beladen und die Elektrophorese gemäss Herstellerempfehlungen (Invitrogen) durchgeführt. Die Proteindetektion erfolgte durch Silberfärbung (s. 2.2.3.5).

2.2.3.19 Dynamische Lichtstreuung

Die zu untersuchenden STAT1-Proteine wurden bei den angegebenen Konzentrationen in PBS durch ein Sterilfilter in das DynaPro 801-TC-Instrument im NCMH (National Centre for Molecular Hydrodynamics, Sutton Bonington, UK) injiziert. Die hydrodynamischen Protein-Radien und Molekulargewichte wurden aus den Daten der dynamischen Lichtstreuung mit dem Dynamics 4.0 Computerprogramm (Protein Solutions) ermittelt.

2.2.3.20 Präparative und analytische Grössenausschluss-Chromatographie

Durch präparative Grössenausschluss-Chromatographie wurden Proteine zur Verwendung in der analytischen Ultrazentrifugation (s. 2.2.3.17), zur kovalenten Vernetzung von Proteinkomplexen durch Glutaraldehyd (s. 2.2.3.18) und zur dynamischen Lichtstreuung (s. 2.2.3.19) von Aggregaten und Verunreinigungen befreit. Dazu wurden die als Ammoniumsulfat-Sedimente vorliegenden (s. 2.2.3.12 und 2.2.3.13) unphosphorylierten und phosphorylierten STAT-Proteine unter Verwendung einer Superose 12-Säule mit dem ÄKTA-Purifier (GE Healthcare Lifesciences) isokratisch mit PBS eluiert.

Durch analytische Grössenausschluss-Chromatographie wurden die Proteine auf ihren Oligomerisierungsgrad hin analysiert. Dabei erfolgte die Kalibrierung der Superose 12-Säule mit den von Sigma-Aldrich erworbenen Molekulargewichts-Standards Dextranblau (2 MDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (160 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa). Die Elutionsprofile wurden bei $\lambda=280$ nm aufgezeichnet.

Anhand der relativen Mobilität k_{AV} :

$$k_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (16)$$

mit V_e : Elutionsvolumen, V_0 : Ausschlussvolumen (definiert durch Dextranblau) und V_t : Säulenvolumen wurde das apparente Molekulargewicht des Proteins ermittelt.

2.2.3.21 Hydrodynamische Modellierungen und Ermittlung von STAT1-Assoziationsraten

Hydrodynamische Modellierungen an Kristallstrukturen des unphosphorylierten und phosphorylierten STATs wurden mit HydroPro 7c durchgeführt, um benötigte hydrodynamische Parameter wie Gyrationradien, Sedimentationskoeffizienten und Diffusionskoeffizienten zur Ermittlung von maximalen Assoziations (k_A)- und Dissoziations (k_D)-Raten zu berechnen. Für die hydrodynamischen Modellierungen wurden die PDB-Koordinatendatensätze des phosphorylierten STAT1 (1BF5) nach Entfernung der Strukturdaten der DNS, sowie des unphosphorylierten STAT1 (1YVL) verwendet. Ausserdem wurden in die Berechnungen korrigierte Pufferbedingungen, partielle spezifische Proteinvolumina aus der Aminosäurezusammensetzung und die Molekulargewichte der Monomere und Dimere einbezogen. Aus den berechneten hydrodynamischen Parametern wurden durch zwei unabhängige Methoden die kinetischen Raten ermittelt.

2 Material und Methoden

Die in Ultrascan implementierte *Adaptive Space-Time Finite Element Method* (ASTFEM; Cao und Demeler, 2008) wurde zur Simulation des Sedimentationsprofils eines Monomer-Dimer-Systems unter Verwendung einer experimentell ermittelten $K_d=50$ nM für phosphorylierte und unphosphorylierte STAT1-Dimere und der k_D als Variable verwendet. Dazu wurden die modellierten hydrodynamischen Parameter mit idealisierten Molekülgestalten abgeglichen. Der Übergang vom dimeren zum monomeren Zustand deutet sich durch ein bi-sigmoidales Sedimentationsprofil an, und die dabei verwendete k_D wurde zur Berechnung der k_A verwendet.

Die maximale Rate des Zusammentreffens k_A zweier gleichermassen reaktiver sphärischer Spezies wurde mit der Smoluchowski-Gleichung (von Hoppel und Berg, 1981) ermittelt:

$$k_A = \frac{4\pi(r_{\text{gyr, M}} + r_{\text{gyr, D}})N_A(D_M + D_D)}{B} \quad (17)$$

mit N_A : Avogadro-Zahl und B : Normalisierungsfaktor ($1000 \text{ m}^3 \text{ l}^{-1}$). Die Assoziations- und Dissoziations-Raten sind über die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d verknüpft:

$$K_d = \frac{k_D}{k_A} \quad (18)$$

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Komplexes kann durch:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_D} \quad (19)$$

erhalten werden.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der STAT1-T327R- und H406A-Mutanten

3.1.1 Subzelluläre Verteilung von STAT1 in HeLa-S3-Zellen

Die Mutanten T327R und H406A zeigten bereits in Voruntersuchungen deutlich von Wildtyp abweichende Eigenschaften in Bezug auf Dephosphorylierung und transkriptionelle Aktivität. Daher wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation und das Kernakkumulationsverhalten nach IFN γ -Stimulation von STAT1 α -WT und den Mutanten T327R, H406A, H406N und H406R im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Aus Vorversuchen war bereits bekannt, dass die N-terminale Fusion mit GFP die Kernakkumulation verhindert. Die C-terminale Position des GFP hingegen führt zu einem ähnlichen Akkumulationsverhalten wie beim nativen STAT1. Daher wurden HeLa-S3-Zellen mit pEGFP-N1-Expressionsplasmiden transfiziert, die die transiente Expression von verschiedenen STAT1 α -Proteinen mit C-terminal fusioniertem GFP ermöglichen. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion für bis zu 6 Stunden mit humanem IFN γ stimuliert, fixiert und die subzelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz ermittelt (Abb. 3.1).

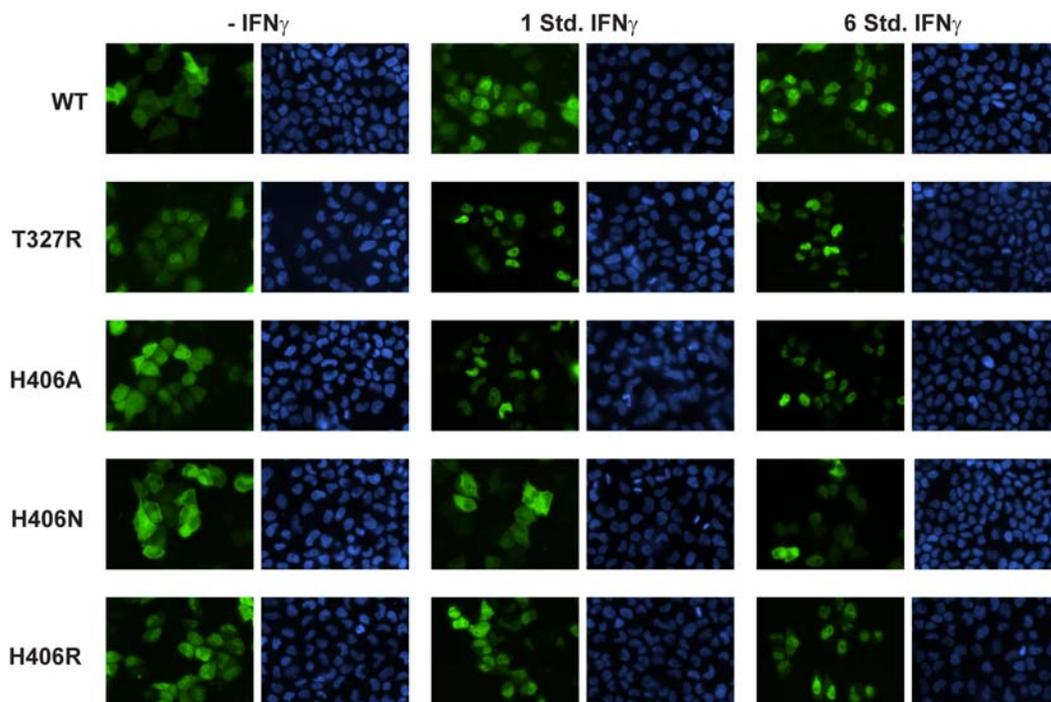


Abb. 3.1 Subzelluläre Verteilung der STAT1-Mutanten. HeLa-S3-Zellen, die GFP-Fusionsproteine von STAT1 α -Wildtyp (WT) oder den Mutanten T327R, H406A, H406N und H406R exprimieren, wurden in Abwesenheit (-IFN γ) oder Anwesenheit von 5 ng/ml IFN γ für die angegebenen Zeiten inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit 4% (v/v) Formaldehyd wurde die subzelluläre Lokalisation der STAT-Proteine anhand der Verteilung der GFP-Fluoreszenz untersucht.

STAT1-WT und die Mutante H406A waren in HeLa-S3-Zellen vor der IFN γ -Behandlung panzellulär verteilt, während die Mutanten T327R und H406R eine leichte Kernbetonung zeigten. H406N hingegen war vor der Stimulation mit IFN γ überwiegend im Zytoplasma lokalisiert und translozierte im Gegensatz zu den anderen STAT1-Proteinen weder nach 1 noch nach 6 Stunden Behandlung mit IFN γ in den Zellkern. Die Mutanten T327R und H406A akkumulierten bereits nach 1 Stunde IFN γ -Stimulation fast vollständig im Zellkern und persistierten dort auch nach 6 Stunden IFN γ -Stimulation. Der Wildtyp und H406R zeigten nach 1 Stunde IFN γ -Behandlung eine weniger vollständige Akkumulation im Zellkern, die jedoch bei der H406R-Mutante nach 6 Stunden ausgeprägter als beim Wildtyp war.

Die auffallend bessere und verlängerte Kernakkumulation der Mutanten T327R und H406A im Vergleich zum Wildtyp stellte die Frage nach der Ursache dieses Phänotyps. Die vorhandene Literatur liefert ein Erklärungsmodell, nach dem eine verlängerte DNS-Bindung die Dephosphorylierung der STAT-Dimere verhindert. Die Dephosphorylierung wiederum ist die Voraussetzung für den Export ins Zytoplasma ist. Bei der untersuchten T327R-Mutante wurde nur eine der drei Aminosäurereste in der DNS-Bindedomäne (DBD) ausgetauscht, die in der „DNS^{plus}“-Mutante (s. 1.3) verändert wurden. Diese Dreifach-Mutante zeichnet sich durch verbesserte, aber unspezifische DNS-Bindung aus, die die Mutante stärker resistent gegen Dephosphorylierung macht. Diese verlängerte DNS-Bindung führte jedoch nicht zur verstärkten transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen (Meyer *et al.*, 2003). In der hier ausserdem untersuchten H406A-Mutante wurde ein weiterer Aminosäurerest in der DBD ausgetauscht, der über Wasserstoffbrückenbindungen das Kohlenstoff-Rückgrat der DNS kontaktiert. Auch diese Mutante zeichnete sich in Vorversuchen durch einen Dephosphorylierungsdefekt aus (Dr. Thomas Meyer, persönliche Kommunikation). Sie war in der Stärke der Bindung an GAS-Stellen zwar mit dem Wildtyp vergleichbar, zeigte jedoch eine leicht erhöhte Präferenz für unspezifische Interaktionen mit DNS. Dennoch aktivierte die H406A-Mutante in Reporterexperimenten die Transkription von Zielgenen um ein Vielfaches besser als der Wildtyp (Dr. Thomas Meyer, persönliche Kommunikation).

3.1.2 Expression, Phosphorylierung und Reinigung von STAT1 α -WT und -Mutanten

Als Erklärung für die bei den Mutanten T327R und H406A im Vergleich zum STAT1 α -Wildtyp länger andauernde IFN γ -vermittelte Retention des Phosphoproteins im Zellkern und den Defekt

in der Dephosphorylierung kommt eine verbesserte Interaktion mit DNS in Frage. Zur Charakterisierung der DNS-Bindungseigenschaften wurden die Strep-markierten STAT1tc-Proteine Wildtyp, T327R und H406A in Bakterienzellen exprimiert, gereinigt, *in vitro* phosphoryliert und ihre DNS-Bindung an verschiedene Zielensonden untersucht. Wie bereits demonstriert wurde, unterscheiden sich die Bindungseigenschaften der STAT1tc-Phosphoproteine in EMSA-Experimenten mit einfachen STAT1-Zielensonden nicht von phosphoryliertem STAT1 α (Vinkemeier *et al.*, 1996). Der Verlauf der Reinigung und Phosphorylierung der bakteriellen Strep-markierten STAT1tc-Proteine wird exemplarisch am Beispiel des Wildtyps gezeigt. Das Protein wurde zunächst affinitätschromatographisch mit Strep-Tactin-Sepharose gereinigt (Abbildung 3.2).

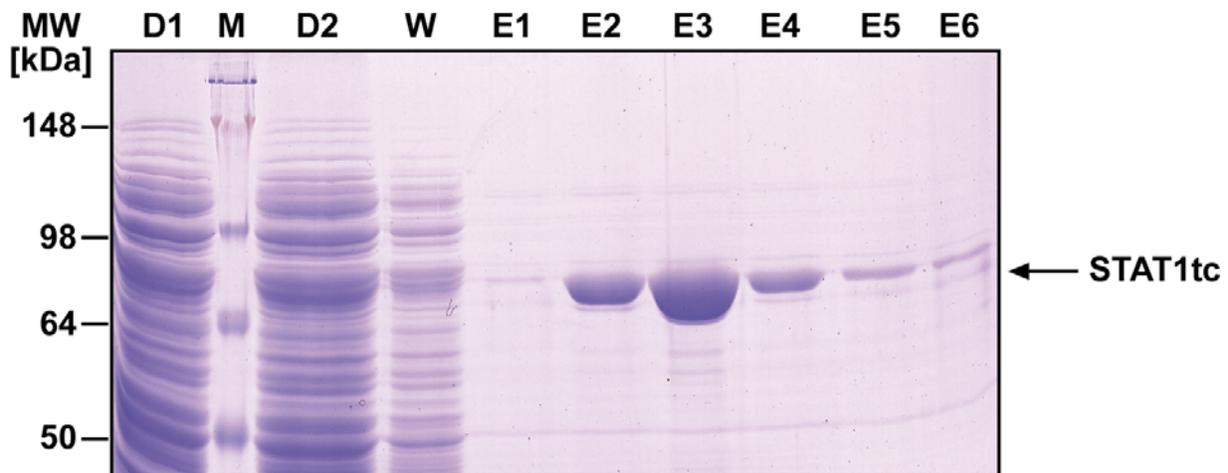


Abb. 3.2 Reinigung des bakteriellen Strep-markierten STAT1tc-WT durch Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin-Sepharose. Gezeigt ist ein mit Coomassie gefärbtes 10%-iges SDS-PA-Gel mit den nicht-gebundenen Durchflussfraktionen D1 und D2, der Waschfraktion W und den 6 Elutionsfraktionen E1-6. Die Position des STAT1tc-Proteins im Gel ist durch den Pfeil gekennzeichnet. M: Molekulargewichts-Standard SeeBlue Plus 2.

Die das gereinigte Protein enthaltenden Fraktionen wurden kombiniert und das Protein mit demselben Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung präzipitiert. Dann wurde das Protein zur Modifikation von Cysteinresten alkyliert, um die Protein-Aggregation durch Bildung kovalenter Disulfidbrücken zu verhindern. Wie bereits gezeigt wurde, beeinflusst diese Modifikation nicht die DNS-Bindungseigenschaften von STAT1 (Vinkemeier *et al.*, 1996). Die *in vitro*-Phosphorylierung erfolgte mithilfe von an Protein A-Agarose immobilisierten Immunkomplexen aus EGF-Rezeptor und mAB108-IgG. Die Reinigung der benötigten monoklonalen mAB108-IgG aus mAB108-Hybridomazellen durch Protein A-Agarose-Affinitätschromatographie (Vinkemeier *et al.*, 1996) ist in Abbildung 3.3 gezeigt.

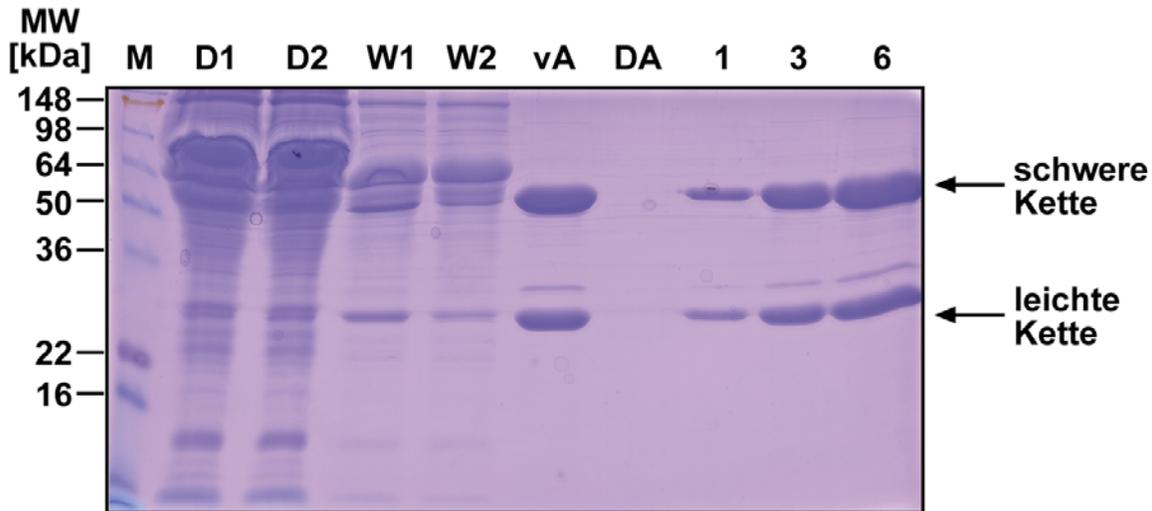


Abb. 3.3 Reinigung der monoklonalen Anti-EGFR-IgG durch Affinitätschromatographie mit Protein A-Agarose. Gezeigt ist ein mit Coomassie gefärbtes 15%-iges SDS-PA-Gel mit den nicht-gebundenen Durchflussfraktionen D1 und D2, den Waschfraktionen W1 und W2, und dem Eluat vor der Aufkonzentrierung (vA), dem Ultrafiltrat (DA) und 1, 3 und 6 μ g des Retenats der Zentrifugalfiltration. Die Positionen der schweren und leichten Kette des Immunglobulins sind durch Pfeile gekennzeichnet. M: Molekulargewichts-Standard SeeBlue Plus 2.

Das *in vitro* phosphorylierte Protein wurde durch Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose durch Elution gegen einen KCl-Stufengradienten bei 400 mM KCl erhalten, während freies ATP der Phosphorylierungsreaktion im Säulendurchfluss detektiert und das unphosphorylierte Protein bereits bei 150 mM KCl eluiert wurde (Abb. 3.4).

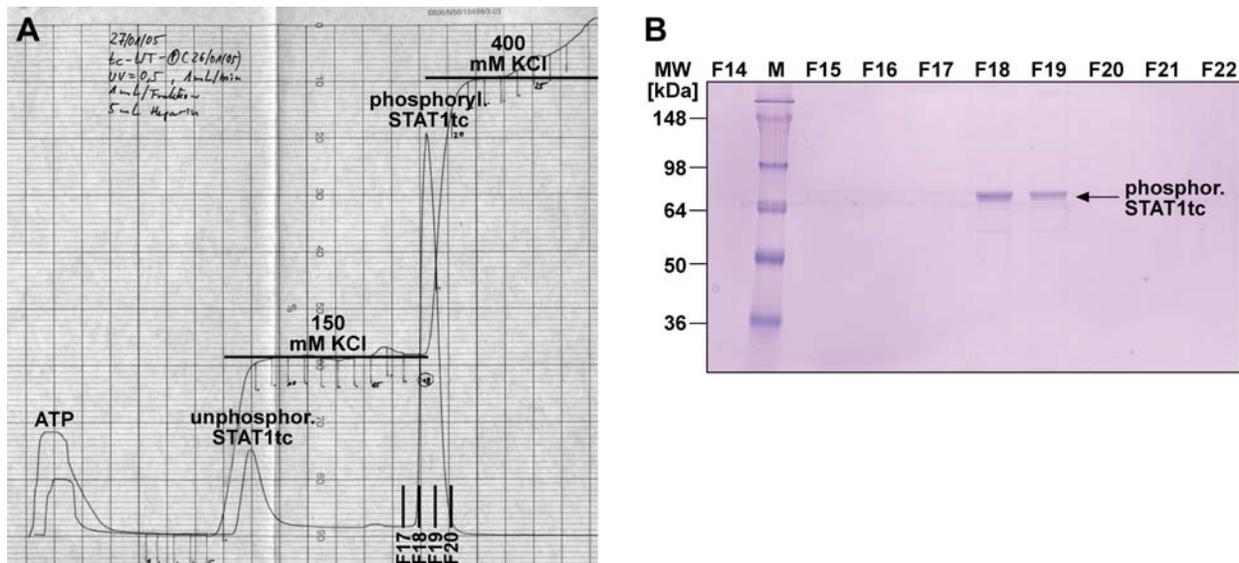


Abb. 3.4 Trennung des phosphorylierten vom unphosphorylierten Protein durch Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose. Das Elutionsprofil (A) zeigt die von der Ionenstärke abhängige Trennung des phosphorylierten Proteins vom ATP-haltigen Säulendurchfluss und dem unphosphorylierten Protein. Die Eluatfraktionen F14-22 wurden im mit Coomassie gefärbten 10%-igen SDS-PA-Gel (B) untersucht und das mutmassliche Phosphoprotein in den Fraktionen F18 und F19 detektiert. Die Position des Phosphoproteins im Gel ist durch den Pfeil gekennzeichnet. M: Molekulargewichts-Standard SeeBlue Plus 2.

3 Ergebnisse

Zur massenspektrometrischen Bestätigung der spezifischen Phosphorylierung der STAT1tc-Varianten am Tyrosinrest 701 wurden die Proteinbanden aus dem SDS-PA-Gel (s. Abb. 3.4B) ausgeschnitten und mit der Endoproteinase AspN verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden durch ESI-TOF Tandem-MS hinsichtlich der Tyrosin 701-Phosphorylierung analysiert (Abb. 3.5).

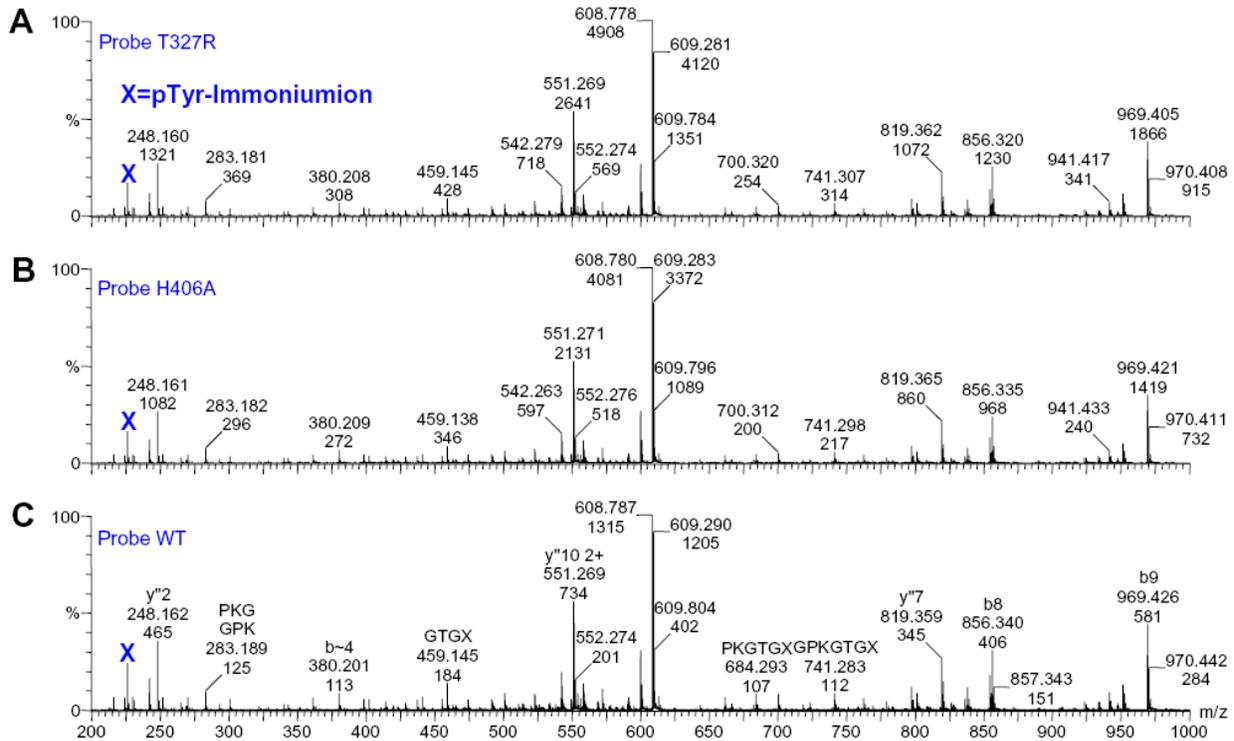


Abb. 3.5 Identifikation des phosphorylierten Tyrosin 701-Rests der STAT1tc-Mutanten durch Massenspektrometrie. Die MS-MS-TOF-Spektren für phosphoryliertes STAT1tc-T327R (A), -H406A (B) und -Wildtyp (C) resultieren aus den zweifach geladenen Vorläuferionen mit $m/z=608,8$. Die relevanten Ionen sind nach gängiger Nomenklatur (Johnson *et al.*, 1987) gekennzeichnet (siehe C). Die y- und b-Ionen wurden durch aufeinanderfolgende Fragmentierungsreaktionen erzeugt. Sie bestätigen die Existenz der Tyrosin-Phosphorylierung anhand von Sequenzionen und dem Phosphotyrosin-Immoniumion bei $m/z=216,04$ („X“).

Die in den ESI-TOF-MS-Spektren (Daten nicht gezeigt) erhaltenen Signale bei $m/z=608,8$ entsprechen den zweifach geladenen Peptid-Ionen der Aminosäurereste 694-704 (DGPKGTYG⁷⁰¹IKT) mit dem phosphorylierten Tyrosin⁷⁰¹-Rest. Das für das unphosphorylierte Peptid erwartete Ion bei $m/z=568,8$ konnte nur bei der unphosphorylierten Kontrollprobe (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden, nicht jedoch bei den phosphorylierten Proben. Die phosphorylierten Proben wurden nach der ESI-TOF-MS direkt durch Tandem-MS weiter untersucht. Die durch fortgesetzte Fragmentierung erhaltenen y- und b-Ionen decken für die Mutanten und den Wildtyp ca. 40-60% aller berechneten Ionen ab und weisen eindeutig anhand der Sequenz-Ionen und des Phosphotyrosin-Immoniumions die Existenz der Tyrosin 701-Phosphorylierung nach.

3.1.3 Eigenschaften der DNS-Bindung von STAT1tc-WT und -Mutanten

Die DNS-Bindung der phosphorylierten STAT1tc-Proteine wurde durch EMSA-Experimente charakterisiert. Zuerst wurden die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_d) der Protein:DNS-Interaktion an die optimierte GAS-Sonde M67 ermittelt. Dazu wurde das Phosphoprotein gegen eine konstante Endkonzentration (0,17 nM) an radioaktiv markierter M67-Sonde titriert und bei der halbmaximalen Bandenintensität die apparente K_d erhalten (Abb. 3.6).

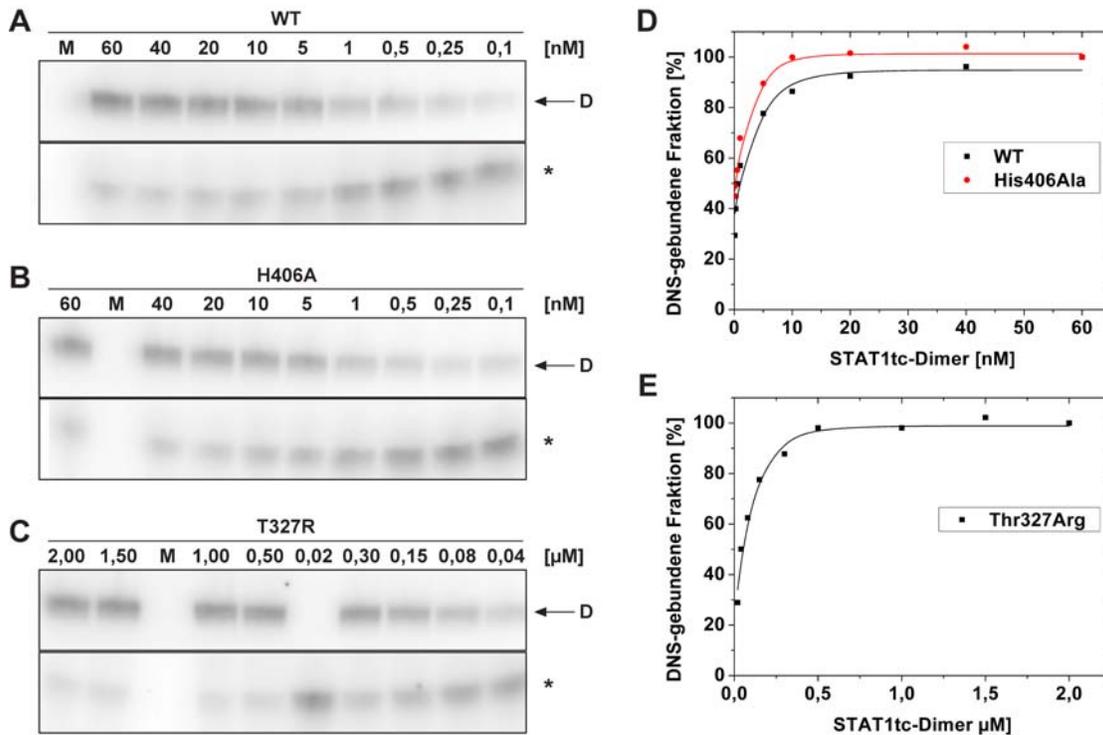


Abb. 3.6 Ermittlung von apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_d) der STAT1tc:DNS-Interaktion durch EMSA-Experimente. Phosphoryliertes STAT1tc-Wildtyp (A), -H406A (B) und -T327R (C) wurde gegen eine konstante Konzentration an radioaktiv markierter M67-Sonde titriert. Das DNS-gebundene Dimer (D) und ungebundene Sonde (*) sind gekennzeichnet. Die apparenten K_d wurden als halbmaximale Bandenintensitäten durch nichtlineare Kurvenanpassung an eine Summe von Boltzmann-Funktionen in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration für STAT1tc-WT und -H406A (D), sowie STAT1tc-T327R (E) ermittelt. Zur Normalisierung wurden die maximalen Bandenintensitäten auf 100% und die niedrigsten Bandenintensitäten auf 0% der DNS-gebundenen Fraktion gesetzt.

Die nichtlinearen Kurvenanpassungen der bis zu einem Plateau ansteigenden DNS-Bindungsisothermen an eine Summe von Boltzmann-Funktionen (s. 2.2.3.16, Gl. 1) mit dem Computerprogramm Origin lieferte für STAT1tc-WT eine apparente K_d von 0,5 nM, für STAT1tc-H406A von 0,3 nM und für STAT1tc-T327R von 14,4 nM.

Von den apparenten K_d ausgehend, wurde die 100x K_d -Konzentration des Proteins gegen eine konstante Endkonzentration (0,17 nM) an radioaktiv markierter und abnehmende

Konzentrationen an unmarkierter M67-Sonde titriert, um den Anteil der zur DNS-Bindung befähigten STAT1tc-Proteine zu ermitteln (Abb. 3.7).

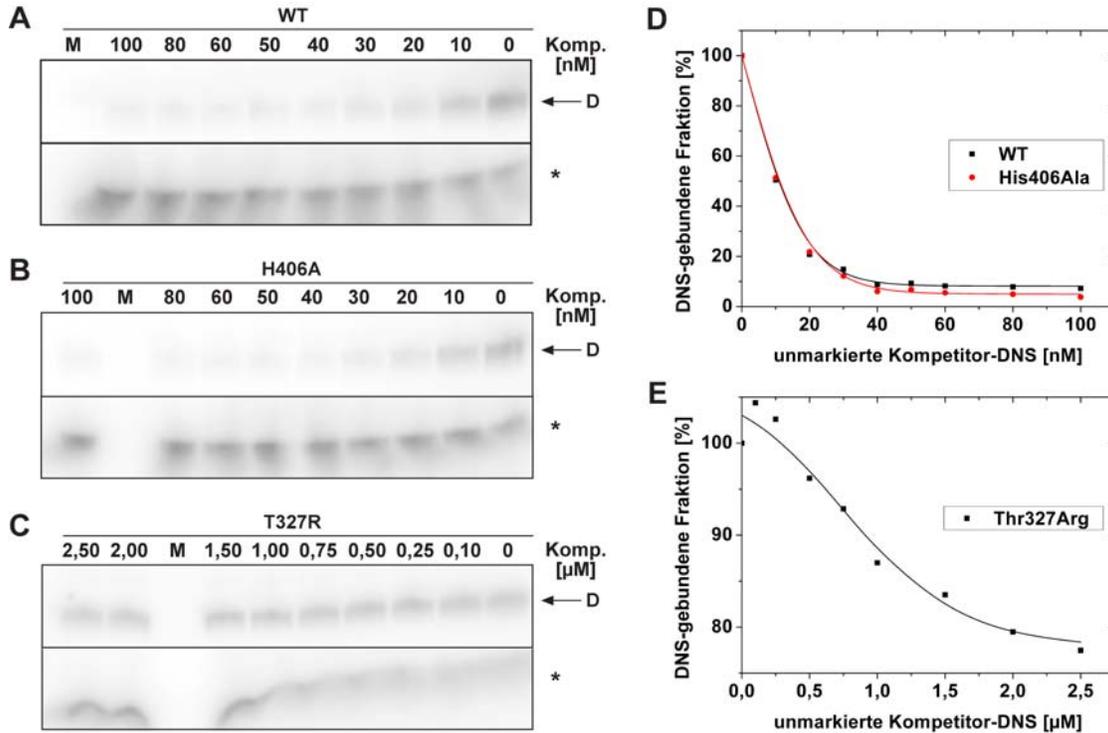


Abb. 3.7 Ermittlung der zur DNS-Bindung befähigten Fraktion des Phosphoproteins durch Competition der DNS-Bindung mit unmarkierter M67-Sonde. Die phosphorylierten STAT1tc-Wildtyp (**A**), -H406A (**B**) und -T327R (**C**) wurden bei der 100x apparenten K_d -Konzentration gegen eine konstante Konzentration an radioaktiv markierter und abnehmende Konzentrationen an unmarkierter M67-Sonde titriert. Das DNS-gebundene Dimer (D) und ungebundene Sonde (*) sind gekennzeichnet. Die DNS-bindungsfähige Fraktion des Phosphoproteins ergibt sich als doppelte Konzentration an unmarkierter M67-Kompetitorsonde (Komp.) bei halbmaximaler Bandenintensität und wurde durch nichtlineare Kurvenanpassung an eine Summe von Boltzmann-Funktionen in Abhängigkeit von der Konzentration an unmarkierter Kompetitor-Sonde für STAT1tc-WT und -H406A (**D**), sowie STAT1tc-T327R (**E**) ermittelt. Zur Normalisierung wurden die maximalen Bandenintensitäten auf 100% der DNS-gebundenen Fraktion gesetzt.

Die Konzentration an unmarkierter Kompetitor-DNS bei halber Bandenintensität entspricht der halben Konzentration des DNS-gebundenen Proteins, da bei dieser Konzentration das Protein zu genau 50% an die markierte und unmarkierte DNS gebunden ist. Mit der bekannten eingesetzten Proteinkonzentration ($100 \times K_d$) und einer halbmaximalen Bandenintensität bei einer Kompetitor-Konzentration von ca. 12 nM wurde der DNS-bindungsfähige Anteil des Wildtyp-Proteins mit ca. 48% und der der H406A-Mutante mit ca. 80% angenommen. Damit wurden unter Verwendung der apparenten K_d als absolute K_d -Werte 0,8 nM für den Wildtyp und 0,4 nM für die Mutante H406A erhalten. Die T327R-Mutante, die bereits durch eine deutlich höhere apparente K_d als Wildtyp und H406A-Mutante aufgefallen war, zeigte auch im Competitionsexperiment ein abweichendes Verhalten. Die Bindungsisotherme nähert sich im

Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Proteinen nicht einem Plateau bei ca. 10%, sondern bei ca. 75% DNS-gebundenem Protein an. Dies lässt den Schluss zu, dass für T327R nur ca. 25% des Proteins spezifisch und 75% des Proteins unspezifisch an die M67-Sonde gebunden war. Unter diesen Umständen konnte keine präzise Aussage über den Anteil an DNS-bindungsfähigem STAT1tc-T327R gemacht werden. Die absolute K_d konnte nur unter der Annahme, dass der Anteil des zur DNS-Bindung fähigen T327R-Proteins vergleichbar mit dem Wildtyp und der H406A-Mutante bei ca. 50-80% liegt, mit ca. 17,6-28,2 nM abgeschätzt werden. Dieser Unterschied in der DNS-Bindung zwischen Wildtyp und H406A auf der einen und T327R auf der anderen Seite wurde durch die Untersuchung der Bindungs-Halbwertszeiten an verschiedene weitere Zielgen-Sonden detaillierter analysiert (Abb. 3.8).

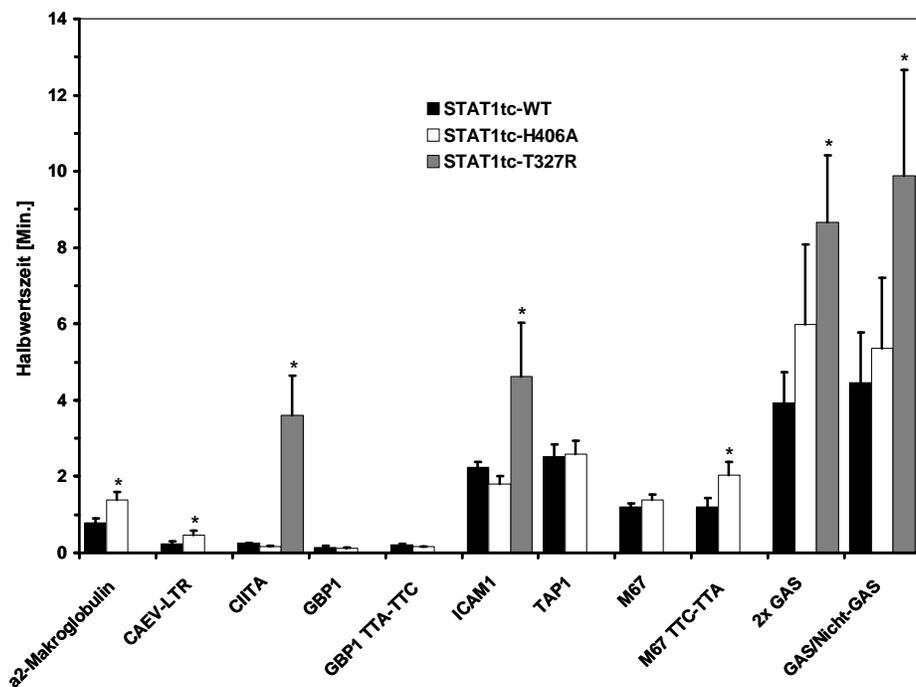


Abb. 3.8 Ermittlung der Halbwertszeiten der Interaktion von STAT1tc an verschiedene Zielgene durch EMSA-Experimente. Gezeigt sind die Halbwertszeiten der DNS-Bindung aus 3 unabhängigen Kompetitions-Experimenten. STAT1tc-WT, -H406A und -T327R wurden nach 15-minütiger Inkubation mit radioaktiv markierten Sonden für weitere 60 Min. (WT und H406A) bzw. für 30 Min. (T327R) mit der jeweiligen unmarkierter Kompetitor-DNS (ca. 3000x Überschuss gegenüber der radioaktiven DNS) inkubiert und zu spezifischen Zeitpunkten Proben auf das laufende TBE-PA-Gel geladen. Nach Quantifizierung der Bandenintensitäten und nichtlinearer Regression an exponentielle Zerfallsfunktionen wurden die Dissoziationsraten k_D erhalten, die in Halbwertszeiten umgerechnet wurden. Statistisch signifikante Abweichungen der Halbwertszeiten für H406A und T327R vom Wildtyp ($p < 0,05$ im T-Test) sind durch das Symbol (*) gekennzeichnet.

Die Dissoziationsraten k_D wurden durch nichtlineare Regression der Bandenintensitäten für einfache GAS-Stellen an einfache exponentielle Zerfallsfunktionen bzw. für Sonden mit

3 Ergebnisse

doppelten Bindestellen (2x GAS und GAS/Nicht-GAS) an zweifache exponentielle Zerfallsfunktionen (s. 2.2.3.16, Gl. 2) mit dem Computerprogramm Origin erhalten. Mit Gleichung 19 (s. 2.2.3.21) wurden anschliessend aus den Dissoziationsraten k_D die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ berechnet.

Die ermittelten Halbwertszeiten lieferten deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und H406A-Protein einerseits und im Vergleich mit der T327R-Mutante andererseits. Für alle untersuchten Sonden waren die Halbwertszeiten der T327R:DNS-Interaktion signifikant länger als beim Wildtyp und im Falle einfacher Bindestellen auch länger als bei der H406A-Mutante. Die Halbwertszeiten von T327R und H406A für Sonden mit doppelten Bindestellen (2x GAS und GAS/Nicht-GAS) unterschieden sich hingegen nicht signifikant voneinander. H406A wies für die Zielgene $\alpha 2$ -Makroglobulin, CAEV-LTR und die mutierte "M67 TTC-TTA"-Sonde signifikant längere Halbwertszeiten als der Wildtyp auf, während sich H406A und Wildtyp in der Bindung an Sonden mit sehr kurzem Halbwertszeiten nicht unterschieden.

Die genauere Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der STAT1tc-T327R:DNS-Interaktion (Abb. 3.9) zeigte ausserdem, dass die DNS-Bindung auch nach 30 Minuten Inkubation mit der unmarkierter DNS ein Plateau von 60% an DNS-gebundenem Protein nicht unterschritt.

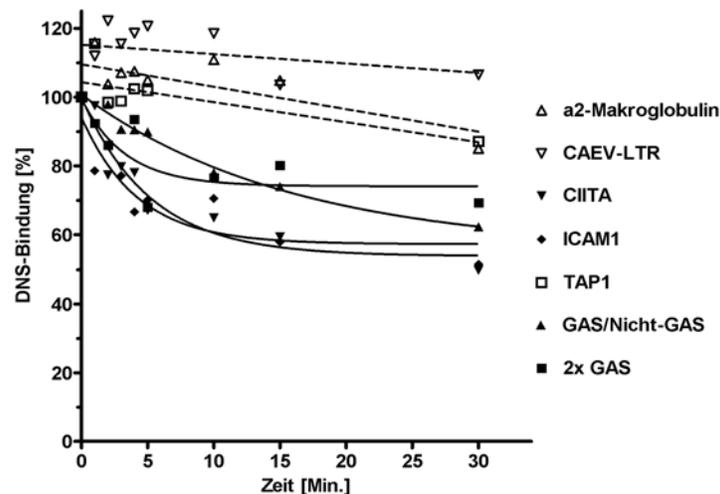


Abb. 3.9 Zeitlicher Verlauf der Konkurrenz der T327R:DNS-Interaktion. Phosphoryliertes T327R-Protein wurde, wie in Abb. 3.8 beschrieben, nach Präinkubation mit radioaktiven Zielgensonden für weitere 30 Min. mit einem 3000x molaren Überschuss an unmarkierten Sonden inkubiert und der zeitliche Verlauf der Abnahme der Interaktion mit DNS untersucht. Nichtlineare Regressionen an exponentielle Zerfallsfunktionen sind als durchgehende Kurven, lineare Regressionen als gestrichelte Linien dargestellt.

Dies verstärkte die Vermutung, dass T327R mit DNS wesentlich unspezifischer interagiert als der Wildtyp oder die H406A-Mutante. Für die $\alpha 2$ -Makroglobulin-, CAEV-LTR- und TAP1-Zielgene ergab sich keine nennenswerte Reduktion der DNS-Bindung im beobachteten Zeitraum,

und eine nichtlineare Regression an eine exponentielle Zerfallsfunktion war nicht möglich. Durch visuelle Inspektion der linearen Regression zeigte sich jedoch eindeutig, dass die Halbwertszeiten für die genannten Sonden den Beobachtungszeitraum von 30 Minuten um ein Vielfaches überschreiten müssen.

Zur weiteren Charakterisierung der unspezifischen Bindung von T327R an DNS wurde die Interaktion mit dem unspezifisch konkurrierenden Polymer dIdC untersucht (Abb. 3.10).

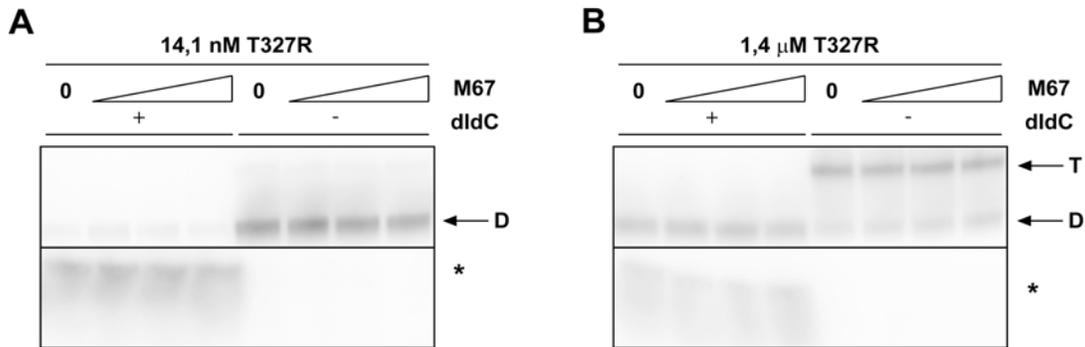


Abb. 3.10 Einfluss von dIdC auf die DNS-Bindung von T327R in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration. T327R wurde in einer Endkonzentration von (A) 14,4 nM ($1 \times K_d$) bzw. (B) 1,4 µM ($100 \times K_d$) mit radioaktiv markierter M67-Sonde (0,17 nM) mit (+) oder ohne (-) eine konstante Endkonzentration an dIdC (0,17 µg/µl) für 15 Min. bei RT inkubiert. Anschliessend wurden die Proben nach Zugabe zunehmender Konzentrationen an unmarkierter M67-Sonde (leerer Keil: 0,1, 0,3 und 0,6 µM) für weitere 15 Min. bei RT inkubiert. DNS-gebundenes Dimer (D) und Tetramer (T), sowie ungebundene Sonde (*) sind gekennzeichnet.

Zur Analyse der unspezifischen DNS-Bindung von T327R wurde das Protein gegen das unspezifisch konkurrierende Polymer dIdC und steigende Konzentrationen des unmarkierten spezifischen Kompetitors M67 titriert. Dabei zeigte sich in Abb. 3.10A deutlich, dass T327R bei einer Konzentration von 14,4 nM ($1 \times K_d$) in Anwesenheit von dIdC unabhängig von der Präsenz der unmarkierten M67-Sonde vollständig an dIdC gebunden war, wie anhand der ungebundenen Sonde ersichtlich ist. In Abwesenheit von dIdC wurde das DNS-gebundene T327R-Dimer mit steigender Konzentration des im Überschuss gegenüber der markierten Sonde vorhandenen unmarkierten M67-Kompetitors zunehmend von der markierten Sonde verdrängt. Bei höheren Proteinkonzentrationen (Abb. 3.10B) trat in Abwesenheit von dIdC zusätzlich zur DNS:Proteindimer-Bande DNS-gebundenes T327R-Tetramer hinzu. Das Tetramer wurde mit steigender Konzentration an unmarkierter M67-Sonde zugunsten einer zunehmenden Dimerbande von der DNS verdrängt. Auch bei dieser Proteinkonzentration zeigte sich deutlich der Einfluss des unspezifisch konkurrierenden dIdC auf die DNS-Bindung, welches das Auftreten von DNS-gebundenem Tetramer vollständig verhinderte. Offensichtlich wurde der Anteil des an die markierte Sonde gebundenen T327R soweit reduziert, dass die Konzentration an freiem

3 Ergebnisse

Protein nicht mehr ausreichte, um das Tetramer zu bilden. Offenbar ist im Falle der T327R-Mutante die Fähigkeit zur Bindung zweier möglicherweise sogar kooperierender Dimere auf der 24 Basenpaare langen M67-Sonde deutlich stärker ausgeprägt als beim Wildtyp.

Die Stabilität dieser unspezifischen DNS-Bindung wurde unter Verwendung steigender Ionenstärken überprüft (Abb. 3.11).

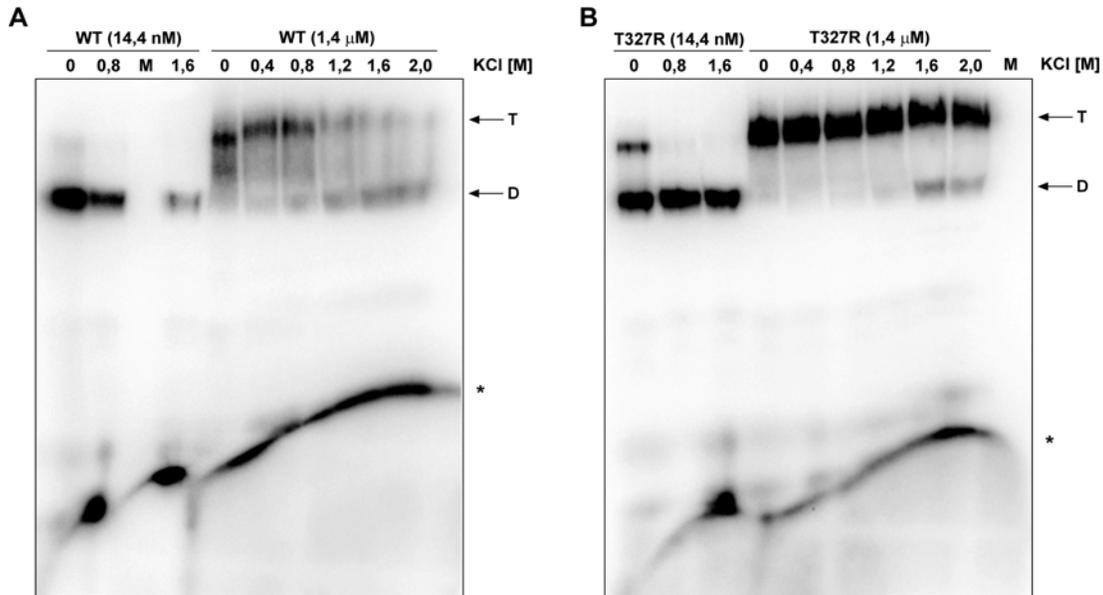


Abb. 3.11 Einfluss hoher Ionenstärken auf die Stabilität der DNS-Bindung von STAT1tc. Wildtyp (A) und T327R (B) wurden bei Endkonzentrationen von $1\times$ und $100\times$ K_d von T327R (entspr. 14,4 nM und 1,4 μ M) für 15 Min. mit M67-Sonde und anschliessend für 15 Min. mit steigenden Konzentrationen an Kaliumchlorid (KCl) bei RT inkubiert. DNS-gebundenes Dimer (D) und Tetramer (T), sowie ungebundene Sonde (*) sind gekennzeichnet.

Zum Vergleich der Stabilität der Interaktion von STAT1tc-WT und STAT1tc-T327R mit DNS wurden die Proteine mit M67-Sonde inkubiert und gegen steigende KCl-Konzentrationen titriert. Dabei wurden beim Wildtyp (Abb. 3.11A) wie bei T327R (Abb. 3.11B) bei Proteinkonzentrationen, die der $100\times$ K_d der T327R-Mutante entsprechen (1,4 μ M), Komplexe aus DNS-gebundenen STAT1tc-Tetrameren beobachtet, die bei T327R ebenfalls bei der $1\times$ K_d -Konzentration (14,4 nM) detektiert werden konnten. Beim Wildtyp traten diese Komplexe bei 14,4 nM (entspr. ca. $18\times$ K_d des Wildtyps) hingegen nicht auf. Ausserdem war die Bandenintensität des Tetramers beim Wildtyp trotz identischer Konzentration (1,4 μ M) weniger stark als bei der Mutante. Mit zunehmender KCl-Konzentration nahm beim Wildtyp bei der niedrigeren Proteinkonzentration die DNS:Dimer-Bande stark ab, während bei der T327R-Mutante lediglich die DNS:Tetramer-Interaktion zerstört wurde und die Dimer-Bandenintensität konstant blieb. Bei den höheren Proteinkonzentrationen wurde ein weiterer grosser Unterschied

zwischen Wildtyp und T327R deutlich. Das beim Wildtyp bei niedrigen KCl-Konzentrationen prominente DNS-gebundene Tetramer wurde bereits bei 1,2 M KCl fast vollständig zerstört. Weiterhin konnte hier eine Zunahme der Dimerbanden-Intensitäten beobachtet werden, die die der noch vorhandenen Tetramer-Banden übertrafen. Auch die Dimer-Banden wurden jedoch bei weiter steigenden Ionenstärken bei 2 M KCl zerstört. Die Mutante T327R hingegen zeigte auch bei hohen Ionenstärken von bis zu 1,2 M KCl nur DNS:Tetramer-Interaktionen, die mit weiter zunehmenden Ionenstärken bis zu 2 M KCl nur wenig geschwächt wurden. Bei 1,6 M KCl trat erstmalig eine schwache DNS:T327R-Dimerbande auf, deren Intensität bei 2 M KCl etwas reduziert wurde. Im Gegensatz zum Wildtyp war die DNS:T327R-Tetramerbande jedoch auch bei höheren Salzkonzentrationen immer wesentlich intensiver als die DNS:T327R-Dimerbande. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die längeren Halbwertszeiten der T327R-Mutante gegenüber den Wildtyp- und H406A-Proteinen ausschliesslich aus den starken unspezifischen Interaktionen von T327R mit den GAS-Sonden resultierten. Der Wildtyp und die H406A-Mutante hingegen zeigten deutlich weniger unspezifische Interaktionen mit ihren Zielgenen und wiesen im Vergleich untereinander relativ ähnliche Halbwertszeiten auf. Die dennoch z.T. signifikanten Abweichungen in den Halbwertszeiten von Wildtyp und H406A müssen sich daher aus unterschiedlichen Präferenzen der Zielensequenzen ergeben. Die Analyse der Unterschiede in den GAS-Stellen der Sonden erlaubte die Korrelation einzelner Nukleotidpositionen mit Halbwertszeiten und damit Zielgenspezifitäten von Wildtyp und H406A. Die Abweichungen zwischen verschiedenen Sonden an einzelnen Nukleotidpositionen und die Verwandtschaft der Sonden untereinander sind in Abb. 3.12 gezeigt.

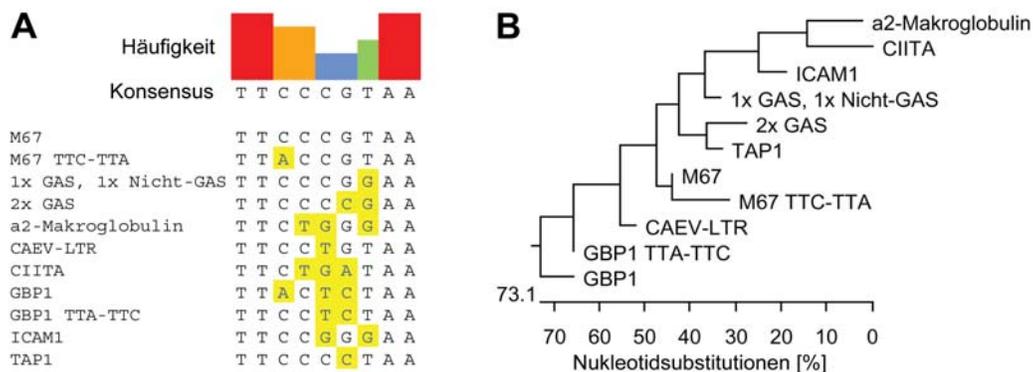


Abb. 3.12 Sequenzvergleich und Verwandtschaft der verwendeten EMSA-Sonden. (A) Vergleich der Konservierung von GAS-Stellen in den verwendeten Sonden. Die Abweichungen im Vergleich zur M67-Sonde (entspr. Konsensus) sind in gelb hervorgehoben. Die Häufigkeit der Nukleotide an den jeweiligen Positionen im Vergleich zur M67-Sonde ist in den Balken durch Höhe und Farbe kodiert: 100% (rot), > 80% (orange), > 50% (grün) und < 50% (blau). (B) Verwandtschaftsgrad der Sonden anhand der ausgetauschten Nukleotide (in %) relativ zur a2-Makroglobulin.

3 Ergebnisse

Die Korrelation der Sondensequenzen mit den ermittelten Halbwertszeiten der DNS-Bindung ist in Tabelle 3.1 aufgeschlüsselt und zeigt, dass bestimmte Kombinationen aus Nukleotiden und Positionen mit der Bindungsdauer von Wildtyp und Mutante zusammenhingen. Einerseits führten bestimmte Kombinationen sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante zu gleichen Halbwertszeiten, die jedoch signifikant von denen mit M67 (TTCCCGTAA) abwichen. Andererseits konnten auch Kombinationen ermittelt werden, die signifikant unterschiedliche Halbwertszeiten bei Wildtyp und Mutante bewirkten.

Tab. 3.1 Korrelation der Nukleotidsequenzen der Sonden mit den ermittelten Halbwertszeiten von STAT1c-Wildtyp und -H406A. Oberhalb des Teilstrichs ist das Auftreten der Nukleotide an den 9 verschiedenen Positionen innerhalb der GAS-Stellen in Prozent angegeben und unterhalb der Effekt der Nukleotide an den jeweiligen Positionen auf die Bindungsdauer. In gelb gekennzeichnete Nukleotide führten zu vergleichbar langen $t_{1/2}$ wie M67, in blau gekennzeichnete zu kürzeren und in rot gekennzeichnete zu längeren $t_{1/2}$ als bei M67. n.e.: nicht ermittelt.

Position/ Nukleotid	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
A	0	0	18	0	0	9	0	100	100
T	100	100	0	18	27	0	64	0	0
G	0	0	0	0	27	55	36	0	0
C	0	0	82	82	45	36	0	0	0
A	n.e.	n.e.	WT= <406	n.e.	n.e.	WT= 406	n.e.	n.e.	n.e.
T	n.e.	n.e.	n.e.	WT= <406	WT= <406	n.e.	kein	n.e.	n.e.
G	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	WT= <406	WT= <406	Einfluss	n.e.	n.e.
C	n.e.	n.e.	WT=406	WT=406	WT= 406	WT= <406	n.e.	n.e.	n.e.

Die Nukleotide an den Positionen -4, -3, +3 und +4 unterschieden sich bei den untersuchten Sonden nicht, und daher war kein Vergleich der Effekte dieser Positionen möglich. Hingegen konnten für die Positionen -2, -1, 0, 1 und 2 Regeln erkannt werden, die die Bindungsdauer von Wildtyp und der Mutante H406A beeinflussten. Das Nukleotid Cytidin an Position -2 war in 82% der untersuchten Sonden präsent und konnte deshalb nur mit dem Nukleotid Adenosin an dieser Position verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass die Halbwertszeit für den Wildtyp im Vergleich zur M67-Sonde unverändert geblieben ist, während H406A signifikant länger an die Sonden "M67 TTC-TTA" gebunden war. Das Cytidin an Position -1 konnte, da es ebenfalls zu 82% in den untersuchten Sonden präsent war, nur mit dem Nukleotid Thymidin verglichen werden. Dieses Thymidin bewirkte an dieser Position in der α 2-Makroglubulin-Sonde eine Reduktion von $t_{1/2}$ für den Wildtyp, während es auf die Bindung der Mutante im Vergleich zur M67-Sonde zwar keinen Einfluss hatte, jedoch zu einer signifikant längeren Halbwertszeit als beim Wildtyp führte. Die beiden variabelsten Positionen, 0 und +1, zeigten deutlich, dass sie einen kritischen Einfluss auf die Halbwertszeiten von Wildtyp und Mutante hatten. Der Wildtyp interagiert mit Thymidin und Guanosin an Position 0 wesentlich schlechter als mit M67. H406A

hingegen bevorzugte Guanosin und Cytidin gegenüber dem Thymidin an dieser Position. Thymidin führte demnach bei Wildtyp und H406A zu einer schlechteren und Cytidin zu einer vergleichbaren DNS-Bindung mit M67. Ein Cytidin an Position +1 bewirkte für Wildtyp und Mutante gleichermaßen eine relativ zu M67 verlängerte, ein Guanosin eine vergleichbare und ein Adenosin eine verschlechterte DNS-Bindung. Weiterhin stellte sich heraus, dass an Position +2 weder Thymidin noch Guanosin die Halbwertszeit der DNS-Bindung beeinflusste.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass die Mutante T327R verlängert an DNS gebunden war und die GAS-Stelle nicht gegenüber unspezifischen Bindestellen bevorzugte. Die H406A-Mutante hatte einerseits zwar eine mit dem Wildtyp vergleichbare K_d . Für spezifische Nukleotide an bestimmten Positionen innerhalb der GAS-Stelle wies sie jedoch signifikant höhere Halbwertszeiten auf als der WT, ohne vergleichbar unspezifisch wie T327R an DNS zu binden. Die längeren Halbwertszeiten der DNS-Bindemutanten korrelierten ausserdem mit der im Vergleich zum WT besseren und längeren nukleären Persistenz (s. Abb. 3.1).

Unklar ist zu diesem Zeitpunkt noch die Natur der DNS-gebundenen Protein-Tetramere auf einfachen GAS-Stellen, deren Auftreten vor allem bei T327R sehr ausgeprägt ist. Damit stellt sich die Frage, ob es sich dabei primär um Interaktionen zwischen Protein-Dimeren handelt, von denen nur eines an DNS gebunden ist, oder ob es sich um die gleichzeitige, aber unspezifische DNS-Bindung zweier Protein-Dimere an die eingesetzte M67-Sonde handelt. Zur Charakterisierung der STAT1-Selbstassoziation eignet sich die analytische Ultrazentrifugation (AUZ). Die Resultate werden in Abschnitt 3.2 dargestellt.

3.1.4 Stabile Expression der Mutanten in STAT1-defizienten U3A-Zellen

Zur weiteren Analyse der DNS-Bindung und transkriptionellen Aktivität *in vivo* wurden aus STAT1-defizienten U3A-Zellen durch Kotransfektion von STAT1-Expressionsplasmiden mit einem Puromycin-Resistenz verleihenden Hilfsplasmid Zelllinien generiert, die die STAT1-Mutanten T327R und H406A stabil exprimieren (Abb. 3.13). Die STAT1-defizienten U3A-Zellen sind aus den STAT1 exprimierenden 2fTGH-Zellen hervorgegangen und ermöglichen nach Rekonstitution mit STAT1-Mutanten die Untersuchung spezifischer Effekte ohne den Einfluss von endogenem STAT1. Nach Selektion mit Puromycin-haltigem Zellkulturmedium konnten durch Immunzytochemie U3A-Zellklone identifiziert werden, die in bis zu 60-80% aller Zellen stabil die Mutanten STAT1-H406A und -T327R exprimierten (Abb. 3.13A). Die Klone

wurden mit IFN γ stimuliert, um durch die Induktion einer Kernakkumulation der STAT1-Proteine eine Erhöhung der Signalstärke zu bewirken.

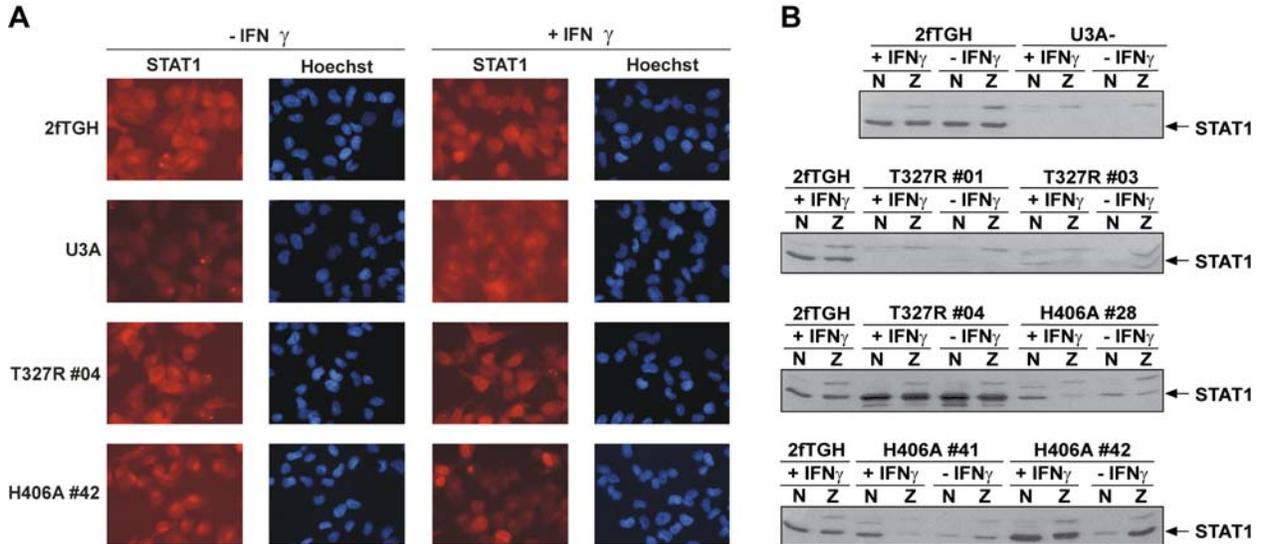


Abb. 3.13 Identifikation von STAT1-Mutanten stabil exprimierenden U3A-Zellen. (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von stabil transfizierten U3A-Zellen. Die Zellen wurden für 1h ohne oder mit IFN γ (200 ng/ml) behandelt, mit 4% (v/v) Formaldehyd fixiert und für 45 Min. mit anti-STAT1-AK (C-24, 1:10000) bei RT inkubiert. Zur Detektion wurde für 45 Min. bei RT mit rot fluoreszierenden, Cy3-konjugierten anti-Kaninchen-IgG (1:2000) inkubiert. Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. (B) Gleiche Mengen an nukleären (N) und zytosolischen (Z) Extrakten aus unbehandelten oder mit IFN γ stimulierten U3A- bzw. 2fTGH-Zellen wurden im 10%-igen SDS-PA-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und über Nacht bei 4 °C mit anti-STAT1-IgG (C-24, 1:2000) inkubiert. Die Membranen wurden für 45 Min. bei RT mit HRP-konjugierten anti-Kaninchen-IgG (1:2000) inkubiert und die STAT1-Proteine (Pfeile) mit einem Lumi-Imager F1 (Boehringer Mannheim) detektiert. Dabei dienten 2fTGH-Zellen als Positiv- und untransfizierte U3A-Zellen als Negativ-Kontrollen.

Von Klonen, die sich nach immunzytochemischer Analyse als potentiell positiv herausstellten, wurden vor und nach IFN γ -Stimulation zytosolische und nukleäre Extrakte erzeugt und die Expressionsrate und subzelluläre Lokalisation des STAT1-Proteins immunchemisch analysiert (Abb. 3.13B). Einige falsch-positive oder STAT1 nur schwach exprimierende Klone wie Nr. 1 und 3 für die T327R und die Klone 28 und 41 für die H406A-Mutante konnten so identifiziert werden. Die Klone T327R Nr. 4 und H406A Nr. 42 zeigten nicht nur in der Immunfluoreszenzaufnahme, sondern auch in der immunchemischen Detektion eine deutliche Expression der STAT1-Mutanten. Weiterhin bestätigte die immunchemische Analyse die schon in Abb. 3.1 gezeigte gleichverteilte bis kernbetonte Lokalisation der T327R- und H406A-Mutanten der GFP-Fusionsproteine bereits vor IFN γ -Stimulation.

Die Untersuchung der Effekte dieser Mutanten *in vivo* durch Chromatin-Immunpräzipitations- oder Reportgen-Experimente wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurden das weitere Augenmerk auf die Voraussetzung für die DNS-Bindung der STAT-Proteine

gerichtet. Es handelt sich dabei um die durch Tyrosin-Phosphorylierung induzierte Dimerisierung, die ebenso wie die Dimerisierung der unphosphorylierten STATs mithilfe analytischer Ultrazentrifugation analysiert werden kann.

3.2 Untersuchung der Selbstassoziation von STAT-Proteinen

3.2.1 Expression, Phosphorylierung und Reinigung von STAT-Proteinen

Durch analytische Ultrazentrifugation wurden die mit Hilfe der Strep-Markierung gereinigten isolierten N-Termini von STAT1, STAT3 und STAT4, sowie die phosphorylierten und unphosphorylierten STAT-Proteine 1 α , die Spleissvariante 1 β , und die experimentellen Deletionsmutanten 1 Δ N und 1tc auf ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung untersucht (Abb. 3.14A).

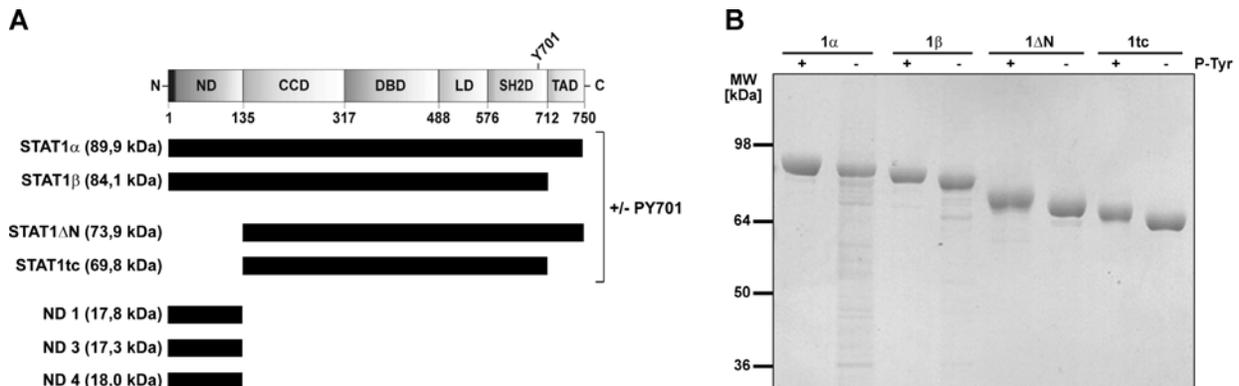


Abb. 3.14 Übersicht der durch AUZ untersuchten STAT-Strep-Fusionskonstrukte. (A) Die isolierten N-Domänen (ND) von humanem STAT1, STAT3 und STAT4, sowie die humanen STAT1-Deletionsvarianten 1 α , 1 β , 1 Δ N und 1tc wurden als Fusionsproteine mit der Strep-Aufreinigungsmarkierung in Sf9-Insekten- oder in BL21-Bakterienzellen exprimiert. (B) Die Reinheit der phosphorylierten und unphosphorylierten humanen STAT1-Varianten wurde im 10%-igen SDS-PA-Gel durch Färbung mit Coomassie analysiert.

Die gereinigten isolierten N-Termini (Daten nicht gezeigt) und die phosphorylierten und unphosphorylierten STAT1-Varianten wurden mit einer Reinheit von 90-95% erhalten (Abb. 3.14B). Der für STAT1 α bereits bekannte charakteristische Mobilitätsunterschied zwischen dem phosphorylierten und dem unphosphorylierten Protein (Shuai *et al.*, 1992) ist im SDS-PA-Gel für sämtliche STAT1-Varianten deutlich sichtbar.

3.2.2 Charakterisierung der STAT-Selbstassoziation

Alle 11 gereinigten STAT-Proteine wurden nach präparativer Grössenausschluss-Chromatographie zunächst durch Sedimentationsgeschwindigkeits (SV)-Experimente auf ihre

3 Ergebnisse

Reinheit, Dispersität und Stabilität überprüft. Die SV-Experimente wurden im Konzentrationsbereich von 0-80 μM in PBS bei 20 °C durchgeführt. Die STAT1-Deletions- und Volllänge-Varianten wurden bei Geschwindigkeiten von 40-50 krpm und die N-Termini bei 60 krpm unter Verwendung von Interferenz- und Absorptionsoptik bei geeigneten Wellenlängen in einer Optima XL-I analytischen Ultrazentrifuge (Beckman-Coulter) zentrifugiert. Die Datenauswertung erfolgte mit UltraScan (Demeler, 2005). Der Verlauf der Datenanalyse wird nachfolgend exemplarisch für phosphoryliertes STAT1 β demonstriert (Abb. 3.15).

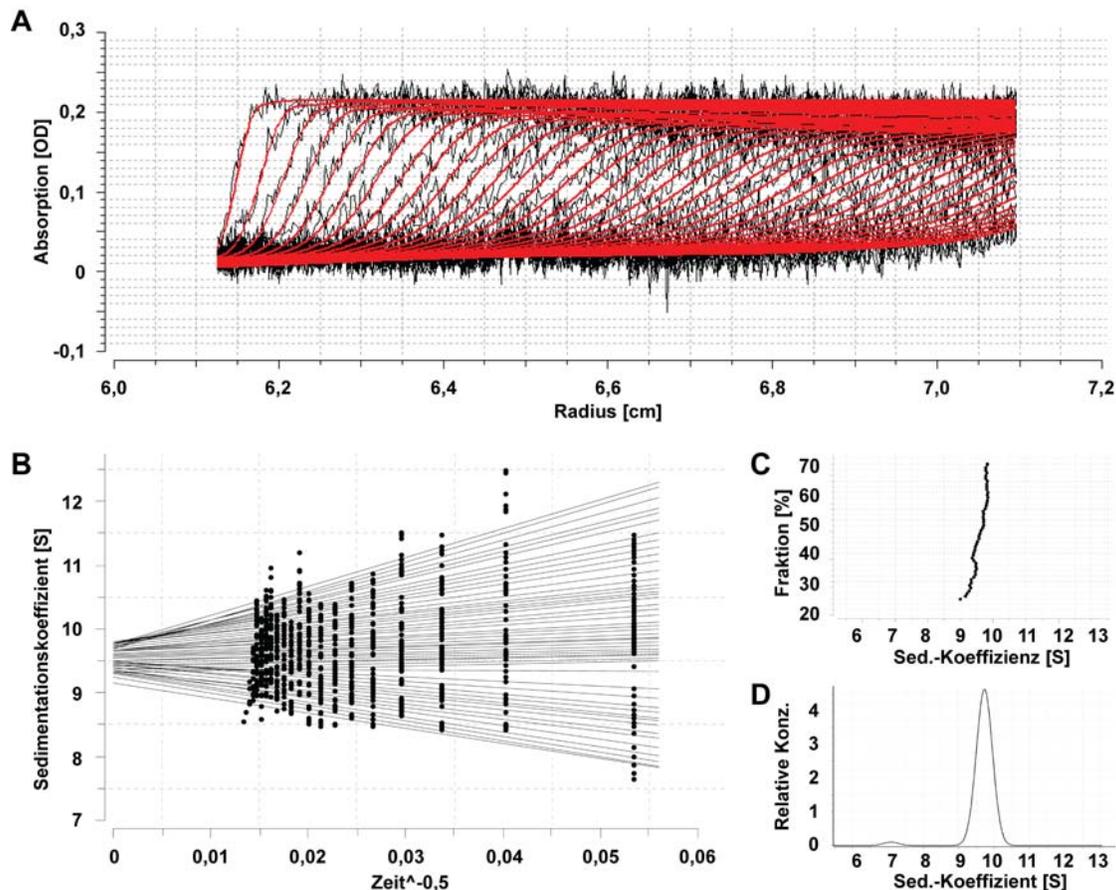


Abb. 3.15 Analyse des phosphorylierten STAT1 β durch Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente. (A) Die bei $\lambda=230$ nm aufgezeichneten Rohdaten (schwarz) bei einer Ladungskonzentration von ca. 5 μM wurden durch 2DSA von Zeit- und Positions-unabhängigem Rauschen befreit (rot). Die Analyse der korrigierten Daten mit dem van Holde-Weischet-Algorithmus (B) und die daraus resultierende g(s)-Verteilung (C) lieferte für das Protein einen Sedimentationskoeffizienten von ca. 9,5 S. Durch Analyse der c(s)-Verteilung (D) wurde ebenfalls ein für Wasser und 20°C korrigierter Sedimentationskoeffizient von ca. 9,5 S erhalten.

Aus den Rohdaten wurde durch 2-dimensionale Spektrumanalyse (2DSA) das systematische Zeit- und Positions-unabhängige Rauschen subtrahiert (Abb. 3.15A). Die nur noch stochastisches Rauschen enthaltenden Daten wurden durch einen weiterentwickelten van-Holde-Weischet (vHW)-Algorithmus (van Holde und Weischet, 1978; Demeler und van Holde, 2004) analysiert,

der durch Dekonvolution der Diffusion eine direkte Aussage über den homogenen und monodispersen Charakter des untersuchten Proteins erlaubt (Abb. 3.15B). Alle weiteren untersuchten STAT-Konstrukte (Daten nicht gezeigt) erwiesen sich ebenfalls in der aus der vHW-Analyse resultierenden $g(s)$ -Verteilung als sehr homogen und monodispers. Der überwiegende Teil des phosphorylierten STAT1 β sedimentierte in diesem Beispiel gemäss der $g(s)$ - (Abb. 3.15C) und $c(s)$ -Analyse (Abb. 3.15D) mit einem für Wasser und 20 °C korrigierten Sedimentationskoeffizienten s von 9,5 S.

Die mit abnehmender Proteinkonzentration einhergehende Abnahme der gemittelten Sedimentationskoeffizienten in der $c(s)$ -Verteilung erlaubte die Annahme einer reversiblen Selbstassoziation des Phosphoproteins. Die bei der geringsten eingesetzten Proteinkonzentration zu mehr als 90% monomodale $c(s)$ -Verteilung zeigt, dass die Assoziations-Dissoziationsreaktion im Sedimentationsverlauf nicht aufgelöst werden konnte. Daher muss es sich hier um eine schnelle Assoziations-Dissoziationsreaktion mit einer Dissoziationsrate von ca. 10^{-4} /Sek. handeln (Cann und Kegeles, 1974). Die durch Analyse der $c(s)$ -Verteilungen mehrerer Proteinkonzentrationen mit SedFit (Schuck, 2000) erhaltenen Massen-gemittelten s -Werte wurden integral normiert. Mit SedPhat (Schuck, 2003) erfolgte anschliessend die nichtlineare Regression der Daten an eine s vs. $c(s)$ -Isotherme (Daten nicht gezeigt). Der Wendepunkt der Isotherme repräsentierte die K_d ($\ll 1\mu\text{M}$) einer reversiblen Selbstassoziation und diente als Orientierung für die in den Sedimentationsgleichgewichts-Experimenten zur Ermittlung von thermodynamischen Parametern wie Molekulargewichte und Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_d) einzusetzenden Proteinkonzentrationen.

Die Sedimentationsgleichgewichts (SE)-Experimente wurden im Gegensatz zu den SV-Experimenten bei 4 °C mit Proteinlösungen durchgeführt, deren Proteinkonzentrationen bis zu zwei Grössenordnungen abdeckten. Die Daten wurden mit Absorptionsoptik bei 3 geeigneten Wellenlängen, die für jede Proteinkonzentration Absorptionswerte zwischen 0,1 und 0,9 lieferten, im radialen Schritt-Modus mit Schrittweiten von 0,001 cm als gemittelte Werte aus 15 Messwiederholungen aufgezeichnet. Die Bestimmung der Oligomerisierungszustände und K_d -Werte der verschiedenen STAT-Proteine erfolgte mit Ultrascan durch Analyse von Sedimentationsgleichgewichts-Profilen und wird exemplarisch an phosphoryliertem STAT1 β demonstriert. Die Resultate aus der globalen nichtlinearen Regression von 108 Datensätzen je Protein an verschiedene Interaktionsmodelle sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Diese

Datensätze setzten sich aus den SE-Profilen von 3 Zellen mit je 3 Proteinkonzentrationen, die jeweils bei 3 Wellenlängen und 4 Rotorgeschwindigkeiten vermessen wurden, zusammen.

Tabelle 3.2 Resultate der globalen Anpassung verschiedener Modelle für nichtinteragierende und interagierende Systeme an SE-Daten für phosphoryliertes STAT1 β . Angegeben sind die für verschiedene Modelle fixierten oder variierten MW, sowie K_d - und RMSD-Werte. n.a.: nicht anwendbar; ^[1] K_d der Monomer-Dimer-Komponente.

Modell	MW [kDa]	Modus	K_d [M]	RMSD [10^{-3} OD]
Fixierte MW-Verteilung	10-2000	500 Kanäle	n.a.	11,281
1 ideale Komponente	153,3	variabel	n.a.	13,040
	84,1	fixiert	n.a.	34,720
	168,3	fixiert	n.a.	14,233
2 ideale Komponenten, nicht-interagierend	122,5/204,6	variabel/variabel	n.a.	11,609
	84,1/183,7	fixiert/variabel	n.a.	11,719
	93,0/168,3	variabel/fixiert	n.a.	11,826
	84,1/168,3	fixiert/fixiert	n.a.	11,855
Monomer-Dimer	84	variabel	$3,73 \cdot 10^{-8}$	12,738
	84,1	fixiert	$3,83 \cdot 10^{-8}$	12,738
Monomer-Trimer	150,1	variabel	$3,18 \cdot 10^{-5}$	12,817
	84,1	fixiert	$5,08 \cdot 10^{-7}$	18,077
Monomer-Tetramer	151,8	variabel	$2,93 \cdot 10^{-5}$	12,942
	84,1	fixiert	$7,89 \cdot 10^{-7}$	25,601
Monomer-Dimer-Trimer	83,9	variabel	$4,05 \cdot 10^{-8}$ ^[1]	12,725
	84,1	fixiert	$3,85 \cdot 10^{-8}$ ^[1]	12,737
Monomer-Dimer-Tetramer	83,9	variabel	$3,90 \cdot 10^{-8}$ ^[1]	12,713
	84,1	fixiert	$4,09 \cdot 10^{-8}$ ^[1]	12,717
Monomer-Dimer-Hexamer	84	variabel	$3,75 \cdot 10^{-8}$ ^[1]	12,738
	84,1	fixiert	$3,82 \cdot 10^{-8}$ ^[1]	12,738

Die nicht-interagierenden Modelle mit 1 oder 2 idealen Komponenten und die Verteilung fixierter Molekulargewichte lieferten immer die bestmöglichen erreichbaren RMSD (*root mean square deviations*; Abweichungen der mittleren Fehlerquadrate)-Werte für verschiedene Interaktionsmodelle, da sie die höchste Anzahl an Freiheitsgraden enthielten. Die Modelle Monomer-Trimer- und Monomer-Tetramer-Gleichgewicht schieden für die realitätsgetreue Beschreibung der Protein-Interaktionen aus. Sie lieferten einerseits bei fixiertem MW schlechte RMSD-Werte und andererseits für variable MW zwar gute RMSD-Werte, jedoch bei zu hohen Molekulargewichten. Die Monomer-Dimer-basierten Modelle lieferten hingegen gute RMSD-Werte bei realitätsgetreuer Ermittlung der Monomer-Molekulargewichte und sehr ähnlichen K_d -Werten für die Gleichgewichte der Monomer-Dimer-Komponenten. Das zusätzliche Vorhandensein höherer Oligomerisierungsstufen im Monomer-Dimer-basierten Modell wie z. B. Trimer, Tetramer oder Hexamer war zunächst nicht auszuschliessen. Die Zunahme an

Freiheitsgraden zur Beschreibung dieser Systeme verbesserte jedoch nicht die RMSD-Werte. Ausserdem erwiesen sie sich nach Vergleich der Resultate aus 10.000 Monte Carlo (MC)-Iterationen für jedes Modell ebenfalls nicht als überlegen gegenüber dem einfachen Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Daher musste dem einfacheren Modell, das die experimentellen Daten statistisch genauso gut beschrieb, nämlich dem Monomer-Dimer-Modell, der Vorzug gegeben werden. Falls Tetramere an diesem Gleichgewicht beteiligt sein sollten, müssten diese einen extrem geringen Anteil daran haben, der daher nicht zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Die hervorragende Qualität der experimentellen Daten und deren Beschreibung durch das Monomer-Dimer-Modell zeigt sich in der geringen Abweichung zwischen experimentellen Daten und berechnetem Modell (Abb. 3.16A und 3.16B) und anhand der sehr scharfen 95%-Konfidenzintervalle für die Varianz (Abb. 3.16C), das Molekulargewicht (Abb. 3.16D) und den natürlichen Logarithmus der Assoziationskonstante (Abb. 3.16E) aus der MC-Analyse.

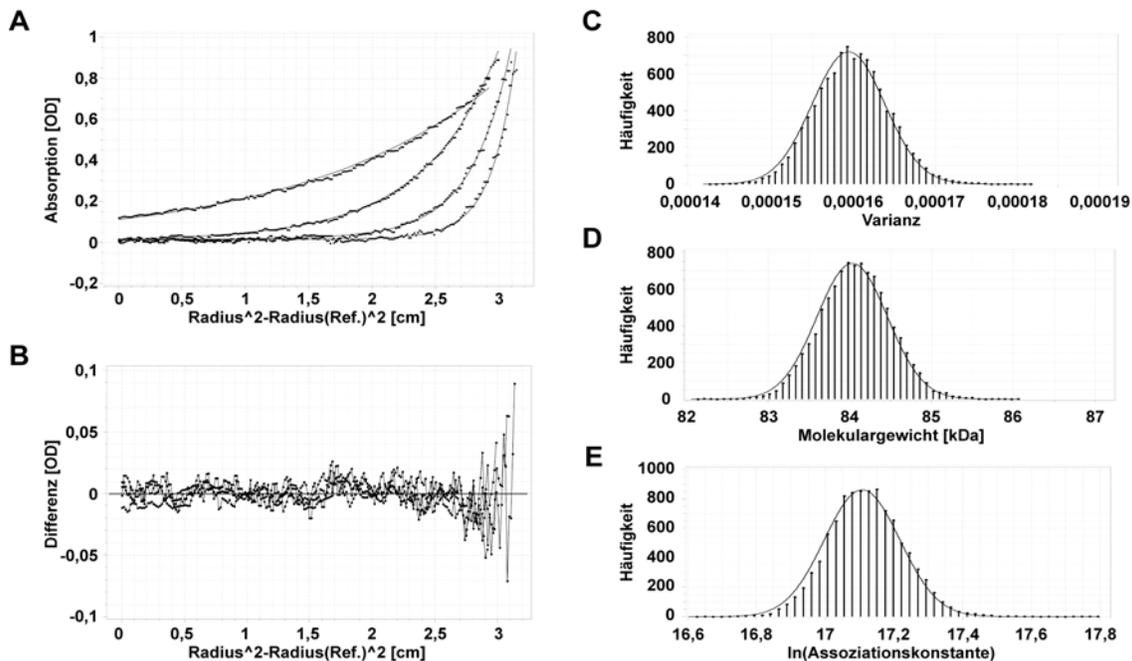


Abb. 3.16 Resultate der globalen nichtlinearen Anpassung der Sedimentationsgleichgewichts-Daten für phosphoryliertes STAT1 β an ein Monomer-Dimer-Modell. (A) zeigt zur besseren Übersicht exemplarisch nur vier der insgesamt 108 Gleichgewichtsprofile (Punkte) und das Resultat der nichtlinearen Regression (Kurven) einer spezifischen Proteinkonzentration bei $\lambda=230$ nm und den vier Rotorgeschwindigkeiten 8, 13, 18 und 23 krpm an ein Monomer-Dimer-Modell. Die Abweichungen zwischen Modell und Daten sind in (B) gezeigt. Die Resultate von 10.000 Monte Carlo-Iterationen für dieses Modell sind in (C) für die Varianz, in (D) für das Monomer-Molekulargewicht und in (E) für den natürlichen Logarithmus der Assoziationskonstante dargestellt.

Alle anderen STAT-Proteine wurden analog ausgewertet und lieferten als am besten zur Beschreibung der experimentellen Daten geeignetes Modell ebenfalls ein Monomer-Dimer-Interaktionssystem (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Zusammenfassung der Resultate der globalen nichtlinearen Anpassung verschiedener Interaktionsmodelle an experimentelle Sedimentations-Gleichgewichtsdaten für sämtliche untersuchten Proteine. Angegeben sind die nach Monte Carlo Analyse erhaltenen besten Modelle, die durch Fixierung oder Variation des Monomer-Molekulargewichts (MW) erhaltenen Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d und RMSD-Werte für STAT-N-Domänen (N), sowie für unphosphorylierte (U) und phosphorylierte (P) STAT1-Varianten. ^[1] K_d der Monomer-Dimer-Komponente; ^[2] K_d der Dimer-Tetramer-Komponente.

Protein	Modell	Monte Carlo 95% Konfidenzbereich		
		MW [kDa]	K_d [M]	RMSD [10^{-3} OD]
STAT1-N	Monomer-Dimer	15,5 (+ 1,9 / - 1,9)	5,4 (+ 1,5 / - 1,1) · 10 ⁻⁶	5,033 (+ 0,203 / - 0,211)
		17,8 (fixiert)	23,3 (+ 0,7 / - 0,6) · 10 ⁻⁶	5,156 (+ 0,800 / - 0,227)
STAT3-N	Monomer-Dimer	17,0 (+ 2,1 / - 2,1)	2,9 (+ 1,6 / - 0,3) · 10 ⁻³	6,067 (+ 0,226 / - 0,234)
		17,3 (fixiert)	3,7 (+ 0,7 / - 0,6) · 10 ⁻³	6,015 (+ 0,223 / - 0,231)
STAT4-N	Monomer-Dimer	18,9 (+ 0,2 / - 0,2)	4,5 (+ 0,4 / - 0,4) · 10 ⁻⁶	7,618 (+ 0,188 / - 0,193)
		18,0 (fixiert)	2,7 (+ 0,1 / - 0,1) · 10 ⁻⁶	7,701 (+ 0,193 / - 0,199)
U-STAT1 α	Monomer-Dimer	92,2 (+ 1,1 / - 1,1)	68,5 (+ 12,2 / - 10,3) · 10 ⁻⁹	8,562 (+ 0,324 / - 0,336)
		89,9 (fixiert)	45,2 (+ 3,4 / - 3,1) · 10 ⁻⁹	8,589 (+ 0,317 / - 0,328)
U-STAT1 β	Monomer-Dimer	83,4 (+ 4,5 / - 3,3)	46,7 (+ 26,5 / - 17,2) · 10 ⁻⁹	5,663 (+ 0,258 / - 0,271)
		84,1 (fixiert)	52,1 (+ 4,4 / - 4,5) · 10 ⁻⁹	5,662 (+ 0,256 / - 0,268)
U-STAT1 Δ N	Monomer-Dimer	72,5 (+ 3,5 / - 4,1)	2,4 (+ 1,6 / - 0,9) · 10 ⁻⁶	8,228 (+ 0,735 / - 0,808)
		73,9 (fixiert)	2,9 (+ 0,3 / - 0,2) · 10 ⁻⁶	8,455 (+ 0,378 / - 0,396)
U-STAT1tc	Monomer-Dimer	67,5 (+ 4,1 / - 3,1)	3,4 (+ 2,0 / - 1,3) · 10 ⁻⁶	7,709 (+ 0,325 / - 0,340)
		69,8 (fixiert)	4,5 (+ 0,3 / - 0,3) · 10 ⁻⁶	7,716 (+ 0,322 / - 0,336)
P-STAT1 α	Monomer-Dimer-Tetramer	89,7 (+ 1,2 / - 1,3)	29,2 (+ 9,0 / - 6,9) · 10 ⁻⁹ ^[1]	8,444 (+ 0,313 / - 0,326)
		89,9 (fixiert)	31,2 (+ 12,4 / - 8,9) · 10 ⁻⁹ ^[1]	8,466 (+ 0,329 / - 0,341)
P-STAT1 α	Dimer-Tetramer	190,5 (+ 3,6 / - 3,6)	136,9 (+ 28,2 / - 23,5) · 10 ⁻⁹ ^[2]	8,644 (+ 0,296 / - 0,308)
		179,8 (fixiert)	75,7 (+ 4,6 / - 4,3) · 10 ⁻⁹ ^[2]	8,721 (+ 0,287 / - 0,296)
P-STAT1 β	Monomer-Dimer	84,0 (+ 0,1 / - 0,1)	37,1 (+ 9,1 / - 7,3) · 10 ⁻⁹	12,620 (+ 0,340 / - 0,350)
		84,1 (fixiert)	38,2 (+ 4,5 / - 4,0) · 10 ⁻⁹	12,620 (+ 0,340 / - 0,350)
P-STAT1 Δ N	Monomer-Dimer	77,6 (+ 4,4 / - 3,0)	98,8 (+ 77,7 / - 43,5) · 10 ⁻⁹	9,605 (+ 0,559 / - 0,594)
		73,9 (fixiert)	48,1 (+ 6,7 / - 5,9) · 10 ⁻⁹	9,636 (+ 0,547 / - 0,580)
P-STAT1tc	Monomer-Dimer	74,2 (+ 5,8 / - 4,4)	47,6 (+ 59,5 / - 26,2) · 10 ⁻⁹	9,181 (+ 0,361 / - 0,376)
		69,8 (fixiert)	19,0 (+ 5,1 / - 4,1) · 10 ⁻⁹	9,276 (+ 0,352 / - 0,366)

Unerwarteterweise wurde beim phosphorylierten STAT1 α zusätzlich ein hoher Tetramer-Anteil erhalten, der bei keiner anderen STAT1-Variante mit statistischer Signifikanz auftrat. Zur Überprüfung dieses abweichenden Verhaltens wurden neben den einfachen Oligomerisierungs-Modellen zusätzliche Modelle untersucht. Insbesondere wurden Modelle mit bis zu drei idealen, nicht-interagierenden Spezies mit einbezogen, um eventuell vorhandene höhere Oligomerisierungsstufen in Monomer-Dimer-basierten Systemen identifizieren zu können. Weiterhin wurden auch irreversible Assoziations-Modelle betrachtet, um zu überprüfen, ob STAT1 α möglicherweise irreversible Aggregate bildet. Ausserdem wurden bei der Analyse des phosphorylierten STAT1 α auch Modelle berücksichtigt, bei denen nicht das Monomer, sondern das Dimer die niedrigste detektierbare Oligomerisierungsstufe darstellt. Die Analyse dieses besonderen Verhaltens wird nachfolgend detailliert beschrieben und ist in Tab. 3.4 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

Tab. 3.4 Zusammenfassung der Resultate der nichtlinearen Anpassung verschiedener Interaktionsmodelle an experimentelle Sedimentations-Gleichgewichtsdaten für phosphoryliertes STAT1 α . Angegeben sind die für verschiedene Modelle durch Fixierung oder variable Ermittlung des Monomer-Molekulargewichts (MW) erhaltenen Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d für das im Modell zuerst genannte Interaktionssystem und RMSD-Werte. n.i.: nicht-interagierend; irrev.: irreversibel.

Modell	MW [kDa]	Modus	K_d [M]	RMSD [10^3 OD]
Fixierte MW-Verteilung	10-500	100 Kanäle	n.a.	11,281
	10-500	500 Kanäle	n.a.	7,222
	10-1000	100 Kanäle	n.a.	7,222
	10-1000	500 Kanäle	n.a.	7,589
1 ideale Komponente	301,3	variabel	n.a.	11,110
"Dimer"	179,8	fixiert	n.a.	27,950
"Trimer"	269,7	fixiert	n.a.	12,850
"Tetramer"	359,6	fixiert	n.a.	14,720
2 ideale Komponenten, n.i.	130,3 / 362,6	variabel/variabel	n.a.	7,836
"Dimer-X-mer", n.i.	179,8 / 381,8	fixiert/variabel	n.a.	7,966
"Trimer-X-mer", n.i.	269,7 / 422,9	fixiert/variabel	n.a.	8,829
"X-mer-Tetramer", n.i.	123,8 / 359,6	variabel/fixiert	n.a.	7,826
"Monomer-Dimer", n.i.	89,9 / 179,8	fixiert/fixiert	n.a.	67,440
"Monomer-Trimer", n.i.	89,9 / 269,7	fixiert/fixiert	n.a.	36,520
"Monomer-Tetramer", n.i.	89,9 / 359,6	fixiert/fixiert	n.a.	36,840
"Dimer-Trimer", n.i.	179,8 / 269,7	fixiert/fixiert	n.a.	16,020
"Dimer-Tetramer", n.i.	179,8 / 359,6	fixiert/fixiert	n.a.	31,840
"Trimer-Tetramer", n.i.	269,7 / 359,6	fixiert/fixiert	n.a.	12,850
3 ideale Komponenten, n.i.	180,6 / 288,2 / 345,9	variabel/variabel/variabel	n.a.	11,530
"Monomer-Dimer-X-mer", n.i.	89,9 / 179,8 / 311,9	fixiert/fixiert/variabel	n.a.	8,502
"Dimer-Trimer-X-mer", n.i.	179,8 / 269,7 / 360,8	fixiert/fixiert/variabel	n.a.	7,507
"Monomer-Dimer-Trimer", n.i.	89,9 / 179,8 / 269,7	fixiert/fixiert/fixiert	n.a.	12,460
"Monomer-Dimer-Tetramer", n.i.	89,9 / 179,8 / 359,6	fixiert/fixiert/fixiert	n.a.	12,130
"Monomer-Trimer-Tetramer", n.i.	89,9 / 269,7 / 359,6	fixiert/fixiert/fixiert	n.a.	11,380
"Dimer-Trimer-Tetramer", n.i.	179,8 / 269,7 / 359,6	fixiert/fixiert/fixiert	n.a.	12,010
Monomer-Dimer	190,4	variabel	$1,36 \cdot 10^{-7}$	8,780
	89,9	fixiert	$9,58 \cdot 10^{-19}$	27,950
Dimer-Tetramer	179,8	fixiert	$7,58 \cdot 10^{-8}$	8,854
Monomer-Trimer	278,3	variabel	$8,00 \cdot 10^{-6}$	10,130
	89,9	fixiert	$1,39 \cdot 10^{-9}$	12,520
Dimer-Hexamer	179,8	fixiert	$3,95 \cdot 10^{-7}$	13,260
Monomer-Tetramer	288,6	variabel	$1,64 \cdot 10^{-3}$	11,340
	89,9	fixiert	$8,32 \cdot 10^{-7}$	18,550
Dimer-Oktamer	179,8	fixiert	$6,78 \cdot 10^{-8}$	13,430
Monomer-Dimer-Trimer	120,1	variabel	$2,45 \cdot 10^{-7}$	8,594
	89,9	fixiert	$7,39 \cdot 10^{-8}$	12,540
Dimer-Tetramer-Hexamer	179,8	fixiert	$9,56 \cdot 10^{-8}$	8,759
Monomer-Dimer-Tetramer	89,6	variabel	$3,13 \cdot 10^{-8}$	8,580
	89,9	fixiert	$2,92 \cdot 10^{-8}$	8,580
Dimer-Tetramer-Oktamer	179,8	fixiert	$8,50 \cdot 10^{-8}$	8,789
Monomer-Dimer-Hexamer	190,4	variabel	$2,73 \cdot 10^{-7}$	8,780
	89,9	fixiert	$2,30 \cdot 10^{-20}$	28,000
Dimer-Tetramer-Dodekamer	179,8	fixiert	$7,93 \cdot 10^{-8}$	8,825
Monomer-Trimer-Tetramer	278,2	variabel	$8,00 \cdot 10^{-6}$	10,130
	89,9	fixiert	$1,52 \cdot 10^{-10}$	8,961
Dimer-Hexamer-Oktamer	179,8	fixiert	$2,82 \cdot 10^{-4}$	13,260
Monomer-Dimer irrev.	187,7	variabel	n.a.	8,009
Monomer-Dimer irrev.	89,9	fixiert	n.a.	69,970
Monomer-Tetramer irrev.	89,9	fixiert	n.a.	13,084
Dimer-Tetramer irrev.	179,8	fixiert	n.a.	8,004

Die visuelle Inspektion der FMV (Abb. 3.17A) zeigte bereits eine kontinuierliche Verteilung mit durchgehenden Molekulargewichten zwischen 100 und 500 kDa. Der Hauptteil des untersuchten

Proteins hatte mittlere Molekulargewichte zwischen 250 und 350 kDa, dies entsprach den Oligomerisierungsstufen Dimer bis Tetramer. Molekulargewichte, die für ein Monomer zu erwarten wären, waren hingegen im Vergleich zu allen anderen untersuchten STAT-Proteinen deutlich unterrepräsentiert.

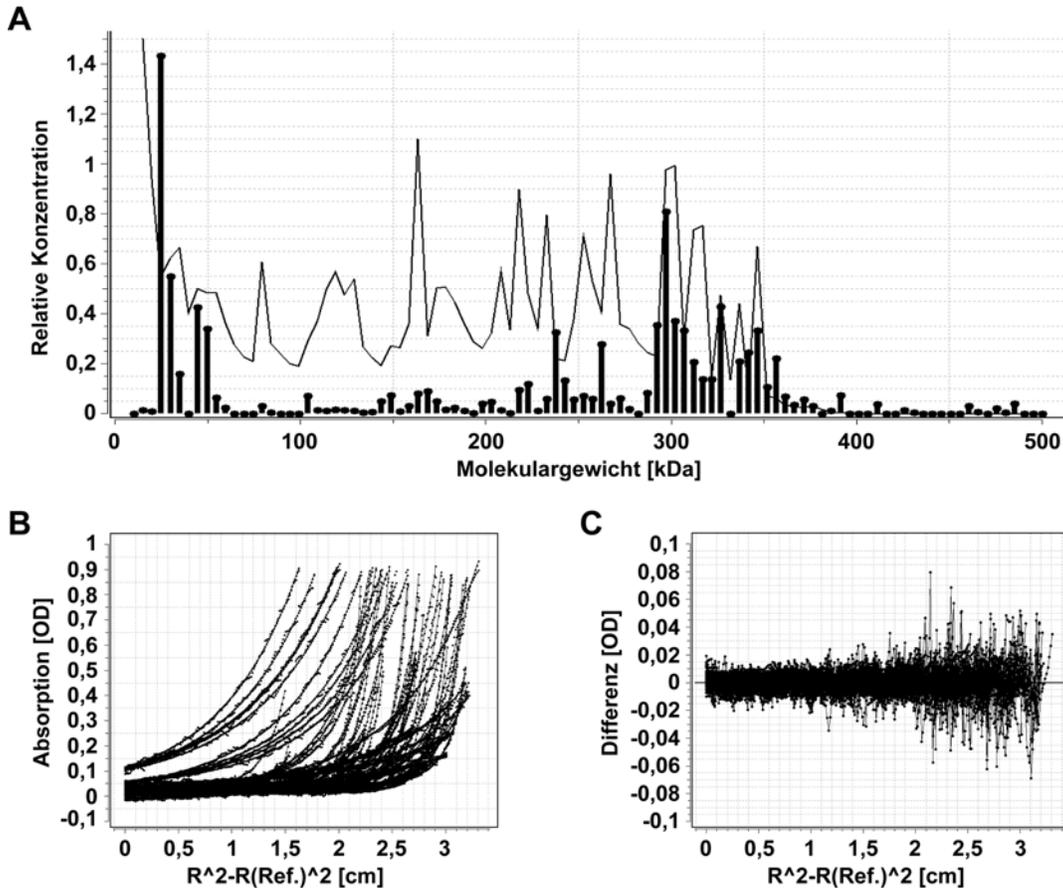


Abb. 3.17 Resultate der globalen nichtlinearen Anpassung der Sedimentationsgleichgewichts-Daten für phosphoryliertes STAT1 α an ein Monomer-Dimer-Tetramer-Modell. (A) Die fixierte Molekulargewichtsverteilung zeigt die kontinuierliche Verteilung der erhaltenen mittleren Molekulargewichte im Bereich zwischen 0 und 500 kDa und demonstriert einen sehr hohen Anteil an Spezies mit einem mittleren Molekulargewicht von 250-350 kDa. (B) Gezeigt sind 108 Gleichgewichtsprofile (Punkte) und das Resultat der globalen nichtlinearen Regression (Kurven) an ein Monomer-Dimer-Tetramer-Modell. Die Abweichungen zwischen Modell und Daten sind in (C) gezeigt.

Das Modell für eine ideale Komponente bestätigte die Anwesenheit von Oligomeren mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 300 kDa und deutete ebenfalls einen grossen Anteil an Tetramer an. Jedoch mussten zusätzliche Spezies mit geringerem Molekulargewicht vorhanden gewesen sein, da für eine Proteinlösung mit reinem Tetramer ein mittleres Molekulargewicht von ca. 360 kDa erwartet worden wäre. Zwei ideale, nicht interagierende Komponenten verbesserten die Beschreibung des Systems und legten ebenfalls die Existenz eines Dimer-Tetramer-Systems nahe. Auch beim Modell mit drei idealen, nicht interagierenden Komponenten wurden gute

Beschreibungen für Systeme mit höheren Oligomerisierungsstufen als dem Monomer erhalten. Diese vier Modelle wiesen jedoch zu viele Freiheitsgrade auf, um mit Modellen konkurrieren zu können, die Interaktionen zulassen. Ein Monomer-Dimer-System mit der variablen Ermittlung des Molekulargewichts der niedrigsten Spezies von 180-190 kDa legte wiederum die Existenz eines "Pseudo-Monomer-Dimer"-Systems mit Dimeren als monomerer Einheit nahe. Ein reines Monomer-Dimer-System konnte definitiv ausgeschlossen werden (RMDS=27,95). Monomer-Trimer- und Monomer-Tetramer-, sowie deren pseudo-analoge Dimer-Hexamer- und Dimer-Oktamer-Gleichgewichte schieden ebenfalls aus. Hingegen beschrieben Modelle mit drei interagierenden Spezies, die die Existenz einer Monomer-Dimer- bzw. Dimer-Tetramer-Komponente erlaubten, neben dem reinen Dimer-Tetramer-System die experimentellen Daten am besten. Bei fixiertem Molekulargewicht für die niedrigste Oligomerisierungsstufe wurden realistische Werte zur Beschreibung des Interaktionssystems erhalten und machten ein Monomer-basiertes System genauso wahrscheinlich wie ein Dimer-basiertes, jeweils mit dem Tetramer als höchster Oligomerisierungsstufe. Trimer-beinhaltende Modelle schieden auch hier zur Beschreibung des Systems aus, weil die erhaltenen K_d -Werte nicht durch den Konzentrationsbereich an Protein im Experiment abgedeckt und daher unrealistisch waren und ausserdem zu hohe Monomer-Molekulargewichte lieferten. Irreversible Modelle schieden ebenfalls aus, weil einerseits die erhöhte Anzahl der Freiheitsgrade nicht den nur leichten Anstieg der RMSD-Werte rechtfertigte und andererseits als wesentlich gewichtiger Grund die visuelle Inspektion der FMV (Abb. 3.17A) und der Gleichgewichtsprofile (Abb. 3.17B) keine Anzeichen für Konzentrations-unabhängige Oligomerisierungszustände lieferte.

Als beste Modelle zur Beschreibung der Selbstassoziation von phosphoryliertem STAT1 α kamen demnach nur diejenigen in Betracht, die die Anwesenheit zumindest einer Dimer-Tetramer-Komponente beinhalteten, nämlich ein reines Dimer-Tetramer-, sowie ein Monomer-Dimer-Tetramer-Gleichgewicht mit minimalem Anteil an Monomer. Die Monte Carlo-Analysen beider Systeme lieferte letztendlich in Übereinstimmung mit der FMV den Ausschlag zu Gunsten eines Monomer-Dimer-Tetramer-Gleichgewichts. Dieses produzierte bereits vor der Monte Carlo-Analyse selbst bei unfixiertem Monomer-Molekulargewicht exakt das für STAT1 α erwartete MW und ausserdem den signifikant besten RMSD-Wert. Darüber hinaus ist der ermittelte K_d -Wert von ca. 30 nM realistisch, da er durch den im Experiment eingesetzten Konzentrationsbereich abgedeckt war und im Bereich der K_d -Konzentration von jeder Spezies

mindestens 10% im Experiment vorhanden waren. Die Abweichungen zwischen experimentellen Daten und dem berechneten Monomer-Dimer-Tetramer-Modell sind in Abb. 3.17B dargestellt. Die Daten zeichneten sich durch rein stochastisches Rauschen aus, das trotz der im Experiment verwendeten niedrigen Konzentrationen und Wellenlängen ausserordentlich gering war.

Die für Tabelle 3.3 verwendeten Modelle zur Beschreibung der Interaktionssysteme wurden zur Erstellung von Assoziationsprofilen (Abb. 3.18) verwendet, die eine übersichtliche Darstellungsform zum visuellen Vergleich von Assoziationseigenschaften der STAT-Proteine bieten. Die Wendepunkte der Assoziationsprofile repräsentieren dabei als halbmaximale Dimer-Anteile die K_d -Werte für ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht.

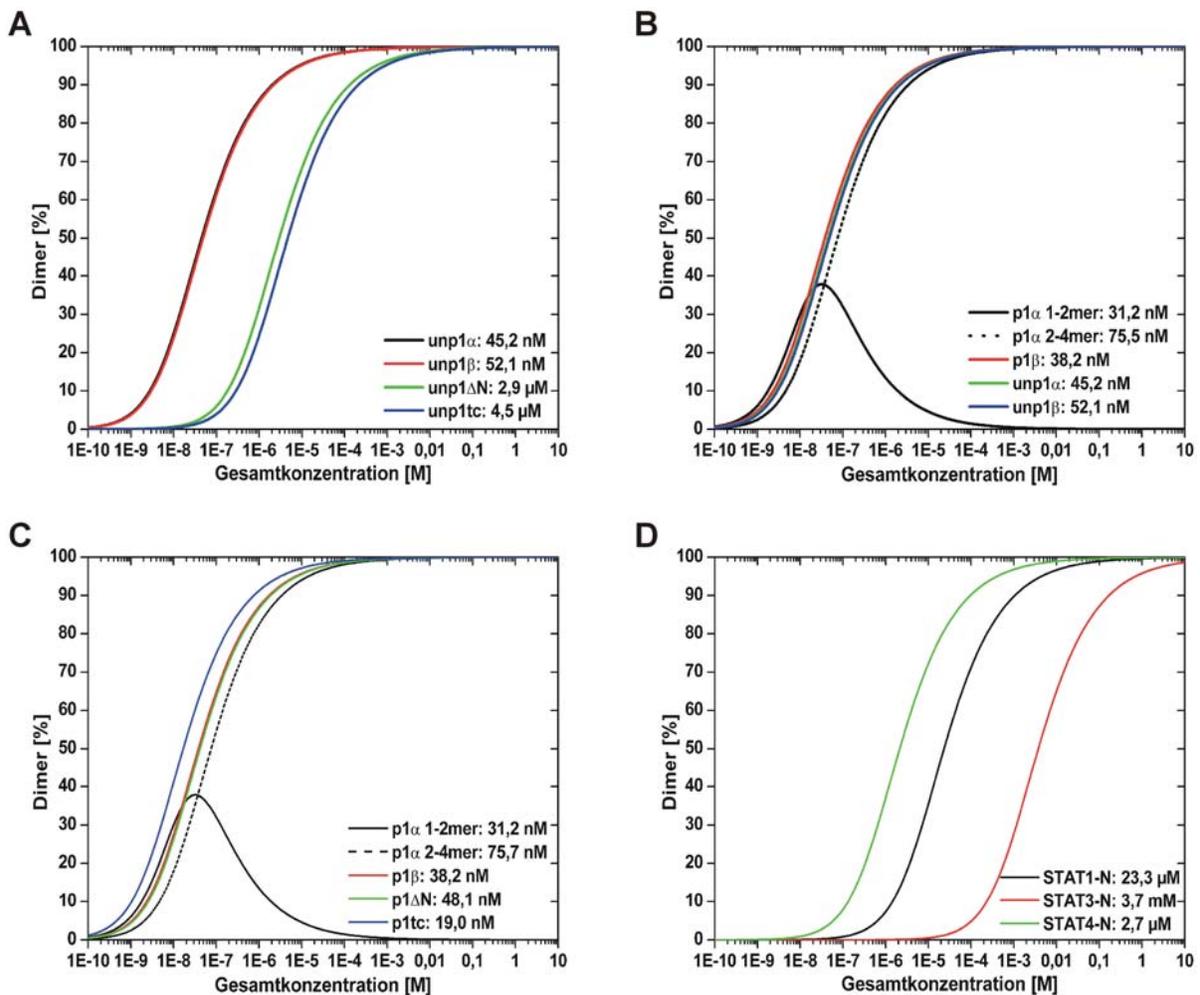


Abb. 3.18 Assoziationsprofile der Oligomerisierung von STAT-Proteinen. Die Überlagerung von Assoziationsprofilen, die aus den Interaktionsmodellen generiert wurden, demonstriert den Einfluss der N-Domäne (A), den Einfluss des Phosphorylierungsstatus' (B) und den Einfluss von N- und C-terminaler Domäne bei phosphoryliertem STAT1 (C) auf die Oligomerisierung. Die gestrichelte Linie in (B) und (C) kennzeichnet das Assoziationsprofil der Dimer-Tetramer-Komponente im Monomer-Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von phosphoryliertem STAT1 α . Der Vergleich der Assoziationsprofile der isolierten N-Termini von STAT1, -3 und -4 ist in (D) dargestellt.

Einfluss der Phosphorylierung auf die STAT1-Selbstassoziation

Der Vergleich der unphosphorylierten STAT1-Varianten (Abb. 3.18A) zeigte deutlich zwei Paare von nahe beieinanderliegenden Assoziationsprofilen für STAT1 α und -1 β mit K_d -Werten von ca. 50 nM einerseits und den Deletionsmutanten STAT1 Δ N und -1tc mit K_d -Werten ca. 3 μ M andererseits. Daraus konnte eindeutig auf eine Notwendigkeit der Präsenz der N-Domäne für eine sehr starke Assoziation des unphosphorylierten STAT1 mit K_d -Werten von ca. 50 nM geschlossen werden. Die unphosphorylierten Deletionsmutanten waren zwar auch in der Lage, Dimere zu formen, jedoch waren die Interaktionen zwischen ihnen mit K_d -Werten von ca. 3 μ M um einen Faktor von ca. 60 schwächer. Da sich STAT1 α und STAT1 β einerseits und die Deletionsvarianten andererseits untereinander nicht in ihren K_d -Werten unterschieden, war hingegen die Präsenz der Transaktivierungsdomäne am C-Terminus nicht notwendig für die Dimerisierung des unphosphorylierten STAT1.

Aufschlussreich war weiterhin der Vergleich der Selbstassoziation der STAT1-Spleissvarianten α und β in Bezug auf den Phosphorylierungsstatus (Abb. 3.18B). Unerwarteterweise wiesen nämlich beide Spleissvarianten unabhängig von einer Phosphorylierung an Tyr⁷⁰¹ vergleichbare und sehr stabile Interaktionen im K_d -Bereich von ca. 30-50 nM auf. Dies steht kontrovers zu der bisherigen allgemeinen Annahme, dass die SH2:Phosphotyrosin-Interaktion zur die Bildung stabiler STAT-Dimere notwendig ist (Shuai *et al.*, 1994). Die weitere Oligomerisierung des phosphorylierten STAT1 α zum Tetramer war innerhalb der untersuchten STAT-Proteine einzigartig, und die K_d für die Tetramerisierung lag ebenfalls im Bereich von ca. 80 nM. Erwartungsgemäss bildeten alle phosphorylierten STAT1-Varianten (Abb. 3.18C) ähnlich stabile Dimere mit K_d -Werten in Bereich von ca. 20-50 nM. Diese bildeten sich unabhängig von der Präsenz der N- und C-terminalen Domäne.

Selbstassoziation der N-Domänen

Das zweite überraschende Resultat ergab sich bei der Analyse der Dimerisierung der isolierten N-Domänen von STAT1, -3 und -4, die auf der Ebene der Aminosäuresequenzen über verschiedene Spezies hinweg stark konserviert sind (s. Abb. 1.3). Trotz grosser Ähnlichkeit der Aminosäurekompositionen und Kristallstrukturen wiesen sie sehr unterschiedliche Selbstassoziations-Eigenschaften auf. Während die N-Termini von STAT1 und STAT4 mit K_d -Werten in der selben Grössenordnung von ca. 23 μ M bzw. 3 μ M vergleichbar stabil waren,

3 Ergebnisse

bildete die STAT3-ND im Vergleich dazu sehr instabilen Dimere, und ihre K_d war mit ca. 4 mM um bis zu drei Grössenordnungen höher als die der STAT1- und STAT4-ND (Abb. 3.18D).

Die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation wurden durch unabhängige Methoden überprüft. So konnte die Fähigkeit zur Tetramerisierung einzig des phosphorylierten STAT1 α und im Gegensatz dazu die Monomer-Dimer-Gleichgewichte von unphosphoryliertem STAT1 α und phosphoryliertem STAT1 β durch kovalente Vernetzungs-Experimente der STAT1-Proteine mit Glutaraldehyd bestätigt werden (Abb. 3.19).

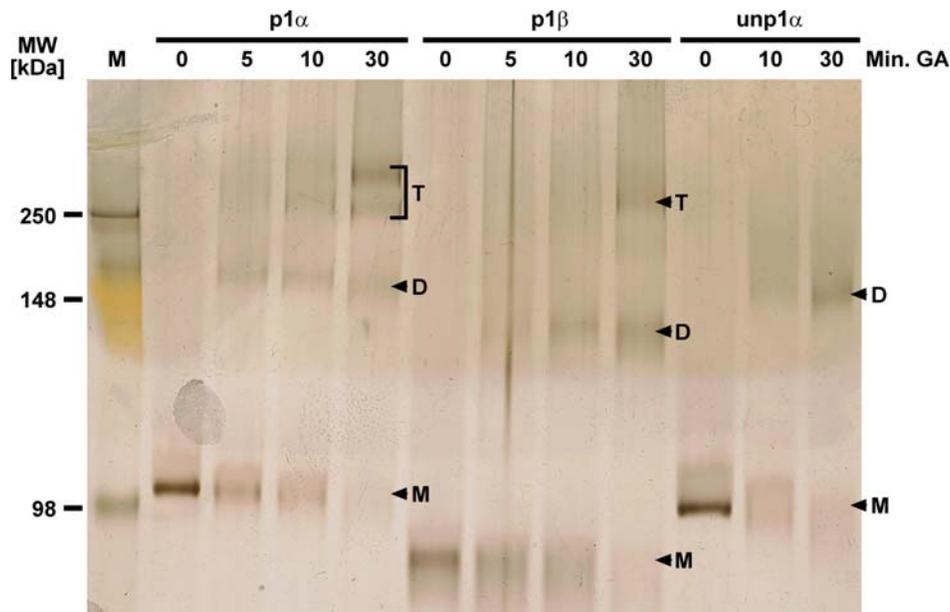
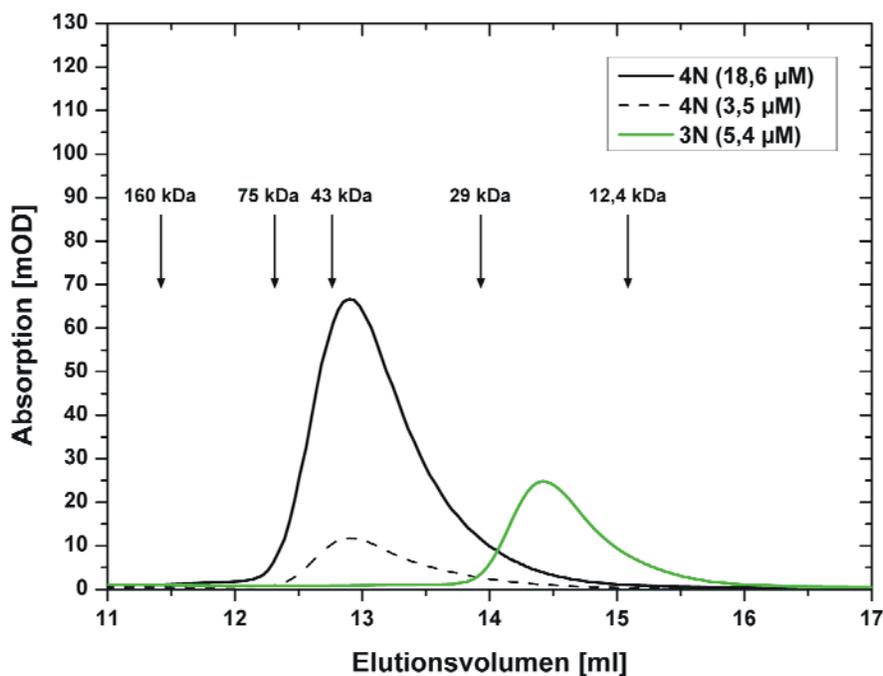


Abb. 3.19 Kovalente Vernetzung von STAT1-Proteinen mit Glutaraldehyd. Endkonzentrationen von jeweils 50 nM P- und U-STAT1 α und P-STAT1 β wurden mit 0,02% (v/v) Glutaraldehyd (GA) in PBS, pH 7,4 für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur inkubiert und die separaten Vernetzungsreaktion durch Zugabe von Tris-HCl, pH 6,8 zu einer Endkonzentration von 100 mM beendet. Die Reaktionsansätze wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach Auftrennung in einem 3-8% Tris-Azetat-PA-Gel die Oligomerisierungsstadien Monomer (M), Dimer (D) und Tetramer (T) der Proteine durch Silberfärbung detektiert.

Während das phosphorylierte STAT1 α nach 30 Minuten Inkubation mit Glutaraldehyd einen höheren Anteil an Tetramer als an Dimer aufwies, war eine Tetramer-Bande beim phosphorylierten STAT1 β zu diesem Zeitpunkt zwar ebenfalls detektierbar, aber in ihrer Intensität schwächer als die Dimerbande. Die Ergebnisse der SE-Analysen haben die Existenz eines P-STAT1 β -Tetramers nicht explizit ausgeschlossen, jedoch bestätigen die Vernetzungs-Experimente mit Glutaraldehyd das im Vergleich zu P-STAT1 α geringe Ausmass der Tetramerisierung von P-STAT1 β . Da sich die beiden Spleissvarianten nur in der Existenz der Transaktivierungsdomäne unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass die TAD einen Einfluss

auf die verstärkte Tetramerisierung des P-STAT1 α hat. Beim unphosphorylierten STAT1 α konnte entsprechend den Resultaten aus der analytischen Ultrazentrifugation ebenfalls keine höhere Assoziationsstufen als das Dimer detektiert werden. Die Resultate für die isolierten N-Domänen wurden durch analytische Grössenausschluss-Chromatographie bestätigt (Abb. 3.20).



Protein	Beladungskonzentration [mOD·ml]	Beladungskonzentration [μM]	Elutions- volumen [ml]	k_{AV}	MW [kDa]
h4N	68	18,6	12,9	0,297	40
	13	3,5	12,9	0,297	40
m3N	24	5,4	14,4	0,392	18

Abb. 3.20 Analytische Grössenausschluss-Chromatographie der humanen STAT4- und STAT3-ND. Die Proteine wurden mit den in der Tabelle angegebenen Beladungskonzentrationen im analytischen Masstab bei 4 °C mit PBS, pH 7,4 von einer Superose 12-Säule eluiert. Im Chromatogramm sind die apparenten Molekulargewichte von fünf Kalibrierungsproteinen (Aldolase, 160 kDa; Conalbumin, 75 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Carbanhydrase, 29 kDa; Zytochrom C, 12,4 kDa) markiert. Die bei $\lambda=280$ nm erhaltenen Absorptionswerte sind in Milli-Absorptionseinheiten (mOD) angegeben. In der Tabelle sind die relativen Mobilitäten k_{AV} , ermittelt nach Gleichung 16 (s. 2.2.3.20), und die daraus abgeleiteten apparenten Molekulargewichte MW angegeben.

Der N-Terminus von STAT4 wurde bei einer Konzentration von ca. 3,5 μM eingesetzt, die dem Bereich der K_d entspricht. Das Protein wurde mit einer relativen Mobilität k_{AV} von 0,297 (s. 2.2.3.20, Gl. 16) eluiert, die einem apparenten Molekulargewicht von ca. 40 kDa entspricht. Dieses Molekulargewicht bestätigte die Existenz eines ND:ND-Dimers und erhöhte sich nicht bei einer fünffach höheren Konzentration. Die Trennleistung der Chromatographie-Säule war ausreichend hoch, um die STAT3-ND bei einer Konzentration von 5,4 μM , was 0,1% der K_d

entspricht, bei $k_{AV}=0,392$ (18 kDa) als reines Monomer zu eluieren. Der Vergleich der N-Termini bei Konzentrationen im K_d -Bereich der STAT4-ND demonstrierte deutlich, dass die N-Domäne von STAT3 als reines Monomer und die von STAT4 als reines Dimer vorlag und bestätigte somit die Resultate der SE-Experimente (s. Tab. 3.3).

Zusammenfassend bestätigten die zusätzlichen Experimente sowohl qualitativ als auch quantitativ die Resultate der analytische Ultrazentrifugation, die eindeutig den Einfluss der N-Domäne und der Tyrosinphosphorylierung auf die Selbstassoziation von STAT1 haben. Die Stabilität des unphosphorylierten Dimers hängt entscheidend von der Präsenz der N-Domäne ab, während sie beim Phosphoprotein nicht zur Bildung eines Dimers benötigt wird. Damit legen die Daten nahe, dass es sich beim unphosphorylierten STAT1-Dimer um eine antiparallele Konformation handelt, die über ND:ND-Interaktionen stabilisiert wird. Hingegen liegt das phosphorylierte Dimer demnach in einer parallelen Konformation vor, die durch reziproke SH2D:Phosphotyrosin-Interaktionen stabilisiert wird. Weiterhin dimerisieren die STAT1- und STAT4-ND im mikromolaren K_d -Bereich, während die Interaktion der STAT3-ND eine K_d von ca. 4 mM aufwies.

3.2.3 Koexistenz der STAT1-Dimere in paralleler und antiparalleler Konformation

Ungeklärt zu diesem Zeitpunkt war noch die Frage, in welchem Ausmass eine Koexistenz der parallelen und antiparallelen Konformation sowohl für das phosphorylierte als auch das unphosphorylierte STAT1-Dimer möglich ist. Gemäss den Kristallstrukturen wird das unphosphorylierte Dimer über reziproke ND:ND- und CCD/DBD:CCD/DBD-Interaktionen stabilisiert, während das Phospho-Dimer über reziproke SH2D:Phosphotyrosin-Interaktionen stabilisiert wird. Dennoch bleibt in beiden Kristallstrukturen die Konformation der Monomere unverändert. Demnach wäre es denkbar, dass das unphosphorylierte STAT1-Dimer zusätzlich in der parallelen Konformation vorliegen könnte. Umgekehrt könnte das Phospho-Dimer ebenso zu einem gewissen Anteil in der antiparallelen Konformationen existieren. Daher würden Experimente, die die Existenz eines parallelen unphosphorylierten Dimers bewiesen, im Umkehrschluss auch die Existenz eines antiparallelen Phospho-Dimers implizieren.

Es wurden deshalb Experimente durchgeführt, die die Existenz eines parallelen unphosphorylierten STAT1-Dimers belegen sollten. Am besten geeignet erschienen dazu DNS-

3 Ergebnisse

Bindungsstudien, bei denen als Indikator für die parallele Dimer-Konformation die Interaktion unphosphorylierter STAT1-Proteine mit DNS diente.

Zunächst wurden weitere STAT1tc-Mutanten in BL21-Bakterienzellen exprimiert und gereinigt (Abb. 3.21). Von den unphosphorylierten N-terminalen Deletionsmutanten war nach den Resultaten der AUZ in dieser Arbeit bereits bekannt, dass bei ihnen die Stärke der Selbstassoziation im Vergleich zu den phosphorylierten STAT1-Proteinen drastisch reduziert ist. Die zusätzliche Punktmutante F172W diente zur weiteren Destabilisierung der antiparallelen Dimer-Konformation (Mao *et al.*, 2005), da der Aminosäurerest F172 in der CCD im Dimer reziprok mit der Bindungstasche in der DBD interagiert und so die antiparallele Konformation stabilisiert. In der parallelen Konformation hingegen wird die reziproke Interaktion zwischen den SH2-Domänen durch die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung verstärkt. Zusätzlich haben jedoch auch van der Waals-Wechselwirkungen, die durch den Phenylring des Tyrosinrests induziert werden, stabilisierende Effekte auf die parallele Dimer-Konformation. Daher sollten die Tyrosin⁷⁰¹-Mutanten Y701A und Y701R nicht mehr zur reziproken Tyr:SH2D-Interaktion befähigt sein. Die Y701A-Mutante wurde bereits als Volllänge-Protein beschrieben (Melen *et al.*, 2001), jedoch mussten beide Mutanten als STAT1tc-Proteine zunächst charakterisiert werden. Die Kontrolle ihrer Stabilität und ihrer trotz der Mutation uneingeschränkten Dimerisierung im Vergleich zum STAT1tc-WT erfolgte durch Dynamische Lichtstreuungen (DLS)-Experimente (Abb. 3.21).

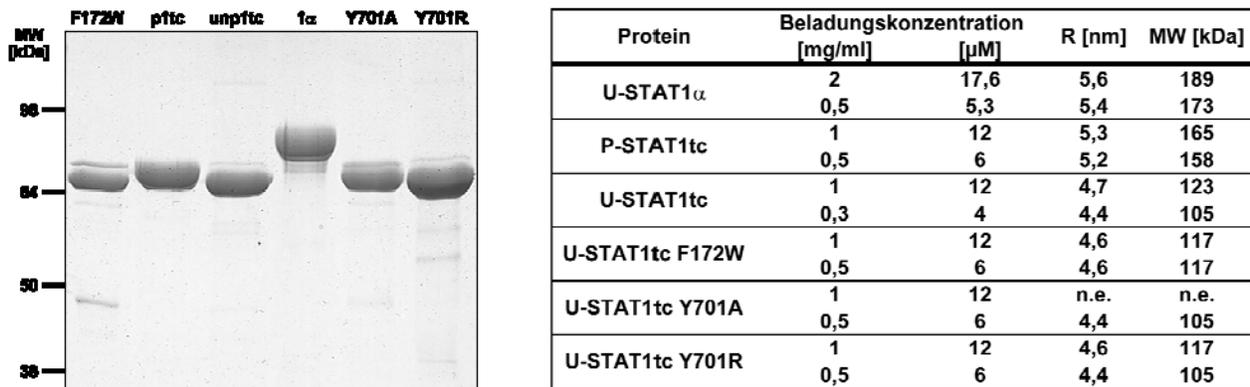
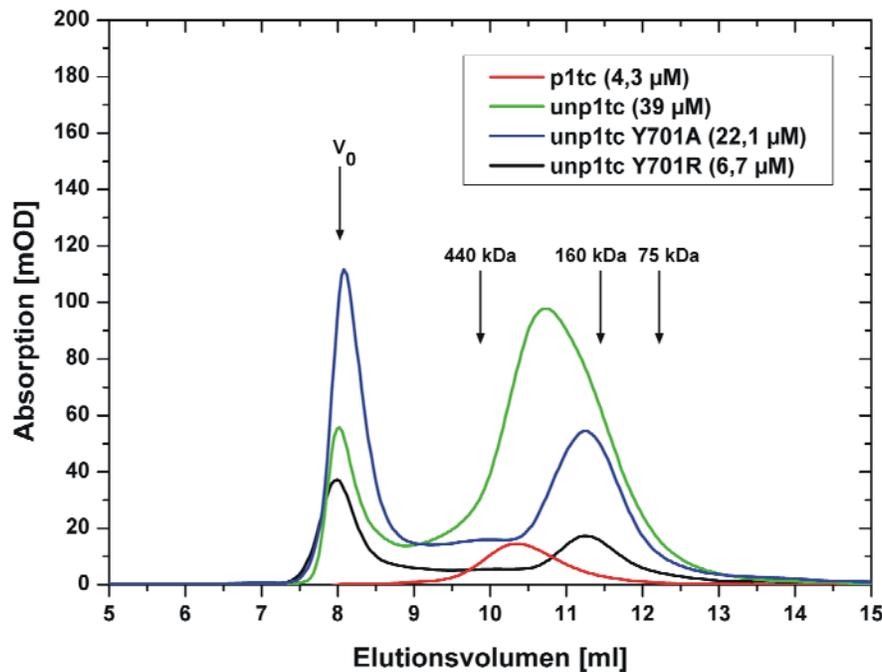


Abb. 3.21 Übersicht der in DLS- und EMSA-Experimenten zusätzlich verwendeten STAT1-Mutanten. (A) Die Reinheit der STAT1-Deletionsvarianten wurde im 10%-igen SDS-PA-Gel durch Färbung mit Coomassie analysiert. Die durch Dynamische Lichtstreuungs-Experimente für die verwendeten STAT1-Proteine bei mikromolaren Konzentrationen erhaltenen Stokes-Radien (R) und daraus ermittelten Molekulargewichte sind in der Tabelle angegeben.

Der Vergleich zwischen den unphosphorylierten STAT1tc-Mutanten zeigte in den DLS-Experimenten, dass die apparenten Molekulargewichte von ca. 120 kDa sich deutlich von denen des phosphorylierten STAT1tc mit ca. 160 kDa unterscheiden. Während sich das P-STAT1tc

3 Ergebnisse

erwartungsgemäss bei Konzentrationen von 6 und 12 μM als dimeres Protein herausstellte, wiesen alle U-STAT1tc-Mutanten ein für Dimere deutlich zu geringes und für Monomere zu hohes apparentes Molekulargewicht auf. Dies bestätigte wiederum die Resultate aus der analytischen Ultrazentrifugation, die für unphosphorylierte ΔN -Mutanten K_d -Werte von ca. 3 μM lieferten. U-STAT1 α auf der anderen Seite war im untersuchten Konzentrationsbereich ebenfalls mit einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa als Dimer zu identifizieren, wie es sich bereits in den SE-Experimenten aufgrund der K_d von 50 nM herausgestellt hatte. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch analytische Grössenausschluss-Chromatographie bestätigt (Abb. 3.22).



Protein	Beladungskonzentration [mOD·ml]	Beladungskonzentration [μM]	Elutionsvolumen [ml]	k_{AV}	MW [kDa]
p1tc	17,8	4,3	10,34	0,135	240
unph1tc	159,6	39,0	10,72	0,159	190
unph1tc Y701A	91,3	22,1	11,25	0,192	170
unph1tc Y701R	29,8	6,7	11,25	0,192	170

Abb. 3.22 Analytische Grössenausschluss-Chromatographie der STAT1tc-Mutanten. Die Proteine wurden mit den in der Tabelle angegebenen Beladungskonzentrationen im analytischen Masstab bei 4 °C mit PBS, pH 7,4 von einer Superose 12-Säule eluiert. Im Chromatogramm sind die apparenten Molekulargewichte von drei Kalibrierungsproteinen (440 kDa, 160 kDa und 75 kDa) markiert. Die bei $\lambda=280$ nm erhaltenen Absorptionen sind in Milli-Absorptionseinheiten (mOD) angegeben. In der Tabelle sind die relativen Mobilitäten k_{AV} , ermittelt nach Gleichung 16 (s. 2.2.3.20), und die daraus abgeleiteten apparenten Molekulargewichte MW angegeben.

Die hier untersuchten STAT1tc-Mutanten wurden alle mit etwas erhöhtem apparentem Molekulargewicht eluiert, das dem von Dimeren entspricht. Es konnten keine Unterschiede

zwischen dem unphosphorylierten Wildtyp und den Y701-Mutanten festgestellt werden. Jedoch zeigte sich anhand der k_{AV} -Werte und den daraus deduzierten apparenten Molekulargewichten des phosphorylierten im Vergleich zum unphosphorylierten STAT1tc ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Dimerisierung.

Wie bereits in der Arbeit von Mao *et al.* (2005) berichtet, unterscheidet sich die Dimerkonformation des Phosphoproteins im Kristall vollkommen vom unphosphorylierten Protein. Die Ergebnisse der Grössenausschluss-Chromatographie waren somit nicht nur mit dem Resultat der Kristallstruktur-Analyse konsistent, sondern auch mit den später in Abschnitt 3.2.4 berechneten Sedimentationskoeffizienten der phosphorylierten und unphosphorylierten STAT1-Proteine (s. Tab. 3.5). Das STAT1tc-Phosphoprotein wies in der analytischen Grössenausschluss-Chromatographie, wie aufgrund seiner hydrodynamischen Gestalt zu erwarten war, ein höheres apparentes Molekulargewicht als das unphosphorylierte STAT1tc auf. Dies steht in Übereinstimmung mit dem höheren Sedimentationskoeffizienten des Phosphoprotein-Dimers im Vergleich zum unphosphorylierten Dimer. Zusammenfassend demonstrierten diese Resultate, dass sich die Mutanten in ihrer Stabilität und Dimerisierungsfähigkeit nicht vom unphosphorylierte STAT1tc-Wildtyp unterschieden.

In EMSA-Experimenten wurde nun untersucht, ob unphosphoryliertes STAT1-Protein neben der antiparallelen auch die DNS-bindungsfähige parallele Konformation einnehmen kann. Zunächst wurden steigende Konzentrationen an phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 α gegen eine konstante Konzentration an unmarkierter M67-Sonde titriert (Abb. 3.23). Das phosphorylierte STAT1 α bildete auf DNS bei äusserst geringen Konzentrationen, die im Bereich des K_d -Wertes der DNS-Bindung des phosphorylierten STAT1tc von ca. 1 nM (s. 3.1.3) lagen, Dimere und in geringerem Ausmass auch Tetramere auf der M67-Sonde (s. Bahnen 1 und 2). Im Vergleich dazu interagierte bemerkenswerterweise auch das unphosphorylierte STAT1 α spezifisch mit der M67-Sonde (s. Bahnen 3-9). Da keine Mobilitätsunterschiede zwischen dem phosphorylierten und unphosphorylierten STAT1 α festgestellt werden konnten, scheint es sich auch beim DNS-gebundenen unphosphorylierten STAT1 α um ein Dimer zu handeln. Es waren jedoch mindestens 200-fach höhere Proteinkonzentrationen notwendig, um eine mit dem phosphorylierten STAT1 α vergleichbare DNS-Bindungsaktivität zu induzieren (vgl. Bahnen 2 und 3).

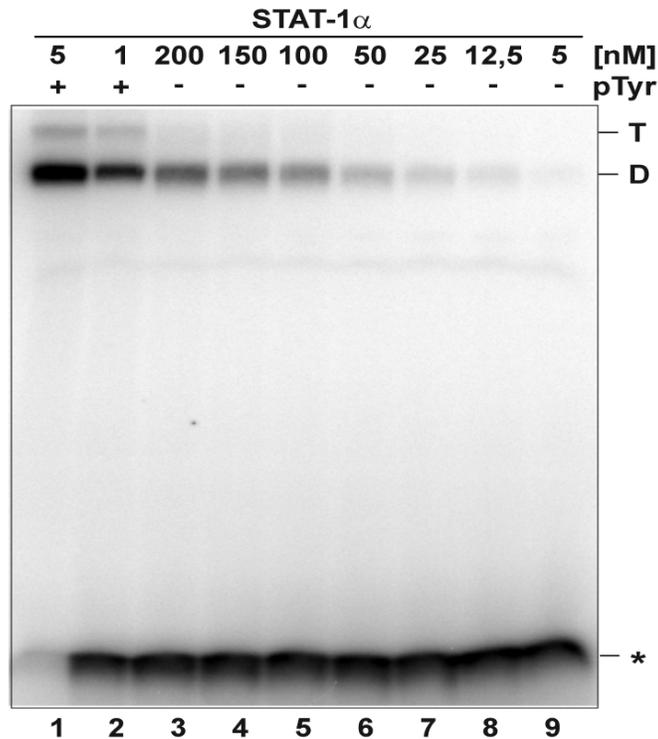


Abb. 3.23 Vergleich der DNS-Bindung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 α im EMSA-Experiment. Die DNS-Bindung von phosphoryliertem (+ pTyr) und unphosphoryliertem STAT1 α (- pTyr) wurde bei den angegebenen Konzentrationen untersucht. Die Proben wurden zuvor für 15 Min. bei RT mit der radioaktiv markierten, hochaffinen M67-Sonde (Endkonzentration 0,1 nM) inkubiert. Die Positionen der dimeren (D) und tetrameren (T) STAT1:DNS-Komplexe, sowie der ungebundenen Sonde (*) sind gekennzeichnet.

Es wurde nun geprüft, ob es sich beim DNS-gebundenen tatsächlich um ein paralleles Dimer handelte und nicht beispielsweise ein dissoziiertes U-STAT1-Dimer, das zu einem antiparallelen Dimer reassozierte. Dazu wurden die DNS-Bindungsaktivitäten von Mutanten untersucht, die im verwendeten Konzentrationsbereich nicht mehr als antiparallele Dimere existieren konnten. Die Deletion der N-Domäne verursacht bereits eine deutliche Reduktion der Dimerisierung des unphosphorylierten STAT1, wie schon durch AUZ demonstriert werden konnte (s. Tab. 3.3). Zur zusätzlichen Destabilisierung des Dimers in der antiparallelen Konformation wurde die Mutation des Aminosäurerests Phenylalanin¹⁷² zu Tryptophan eingeführt. Zu erwarten wäre im Falle der Bindung eines antiparallelen Dimers an DNS eine dramatische Reduktion in der Interaktionsfähigkeit. Mit Abbildung 3.24 konnte jedoch eindeutig demonstriert werden, dass sich die DNS-Bindung von F172W im Vergleich zu U-STAT1tc-Wildtyp (vgl. Bahnen 1-3 vs. 4-6) nicht unterschied. Im Gegenteil, es konnte gezeigt werden, dass die DNS-Bindung im Vergleich zum unphosphorylierten STAT1 α (Bahnen 7-9) um mindestens den Faktor Vier gesteigert war. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Modell von Mao *et al.* (2005), nachdem

die Anwesenheit der N-Domäne im unphosphorylierten Protein die Stabilität des antiparallelen Dimers steigern und sich somit der Anteil des DNS-bindungsfähigen Proteins in paralleler Konformation reduzieren sollte. Weiterhin zeigte sich eindeutig, dass die antiparallele Konformation nicht zur DNS-Bindung beiträgt.

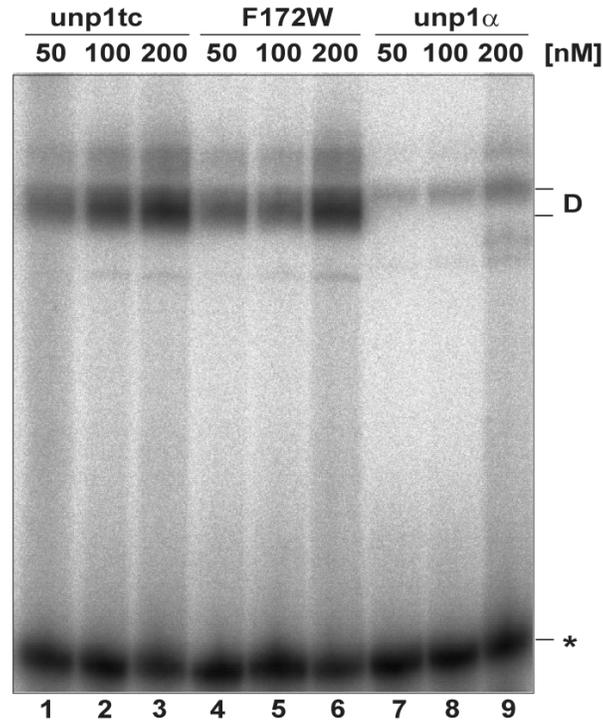


Abb. 3.24 Vergleich der DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1 α mit den Mutanten STAT1tc-WT und STAT1tc-F172W im EMSA-Experiment. Die DNS-Bindung der unphosphorylierten Proteine wurde bei gleichen Proteinkonzentrationen untersucht. Die Proben wurden zuvor für 15 Min. bei RT mit der radioaktiv markierten, hochaffinen M67-Sonde (Endkonzentration 0,1 nM) inkubiert. Die Positionen der dimeren (D) STAT1:DNS-Komplexe und der ungebundenen Sonde (*) sind gekennzeichnet.

Durch dieses Resultat wurde jedoch noch nicht explizit nachgewiesen, dass es sich um in paralleler Konformation an DNS gebundene Dimere handelte. Das nicht-peptidische Molekül 6-Nitrobenzo[b]thiophen-1,1-dioxid (6-NBT) wurde als spezifischer irreversibler Inhibitor der SH2D:Phosphotyrosin-Interaktionen für STAT3 beschrieben (Schust *et al.*, 2006). Er wirkt bei STAT1 ebenfalls inhibierend, jedoch sind höhere Konzentrationen notwendig als bei STAT3, um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen. Durch Titration steigender 6-NBT-Konzentrationen gegen ähnliche Bindungsaktivitäten des unphosphorylierten (200 nM) und phosphorylierten STAT1tc (1 nM) wurde untersucht, ob eine Inhibierung der Ausbildung von parallelen Dimeren die Fähigkeit zur DNS-Bindung reduziert. In Abbildung 3.25A konnte eindeutig demonstriert werden, dass dies tatsächlich der Fall ist.

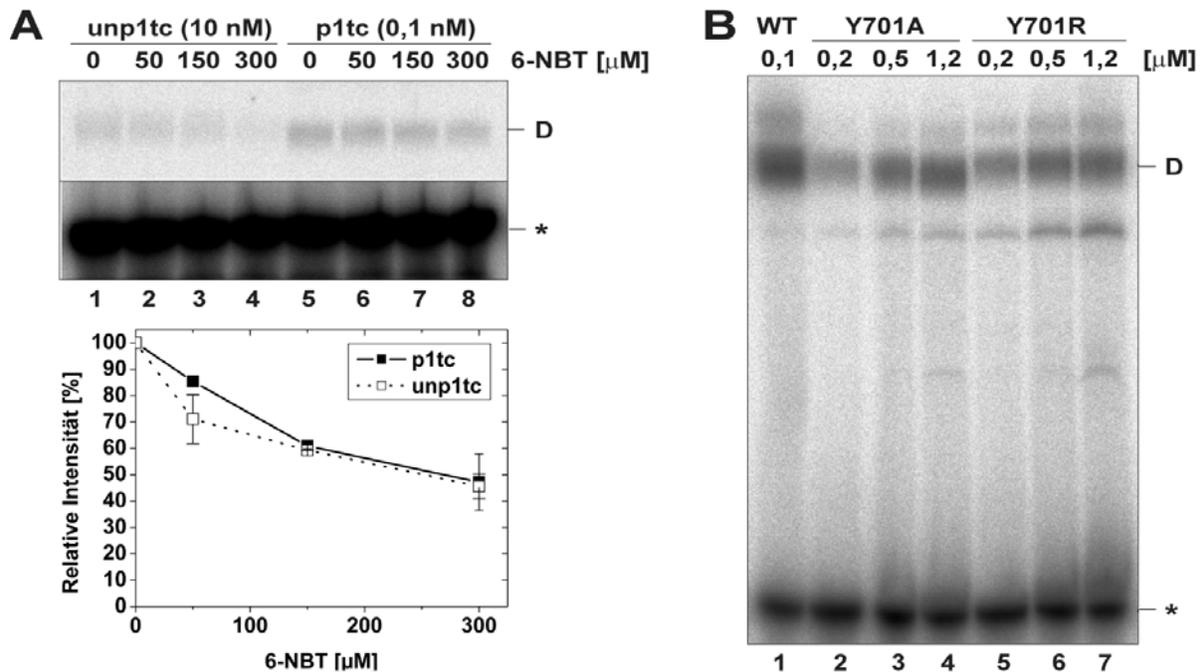


Abb. 3.25 Einfluss der reziproken SH2-Domänen-Interaktionen auf die DNS-Bindung. Die Positionen der dimeren (D) STAT1:DNS-Komplexe, sowie der ungebundenen M67-Sonde (*) sind gekennzeichnet. (A) Inaktivierung der STAT1-SH2-Domäne durch den irreversiblen Inhibitor 6-NBT. Phosphoryliertes und unphosphoryliertes STAT1tc wurde zunächst für 45 Min. bei Raumtemperatur mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors 6-NBT inkubiert. Anschliessend wurde die radioaktiv markierte M67-Sonde in einer Endkonzentration von 0,1 nM hinzugegeben und die Reaktionsansätze für weitere 15 Min. bei RT inkubiert. Die Daten der Quantifizierung der relativen Bindungsintensitäten aus zwei unabhängigen Experimenten sind mit ihren Standardabweichungen dargestellt (unten). (B) Untersuchung des Einflusses des Tyrosin⁷⁰¹-Rests auf die DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1tc. Die DNS-Bindung von STAT1tc-WT und den Tyr⁷⁰¹-Mutanten Y701A und Y701R mit der M67-Sonde (0,1 nM) wurde bei den angegebenen Proteinkonzentrationen untersucht.

Sowohl die DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1tc als auch des phosphorylierten Proteins (Bahnen 1-4 vs. 5-8) konnte dosisabhängig auf bis zu 50% der ursprünglichen Bindungsaktivität reduziert werden. Da die Abnahme der DNS-Bindung von P-STAT1tc und U-STAT1tc durch 6-NBT sich als ununterscheidbar herausstellte, konnte gefolgert werden, dass beide STAT1-Proteine als SH2-Domäne-vermittelte Dimere an DNS binden.

Zur Erhärtung dieses Befundes wurden Tyrosin-Mutanten herangezogen, bei denen spezifisch die Fähigkeit zur reziproken Interaktion über SH2-Domänen gestört war. Die Titration steigender Proteinkonzentrationen an STAT1tc-Protein gegen eine konstante M67-Konzentration (Abb. 3.25B) demonstrierte, dass mindestens 12-fach höhere Konzentrationen an Tyrosinmutanten-Protein benötigt wurden (1,2 μ M), um die Bindungsaktivität des unphosphorylierten Wildtyp-Proteins (0,1 μ M) zu erreichen (Bahn 1 vs. 2-4 bzw. 5-7). Die bisherigen Ergebnisse rechtfertigten damit die Schlussfolgerung, dass unphosphoryliertes STAT1-Protein als paralleles Dimer an DNS binden kann.

Die Spezifität der DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1tc wurde durch Wettbewerbs-Experimente mit der spezifischen M67- oder einer unspezifischen Nicht-GAS-Sonde gezeigt (Abb. 3.26A).

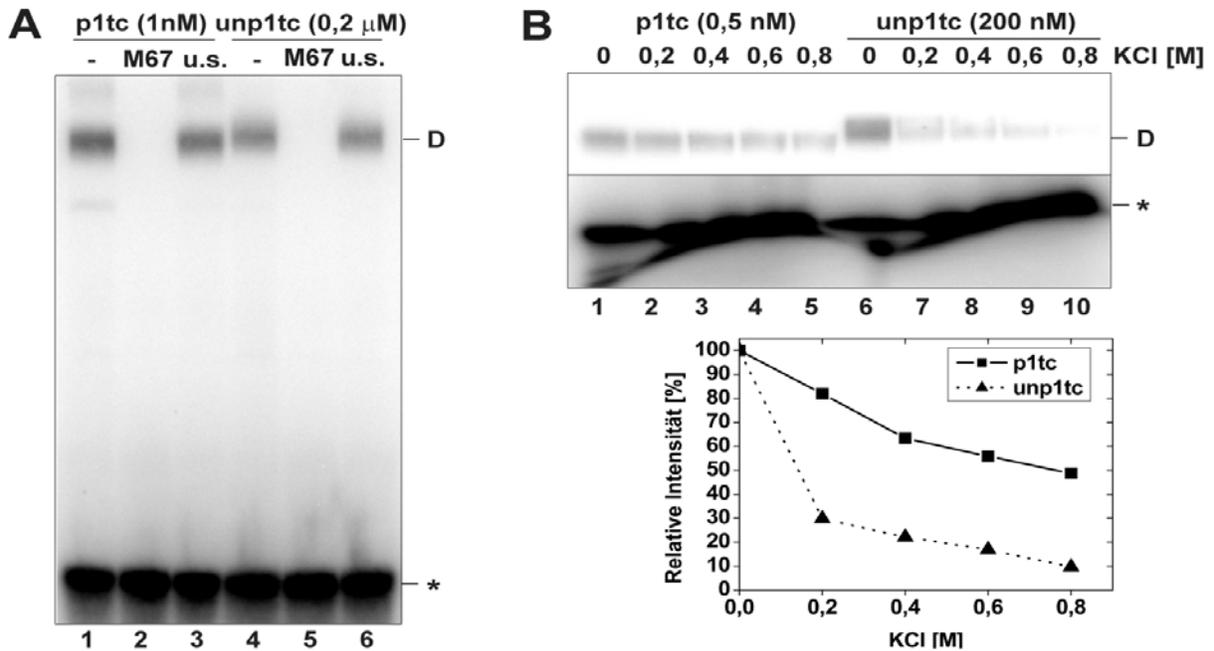


Abb. 3.26 Vergleich der DNS-Kontakte von phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1tc. Die Positionen der dimeren (D) STAT1:DNS-Komplexe, sowie der ungebundenen M67-Sonde (*) sind gekennzeichnet. (A) Untersuchung der Spezifität der DNS-Bindung von STAT1tc durch Wettbewerbs-Experimente. Phosphoryliertes (1 nM) und unphosphoryliertes STAT1tc (200 nM) wurden bei vergleichbaren Bindungsintensitäten mit markierter M67-Sonde (0,1 nM) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden gleiche Volumina entweder des Oligonukleotid-Puffers allein oder der unmarkierten M67- bzw. unspezifischen (u.s.) Sonde (10 nM) in Oligopuffer hinzugefügt und die Reaktionsansätze für weitere 15 Min. bei RT inkubiert. (B) Vergleich der Stabilität der DNS-Bindung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1tc bei hohen Ionenstärken. Vergleichbare Bindungsaktivitäten an phosphoryliertem (0,5 nM) und unphosphoryliertem STAT1tc (200 nM) wurden nach Inkubation für 15 Min. bei RT mit M67-Sonde (0,1 nM) und anschliessend für weitere 15 Minuten bei RT mit den angegebenen Endkonzentrationen an KCl verglichen. Die Daten der Quantifizierung der relativen Bindungsintensitäten sind dargestellt (unten).

Bei gleicher Bindungsaktivität von P- und U-STAT1tc (Bahn 1 vs. 4) konnte durch spezifische Konkurrenz die DNS-Bindung des phosphorylierten Proteins für das unphosphorylierte reproduziert werden (vgl. Bahnen 1 und 4 vs. 2 und 5). Weiterhin konnte die DNS-Bindungsaktivität bei Inkubation mit dem unspezifischen Konkurrenten für beide STAT1tc-Proteine nicht reduziert werden (Bahnen 1 vs. 3 und 4 vs. 6). Dies demonstrierte die spezifische Bindung von Phospho- und U-STAT1tc an die M67-Sonde unter Ausbildung identischer Protein:DNS-Kontakte. Letztlich konnte in Gegenwart steigender Ionenstärken während der DNS-Bindung gezeigt werden, dass sich die Proteine trotz identischer Kontakte mit der DNS dennoch in der Stabilität der Interaktion unterscheiden (Abb. 3.26B). Während sich die DNS-

Bindung des phosphorylierten STAT1tc als relativ unempfindlich gegen hohe Ionenstärken herausstellte und selbst bei 0,8 M KCl noch zu ca. 50% DNS-gebunden war, wurde die DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1tc bereits bei 0,2 M KCl um mehr als 70% reduziert.

Zusammenfassend konnte durch die EMSA-Experimente demonstriert werden, dass nicht nur das phosphorylierte STAT1-Protein zur Bindung an DNS in der Lage ist, sondern auch das unphosphorylierte. Jedoch sind mindestens 200-fach höhere Proteinkonzentrationen notwendig, um vergleichbare Bindungsaktivitäten wie beim Phosphoprotein zu erreichen. Beide Proteine konnten spezifisch an GAS-Sonden binden und die DNS-Bindung durch spezifische Kompetitorsonden inhibiert werden. Durch die Destabilisierung der Protein:Protein-Interaktion in der antiparallelen Konformation durch die F172W-Mutante wurde die DNS-Bindung nicht reduziert. Dadurch konnte die Bindung des unphosphorylierten Proteins in antiparalleler Konformation ausgeschlossen werden. Die sukzessive Bindung zweier unphosphorylierter Monomere konnte aufgrund der reduzierten DNS-Bindung nach spezifischer Inhibition der SH2D-vermittelten Interaktion im Dimer ebenfalls ausgeschlossen werden. Letztendlich konnte unter Verwendung von Tyrosin-Mutanten nachgewiesen werden, dass die DNS-Bindung durch unphosphorylierte STAT1-Dimere in paralleler Konformation möglich ist. Dies lieferte den Beweis, dass U-STAT1 neben der parallelen auch in der antiparallelen Konformation existiert. Aufgrund der mindestens 200-fach schwächeren Bindungsaktivität musste der Anteil der antiparallelen Konformation gegenüber der parallelen um denselben Faktor niedriger sein und daher unter 0,5% liegen.

3.2.4 Kinetische Stabilität der parallelen und antiparallelen STAT1-Dimere

Diese Resultate warfen die interessante Frage auf, welche zeitliche Stabilität die Dimere in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus und der sich aus der Kristallstruktur ergebenden Dimer-Konformation haben. Beide Dimere haben zwar die gleiche thermodynamische Stabilität, aber aus den K_d -Werten der SE-Experimente lassen sich keine kinetischen Daten extrahieren. Dennoch konnten die Assoziations- und Dissoziationsraten und damit die Halbwertszeiten der Dimere abgeschätzt werden. Dazu wurden zwei unabhängige auf der hydrodynamischen Gestalt der Dimere basierende Methoden verwendet. Nach Kugelmodell-basierten Modellierungen von PDB-Koordinatendatensätzen, die durch Kristallstrukturanalysen des phosphorylierten, DNS-gebundenen STAT1tc und des unphosphorylierten STAT1 β erhalten wurden, konnten die für die

Berechnungen benötigten hydrodynamischen Parameter ermittelt werden. Damit konnten einerseits mithilfe der Smoluchowski-Gleichung (s. 2.2.3.21, Gl. 17) die Assoziationsraten k_A berechnet werden. Zusätzlich wurden Simulationen von SV-Läufen des phosphorylierten und unphosphorylierten STAT1-Dimers mit der *Adaptive Space-Time Finite Element*-Methode (ASTFEM; Cao und Demeler, 2008) durchgeführt. So konnten unter Einbeziehung der K_d -Werte aus den SE-Experimenten die Dissoziationsraten k_D ermittelt werden. Die Resultate beider Berechnungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tab. 3.5 Berechnung der kinetischen Raten und Halbwertszeiten der P- und U-STAT1-Dimere. Die hydrodynamischen Parameter Diffusionskoeffizient (D) für Monomere (Index M) und Dimere (Index D), Sedimentationskoeffizienten (s) und Gyrationenradien (r_{gyr}) wurden anhand der PDB-Koordinatendatensätze für P-STAT1tc (1BF5; die DNS wurde in die Analysen nicht einbezogen) und U-STAT1 β (1YVL) ermittelt. Zur Berechnung der Dissoziationsraten k_D wurde die in Ultrascan implementierte ASTFE-Methode und die Smoluchowski-Gleichung (s. 2.2.3.21, Gl. 17) zur Berechnung der maximalen Assoziationsraten k_A verwendet. Mithilfe der Gleichungen 18 und 19 (s. 2.2.3.21) wurden diese unter Verwendung der experimentell ermittelten K_d -Werte in Dissoziationsraten k_D konvertiert und die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Dimere ermittelt.

Protein	Methode	D_M [$10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$]	D_D [$10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$]	s_M [S]	s_D [S]	$r_{gyr,M}$ [10^{-11} m]	$r_{gyr,D}$ [10^{-11} m]	k_A [$10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	k_D [10^{-4} s^{-1}]	$t_{1/2}$ [Min.]
P-STAT1	ASTFEM	5,4	4,1	5,4	8,2	n.a.	n.a.	8,0	4,0	28,9
	Smoluchowski			n.a.	n.a.	4,7	3,6	4,3	2,2	52,5
U-STAT1	ASTFEM	4,7	4,0	5,0	7,9	n.a.	n.a.	12,0	6,0	19,3
	Smoluchowski			n.a.	n.a.	4,7	4,0	4,9	2,5	46,2

Die ASTFE-Methode lieferte für phosphorylierte und unphosphorylierte STAT1-Dimere vergleichbare Halbwertszeiten von ca. 19-28 Minuten und unter Verwendung der Smoluchowski-Gleichung die aus den maximalen Assoziationsraten ermittelten maximalen Halbwertszeiten von 46-52 Minuten. Demnach sind STAT1-Dimere unabhängig von ihrem Phosphorylierungszustand ca. 20-50 Minuten stabil.

3.2.5 Die K_d entspricht der Konzentration von STAT1 in lebenden Zellen

Sämtliche bisherigen Resultate stammten aus reinen *in vitro*-Messungen. Deshalb ergab sich die interessante Frage, in welchem Oligomerisierungszustand STAT1-Proteine in der lebenden Zelle vorliegen könnten. Da gegenwärtig jedoch noch keine Daten über die zelluläre STAT1-Konzentration vorliegen, wurden diese Daten nun für HeLa-S3-Zellen erhoben, um sie mit den erhaltenen K_d -Werten vergleichen zu können.

Dazu wurde zunächst die Konzentration an endogenem STAT1 in HeLa-Zellen ermittelt, indem STAT1 α -Proteine aus Gesamtzell-Extrakten im Western Blot immunchemisch detektiert (Abb. 3.27A) und quantifiziert wurden. Die Daten aus sieben unabhängigen Experimenten wurden

3 Ergebnisse

freundlicherweise von Frau Stephanie Meyer zur Verfügung gestellt. Die Immunreaktivität des STAT1-Proteins in den Extrakten aus $2,8$ und $1,4 \cdot 10^5$ Zellen wurde mit einer Kalibrierungskurve verglichen und betrug $3,9 \pm 0,6$ ng bzw. $2,0 \pm 0,3$ ng (s. Markierungen a und b in Abb. 3.27A, unten). Daraus konnten mit einem angenommenen Volumen der HeLa-Zellen von $4 \cdot 10^{-12}$ l (Luby-Phelps, 2000; Monier *et al.*, 2000) die zelluläre Gesamtkonzentration an STAT1 α berechnet werden. Sie lag mit 40 ± 7 nM genau im durch analytische Ultrazentrifugation ermittelten K_d -Bereich des Monomer-Dimer-Gleichgewichts des phosphorylierten und unphosphorylierten STAT1 α - und - β -Proteins. Weiterhin konnte in zusätzlichen von Frau Stephanie Meyer freundlicherweise zur Verfügung gestellten Resultaten aus Western Blot-Experimenten gezeigt werden, dass nach IFN γ -Stimulation maximal ca. 36% des STAT1-Proteins in phosphoryliertem Zustand vorlagen (Abb. 3.27B). Angesichts der K_d kann somit vermutet werden, dass in lebenden Zellen sowohl vor als auch nach IFN-Stimulation das STAT1-Protein zu etwa gleichen Anteilen als Monomer und Dimer vorliegen könnte.

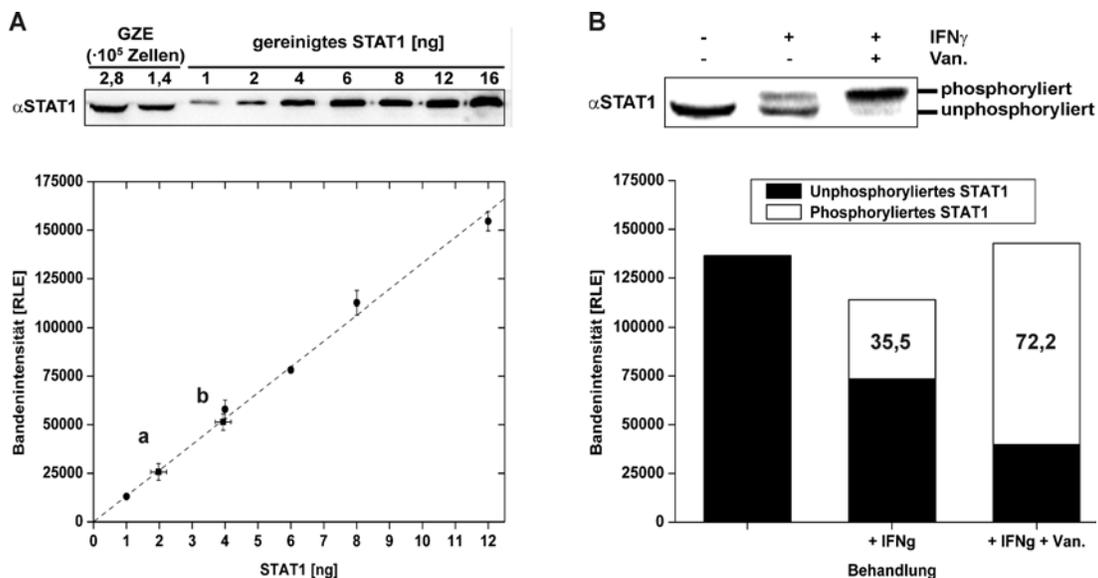


Abb. 3.27 Ermittlung der endogenen STAT1-Konzentration HeLa-S3-Zellen. (A) Zur Kalibrierung der Anti-STAT1 α -IgG C-24 wurden die angegebenen Mengen an gereinigtem STAT1-Protein nach Auftrennung im 7%-igen SDS-PA-Gel im Western Blot (oben) durch Immunchemie detektiert und quantifiziert. Anschließend wurden die Immunreaktivitäten von Gesamtzell-Extrakten (GZE) aus $2,8$ und $1,4 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen durch Vergleich mit der Kalibrierkurve (unten; gekennzeichnet als a und b) ermittelt. Die Bandenintensitäten der Zellextrakte und der gereinigten STAT1-Proteine sind in relativen Lichteinheiten (RLE) mit ihren Standardabweichungen aus sieben unabhängigen Experimenten angegeben. (B) Subkonfluente HeLa-S3-Zellen wurden unstimuliert belassen (-) oder für 30 Min. mit 5 ng/ml IFN γ allein oder in Kombination mit 0,8 mM Natriumorthovanadat (Van.) und 0,2 mM H $_2$ O $_2$ zur Inhibierung von Phosphatasen inkubiert. Die Gesamtzellextrakte aus $3 \cdot 10^5$ Zellen wurden im 7%-igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und STAT1 α durch Immunchemie mit dem Antikörper C-24 detektiert (oben) und quantifiziert (unten). Die Zahlen im Balkendiagramm geben den prozentualen Anteil des phosphorylierten Proteins an der gesamten STAT1 α -Menge an.

4 Diskussion

Die verlängerte Kernretention der T327R-Mutante beruht auf unspezifischer DNS-Bindung

In EMSA-Experimenten wurden die DNS-Bindungseigenschaften zweier STAT1tc-Varianten mit Mutationen in der DNS-Bindedomäne untersucht. Dabei stellte sich für die T327R-Mutante heraus, dass der standardmässig verwendete unspezifische Kompetitor dIdC das Protein fast vollständig von der Zielsonde verdrängt (Abb. 3.10). Aufgrund der unspezifischen Bindung von T327R wurden daher zur besseren Vergleichbarkeit für alle STAT-Varianten die weiteren EMSA-Experimente in Abwesenheit von dIdC durchgeführt. Die T327R-Mutante wies nunmehr bei der M67-Sonde eine gegenüber dem Wildtyp fast 30-fach erhöhte K_d von ca. 28 nM auf. Ausserdem unterschied sie sich auch durch deutlich verlängerte Halbwertsbindungszeiten an weiteren STAT1-Zielensonden klar vom Wildtyp. Im Vergleich mit der ebenfalls unspezifisch an DNS bindenden DNS^{plus}-Mutante (T327R/V426H/T427H; Meyer *et al.*, 2003) zeigte sich, dass bereits die alleinige Mutation von T327R genügt, um den Verlust der Diskriminierung zwischen GAS- und Nicht-GAS-Stelle bei STAT1 hervorzurufen. Von Decker *et al.* (1997) wurde bereits diskutiert, dass der Übergang zwischen spezifischer und unspezifischer DNS-Bindung fließend ist, insbesondere da GAS-Stellen nur schwach konserviert sind. Damit bestätigt sich für die T327R-Mutante, dass bereits geringfügige Modifikationen in der Aminosäuresequenz zu einem deutlich veränderten Zielenspektrum führen können (Horvath *et al.*, 1995; Schindler *et al.*, 1995; Seidel *et al.*, 1995; Ehret *et al.*, 2001).

Bemerkenswert für die T327R-Mutante ist auch das verstärkte Auftreten von Tetrameren, die extrem resistent gegenüber hohen Ionenstärken waren (Abb. 3.11). Bei diesen Tetrameren ist zwar unklar, ob es sich dabei um zwei unspezifisch DNS-gebundene Dimere handelt oder möglicherweise um ein echtes Tetramer aus zwei miteinander interagierenden Dimeren. Zugunsten von unspezifisch gebundenen Dimeren spricht aber einerseits die mit dIdC nachgewiesene unspezifische DNS-Bindung und weiterhin das Fehlen der N-Domäne, die für die Tetramerisierung auf DNS benötigt wird (Vinkemeier *et al.*, 1996). Die Bestätigung der Hypothese eines DNS-gebundenen Tetramers durch EMSA-Experimente mit einer verkürzten Sonde, die räumlich nur Platz für die Bindung eines Dimers bietet, steht jedoch bislang noch aus. Wie bereits gezeigt wurde, beträgt die Halbwertszeit für die spezifische DNS-Bindung eines STAT1-Dimers an einfache Bindungsstellen höchstens 3-5 Minuten. Auf doppelten

Bindungsstellen kann die Halbwertszeit aufgrund kooperativer Interaktionen zwischen DNS-gebundenen STAT-Dimeren sogar bis zu 10-15 Minuten betragen (Morrigl *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Vinkemeier *et al.*, 1996; John *et al.*, 1999. Für die unspezifisch DNS bindende T327R-Mutante ist deshalb anzunehmen, dass sie mit jeglicher DNS im Zellkern interagieren und auf ihr lange Ketten aus kooperativen Dimeren bilden kann. Sie bleibt daher länger als der Wildtyp vor Dephosphorylierung geschützt und weist eine aus Vorversuchen bereits bekannte verlängerte Kernakkumulation auf. Dieser Phänotyp wurde erstmals bei der bereits erwähnten DNS^{plus}-Mutante beobachtet. Die DNS^{minus}-Mutante hingegen bindet an keinerlei DNS mehr und akkumuliert auch nicht im Zellkern. Diese Mutanten bildeten die Grundlage für ein Modell, nach dem der Kernexport von STAT1 erst nach Dephosphorylierung erfolgen kann. Die Dephosphorylierung wiederum kann durch DNS-Bindung von STAT1 verzögert werden (Meyer *et al.*, 2003). Es sind ausserdem weitere STAT1-Mutanten beschrieben, die ebenfalls ihre Spezifität für GAS-Sequenzen verloren haben, aber dennoch die gleiche Kernexport-Rate wie der Wildtyp aufweisen (McBride *et al.*, 2000; Lillemeier *et al.*, 2001). Auch bei einigen von ihnen könnte sich dieser Phänotyp mit dem Modell von Meyer *et al.* (2003) aufgrund unspezifischer DNS-Bindung erklären lassen. Dennoch ist DNS^{plus} die einzige publizierte Mutante, die zwar ihre GAS-Erkennung, aber nicht die DNS-Bindung *per se* verloren hat. Dies ermöglicht es ihr, länger als der Wildtyp im Zellkern zu akkumulieren. Letztlich erklärt für T327R der Verlust der spezifischen GAS-Erkennung auch das Fehlen der transkriptionellen Aktivierung von STAT1-Promotoren im Reporter-Experiment. Somit lassen sich die in Vorversuchen beobachtete verzögerte Dephosphorylierung, verlängerte Kernretention und reduzierte transkriptionelle Aktivität der T327R-Mutante mit dem Modell von Meyer *et al.* (2003) allesamt als Resultat einer verlängerten, aber unspezifischen DNS-Bindung hinreichend erklären.

Verlängerte Kernretention und erhöhte transkriptionelle Aktivität der H406A-Mutante sind unabhängig von der DNS-Bindung

Für die H406A-Mutante genügt dieses Erklärungsmodell jedoch nicht. H406A unterschied sich im Gegensatz zur T327R-Mutante weder in An- noch in Abwesenheit von dIdC bezüglich ihrer Zielgen-Bindungsdauer und -spezifität vom Wildtyp. Es sind jedoch für STAT1 mehrere Mutanten beschrieben, bei denen verlängerte Kernretention, verzögerte Dephosphorylierung und vom Wildtyp abweichende transkriptionelle Aktivität als von der DNS-Bindung unabhängige

Phänomene erklärt werden konnten. So führt auch die Mutation F172W in der *Coiled-Coil*-Domäne (Zhong *et al.*, 2005) zu einem ähnlichen Phänotyp, der sich ebenfalls durch einen Dephosphorylierungsdefekt äussert und deshalb eine verlängerte Kernretention bewirkt. Durch Kristallstrukturen konnte für den Aminosäurerest F172 gezeigt werden, dass er für die Stabilisierung der zur Dephosphorylierung benötigten antiparallelen Dimerkonformation kritisch ist (Mao *et al.*, 2005). In nachfolgenden Experimenten wurde für die Mutationen Q340W, G384A und Q408W in der Bindungstasche (s. Abb. 4.1), mit der der F172-Rest interagiert, ebenfalls ein Dephosphorylierungsdefekt demonstriert (Mertens *et al.*, 2006).

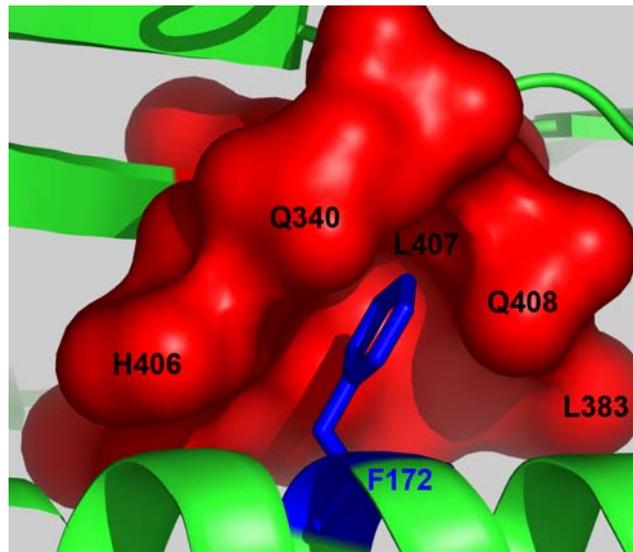


Abb. 4.1 Detailansicht der Interaktion zwischen F172 und der reziproken Bindungstasche im antiparallelen STAT1-Dimer. Die Bindungstasche (H406, Q340, L383, L407 und Q408) ist in rot und der F172-Rest in der reziproken CCD in blau hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit Pymol anhand des PDB-Koordinatensatzes 1YVL erstellt.

Auf dieser Beobachtung basierend, wurde ein Modell entwickelt, das einen Mechanismus für die Dephosphorylierung von STAT1 vorschlägt. Das phosphorylierte STAT1-Dimer lagert sich aus der parallelen in die antiparallele Konformation um. Diese Umlagerung erfolgt ohne Dissoziation, sondern wird durch die Interaktion der N-Domänen vermittelt. In der antiparallelen Konformation stabilisiert dann zusätzlich zu den N-Domänen die bereits beschriebene Bindungstasche das Dimer. Die SH2-Domänen mit dem Phospho-Tyrosinresten liegen somit exponiert vor und können von Phosphatasen ohne sterische Hinderungen erreicht und dephosphoryliert werden. Jegliche Destabilisierung der antiparallelen Konformation sollte daher die Dephosphorylierung erschweren (Mertens *et al.* 2006).

Auch die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchte Mutation H406A befindet sich in besagter Bindungstasche. Daher es ist sehr wahrscheinlich, dass sich für diese Mutante der beobachtete

Dephosphorylierungsdefekt ebenfalls durch die Destabilisierung der antiparallelen Konformation erklären lässt. Unterstützt wird die Hypothese durch die Untersuchung der F172W-Mutante durch analytische Ultrazentrifugation (AUZ), die für diese Mutation tatsächlich eine reduzierte Dimerstabilität nachgewiesen hat (Mao *et al.*, 2005). Daher bietet sich analog dazu auch für die H406A-Mutante die Überprüfung einer möglichen Destabilisierung der antiparallelen Dimerkonformation durch AUZ an. Weiterhin führt die verzögerte Dephosphorylierung zur nukleären Retention von H406A und kann, möglicherweise aufgrund wiederholter Zielgen-Bindung, die in Vorversuchen beobachtete gesteigerte transkriptionelle Aktivität im Reporteragen-Experiment erklären. Dasselbe Verhalten im Reporteragen-Experiment zeigt übrigens auch die F172W-Mutante (Dr. Uwe Vinkemeier, persönliche Kommunikation). Die Phänotypen von H406A können somit analog zu den Resultaten von Meyer *et al.* (2003 und 2004), Mao *et al.* (2005) und Mertens *et al.* (2006) plausibel erklärt werden. Demnach ist die DNS-Bindung für eine verzögerte Dephosphorylierung zwar hinreichend, aber nicht notwendig (Meyer *et al.*, 2004). Vielmehr führt jegliche Destabilisierung der antiparallelen Konformation zu einem Dephosphorylierungsdefekt (Mertens *et al.*, 2006). Mit dem Dephosphorylierungsdefekt einhergehend, könnte der verzögerte Kernexport STAT1 eine effizientere Zielgen-Aktivierung ermöglichen, wie für F172W bereits gezeigt wurde. Als weiteres Beispiel für einen von der DNS-Bindung unabhängigen Dephosphorylierungsdefekt ist die Mutation F77A in der N-Domäne zu nennen. Für diese Mutante konnte demonstriert werden, dass trotz mit dem Wildtyp vergleichbarer DNS-Bindeaktivität an einfache GAS-Stellen ebenfalls eine verlängerte Kernretention aufgrund eines Dephosphorylierungsdefekts eintritt (Meyer *et al.*, 2004). Der zum Dephosphorylierungsdefekt führende Mechanismus beruht zwar ebenso wie bei F172W auf einer Destabilisierung der antiparallelen Dimer-Konformation. Jedoch weist die F77A-Mutante bemerkenswerterweise eine reduzierte transkriptionelle Aktivität auf. Diese erklärt sich aber plausibel, weil durch die Mutation F77A dieselbe Interaktionsoberfläche in der N-Domäne gestört ist, welche sowohl die antiparallele Dimer-Konformation stabilisiert als auch die Tetramerisierung auf DNS ermöglicht.

Die bedeutende Rolle der Dimer-Umlagerung bei der Aktivierung und Inaktivierung von STAT1 lieferte den Anlass, mittels AUZ den Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung auf die Dimerisierung von STAT1-Varianten (s. Abb. 3.14) erstmalig zu untersuchen.

Unphosphoryliertes STAT1 benötigt die N-Domäne zur Bildung stabiler Dimere

Bereits die initiale Überprüfung von Homogenität und Monodispersität durch Sedimentationsgeschwindigkeits (SV)-Experimente lieferte erste Hinweise, dass nicht nur phosphoryliertes, sondern auch unphosphoryliertes STAT1 in einem Gleichgewicht aus Assoziation und Dissoziation mit einer Dissoziationsrate von ca. 10^{-4} /Sek. steht (Abb. 3.15). Ausserdem lieferten die SV-Experimente die Information, dass die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_d) im mikro- bis nanomolaren Bereich liegen. Um jedoch eine präzise Aussage über die thermodynamische Stabilität der Oligomere machen zu können, wurden Sedimentationsgleichgewichts-Experimente durchgeführt, deren Resultate in Tab. 3.3 zusammengefasst sind. Diese Daten belegen, dass unphosphoryliertes STAT1 für die Bildung stabiler Dimere mit K_d -Werten von ca. 50 nM unbedingt der N-Domäne bedarf, da sich bei Deletion der N-Domäne die Dimerstabilität um den Faktor 100 auf eine K_d von 3-4 μ M reduziert (Abb. 3.18A; s.a. Abb. 4.2A und B). Damit stehen die Daten in guter Übereinstimmung mit denen aus einer vorherigen AUZ-Studie, die ähnliche K_d -Werte für das unphosphorylierte STAT1 geliefert und ebenfalls den essentiellen Einfluss der N-Domäne auf die Dimerisierung des unphosphorylierten STAT1 nachgewiesen hat (Mao *et al.*, 2005). Es existiert noch eine weitere Arbeit zur Dimerisierung von unphosphoryliertem STAT1 und STAT3 (Braunstein *et al.*, 2003). Die darin ermittelten K_d -Werte liegen im mittleren mikromolaren Bereich und sind damit um drei Grössenordnungen höher als die in der vorliegenden Arbeit. Die Resultate von Braunstein *et al.* sind jedoch aufgrund methodischer Fehler bei der Datenanalyse nicht verwertbar, da ihre angegebenen K_d -Werte ausserhalb des von ihnen in der AUZ untersuchten Proteinkonzentrationsbereichs lagen.

STAT1-Dimere sind vor und nach Phosphorylierung gleich stabil

Weiterhin wurde der Einfluss der Phosphorylierung am Tyrosinrest 701 auf die Selbstassoziation analysiert. Bisher wurde allgemein angenommen, dass STAT1-Proteine erst nach Phosphorylierung stabile Dimere bilden (Shuai *et al.*, 1994; Hennighausen und Robinson, 2008). Beim Vergleich zwischen den unphosphorylierten und phosphorylierten STAT1 α - und STAT1 β -Proteinen stellte sich jedoch überraschenderweise heraus, dass die Stabilität der Dimere nach Phosphorylierung nicht zunimmt (Abb. 3.18B). Sowohl die beiden phosphorylierten als auch die beiden unphosphorylierten STAT1-Varianten weisen statistisch identische K_d -Werte von ca.

30-50 nM auf (s.a. Abb. 4.2A und C). Die Phosphotyrosin:SH2-Interaktion ist unter Verwendung von isolierten SH2-Domänen und Phosphopeptiden bereits gut charakterisiert (Müller et al., 1992; Felder et al., 1993). Auch für STAT1 liegen seit längerem Interaktionsdaten vor, die aus Fluoreszenz-Polarisations- und Oberflächen-Plasmonresonanz-Messungen mit dem gereinigten unphosphorylierten Protein und vom IFN γ -Rezeptor abgeleiteten Phosphopeptiden erhalten wurden (Greenlund *et al.*, 1995; Schindler *et al.*, 1995). Jedoch handelt es sich nach meinem Wissen bei der von mir durchgeführten Untersuchung der Stabilität von Phosphotyrosin:SH2-Interaktionen um die erste Studie überhaupt, die diese Wechselwirkung zwischen Vollelänge-Proteinen charakterisiert. Die dabei erhaltenen Resultate stehen in exakter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben erwähnten Interaktions-Studien von Phosphopeptiden mit STAT1, die K_d -Werte von ca. 140 bzw. ca. 50 nM lieferten (Greenlund *et al.*, 1995; Schindler *et al.*, 1995). Aus dem Vergleich mit meinen Daten kann somit geschlossen werden, dass die Bindungsenergie für die Phosphotyrosin:SH2-Interaktion tatsächlich vom Phosphotyrosinrest stammt. Ausserdem kann aus den bisher diskutierten Resultaten gefolgert werden, dass die über ND-Wechselwirkungen stabilisierten unphosphorylierten STAT1-Dimere dieselbe thermodynamische Stabilität aufweisen wie die über reziproke Phosphotyrosin:SH2-Interaktionen stabilisierten Phospho-Dimere.

Im Gegensatz zum unphosphorylierten Protein ergab sich für die phosphorylierten STAT1-Varianten anhand der ähnlichen K_d -Werte von ca. 20-50 nM keine Abhängigkeit des Ausmasses der Dimerisierung von der Präsenz der N-Domäne (Abb. 3.18C). Aufgrund der vergleichbaren DNS-Bindungsaktivitäten von phosphoryliertem STAT1tc und STAT1 α in EMSA-Experimenten (Vinkemeier et al., 1996) und den Kristallstrukturen von phosphoryliertem DNS-gebundenem STAT1tc (Chen *et al.*, 1998) und STAT3tc (Soler-Lopez *et al.*, 2004) war eine Beteiligung der N-Domänen an der Stabilisierung des Phospho-Dimers jedoch auch nicht erwartet worden. Vielmehr bestätigt sich, dass die reziproken Phosphotyrosin:SH2-Domänen-Interaktionen für Stabilisierung der Phospho-Dimere genügen (s.a. Abb. 4.2C und D). Somit scheinen in Lösung die phosphorylierten und unphosphorylierten Dimere in der parallelen bzw. antiparallelen Konformation vorzuliegen, wie es sich auch in den Kristallstrukturen darstellt.

Eine wichtige Konsequenz der reziproken Interaktion der SH2-Domänen nach Tyrosin-Phosphorylierung ist die Freisetzung der N-Domänen, die beim unphosphorylierten Dimer in Wechselwirkungen zwischen den Monomeren involviert waren. Stattdessen können nun die N-

Domänen für Inter-Dimer-Interaktionen rekrutiert werden. Dies wurde durch das Auftreten von Tetrameren deutlich (Abb. 3.18C), die die ND:ND-Interaktionen zwischen den Dimeren benötigten. Bemerkenswerterweise konnten einzig für phosphoryliertes STAT1 α (Tab. 3.4 und Abb. 3.17), aber nicht für phosphoryliertes STAT1 β (Tab. 3.2 und Abb. 3.16) Tetramere in einem Gleichgewichtssystem mit Monomeren und Dimeren detektiert werden. Der K_d -Wert für den Monomer-Dimer-Anteil lag im selben Konzentrationsbereich wie für die anderen Phospho-Proteine bei ca. 30-40 nM, aber auch die Dimer-Tetramer- K_d wurde in der gleichen Grössenordnung bei ca. 80-140 nM ermittelt. Damit stellte sich eindeutig heraus, dass die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren im Dimer einerseits und zwischen den Dimeren im Tetramer andererseits etwa gleich stark sind. Die Stabilisierung der Interaktion mit DNS durch zwei an benachbarte GAS-Stellen bindende Dimere aufgrund kooperativ wirkender ND:ND-Interaktionen (Vinkemeier *et al.*, 1996) wurde bereits demonstriert und konnte in dieser Arbeit anhand signifikant längerer Halbwertszeiten für benachbarte GAS-Stellen (2x GAS) bestätigt werden (Abb. 3.8). Aufgrund der Windung der DNS-Doppelhelix können bei benachbarten Bindestellen mit einem Abstand von ca. 10 Nukleotiden nur zwei N-Domänen zwischen den Dimeren interagieren (Rhodes und Schwabe, 1998). Daher können die zwei freien N-Domänen mit anderen STAT-Dimeren interagieren und auf DNS potentiell unlimitierte Ketten aus kooperativen Dimeren bilden (Vinkemeier *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996).

In Abwesenheit von DNS erscheint hingegen die gleichzeitige Interaktion aller vier N-Domänen im Tetramer möglich. Deshalb kann vermutet werden, dass das Tetramer den höchsten Oligomerisierungsgrad für nicht an DNS gebundenes STAT1 darstellt. Demnach sind die Tetramere des DNS-gebundenen und -ungebundenen Phospho-STAT1 α wahrscheinlich nicht identisch (s. 4.2C, Konf. I und II). Interessanterweise bilden STAT1 β -Dimere keine höheren Oligomere, woraus sich der Schluss ziehen lässt, dass möglicherweise die Transaktivierungsdomäne eine weitere Interaktionsfläche zwischen den Dimeren bietet. Die Unterschiede im Ausmass der Tetramerbildung konnten durch die kovalente Vernetzung mit Glutaraldehyd bei Proteinkonzentrationen von 50 nM bestätigt werden (Abb. 3.19). Damit demonstrieren diese Resultate, dass die Tyrosin-Phosphorylierung im Vergleich zum unphosphorylierten Zustand keine zusätzliche Stabilisierung der Interaktion zwischen STAT1 α - bzw. STAT1 β -Monomeren bewirkt. Vielmehr stellte sich heraus, dass Phospho-STAT1 im Vergleich zum unphosphorylierten STAT1 in einer anderen Konformation dimerisiert, in der die

freien N-Domänen zwischen den Dimeren interagieren und somit STAT1-Tetramere erzeugen können.

Die Dimerisierung der N-Domänen ist in der STAT-Familie nicht konserviert

Aufgrund der wichtigen Rolle der ND:ND-Interaktion für die Bildung von Dimeren und Tetrameren wurde die Selbstassoziation der isolierten N-Domänen von STAT1, STAT3 und STAT4 ebenfalls untersucht. Sie bildeten trotz hoher Konservierung auf der Ebene von Struktur (Vinkemeier *et al.*, 1998) und Aminosäuresequenz (Abb. 1.3) zwar Dimere, wie bereits qualitativ im Hefe-2-Hybrid-System von Ota *et al.* (2004) demonstriert wurde. Erstaunlicherweise variieren die N-Domänen jedoch in ihrer Stabilität sehr deutlich im Vergleich untereinander. Während die N-Domänen von STAT1 und -4 im mikromolaren K_d -Bereich Dimere bildeten, die in ihrer Stabilität mit den bekannten Glutathion-S-Transferase-Dimeren ($K_d=0,4 \mu\text{M}$) vergleichbar sind (Vargo *et al.*, 2004), war die K_d der STAT3-ND mit ca. 3 mM um etwa drei Größenordnungen höher (Abb. 3.18D). Falls STAT1 und STAT3 in der selben zellulären Konzentration (ca. 40 nM) vorliegen sollten, wären somit die N-Domänen von STAT3 nicht in der Lage, den monomeren Status zu überwinden. Ausserdem unterscheidet sich die Stabilität der ND-Dimere auch sehr deutlich von den nano- bis mikromolaren K_d -Werten der STAT1-Varianten α , β , ΔN und tc.

Dies wirft jedoch die wichtige Frage auf, ob die schwache Dimerisierung der STAT3-ND sich auch negativ auf die Dimerisierung des unphosphorylierten Vollelänge-STAT3 auswirkt. Die bereits diskutierte Studie von Braunstein *et al.* (2003) lieferte für unphosphoryliertes STAT1 und STAT3 ähnliche Dimerstabilitäten mit K_d -Werten von ca. 150-200 μM . Trotz der bereits diskutierten Fehlinterpretation ihrer Daten scheint sich zumindest qualitativ herauszustellen, dass möglicherweise weitere Interaktionsoberflächen im STAT3-Protein die schwache ND-Dimerisierung kompensieren könnten. Zur Unterstützung der Annahme zusätzlicher Interaktionsflächen kann die Kristallstruktur von unphosphoryliertem STAT1 herangezogen werden, die zusätzlich zu den ND:ND-Interaktionen auch die reziproken Interaktionen der DNS-bindenden und CC-Domänen demonstriert. Weiterhin konnten Zhang *et al.* (2006) durch den Vergleich von STAT3 α und STAT3- ΔN zeigen, dass im Gegensatz zu STAT1 und STAT4 die STAT3-ND keine wichtige Rolle im STAT3-Signalweg spielt. Vielmehr demonstrieren sie, dass sowohl die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungskinetiken als auch die Kernakkumulation und die transkriptionelle Aktivität von STAT3 vollkommen unabhängig von

der N-Domäne sind. Andererseits konnten Ren *et al.* (2008) in MALS (Multiangle Light Scattering)-Experimenten zeigen, dass unphosphoryliertes STAT3tc in Lösung selbst bei Konzentrationen von ca. 25 μM nur als Monomer vorliegt, während U-STAT3 α bereits bei ca. 1 μM als Dimer vorliegt. Daraus ergibt sich zwar ein klarer Einfluss der N-Domäne auf die Dimerisierung von STAT3, jedoch liegt auch für das Vollelänge-Protein die K_d um etwa zwei Grössenordnungen über der des unphosphorylierten STAT1 α . Damit scheint sich die schwächere Dimerisierung der STAT3-ND auch auf das Vollelänge-Protein auszuwirken. Möglicherweise spielen für STAT3 Lysin-Azetylierungen in der N- oder SH2-Domäne eine wichtige Rolle bei der Bildung stabiler Dimere (Ray *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005). Aufgrund der widersprüchlichen Resultate über den Beitrag der N-Domänen bei der Stabilisierung von unphosphorylierten STAT3-Dimeren könnten zukünftige AUZ-Untersuchungen zeigen, inwieweit sich die reduzierte Dimerstabilität der isolierten N-Domänen tatsächlich auf das Vollelänge-STAT3 auswirkt.

Die Tyrosin-Phosphorylierung reguliert die Koexistenz von STAT1-Dimeren in der parallelen und antiparallelen Konformation

Obwohl die Resultate der AUZ die Existenz des unphosphorylierten STAT1-Dimers in der antiparallelen und des phosphorylierten Dimers in der parallelen Konformation demonstrierten, blieb unklar, ob diese Konformationen ausschliesslich bei den jeweiligen Phosphorylierungszuständen auftreten. Um diese Frage zu klären, wurde die DNS-Bindung der STAT1-Proteine untersucht. Kristallstrukturen von DNS-gebundenem phosphoryliertem STAT3 bzw. STAT1 (Becker *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998) zeigen, dass die STAT1:DNS-Interaktion in der parallelen Konformation stattfinden kann. Deshalb kann die DNS-Bindung als Indikator für die parallele Dimer-Konformation verwendet werden. In EMSA-Experimenten wurde daher die DNS-Bindung von unphosphoryliertem STAT1 untersucht.

Wie in Abb. 3.23 anhand der Titration steigender Konzentrationen an phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 gegen eine konstante Sondenkonzentration gezeigt ist, konnte das Phosphoprotein wie erwartet an die M67-Sonde binden. Überraschenderweise wurde auch die Interaktion des unphosphorylierten Proteins mit der DNS detektiert. Da sich die relative Mobilität des unphosphorylierten nicht vom phosphorylierten Komplex unterschied, kann angenommen werden, dass es sich auch beim unphosphorylierten DNS-gebundenen STAT1 um ein Dimer handelt. Die um den Faktor 200 geringere Bindungsaktivität impliziert jedoch, dass nur ca. 0,5%

des unphosphorylierten Proteins in einer DNS-bindenden Konformation vorlagen. Bei ähnlichen Proteinkonzentrationen (ca. 200 nM) konnten bereits Chatterjee-Kishore *et al.* (2000) die DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1-Dimers demonstrieren. In ihren Experimenten detektierten sie erstaunlicherweise auch eine Spezies mit höherer Mobilität, die sie als Monomere interpretiert haben. Jedoch konnte eine solche Spezies in der hier vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden, und auch in anderen Publikationen wurden bislang noch keine DNS-gebundenen STAT1-Monomere beschrieben.

Die Hypothese, dass unphosphoryliertes STAT1 als paralleles Dimer an DNS bindet, wurde durch weitere Experimente erhärtet. Dazu wurden Mutanten generiert, die durch selektive Destabilisierung definierter Dimer-Interaktionen die Dimerisierung in einer bestimmten Konformation verhindern (Abb. 3.21). Zunächst wurde durch die Deletion der N-Domäne das antiparallele Dimer destabilisiert. Beim Vergleich zwischen dem unphosphorylierten STAT1_{tc} und STAT1 α zeigte sich jedoch, dass die Deletion der N-Domäne die DNS-Bindungsaktivität nicht reduzierte, sondern im Vergleich zu STAT1 α sogar vierfach erhöhte (Abb. 3.24, Bahnen 1-3 vs. 7-9). Durch die Verwendung der F172W-Mutante, bei der die antiparallele Konformation zusätzlich destabilisiert wird (Mao *et al.*, 2005), zeigte sich ebenfalls keine Reduktion der DNS-Bindung (Abb. 3.24, Bahnen 4-6 vs. 1-3). Damit ist direkt demonstriert, dass die DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1-Dimers nicht in der antiparallelen Konformation stattfindet.

Nach dem bereits diskutierten Modell von Mertens *et al.* (2006) wird die Umlagerung von der parallelen in die zur Dephosphorylierung benötigte antiparallele Dimer-Konformation durch Interaktionen der N-Domänen stabilisiert. Die durch Kristallstrukturen nachgewiesenen antiparallelen Dimere bilden die Grundlage der Hypothese, wonach Phosphatasen in dieser Konformation direkten Zugang zu den Phosphotyrosin-Resten in den exponierten SH2-Domänen erhalten. Jegliche Destabilisierung der antiparallelen Konformation sollte daher zu einem Dephosphorylierungs-Defekt führen. Daher erklärt das Modell sehr überzeugend, weshalb N-terminale Deletionsmutanten, die F172W-Mutante und auch Bindungstaschen-Mutanten (s. Abb. 4.1) nicht mehr dephosphoryliert werden können. Ein Detail dieses Modells, nämlich dass die Konformationsumlagerung durch N-Domänen-Interaktionen vermittelt werden könnte, kann jedoch aufgrund der in der hier vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht aufrechterhalten werden. Einerseits wäre in den EMSA-Experimenten im Vergleich mit unphosphoryliertem STAT1_{tc} für STAT1 α eine bessere DNS-Bindung zu erwarten gewesen, weil nach dem Modell

von Mertens *et al.* zuerst ein Monomer an DNS binden und über die N-Domänen-Interaktion ein zweites Monomer rekrutieren könnte. Dementgegen stellte sich für STAT1 α jedoch eine vierfach reduzierte DNS-Bindung heraus. Dieses Resultat bestätigt die Erwartung, dass die Anwesenheit der N-Domänen die DNS-Bindung behindert, denn in diesem Fall ist das antiparallele Dimer stabiler als das parallele und die Umlagerung zum parallelen Dimer daher erschwert. Gegen das Modell der N-Domänen-vermittelten Umlagerung sprechen weiterhin die Resultate der analytischen Ultrazentrifugation zur Selbstassoziation der isolierten N-Domänen. Es ist schwer vorstellbar, dass die N-Domänen während der Umlagerung des parallelen Phospho-Dimers weiterhin assoziiert bleiben, während sich die Interaktion zwischen den SH2-Domänen (K_d ca. 50 nM) löst. Abgesehen davon zeigen die AUZ- und EMSA-Resultate, dass die gleichzeitige Interaktion der SH2- und N-Domänen im selben Dimer nicht stattfindet. So führte in den AUZ-Experimenten die Anwesenheit der N-Domäne bei STAT1 α im Vergleich zu den ΔN -Mutanten zu keiner zusätzlichen Stabilisierung der Phospho-Dimere. Ausserdem schliesst die Existenz von Tetrameren, die sich nur nach Phosphorylierung bilden, ebenfalls die gleichzeitige Interaktion von SH2- und N-Domänen im selben Dimer aus. Weiterhin stellte sich in EMSA-Experimenten heraus, dass nach Inhibition der SH2-Interaktionen mit 6-NBT die DNS-Bindungsaktivität reduziert wird und die N-Domänen keinen Beitrag zur Stabilisierung der DNS-gebundenen Dimere leisten. Es erscheint somit ausgeschlossen, dass die Umlagerung durch N-Domänen-Interaktionen vermittelt werden kann. Vielmehr muss die Dimer-Umlagerung durch vollständige Dissoziation der Dimere und anschliessende Reassoziierung der Monomere erfolgen.

Die bisher diskutierten EMSA-Resultate beweisen für sich genommen noch nicht, dass unphosphorylierte Dimere in der parallelen Konformation an DNS binden. Daher wurden weitere Experimente durchgeführt, die eindeutig die reziproke Interaktion der SH2-Domänen im unphosphorylierten Dimer belegen sollten. Durch Behandlung mit dem nicht-peptidischen Inhibitor 6-NBT (Schust *et al.*, 2006) konnte durch irreversible Blockierung der SH2-Interaktionsoberfläche die DNS-Bindung um die Hälfte reduziert werden (Abb. 3.25A). Auch beim als Kontrolle verwendeten phosphorylierten STAT1tc zeigte sich eine sehr ähnliche Reduktion der Bindungsaktivität. Da sich das unphosphorylierte Dimer genauso wie das Phospho-Dimer verhielt, spricht dieses Resultat stark für ein in paralleler Konformation an DNS gebundenes unphosphoryliertes Dimer. Zur weiteren Bestätigung wurden zwei zusätzliche Mutanten erzeugt, bei denen der kritische Tyrosinrest 701 durch Alanin oder Arginin (Melen *et*

al., 2001) ersetzt wurde (Abb. 3.21). Obwohl die Mutanten in der Grössenausschluss-Chromatographie gleichermassen Dimere bildeten (Abb. 3.22), unterschieden sie sich in der DNS-Bindung durch eine zwölfmal geringere Bindungsaktivität deutlich vom unphosphorylierten Wildtyp (Abb. 3.25B). Diese Reduktion der DNS-Bindung deutet auf eine verringerte Anzahl an parallelen Dimeren hin und demonstriert, dass auch im unphosphorylierten Zustand die Tyrosin-Seitenkette für die parallele Konformation benötigt wird.

Letztlich konnte gezeigt werden, dass die DNS-Bindung des phosphorylierten und unphosphorylierten STAT1 bei Verwendung einer unspezifischen Kompetitor-Sonde nicht beeinflusst wurde. Durch einen Überschuss des unmarkierten spezifischen Kompetitors hingegen konnten die phosphorylierten und unphosphorylierten Dimere gleichermassen von der radioaktiv markierten Sonde verdrängt werden (Abb.3.26A). Damit ist demonstriert, dass beide Dimerformen dieselben spezifischen Kontakte mit DNS ausbilden. Dennoch war das parallele unphosphorylierte STAT1-Dimer weniger resistent gegenüber hohen Ionenstärken als das phosphorylierte STAT1 (Abb. 3.26B). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die DNS-Bindung des unphosphorylierten STAT1 trotz identischer Kontakte mit der DNS schwächer ist als beim phosphorylierten STAT1, weil die unphosphorylierten SH2-Dimere weniger stabil sind als phosphorylierte SH2-Dimere.

Die EMSA-Experimente demonstrieren, dass unphosphoryliertes STAT1 nur in der parallelen Konformation DNS binden kann und schliessen dies für das antiparallele Dimer im Gegenzug aus. Jedoch liegt der Anteil des unphosphorylierten STAT1 in paralleler Konformation nur bei ca. 0,5%, im Gegensatz zu den 99,5% des unphosphorylierten Proteins in der antiparallelen Konformation. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Dissoziationsrate des parallelen U-STAT1 wesentlich höher sein muss als die des antiparallelen unphosphorylierten STAT1. Wie bereits diskutiert wurde, wurden in den EMSA-Experimenten ca. 200-fach höhere Konzentrationen an unphosphoryliertem STAT1 benötigt, um ähnliche Bindungsaktivitäten wie beim Phosphoprotein zu erreichen. Daher kann der K_d -Wert des unphosphorylierten parallelen Dimers auf ca. 10 μ M geschätzt werden (s. Abb. 4.2A und B). Damit wird wiederum eine Rolle des unphosphorylierten STAT1-Dimers als autonomer Transkriptionsfaktor ohne weitere Kofaktoren in lebenden Zellen unwahrscheinlich. Allerdings haben Arbeiten aus dem Labor von Dr. G. R. Stark gezeigt, dass unphosphoryliertes STAT1 im Komplex mit IRF1 und

unphosphoryliertes STAT3 im Komplex mit NF- κ B *in vivo* an Promotoren binden und transkriptionell aktiv sind (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2007).

Weiterhin implizieren die Resultate aufgrund der Existenz des unphosphorylierten STAT1 in beiden Dimer-Konformationen im Umkehrschluss auch die Existenz des Phosphoproteins in beiden Konformationen. Dies wäre gemäss dem Modell von Mertens *et al.* auch zu erwarten, da sich das Phospho-Dimer zur Dephosphorylierung ebenfalls in die antiparallele Konformation umlagern muss. Die Klärung, ob sich die Anteile an beiden Konformationen jedoch wie beim unphosphorylierten STAT1 stark unterscheiden, oder ob beide Konformationen des Phosphoproteins gleich häufig auftreten, bleibt zukünftigen Experimenten vorbehalten. Da beide Dimerkonformationen thermodynamisch gleich stabil sind, ist davon auszugehen, dass sie beim Phosphoprotein auch tatsächlich zu etwa gleichen Anteilen vorliegen. Zur Überprüfung der Hypothese wären Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente hervorragend geeignet.

Die vorgestellten Daten zur Charakterisierung der Dimerisierungseigenschaften bilden die Grundlage zum Verständnis der Mechanismen der STAT1-Selbstassoziation in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand in der lebenden Zelle. In Abb. 4.2 sind die Resultate deshalb unter Verwendung aller verfügbaren Informationen aus den AUZ- und EMSA-Experimenten und unter Berücksichtigung der sich aus den Kristallstrukturen ergebenden Dimer-Konformationen in einem Modell zusammengefasst, das möglicherweise generell für die Zytokin-induzierte Konformationsumlagerung der STATs gültig ist. Demnach erfolgt der Wechsel zwischen der antiparallelen und parallelen Konformation nicht aus einem bereits existierenden Dimer, sondern durch eine spontane Dissoziations- und Reassoziationsreaktion, wobei die Tyrosinphosphorylierung die Häufigkeit beider Dimer-Konformationen reguliert. Das unphosphorylierte Dimer wird über die Interaktionen der N-Domänen in der antiparallelen Konformation stabilisiert. Ein kleiner Anteil des unphosphorylierten STAT1 liegt gleichzeitig auch in der parallelen Konformation vor (Abb. 4.2A und B). Durch STAT1-Aktivierung wird der Anteil der Phosphotyrosin:SH2-Interaktionen erhöht und die schwach affinen in hoch-affine Wechselwirkungen mit einer K_d von 50 nM umgewandelt (Abb. 4.2C). Die N-Domänen können nun eine offene Konformation einnehmen, die die Tetramerisierung ($K_d=100$ nM) ermöglicht. In Lösung tragen wahrscheinlich alle vier N-Domänen zum Tetramer bei (Abb. 4.2C, Konf. I), während im DNS-gebundenen Zustand nur Konformation II möglich ist. Weiterhin schliessen sich bei STAT1 die gleichzeitigen Interaktionen der N- und SH2-Domänen im selben Dimer aus.

Da das unphosphorylierte STAT1 in beiden Konformation existiert und die K_d -Werte der Dimere vor und nach Phosphorylierung identisch sind, ist davon auszugehen, dass auch phosphorylierte STAT1-Dimere in beiden Konformationen mit gleicher Stabilität ($K_d=50$ nM) vorliegen (Abb. 4.2D).

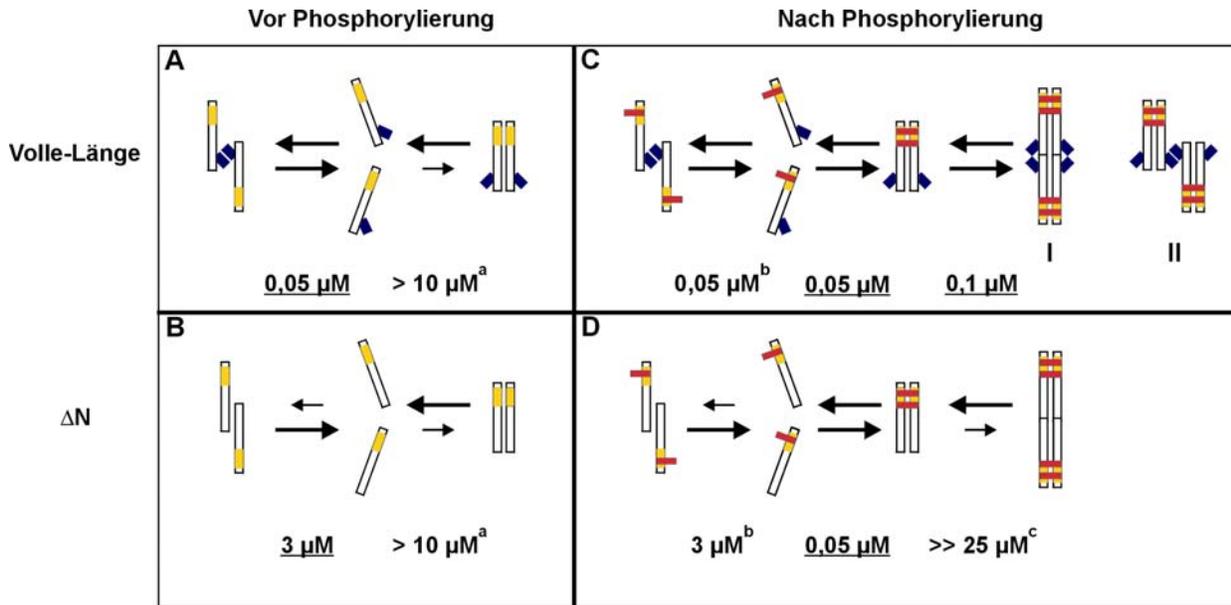


Abb. 4.2 Modell der Oligomerisierung von STAT1 vor (A und B) und nach (C und D) Tyrosin-Phosphorylierung. Die N-Domänen sind in lila, die SH2-Domänen in gelb und der phosphorylierte Tyrosinrest 701 in rot gekennzeichnet. I und II repräsentieren zwei mögliche Tetramer-Konformationen von STAT1 α . Weiterhin sind die K_d -Werte für Volle-Länge- und die ΔN -Varianten von STAT1. Unterstrichene Werte wurden direkt aus SE-Experimenten erhalten. ^a K_d abgeschätzt aus EMSA-Experimenten; ^b K_d übertragen aus der Dimerisierung des unphosphorylierten STAT1; ^c K_d überschreitet den durch die AUZ abgedeckten Konzentrationsbereich.

Die zeitliche Stabilität beider Dimer-Konformationen hat eine physiologische Bedeutung bei der Inaktivierung von STAT1

Die Existenz stabiler unphosphorylierter STAT1-Dimere wirft die Frage auf, wie sich die ermittelten K_d -Werte im Vergleich zur endogenen STAT1-Konzentration in der lebenden Zelle verhalten. Die Konzentration an endogenem STAT1 konnte als 40 ± 7 nM, das entspricht ca. 100.000 Molekülen pro Zelle, angegeben werden (Abb. 3.27A). Damit liegt STAT1 in der Zelle in ähnlicher Konzentration vor wie andere Transkriptionsfaktoren, z.B. SMADs (Schmierer *et al.*, 2008). Zu beachten ist beim Vergleich der endogenen STAT1-Konzentration mit dem ermittelten K_d -Wert, dass die Gesamtkonzentration aller zellulären Proteine wesentlich höher ist als 40 nM und sich *in vivo* dadurch nicht-ideale Beeinträchtigungen der Diffusion ("Crowding"-Effekte) der Proteine in der Zelle bemerkbar machen könnten (Dix und Verkman, 2008). Nach gängiger

Auffassung würde dies sich jedoch nicht nachteilig auf die Dimerisierung von Proteinen auswirken. Es ist im Gegenteil eher anzunehmen, dass dadurch die Reassoziierung von zerfallenen Dimeren begünstigt wird, weil sich die Monomere aufgrund der durch andere Proteine behinderten Diffusion nicht weit voneinander entfernen können. Daher ist in lebenden Zellen der Anteil an dimerisiertem Protein möglicherweise höher als die ermittelten K_d -Werten vermuten lassen. Alternativ könnten die *in vitro*- K_d -Werte unverändert auf die Situation in der Zelle übertragen werden, falls sich in der Zelle keine *Crowding*-Effekte bemerkbar machen sollten. In beiden Fällen ist in lebenden Zellen aufgrund der mit den K_d -Werten übereinstimmenden endogenen STAT1-Konzentration das gleichzeitige Auftreten von unphosphorylierten Monomeren und Dimeren zu gleichen Anteilen somit sehr wahrscheinlich. Damit besteht die Möglichkeit, dass es in der Tat das unphosphorylierte Dimer sein könnte, das mit dem Rezeptor assoziiert, wie von Mao *et al.* (2005) angenommen wird, und nicht das Monomer, welches gemäss dem veralteten Modell erst nach Aktivierung dimerisiert (Shuai *et al.*, 1994). Für STAT4 könnte die Hypothese von unphosphorylierten Rezeptor-gebundenen Dimeren durchaus zutreffen, da ΔN -Mutanten, die keine Dimere mehr bilden können, *in vivo* wesentlich schlechter phosphoryliert werden als der Wildtyp (Chang *et al.*, 2003). Für STAT1 jedoch ist bekannt, dass auch unphosphorylierte N-terminale Deletionsmutanten trotz stark reduzierter Dimerstabilität genauso effizient wie der Wildtyp phosphoryliert werden können (Marg et al., 2004).

Die Ermittlung eines maximalen Anteils an Phosphoprotein in der IFN γ -stimulierten Zelle von ca. 35% (Abb. 3.27B) machte in Kombination mit den ermittelten K_d -Werten für phosphoryliertes und unphosphoryliertes STAT1 α und β die Aussage möglich, dass sich im Verlauf der STAT-Aktivierung die Gesamtkonzentration beider Dimer-Formen vermutlich nicht wesentlich ändert. Stattdessen existiert STAT1 in zwei verschiedenen Konformationen, für deren zeitliche Stabilität jedoch bisher keine Daten vorlagen. Die weitreichende physiologische Bedeutung der zeitlichen Stabilität beider Dimerkonformationen zeigt sich im Zyklus von Aktivierung und Inaktivierung der STATs. Gemäss den EMSA-Resultaten ist nur das phosphorylierte STAT1 in der Lage, bei physiologischen Konzentrationen stabile parallele Dimere zu bilden. Daher ist die Phosphorylierung die entscheidende Voraussetzung für die DNS-Bindung und somit die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen. Nach Dissoziation von der DNS kann das Protein dephosphoryliert und ins Zytoplasma exportiert werden, wo es für einen erneuten Aktivierungszyklus zur Verfügung steht. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im

gesamten Kreislauf ist jedoch offenbar nicht die DNS-Bindung, die lediglich eine Halbwertszeit von wenigen Minuten aufweist und nur während dieser Zeit eine STAT-Dephosphorylierung verhindert (Meyer *et al.*, 2003). Vielmehr scheint es sich beim entscheidenden, weil langsamsten Schritt um die Dissoziation der parallelen Phospho-Dimere zu handeln. Erst danach kann die antiparallele Konformation eingenommen werden, die Voraussetzung für die Dephosphorylierungsreaktion ist. Nach Extraktion hydrodynamischer Parameter aus den Kristallstrukturen für das parallele und antiparallele Dimer konnten mithilfe der experimentell ermittelten K_d -Werte kinetische Ratenkonstanten abgeschätzt werden. Zwei voneinander unabhängige Lösungsansätze lieferten ähnliche Dimer-Halbwertszeiten von ca. 20-50 Minuten für beide Konformationen (Tab. 3.5). Damit ist zwar die thermodynamische Stabilität von STAT1-Dimeren durchaus vergleichbar mit einer für Antikörper:Antigen-Komplexe eher schwach affinen Interaktion wie im Fall von IgG: β -Galaktosidase-Immunkomplexen (K_d ca. 5 nM). Die Halbwertszeit der erwähnten Immunkomplexe ist jedoch mit ca. 9 Stunden (Kennedy *et al.*, 1994) um den Faktor 20-30 höher als bei der Interaktion zweier STAT1-Monomere. Als weitaus aufschlussreicher stellt sich allerdings der Vergleich der Dimer-Stabilität von STAT1 mit der zeitlichen Stabilität anderer Komponenten des Zytokin-Signalwegs heraus. So weist die Interaktion von IL2 mit dem IL2-Rezeptor ebenfalls einen K_d -Wert von ca. 6 nM auf. Die Halbwertszeit des IL2:IL2-Rezeptor-Komplexes ist jedoch mit etwa 10 Sekunden (Siess *et al.*, 1989) ca. 30-fach niedriger als beim STAT1-Dimer. Hingegen liefern die Daten von Greenlund *et al.* (1995) für die Bindung des unphosphorylierten STAT1 an ein phosphoryliertes IFN γ -Rezeptor-Peptid eine etwas längere Halbwertszeit von ca. 3-5 Minuten (eigene unveröffentlichte Berechnungen). Im Kontext der Zytokinsignal-Verarbeitung stellt sich somit heraus, dass die Dissoziation der STAT1-Dimere der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein scheint. Wie oben beim Vergleich der isolierten N-Domänen bereits diskutiert, findet die Dimerumlagerung nicht unter Vermittlung von ND-Interaktionen statt, sondern durch Dissoziation des parallelen Phosphodimers und Reassoziierung in der antiparallelen Konformation. Somit kann die Dephosphorylierung frühestens 20 Minuten nach beendeter DNS-Bindung erfolgen. Damit sind die vorliegenden Daten mit dem von Haspel und Darnell (1999) *in vivo* und von Meyer *et al.* (2003) *in vitro* untersuchten zeitlichen Verlauf der STAT1-Inaktivierung konsistent. Obwohl die Dimer-Halbwertszeit von bis zu 50 Minuten sehr lang erscheint, bleibt dennoch zu bedenken, dass die Abschätzung auf reinen *in vitro*-Daten basiert. Ausserdem wurden während der

Proteinreinigung zelluläre Proteine, die möglicherweise eine beschleunigte Umlagerung des Phospho-Dimers unterstützen könnten, entfernt und konnten daher nicht mit einbezogen werden. Als ein möglicher Faktor wurde kürzlich β -Arrestin1 identifiziert, das mit STAT1 interagiert und dessen Dephosphorylierung durch einen bislang unbekanntem Mechanismus beschleunigt (Mo *et al.*, 2008).

Diese Überlegungen rücken die Frage in den Mittelpunkt, ob die Dephosphorylierung durch die Geschwindigkeit der Dimerumlagerung limitiert wird. Dieser Aspekt ist von entscheidender Bedeutung für die zeitliche Auflösung der Signalverarbeitung in der Zelle. Bei einer niedrigen Zerfallsrate der STAT1-Dimere würde die Zelle möglicherweise auf einen kurzen Stimulus genauso intensiv reagieren wie auf ein Signal, das länger als die Dimer-Halbwertszeit andauert. In zukünftigen Untersuchungen muss deshalb überprüft werden, ob die modellierten kinetischen Dimer-Stabilitäten tatsächlich die Situation in der lebenden Zelle widerspiegeln.

5 Zusammenfassung

Das zentrale Ereignis in der Verarbeitung von Zytokinsignalen ist die Phosphorylierung von STAT-Proteinen, die dadurch in DNS-bindende Transkriptionsfaktoren umgewandelt werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die DNS-Bindung von zwei STAT1-Varianten mit Mutationen in der DNS-Bindedomäne untersucht. Die T327R-Mutante zeigte eine verlängerte und unspezifische DNS-Bindung, die ihre in Vorversuchen beobachtete verlängerte Kernretention und transkriptionelle Inaktivität vollständig erklärt. Die H406A-Mutante hingegen war dem Wildtyp in der DNS-Bindungsspezifität sehr ähnlich. Allerdings könnte diese Mutation die zur Dephosphorylierung benötigte antiparallele Dimerkonformation destabilisieren und so die gesteigerte transkriptionelle Aktivität der Mutante erklären. Aufgrund der wichtigen Rolle der Dimerumlagerung bei der STAT-Inaktivierung wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung auf die Stabilität und Konformation von STAT1-Dimeren erstmalig untersucht. Durch analytische Ultrazentrifugation stellte sich heraus, dass STAT1 unabhängig vom Phosphorylierungsstatus hoch-affine Dimere identischer Stabilität (K_d ca. 50 nM) mit Halbwertszeiten von ca. 20-50 Minuten bildet. Während das unphosphorylierte Dimer über die N-Domänen stabilisiert wurde, interagiert das phosphorylierte STAT1 über die SH2-Domänen. In EMSA-Experimenten wurde demonstriert, dass die Tyrosin-Phosphorylierung nicht zur DNS-Bindung benötigt wird. Allerdings erhöhte sich durch STAT1-Aktivierung die Menge der SH2-Domäne-vermittelten Dimere und somit die DNS-Bindeaktivität mehr als 200-fach. Demnach koexistieren unabhängig vom Phosphorylierungsstatus zwei Dimerkonformationen, die sich durch Dissoziation und Reassoziierung ineinander umwandeln. Zudem nehmen die N-Domänen nach STAT1-Aktivierung eine offene Konformation ein, die durch Inter-Dimer-Interaktionen die Tetramerisierung von STAT1 ermöglicht. Erstaunlicherweise sind homotypische N-Domänen-Interaktionen jedoch in der STAT-Familie nicht konserviert, da die K_d -Werte der isolierten N-Termini von STAT1, -3 und -4 um den Faktor 1000 variierten. Meine Daten zeigen, dass STAT1 zwischen verschiedenen Dimerkonformationen oszilliert und deren Häufigkeit durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert wird. Für diesen dynamischen Prozess wird ein auf den Resultaten dieser Arbeit basierendes Modell vorgestellt, das mit vorliegenden Kristallstrukturen kompatibel ist und vermutlich paradigmatisch für die STAT-Familie ist.

Summary

The central event in the transduction of cytokine signals is the phosphorylation of STAT proteins which thereby convert into DNA binding transcription factors. In the first part of this work, the DNA binding of two STAT1 variants with mutations in the DNA binding domain was analysed. The T327R mutant showed prolonged and unspecific DNA binding that completely explains its prolonged nuclear retention and transcriptional inactivity as was observed in previous experiments. The H406A mutant on the other hand was very similar to the wildtype with respect to DNA binding specificity. However, this mutation might destabilize the antiparallel dimer conformation, which is required for dephosphorylation, and this might explain the increased transcriptional activity of the mutant. Due to the important role of dimer rearrangement for STAT inactivation, the influence of tyrosine phosphorylation on dimer stability and conformation of STAT1 dimers was analysed in the second part of this work for the first time. Analytical ultracentrifugation revealed that STAT1 forms high-affinity dimers of equal stability (K_d ca. 50 nM) with half-life times of 20-50 minutes, irrespective of the phosphorylation state. Whereas the unphosphorylated dimer was stabilized by N-domain interactions, the phosphorylated STAT1 interacted via its SH2 domains. EMSA experiments demonstrated that tyrosine phosphorylation is dispensable for DNA binding. However, STAT1 activation increased the amount of SH2 domain-mediated dimers and thus enhanced the DNA binding activity of STAT1 more than 200-fold. Hence, irrespective of the phosphorylation state two dimer conformations coexist that convert into each other via dissociation and reassociation. Moreover, upon STAT1 activation the N-domains adopt an open conformation that facilitates tetramerization of STAT1 via inter-dimer interactions. Surprisingly, homotypic N-domain interactions are not conserved in the STAT family, because the K_d values of the isolated N-termini of STAT1, -3 and -4 varied by a factor of 1000. My data demonstrate that STAT1 oscillates between different dimer conformations and tyrosine phosphorylation regulates the abundance of the conformations. Based on the results of this work, a model for this dynamic process is introduced that is compatible with existing crystal structures and that may serve as a paradigm for the STAT family.

6 Literaturverzeichnis

Akira, S. (1999) Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17, 138-146.

Barahmand-Pour, F., Meinke, A., Groner, B., Decker, T. (1998) Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 12567-12575.

Barillas-Mury, C., Han, Y.-S., Seeley, D., Kafatos, F. C. (1999) *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18, 959-967.

Bazan, J. F. (1989) A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 788-795.

Becker, S., Groner, B., Müller, C. W. (1998) Three-dimensional structure of the Stat3 β homodimer bound to DNA. *Nature* 394, 145-151.

Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M., Vinkemeier, U. (2000) Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10418-10423.

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

Braunstein, J., Brutsaert, S., Olson, R., Schindler, C. (2003) STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 34133-34140.

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

Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., Darnell, J. E. Jr. (1999) Stat3 as an Oncogene. *Cell* 98, 295-303.

Caldenhoven, E., van Dijk, T. B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., de Groot, R. P. (1996) STAT3 β , a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* 271, 13221-13227.

Cann, J. R., Kegeles, G. (1974) Theory of sedimentation for kinetically controlled dimerization reactions. *Biochemistry* 13, 1868-1874.

Cao, W., Demeler, B. (2008) Modeling Analytical Ultracentrifugation Experiments with an Adaptive Space-Time Finite Element Solution for Multi-Component Reacting Systems. *Biophys. J.* 95, 54-65.

Chang, C.-H., Hammer, J., Loh, J. E., Fodor, W. L., Flavell, R. A. (1992) The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* 35, 378-384.

Chang, H. C., Zhang, S., Oldham, I., Naeger, L., Hoey, T., Kaplan, M. H. (2003) STAT4 requires the N-terminal domain for efficient phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 32471-32477.

Chatterjee-Kishore, M., Kishore, R., Hicklin, D. J., Marincola, F. M., Ferrone, S. (1998) Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 273, 16177-16183.

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., Stark, G. R. (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, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E. Jr., 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, J. E. Jr., Kuriyan, J. (2003) A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal domains of STATs. *Protein Sci.* 12, 361-365.

Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., Iwamoto, Y., Fu, X. Y. (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1:CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.

Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A., Fu, X. Y. (1997) Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5328-5337.

Chretien, S., Varlet, P., Verdier, F., Gobert, S., Cartron, J. P., Gisselbrecht, S. (1996) Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation. *EMBO J.* 15, 4174-4181.

Cironimo, N. M., Li, G. Y., Xiao, W., Torrence, P. F., Silverman, R. H. (1997) Targeting RNA decay with 2',5' oligoadenylate-antisense in respiratory syncytial virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1937-1942.

Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114.

Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J. E. Jr., Mui, A. L., Miyajima, A., Quelle, F. W., Ihle, J. I., Jenkins, N. A. (1995) Distribution of the Mammalian Stat Gene Family in Mouse Chromosomes. *Genomics* 29, 225-228.

Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., Brenner, S. E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188-1190.

Darnell, J. E. Jr. (1997) Phosphotyrosine signaling and the single cell:metazoan boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11767-11769.

Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 121-134.

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

Demeler B., van Holde, K. E. (2004) Sedimentation velocity analysis of highly heterogeneous systems. *Anal. Biochem.* 335, 279-288.

Demeler, B. (2005) UltraScan. A Comprehensive Data Analysis Software Package for Analytical Ultracentrifugation Experiments. In *Modern Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods*, Editoren: Scott, D. J., Harding, S. E., Rowe, A. J. (Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK), 210-229.

Diaz-Guerra, M., Rivas, C., Esteban, M. (1997) Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology* 227, 220-228.

Dix, J. A., Verkman, A. S. (2008) Crowding effects on diffusion in solutions and cells. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 247-263.

Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.

Ehret, G. B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C. M., Fritz, S., Nabholz, M., Bucher, P. (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of *in vitro* specificity with natural target sites. *J. Biol. Chem.* 276, 6675-6688.

Einstein, A. (1905) Über die von der Molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* 17, 182-193.

Epling-Burnette, P. K., Liu, J. H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J. M., Yang-Yen, H. F., Karras, J., Jove, R., Loughran, T. P. Jr. (2001) Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J. Clin. Invest.* 107, 351-362.

Epperson, D. E., Arnold, E., Spies, T., Cresswell, P., Poher, J. S., Johnson, D. R. (1992) Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J. Immunol.* 149, 3297-3301.

Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L., Julkunen, I. (2002) Arginine/Lysine-rich Nuclear Localization Signals Mediate Interactions between Dimeric STATs and Importin α 5. *J. Biol. Chem.* 277, 30072-30078.

Felder, S., Zhou, M., Hu, P., Ureña, J., Ullrich, A., Chaudhuri, M., White, M., Shoelson, S. E., Schlessinger, J. (1993) SH2 domains exhibit high-affinity binding to tyrosine-phosphorylated peptides yet also exhibit rapid dissociation and exchange. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1449-1455.

Fick, A. (1855) Über Diffusion. *Ann. Physik u. Chemie* 94, 59-86.

Frese, M., Kochs, G., Feldmann, H., Hertkorn, C., Haller, O. (1996) Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J. Virol.* 70, 915-923.

Friedmann, M. C., Migone, T. S., Russell, S. M., Leonard, W. J. (1996) Different interleukin 2 receptor β -chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2077-2082.

Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., Groner B., Ihle, J. N., Minami, Y., Miyazaki, T. (1995) Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor β chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5482-5486.

Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., Hirano, T. (1996) Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5, 449-460.

Gao, Q., Hua, J., Kimura, R., Headd, J. J., Fu, X. Y., Chin, Y. E. (2004) Identification of the linker-SH2 domain of STAT as the origin of the SH2 domain using two-dimensional structural alignment. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 704-714.

Greenlund, A. C., Morales, M. O., Viviano, B. L., Yan, H., Krolewski, J., Schreiber, R. D. (1995) Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 2, 677-687.

Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J., Schindler, C. (1996) The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals. *EMBO J.* 15, 1075-1084.

Haan, S., Kortylewski, M., Behrmann, I., Müller-Esterl, W., Heinrich, P. C., Schaper, F. (2000) Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation. *Biochem. J.* 345, 417-421.

Haspel, R. L., Darnell, J. E. Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10188-10193.

Hennighausen, L., Robinson, G. W. (2008) Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev.* 22, 711-721.

von Hippel, P. H., Berg, O. G. (1981) Facilitated target location in biological systems. *J. Biol. Chem.* 264, 675-678.

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

van Holde, K. E., Weischet, W. O. (1978) Boundary analysis of sedimentation velocity experiments with monodisperse and paucidisperse solutes. *Biopolymers* 17, 1387-1403.

Horvath, C. M., Wen, Z., Darnell, J. E. Jr. (1995) A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, 984-994.

Horvath, C. M., Stark, G. R., Kerr, I. M., Darnell, J. E. Jr. (1996) Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6957-6964.

Horvath, C. M. (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* 25, 496-502.

Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B* 147, 258-267.

John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J. E. Jr., Leonard, W. J. (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1910-1918.

6 Literaturverzeichnis

Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T., Watson, J. T. (1987) Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem.* 59, 2621-2625.

Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., Grusby, M. J. (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.

Kawata, T., Shevchenko, A., Fukuzawa, M., Jermyn, K. A., Totty, N. F., Zhukovskaya, N. V., Sterling, A. E., Mann, M., Williams, J. G. (1997) SH2 Signaling in a Lower Eukaryote: A STAT Protein That Regulates Stalk Cell Differentiation in *Dictyostelium*. *Cell* 89, 909-916.

Kennedy, D. M., Skillen, A. W., Self, C. H. (1994) Glycation of monoclonal antibodies impairs their ability to bind antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 245-251.

Kotaja, N., Karvonen, U., Jänne, O. A., Palvimo, J. J. (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5222-5234.

Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T. W., Horvath, C. M., Stark, G. R. (1997) Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278, 1630-1632.

Kuriyan, J., Cowburn, D. (1997) Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 259-288.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamm, O. (1929) Die Differenzialgleichung der Ultrazentrifugierung. *Ark. Mat. Astron. Fysik* 21B, 1-4.

Langer, J. A., Pestka, S. (1988) Interferon receptors. *Immunol. Today* 9, 393-400.

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

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

Levy, D. E., Darnell, J. E. Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651-662.

Liao, J., Fu, Y., Shuai, K. (2000) Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5267-5272.

Lillemeier, B. F., Köster, M., Kerr, I. M. (2001) STAT1 from the cell membrane to the DNA. *EMBO J.* 20, 2508-2517.

Litterst, C. M., Pfitzner, E. (2001) Transcriptional Activation by STAT6 Requires the Direct Interaction with NCoA-1. *J. Biol. Chem.* 276, 45713-45721.

Liu, L., McBride, K. M., Reich, N. C. (2005) STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8150-8155.

Liu, X., Quinn, A. M., Chin, Y. E., Fu, X.-Y., Ruvkun, G., Hobert, O. (1999) STAT Genes Found in *C. elegans*. *Science* 285, 167.

Livesey, A. K., Skilling, J. (1985) Maximum entropy theory. *Acta Cryst.* A41, 113-122.

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

Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: Volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* 192, 189-21.

Lufe, C., Ma, J., Huang, G., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Ong, C. T., Cao, X. (2003) GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. *EMBO J.* 22, 1325-1335.

Ma, J., Cao, J. (2006) Regulation of Stat3 nuclear import by importin α 5 and importin α 7 via two different functional sequence elements. *Cell Signal.* 18, 1117-1126.

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

MacMicking, J., Xie, Q.-W., Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350.

Mao, X., Ren, Z., Parker, G. N., Sondermann, H., Pastorello, M. A., Wang, W., McMurray, J. S., Demeler, B., Darnell, J. E. Jr., Chen, X. (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol. Cell* 17, 761-771.

Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., Vinkemeier, U. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J. Cell Biol.* 165, 823-833.

McBride, K. M., McDonald, C., Reich, N. C. (2000) Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J.* 19, 6196-6206.

McBride, K. M., Banninger, G., McDonald, C., Reich, N. C. (2002) Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *EMBO J.* 21, 1754-1763.

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

Melen, K., Kinnunen, L., Julkunen, I. (2001) Arginine/Lysine-rich Structural Element Is Involved in Interferon-induced Nuclear Import of STATs. *J. Biol. Chem.* 276, 16447-16455.

Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., Ebert, M. H. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1438.

Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., Darnell, J. E. Jr. (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.

Meurs, E. F., Watanabe, Y., Kadereit, S., Barber, G. N., Katze, M. G., Chong, K., Williams, B. R., Hovanessian, A. G. (1992) Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J. Virol.* 66, 5805-5814.

Meyer, T., Begitt, A., Lödige, I., van Rossum, M., Vinkemeier, U. (2002) Constitutive and IFN- γ -induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* 21, 344-354.

Meyer, T., Marg, A., Lemke, P., Wiesner, B., Vinkemeier, U. (2003) DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev.* 17, 1992-2005.

Meyer, T., Hendry, L., Begitt, A., John, S., Vinkemeier, U. (2004) A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J. Biol. Chem.* 279, 18998-19007.

Mo, W., Zhang, L., Yang, G., Zhai, J., Hu, Z., Chen, Y., Chen, X., Hui, L., Huang, R., Hu, G. (2008) Nuclear β -Arrestin1 functions as a scaffold for the dephosphorylation of STAT1 and moderates the antiviral activity of IFN- γ . *Mol. Cell* 31, 695-707.

Monier, K., Armas, J. C., Etteldorf, S., Ghazal, P., Sullivan, K. F. (2000) Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nature Cell Biol.* 2, 661-665.

Morgenstern, J. P., Land, H. (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 18, 3587-3596.

Moriggl, R., Gouilleux-Gruart, V., Jähne, R., Berchtold, S., Gartmann, C., Liu, X., Hennighausen, L., Sotiropoulos, A., Groner, B., Gouilleux, F. (1996) Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5691-5700.

Müller, A. J., Pendergast, A. M., Havlik, M. H., Puil, L., Pawson, T., Witte, O. N. (1992) A limited set of SH2 domains binds BCR through a high-affinity phosphotyrosine-independent interaction. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5087-5093.

Murphy, T. L., Geissal, E. D., Farrar, J. D., Murphy, K. M. (2000) Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7121-7131.

Ndubuisi, M. I., Guo, G. G., Fried, V. A., Etlinger, J. D., Sehgal, P. B. (1999) Cellular physiology of STAT3: where's the cytoplasmic monomer? *J. Biol. Chem.* 274, 25499-25509.

Neculai, D., Neculai, A. M., Verrier, S., Straub, K., Klumpp, K., Pfitzner, E., Becker, S. (2005) Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer. *J. Biol. Chem.* 280, 40782-40787.

Nicola, N. A. (1994) Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells* 12, 3-12.

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.

Novick, D., Cohen, B., Rubinstein, M. (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77, 391-400.

Oates, A. C., Wollberg, P., Pratt, S. J., Paw, B. H., Johnson, S. L., Ho, R. K., Postlethwait, J. H., Zon, L. I., Wilks, A. F. (1999) Zebrafish *stat3* is expressed in restricted tissues during embryogenesis and *stat1* rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line. *Dev. Dyn.* 215, 352-370.

Ota, N., Brett, T. J., Murphy, T. L., Fremont, D. H., Murphy, K. M. (2004) N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation. *Nature Immunol.* 5, 208-215.

Ouchi, T., Lee, S. W., Ouchi, M., Aaronson, S. A., Horvath, C. M. (2000) Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN- γ target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5208-5213.

Park, C., Li, S., Cha, E., Schindler, C. (2000) Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13, 795-804.

Pascal, A., Riou, J.-F., Carron, C., Boucaut, J.-C., Umbhauer, M. (2001) Cloning and developmental expression of STAT5 in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 106, 171-174.

Paul, W. E. (1989) Pleiotropy and redundancy: T-cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* 57, 521-524.

Puthier, D., Bataille, R., Amiot, M. (1999) IL-6 up-regulates *mcl-1* in human myeloma cells through JAK/STAT rather than Ras/MAP kinase pathway. *Eur. J. Immunol.* 29, 3945-3950.

6 Literaturverzeichnis

Ray, S., Boldogh, I., Brasier, A. R. (2005) STAT3 NH2-terminal acetylation is activated by the hepatic acute-phase response and required for IL-6 induction of angiotensinogen. *Gastroenterology* 129, 1616-1632.

Ren, Z., Mao, X., Mertens, C., Krishnaraj, R., Qin, J., Mandal, P. K., Romanowski, M. J., McMurray, J. S., Chen, X. (2008) Crystal structure of unphosphorylated STAT3 core fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 1-5.

Rhodes, D., Schwabe, J. W. (1998) Signal transduction: fast lane to transcriptional activation. *Curr. Biol.* 8, R765-R767.

Sadowski, H. B., Shuai, K., Darnell, J. E. Jr., Gilman, M. Z. (1993) A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* 261, 1739-1744.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V. R., Darnell, J. E. Jr. (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 257, 809-813.

Schindler, U., Pengguang, W., Roth, M., Brasseur, M., McKinght, S. L. (1995) Components of a Stat Recognition Code for Two Layers of Molecular Sensitivity. *Immunity* 2, 689-697.

Schmierer, B., Tournier, A. L., Bates, P. A., Hill, C. S. (2008) Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 6608-6613.

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

Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78, 1606-1619.

Schuck, P. (2003) On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal. Biochem.* 320, 104-124.

Sehgal, P. B. (2008) Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 329-340.

Seidel, H. M., Milocco, L. H., Lamb, P., Darnell, J. E. Jr., Stein, R. B., Rosen, J. (1995) Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3041-3045.

Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E., Ihle, J. N. (1996) Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630-633.

Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R., Darnell, J. E. Jr. (1992) Activation of transcription by IFN- γ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258, 1808-1812.

Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M., Darnell, J. E. Jr. (1993) A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science* 261, 1744-1746.

Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D., Darnell, J. E. Jr. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821-828.

Siess, D. C., Magnuson, N. S., Reeves, R. (1989) Characterization of the bovine receptor(s) for interleukin-2. *Immunology* 68, 190-195.

Skov, S., Nielsen, M., Bregenholt, S., Odum, N., Claesson, M. H. (1998) Activation of Stat-3 is involved in the induction of apoptosis after ligation of major histocompatibility complex class I molecules on human Jurkat T cells. *Blood* 91, 3566-3573.

Snapper, C. M., Paul, W. E. (1987) Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236, 944-947.

Soler-Lopez, M., Petosa, C., Fukuzawa, M., Ravelli, R., Williams, J. G., Müller, C. W. (2004) Structure of an activated Dictyostelium STAT in its DNA-unbound form. *Mol. Cell* 13, 791-804.

Stancato, L. F., David, M., Carter-Su, C., Lerner, A. C., Pratt, W. B. (1996) Preassociation of STAT1 with STAT2 and STAT3 in separate signaling complexes prior to cytokine stimulation. *J. Biol. Chem.* 271, 4134-4137.

Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., Schreiber, R. D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.

Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., Hilton, D. J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.

Stokes, G. G. (1850) On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums. *Trans. Cambridge Phil. Soc.* 9, 8-106.

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

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

Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T., Akira, S. (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.* 161, 4652-4660.

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

Tiefenbrun, N., Melamed, D., Levy, N., Resnitzky, D., Hoffmann, I., Reed, S., Kimchi, A. (1996) Interferon α suppresses cyclin D3 and Cdc25A genes leading to a reversible G0-like arrest. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3934-3944.

de la Torre, J. C., Huertas, M. L., Carrasco, B. (2000) Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78, 719-730.

Townsend, P. A., Scarabelli, T. M., Davidson, S. M., Knight, R. A., Latchman, D. S., Stephanou, A. (2004) STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 5811-5820.

Vargo, M. A., Nguyen, L., Colman, R. F. (2004) Subunit interface residues of glutathione S-transferase A1-1 that are important in the monomer-dimer equilibrium. *Biochemistry* 43, 3327-3335.

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

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

Vinkemeier, U. (2004) Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit. *J. Cell Biol.* 167, 197-201.

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

Wang, R., Cherukuri, P., Luo, J. (2005) Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J. Biol. Chem.* 280, 11528-11534.

Wegenka, U. M., Buschmann, J., Luttkicken, C., Heinrich, P. C., Horn, F. (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell. Biol.* 13, 276-288.

Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, J. E. Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-250.

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

Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R., Darnell, J. E. Jr. (1996) Identification of a Stat Gene That Functions in Drosophila Development. *Cell* 84, 421-430.

Yang, E., Wen, Z., Haspel, R. L., Zhang, J. J., Darnell, J. E. Jr. (1999) The Linker Domain of Stat1 is Required for Gamma Interferon-Driven Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5106-5112.

Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., Auron, P. E., Stark, G. R. (2007) Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFκB. *Genes Dev.* 21, 1396-1408.

York, I. A., Rock, K. L. (1996) Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 369-396.

Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D., Chin, Y. E. (2005) Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 307, 269-273.

Zeng, R., Aoki, Y., Yoshida, M., Arai, K., Watanabe, S. (2002) Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J. Immunol.* 168, 4567-4575.

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

Zhang, J. J., Zhao, Y., Chait, B. T., Lathem, W. W., Ritzi, M., Knippers, R., Darnell, J. E. Jr. (1998) Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1 α in IFN- γ -induced transcriptional activation. *EMBO J.* 17, 6963-6971.

Zhang, L., Badgwell, D. B., Bevers, J. J. 3rd, Schlessinger, K., Murray, P. J., Levy, D. E., Watowich, S. S. (2006) IL-6 signaling via the STAT3/SOCS3 pathway: functional analysis of the conserved STAT3 N-domain. *Mol. Cell Biochem.* 288, 179-189.

Zhang, T., Kee, W. H., Seow, K. T., Fung, W., Cao, X. (2000) The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7132-7139.

Zhang, T., Seow, K. T., Ong, C. T., Cao, X. (2002) Interdomain Interaction of Stat3 Regulates Its Src Homology 2 Domain-mediated Receptor Binding Activity. *J. Biol. Chem.* 277, 17556-17563.

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

Zhang, X., Wrzeszczynska, M. H., Horvath, C. M., Darnell, J. E. Jr. (1999) Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7138-7146.

Zhao, H., De, B. P., Das, T., Banerjee, A. K. (1996) Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA. *Virology* 220, 330-338.

Zhao, W., Cha, E. N., Lee, C., Park, C. Y., Schindler, C. (2007) Stat2-Dependent Regulation of MHC Class II Expression. *J. Immunol.* 179, 463-471.

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

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

7 Abkürzungen

2DSA	2-Dimensionale Spektrumanalyse
6-NBT	6-Nitrobenzo[b]thiophen-1,1-dioxid
A	Alanin; Adenosin
AA/BA	Akrylamid/Bisakrylamid
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäurerest
ASTFEM	<i>Adaptive Space-Time Finite Element Method</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
Bax	Bcl2 assoziiertes X-Protein
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i> -Protein
Bp	Basenpaare
BRCA	<i>Breast Cancer Type 2 susceptibility</i> -Protein
BSA	Bovines Serum-Albumin
c	Konzentration
C	Cytidin
c-Myc	<i>c-Myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> -Protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CAEV-LTR	Gen-flankierende DNS-Wiederholungseinheit des Ziegen-Arthritis-Enzephalitis-Virus
CBP	CREB-bindendes Protein
CCD	" <i>Coiled-Coil</i> "-Domäne, 4-Helix-Bündel
CCL	Ligand für Chemokine mit CC-Motiv
cDNS	komplementäre DNS
CIITA	<i>MHC Class II Transactivator</i> , Transaktivator des Klasse II-MHC
COX	Zyklooxygenase
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i> -Protein

ΔN	N-terminale STAT-Deletionsmutante
D	Diffusionskoeffizient; Asparaginsäure
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNS-Bindedomäne
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dIdC	Polymer aus Desoxyinosid- und Desoxycytidinphosphat
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelsträngige RNS
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eIF2	Eukaryontischer Translations-Initiationsfaktor 2
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> , Gelretardierungs-Experiment
entspr.	entspricht
EPO	Erythropoetin
ESI-TOF-MS	<i>Electrospray Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>
f	Reibungsfaktor
F	Phenylalanin; Kraft
FKS	Fetales Kälberserum
FMV	Fixierte Molekulargewichts-Verteilung

FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung; Gramm
G	Guanosin; Glyzin
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	IFN γ -aktivierte Stelle
GBP	Guanosin-bindendes Protein
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
Gly	Glyzin
GRIM	<i>Genes associated with Retinoid IFN induced Mortality</i> -Protein
GZE	Gesamtzell-Extrakt
H	Histidin
HAT	Histon-Azetyltransferase
HDAC	Histon-Deazetylase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horse-raddish Peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
I	Isoleuzin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
irrev.	irreversibel
ISGF	Interferon-stimulierter Genfaktor
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
J	Massentransport
JAK	Janus-Kinase
K	Lysin
k.K.	keine Korrelation
k _A	Assoziationsrate
k _{AV}	relative Mobilität
kb	kilo-Basenpaare

K_d	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
k_D	Dissoziationsrate
kDa	Kilo-Dalton
Komp.	Kompetitor
krpm	Kilo-rpm
λ	Wellenlänge
L	Leuzin
LacZ-Gen	β -Galaktosidase-Gen
LB	<i>lysogeny broth</i> , komplexes Nährmedium
LD	<i>Linker</i> -Domäne
LMP	<i>Low molecular Mass Polypeptide</i>
m	Masse
M	Methionin; molar
m/z	Masse pro Ladung
MALS	<i>Multiangle Light Scattering</i>
MC	Monte Carlo
Mcl	<i>Myeloid cell leukemia</i> -Protein
MCM	<i>Minichromosome Maintenance</i> -Protein
MDa	Mega-Dalton
Mdm	<i>Murine double minute</i> -Protein
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min.	Minuten
mOD	Milli-Absorptionseinheiten
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular Weight</i> ; Molekulargewicht
N	Asparagin
n.a.	nicht anwendbar
n.e.	nicht ermittelt
n.i.	nicht-interagierend
N-Terminus	Amino-Terminus
N_A	Avogadro-Zahl

NCoA	<i>Nuclear Receptor Coactivator A</i> -Protein
ND	N-Domäne
NES	<i>Nuclear Export Signal</i> , Kernexportsignal
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i> , Kernfaktor κ B
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i> , Kernlokalisierungssignal
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
P	Prolin
P-STAT	phosphoryliertes STAT
PA	Polyakrylamid
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIAS	Protein-Inhibitor für aktiviertes STAT
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
Q	Glutamin
R	Arginin; Radius
Ref.	Referenz
r_{gyr}	Gyrationsradius
RLE	relative Lichteinheit
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , Abweichung der mittleren Fehlerquadrate
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sedimentationskoeffizient
S	Serin; Svedberg (10^{-13} s^{-1})
s.	siehe

7 Abkürzungen

SDS	Natriumdodekylsulfat
SE	<i>Sedimentation Equilibrium</i> , Sedimentationsgleichgewicht
Sek.	Sekunden
SH2D	Src-Homologie 2-Domäne
SIE	SIS-induzierbares Element
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signalling</i> , Suppressor der Zytokin-Signalgebung
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
Std.	Stunden
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> -Protein
SV	<i>Sedimentation Velocity</i> , Sedimentationsgeschwindigkeit
T	Threonin; Thymidin
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
TBS-T	TBS-Tween
tc	N- und C-terminale STAT-Deletionsmutante
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
u.a.	unter anderem
u.s.	unspezifisch
U-STAT	unphosphoryliertes STAT
V	Valin; Volt; Volumen
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
Van.	Natriumorthovanadat
vgl.	vergleiche
W	Tryptophan

7 Abkürzungen

w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-2-D-Galaktosid
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

8 Anhang

Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation erschienen:

Wenta, N., Strauss, H., Meyer, S., Vinkemeier, U. (2008) Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 9238-9243.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Konferenzen vorgestellt:

15th International Symposium on Analytical Ultracentrifugation, 6.-7. April 2006 in London, UK: Dimerization of different phosphorylated and unphosphorylated STAT variants (Poster).

16th Symposium on Analytical Ultracentrifugation, 1.-2. März 2007, Hannover: Dimerization of phosphorylated and unphosphorylated STAT1 (Vortrag).

17th International Symposium on Analytical Ultracentrifugation and Hydrodynamics, 10.-12. September 2008 in Newcastle, UK: Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations (Vortrag).

Lebenslauf

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten**

Danksagung

Viele Menschen haben durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihnen allen an dieser Stelle von ganzem Herzen. Bei einigen Personen möchte ich mich ganz besonders bedanken:

Mein besonderers herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Vinkemeier. Er hat mir in meiner gesamten Zeit als Doktorand viel Vertrauen entgegengebracht und mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen, in der meine Arbeit in einem sehr angenehmen Klima gedeihen konnte. Seine scharfsinnige Art, wissenschaftliche Probleme in allen Teilaspekten zu erfassen und elegante Lösungen zu entwickeln, hat mich stark beeindruckt. Ohne seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und seine exzellente Betreuung wäre diese Arbeit undenkbar gewesen.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Saenger bedanke ich mich ganz herzlich für die Unterstützung, die ich von ihm insbesondere zum Ende meines Studiums erfahren habe. Ausserdem danke ich ihm und Herrn Prof. Dr. Uwe Vinkemeier für ihre Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die vielen Gefälligkeiten, die sie mir im Verlauf meiner Arbeit erwiesen haben, danken. Herrn Prof. Dr. Thomas Meyer danke ich sehr für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Einführung in mein Thema. Seine grossartigen Vorarbeiten zusammen mit denen von Petra Lemke haben mir den reibungslosen Einstieg in meine Arbeit geebnet. Ich denke immer gerne an die vielen gemeinsamen Nachtschichten mit Thomas zurück, bei denen er mich bereits durch seine reine Anwesenheit moralisch gestärkt hat. Dr. Torsten Meissner hat mich bereits in einem Praktikum betreut und in das Feld der STAT-Proteine eingeführt. Ihm verdanke ich die ausgezeichnete Einführung in die Grundlagen meines Themas und die wissenschaftliche Arbeitsweise. Sein Ehrgeiz und Fleiss haben mir zum Vorbild gedient, und seine Bereitschaft zur Diskussion und zur Korrektur meiner Arbeit waren unschätzbar. Dr. Andreas Marg und Mandy Kummerow danke ich für die hilfreiche Einführung in die Kunst der Proteinreinigung. Stephanie Meyer, Melanie Lange und Marleen van Rossum danke ich für die immerwährende Freundlichkeit, die Einführung in die Zellkultur und die Überlassung der vielen kleinen Kniffe, die zum Gelingen der Laborarbeit notwendig sind. Steffi danke ich weiterhin ganz besonders für die freundliche Erlaubnis zur Verwendung ihrer ausgezeichneten Western Blot-Resultate. Ausserdem möchte ich mich herzlich bei meiner Praktikantin Rita Sachse bedanken, der ich hoffentlich einige Einblicke

in das Forscherleben vermitteln konnte und die sich im Gegenzug mit Arbeitseifer und Wissensdurst, der in viele viele gute Fragen mündete, revanchiert hat. Bei Manuela Peucker bedanke ich mich ebenfalls besonders herzlich für ihre immanente Freundlichkeit, die mir den Laboralltag sehr erleichtert hat und die vielen beflügelnden Diskussionen. Ausserdem möchte ich mich neben meinen Mit-Doktoranden Matthias Dröscher und Filipa Antunes auch bei Christin Pelzel und Dr. Andreas Begitt für ihren fachlichen Rat und ihre Hilfe bei der Eingewöhnung in die neue „Heimat“ herzlich bedanken.

Darüberhinaus danke ich allen Mitarbeitern des Leibniz-Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie und der University of Nottingham, die zu meiner Arbeit beigetragen haben. Allen voran bedanke ich mich sehr herzlich bei allen Mitgliedern der AG Freund für ihre immerwährende Bereitschaft, Geräte und Methoden, sowie wissenschaftliche und ausserwissenschaftliche Gedanken mit mir zu teilen. Herrn Dr. Eberhard Krause danke ich vielmals für die massenspektrometrische Analyse meiner Proteine. Ich danke ausserdem Herrn Dr. Eberhard Klausens für die Durchführung von DNS-Sequenzierungen und die vielen anregenden philosophischen Gespräche, die wir geführt haben.

Sehr zum Dank verpflichtet bin ich meinen Kollegen aus dem Feld der analytischen Ultrazentrifugation. Allen voran bedanke ich mich besonders herzlich bei Herrn Dr. Holger Strauss, der mich geduldig und mit sehr grossem Sachverstand in die hohe Kunst der AUZ eingeführt hat. Ausserdem danke ich ihm für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und Korrektur meiner Arbeit auch nach seinem Ausscheiden aus dem FMP. Gleichermassen herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Borries Demeler vom UTHSC in San Antonio für seine unschätzbare Hilfe bei der Auswertung meiner Daten, die ohne seine hervorragende UltraScan-Software nicht denkbar gewesen wäre. Weiterhin bedanke ich mich herzlich für die grosszügige Unterstützung und überwältigende Fachkompetenz, die ich von Antje Völkel und Dr. Helmut Cölfen vom MPI in Potsdam erfahren habe. Ausserdem danke ich Herrn Prof. Dr. Arthur Rowe und Herrn Prof. Dr. Stephen Harding für ihre Unterstützung bei meiner biophysikalischen Arbeit in Nottingham.

Nicht zuletzt bin ich zutiefst meiner Familie Takačev in Kikinda und meiner lieben Mutter Ljubica dankbar. Sie haben es stets verstanden, mich zur richtigen Zeit moralisch aufzubauen und mit Verständnis und unendlicher Geduld bei allen Schwierigkeiten im Leben innerhalb und ausserhalb des Labors zu unterstützen. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.