

**Die Entdeckung Zytokin-induzierter STAT-Protein-Parakristalle:  
Regulation ihrer Löslichkeit durch SUMO und ihr Einfluss auf die  
IFN $\gamma$ -Sensitivität von Zellen**

**Dissertation**

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

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

vorgelegt von

**Mathias Droescher**

aus Weimar

Berlin, im Juli 2011

Die vorliegende Arbeit habe ich unter der Leitung von Prof. Uwe Vinkemeier, von Mai 2006 bis Juni 2007 am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin-Buch und von Juli 2007 bis Mai 2011 in der School of Biomedical Sciences der University of Nottingham (UK), durchgeführt.

Gutachter: Prof. Volker Haucke (Freie Universität Berlin)  
Prof. Uwe Vinkemeier (University of Nottingham, UK)

Disputation am: 25.10.2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	1
<b>1. Einleitung</b> .....	4
1.1 Die zelluläre Kommunikation durch Zytokine und Interferone .....	4
1.2 Der JAK/STAT Signalweg.....	5
1.3 Die Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren .....	7
1.3.1 Der Transkriptionsfaktor STAT1 .....	9
1.4 Die SUMO-Modifikation von Proteinen .....	12
1.4.1 SUMO-Modifikation von STAT1 .....	16
1.5 Fragestellung .....	19
<b>2. Material</b> .....	20
2.1 Chemikalien .....	20
2.2 Puffer, Lösungen und Medien .....	20
2.3 Antikörper .....	20
2.4 Proteine und Enzyme .....	21
2.5 Plasmide .....	22
2.6 Oligo-Nukleotide .....	22
2.7 Bakterien .....	24
2.8 Zell-Linien .....	24
<b>3. Methoden</b> .....	25
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	25
3.1.1 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien .....	25
3.1.2 Hitzeschock-Transformation von DNS in kompetente Bakterien .....	25
3.1.3 Gewinnung rekombinanter DNS aus transformierten Bakterien .....	26
3.1.4 Auftrennung und Konzentrationsbestimmung von DNS .....	26
3.1.5 DNS-Sequenzierung .....	27
3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
3.1.7 Einführen von Punktmutationen in Plasmide (Mutagenese) .....	28
3.1.8 Restriktionsverdau von DNS .....	28
3.1.9 Ligation von DNS-Fragmenten .....	28
3.1.10 Klonierung von STAT1-Expressionsplasmiden .....	29
3.1.11 Gewinnung und Genotypisierung genomischer DNS .....	29

3.1.12 Identifizierung transgener Stammzell-Kolonien .....	30
3.2 Biochemische Methoden .....	31
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
3.2.2 Western-Blot und immunchemischer Nachweis von Proteinen .....	32
3.2.3 Herstellung von Zellextrakten .....	33
3.2.4 Affinitäts-Anreicherung von His-SUMO1 modifizierten Proteinen .....	33
3.2.5 Dephosphorylierungs-Kinetik von STAT-Proteinen .....	34
3.2.6 Immunpräzipitation (IP) .....	34
3.2.7 <i>In vitro</i> Sumolierung und Monomer-Austausch-Reaktion .....	35
3.2.8 Immunocytochemie .....	36
3.2.9 Fluoreszenz-Mikroskopie .....	37
3.2.10 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) .....	37
3.2.11 Reporter-gen-Analyse .....	38
3.3 Zellbiologische Methoden .....	39
3.3.1 Kultivierung und Behandlung von Säugerzellen .....	39
3.3.2 Transfektion von Säugerzellen .....	40
3.3.3 Behandlung von Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren .....	40
3.3.4 Gewinnung primärer embryonaler Maus-Fibroblasten (MEF) .....	40
3.3.5 Gewinnung von Knochenmarks-Makrophagen .....	41
3.3.6 Induktion systemischer bakterieller Infektion in Mäusen .....	41
3.3.7 IFN $\gamma$ -vermittelte Zytotoxizitäts-Analyse von Knochenmarks-Makrophagen .	42
3.3.8 Kultivierung und Behandlung von embryonalen Maus-Stammzellen .....	43
<b>4. Resultate</b> .....	45
4.1 Die SUMO-Modifikation reduziert die Tyr <sup>701</sup> -Phosphorylierung von STAT1.....	45
4.1.1 Die Generierung einer für die Lys <sup>703</sup> -Sumolierung spezifischen STAT1-Mutante .....	45
4.1.2 Die strukturelle Integrität der Tyr <sup>701</sup> -Phosphorylierungsstelle wird durch die STAT1-Mutation E <sup>705</sup> Q nicht beeinträchtigt .....	48
4.2 Die Lys <sup>703</sup> -Sumolierung verändert die subzelluläre Verteilung von STAT1 .....	50
4.2.1 SUMO-freies STAT1 lokalisiert in Zytokin-induzierten nukleären Partikeln .	50
4.2.2 Die subzelluläre Verteilung von STAT3 gleicht der von SUMO-freiem STAT1 .....	56
4.2.3 Nukleäre STAT-Partikeln besitzen eine parakristalline Ultrastruktur .....	59

4.3 Die Lys <sup>703</sup> -Sumolierung verhindert die Polymerisierung und Parakristallbildung von STAT1 .....	64
4.3.1 Die Polymerisierung phosphorylierter STAT1-Dimere führt zu Parakristallen .....	64
4.3.2 Auch die erzwungene Sumolierung von STAT3 verhindert die Parakristallbildung .....	71
4.3.3 Die Auflösung von Parakristallen erfordert die Sumolierungs-abhängige Blockierung der Tyr <sup>701</sup> -Phosphorylierung .....	73
4.3.4 Die Lys <sup>703</sup> -Sumolierung induzierte Reduktion der Tyr <sup>701</sup> -Phosphorylierung ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Auflösung von STAT1-Parakristallen	77
4.3.5 Die Sumolierung fördert die Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren .....	80
4.3.6 Die Bildung von STAT1-Parakristallen wird über die Sumolierungs-abhängige Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren verhindert .....	87
4.4 Parakristalle verlängern die Dauer der Zytokin-induzierten STAT-Aktivierung .....	90
4.4.1 Parakristalle schützen STAT-Proteine vor der Dephosphorylierung .....	91
4.4.2 Parakristalle puffern die Konzentration von aktiviertem STAT1 im Nukleoplasma .....	95
4.4.3 Die Sumolierung reduziert die transkriptionelle Aktivität von STAT-Proteinen .....	98
4.5 Physiologische Relevanz der STAT1-Sumolierung im transgenen Tier-Modell .....	100
4.5.1 Generierung einer transgenen Maus, welche SUMO-freies STAT1-E <sup>705</sup> Q unter der Kontrolle des endogenen STAT1-Promotors exprimiert .....	100
4.5.2 Die Sumolierung von STAT1 reduziert die Sensitivität von Knochenmarks-Makrophagen gegenüber IFN $\gamma$ .....	104
<b>5. Diskussion</b> .....	111
5.1 Die SUMO-Modifikation reduziert die Tyr <sup>701</sup> -Phosphorylierung von STAT1 .....	111
5.2 Aktiviertes STAT lokalisiert in nukleären Parakristallen .....	113
5.3 Die Polymerisierung phosphorylierter STAT1-Dimere führt zu Parakristallen .....	114
5.4 Die Lys <sup>703</sup> -Sumolierung verhindert die Polymerisierung von STAT1 .....	116
5.5 Die Sumolierung als Modulator der Löslichkeit von Proteinen .....	119
5.6 Die physiologische Bedeutung von STAT-Parakristallen und ihrer Verhinderung durch die Sumolierung .....	120

<b>6. Zusammenfassung</b> .....	125
6.1 Summary .....	126
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	127
<b>8. Anhang</b> .....	144
8.1 Die Sequenzierung der genomischen STAT1-DNS des Haushuhns .....	144
8.2 Veröffentlichungsnachweise .....	145
8.3 Lebenslauf .....	146
8.4 Danksagung .....	147
8.5 Eidesstattliche Erklärung .....	148

**Abkürzungen**

A	Alanin
APR	Akute-Phase Reaktion
APRE	<i>Acute Phase Response Element</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiotreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
F	Phenylalanin
FCS	Fetales Kälberserum
FRAP	Fluoreszenz-Wiederauffüllung nach Photobleichung
GAS	Gamma-aktivierte Stelle
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
Glu	Glutaminsäure
Gln	Glutamin
GZE	Gesamtzellextrakt
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazino-Ethansulfonsäure
I	Isoleuzin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISGF3	<i>IFN-Stimulated Gene Factor 3</i>

ISRE	<i>IFN-Stimulated Response Element</i>
JAK	Janus-Kinase
K	Lysin
KOAc	Kaliumacetat
LiCl	Lithiumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
M	Methionin
MEF	embryonale Maus-Fibroblasten
Mg(OAc) <sub>2</sub>	Magnesiumacetat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethylmaleinimid
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NO	Stickstoffoxid
ONPG	2-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIAS	<i>Proteininhibitor of activated STAT</i>
PML	Promyelotisches-Leukämie-Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
pTyr	Phosphor-Tyrosin
Q	Glutamin
R	Arginin
RFLP	Restriktions-Fragments-Längen-Polymorphismus
RNS	Ribonukleinsäure
S	Serin

SDS	Natriumlaurylsulfat
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SPF	Spezifisch Pathogen Frei
STAT	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
T	Threonin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propanediol
UV	Ultraviolett
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

## **1. Einleitung**

### **1.1 Die zelluläre Kommunikation durch Zytokine und Interferone**

Für einen Organismus mit einer Vielzahl von differenzierten Funktionen ist die Kommunikation einzelner Zellen mit ihrer Umgebung von essentieller Bedeutung. Durch die Sezernierung von Botenstoffen können die Funktionen einer Zelle selbst (autokrin) oder von benachbarten Zellen (parakrin) beeinflusst werden (LeRoy et al. 1990). In einer von ständigen Veränderungen geprägten Umwelt können somit verschiedene metabolische, proliferative, inflammatorische und apoptotische Prozesse bzw. Differenzierungsvorgänge miteinander koordiniert werden. Die Informationsweiterleitung eines extrazellulären Signalträgers zu den zu aktivierenden Zielgenpromotoren im Zellkern wird allgemein als Signaltransduktion bezeichnet. Eine wichtige Familie von Signalmolekülen stellen die Zytokine dar, welche nicht nur die Kommunikation zwischen den Zellen einzelner Gewebe, sondern auch die überlebenswichtige Immunantwort eines Organismus koordinieren. Eine ihrer Hauptaufgaben besteht in der Instandhaltung bzw. Wiederherstellung der Homöostase in einem Organismus, wobei das unkontrollierte Fehlen bzw. die erhöhte Präsenz dieser regulatorischen Botenstoffe die Grundlage einer Vielzahl von Krankheiten darstellt (Schooltink & Rose-John 2002). Zytokine lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Funktion in verschiedene Familien einteilen (Taga & Kishimoto 1992), zu denen man u.a. die Interleukine (IL), die Koloniestimulierenden Faktoren (CSF), die Tumornekrosefaktoren (TNF) und die Chemokine zählt (Cavaillon 1994). Eine weitere bedeutende Gruppe stellen die für diese Arbeit bedeutsamen Interferone (IFN) dar, benannt aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interferenz mit Virusinfektionen (Isaacs & Lindenmann 1957). Die Interferone werden aufgrund ihrer Funktion und Rezeptorbindung in drei verschiedene Klassen unterteilt, Typ-I, -II und -III Interferone. Zu den Typ-I Interferonen gehören  $IFN\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$  sowie abhängig von der Spezies und dem Zelltyp  $IFN\delta$  bzw.  $IFN\tau$  (Pestka et al. 2004). Während einer Virusinfektion werden die Typ-I-Interferone von Leukozyten und Fibroblasten produziert und binden an den  $IFN\alpha$ -Rezeptor (IFNAR), welcher aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 besteht (Mogensen et al. 1999). Die Typ-III Interferone  $IFN\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  und  $\lambda_3$  werden vorrangig von Keratinozyten produziert. Obwohl nicht viel über sie bekannt ist, führen die Typ-III Interferone zu einer ähnlichen Wirkung wie die Typ-I Interferone (Ank & Paludan 2006). Das einzige Mitglied der Typ-II Interferone ist  $IFN\gamma$ . Es wird in der frühen Immunantwort von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert und bindet an den aus den Untereinheiten IFNGR1 und

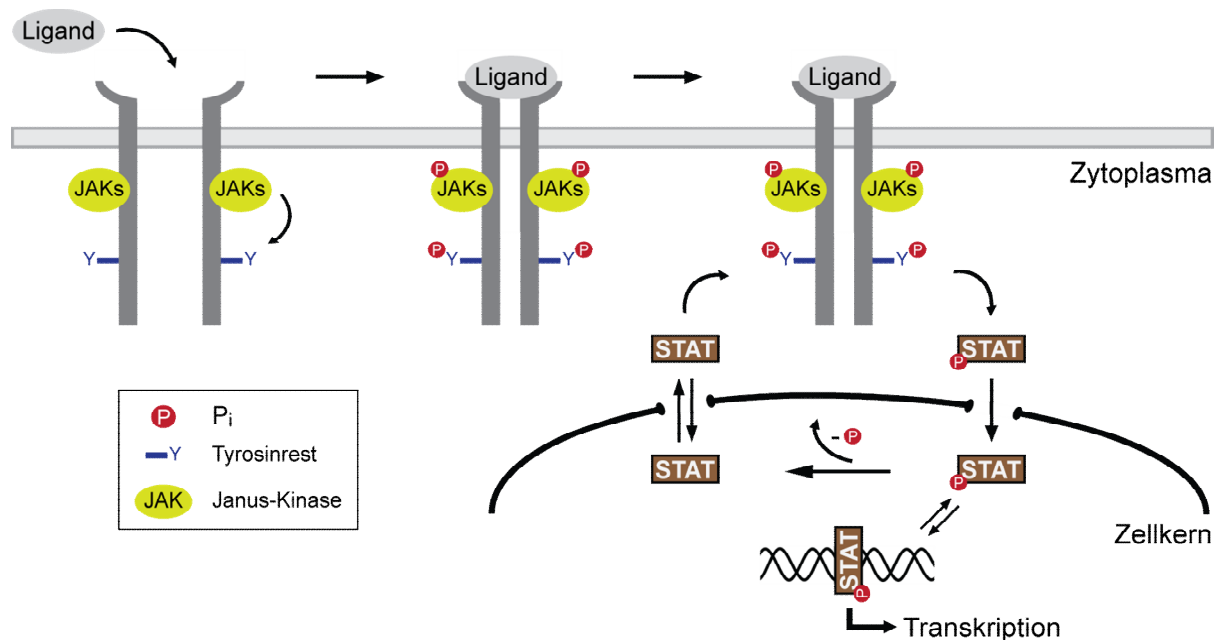


IFNGR2 bestehenden IFN $\gamma$ -Rezeptor (Boehm et al. 1997, Pestka et al. 2004). Aufgrund ihrer antiviralen, immunmodulatorischen und antiproliferativen Eigenschaften bilden die Interferone die erste Abwehr von viralen Infektionen und spielen eine Rolle bei der Tumor-Prävention (Gariglio et al. 1990, Kaplan et al. 1998). Nach der Erkennung viraler RNS wirken die Interferone über verschiedene Mechanismen (Cebulla et al. 1999). Einerseits wird über die transkriptionelle Aktivierung der GTPase Mx die Transkription viraler RNS inhibiert, andererseits wird über die Synthese von 2'-5'-Oligoadenylaten die RNase L induziert, welche die Viren-Replikation über den Abbau von einzelsträngiger RNS in der Zelle stört (Samuel 1991). Zusätzlich hemmen Interferone das Wachstum bereits infizierter Zellen und sensitivieren sie gegenüber apoptotischen Stimuli. Die IFN-induzierte Expression der Proteinkinase R (PKR) führt zu der Inaktivierung des Translations-Initiationsfaktors eIF2 und damit zu einer verminderten Protein-Synthese in der Zelle (Clemens & Elia 1997). Auch die Kinase CDK2, welche an den Zell-Zyklus-Übergängen G1-S und S-G2 beteiligt ist, wird durch IFN $\gamma$  deutlich herunter reguliert (Czajkowski et al. 2002, Gollob et al. 2005). Desweiteren stimulieren die Interferone die Expression von MHC-Proteinen (Haupthistokompatibilitätskomplex), welche eine Rolle bei der Erkennung entarteter Zellen spielen und für die Präsentation von körperfremden Antigenen auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen verantwortlich sind (Boehm et al. 1997, Cebulla et al. 1999). Zusätzlich ist IFN $\gamma$  bei der Aktivierung von Makrophagen und der damit verbundenen Produktion zytotoxischer Sauerstoff- bzw. Stickstoff-Radikale beteiligt (MacMicking et al. 1997). Während der genaueren Untersuchung der Interferon-induzierten Signalweiterleitung wurde der JAK/STAT-Signalweg entdeckt, welcher die weitere Signalweiterleitung in der Zelle vermittelt (Darnell et al. 1994).

### **1.2 Der JAK/STAT Signalweg**

Ein stark konservierter und phylogenetisch sehr alter Signaltransduktionsweg wird über die Janus-Kinasen (JAK) und die Signal-Transduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) vermittelt. In Verbindung mit der Tyrosin-Phosphorylierung wurden STAT-Proteine schon bei dem Einzeller *Dictyostelium discoideum* beobachtet (Darnell 1997). Die JAK-Proteine sind der Funktion nach Rezeptor-assoziierte Tyrosin-Kinasen. Die bisher in Säugtieren entdeckten vier Mitglieder JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2 sind ebenfalls evolutionär konserviert und verfügen jeweils über eine Carboxy-terminal lokalisierte Kinase-Domäne (Boehm et al. 1997, Stark et al. 1998). Die Bedeutung der JAKs bzw. STATs wird durch

zahlreiche Immunerkrankungen unterstrichen, welche bei einer gestörten Rezeptor-Kinase-Assoziation oder bei Mutationen bzw. bei dem Fehlen der Proteine auftreten (Horvath 2000, Levy & Darnell 2002).



**Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Dynamik des kanonischen JAK/STAT-Signaltransduktionsweges.** Latente STATs translozieren fortwährend zwischen Zytoplasma und Zellkern (Meyer & Vinkemeier 2004). Die Liganden-vermittelte Dimerisierung von Rezeptoruntereinheiten setzt eine Tyrosin-Phosphorylierungs-Kaskade in Gang, die letztendlich zu der Tyr-Phosphorylierung der STAT-Proteine führt. Daraufhin transloziert das phosphorylierte STAT in den Zellkern, wo durch die Bindung an spezifische Promotorelemente die Expression von Zielgenen gesteuert wird (Levy & Darnell 2002).

Der JAK/STAT-Signalweg wird über die Bindung eines Zytokins an den extrazellulären Teil des entsprechenden Rezeptors eingeleitet (Abb. 1.1). Die Liganden-induzierte Assoziation der Rezeptor-Untereinheiten führt zu der Autophosphorylierung von intrazellulär mit dem Rezeptor assoziierten JAKs, welche infolge die spezifische Phosphorylierung intrazellulärer Rezeptor-Tyrosinreste katalysieren. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Erkennungssequenzen für STAT-Proteine, welche über SH2-Domänen (*Src Homology 2*) vermittelte Interaktionen zum Rezeptor rekrutiert werden. Am Rezeptor erfolgt durch die JAKs die Phosphorylierung eines in den STAT-Proteinen konservierten Tyrosinrestes der carboxy-terminalen SH2-Domäne (Shuai et al. 1993). Die Tyrosin-Phosphorylierung erlaubt den STATs die Dimerisierung über reziproke pTyr-SH2-Domänen-Interaktionen, woraufhin sie innerhalb kurzer Zeit im Zellkern akkumulieren (Shuai et al. 1994, Stark et al. 1998, Horvath 2000). Obwohl auch das nicht Tyrosin-phosphorylierte STAT über einen energieunabhängigen Transportmechanismus dauerhaft zwischen Zytoplasma und Zellkern pendelt

(Meyer et al. 2002), wird die nukleäre Akkumulation der STATs über einen Ran-GTPase abhängigen Prozess angetrieben (Sekimoto et al. 1996, Meyer et al. 2004). Im Zellkern steuern die STAT-Proteine, über die Bindung an spezifische Promotorregionen der DNS, die transkriptionelle Regulation von Zielgenen (Decker et al. 1997, Stark et al. 1998). Die Inaktivierung des Signalweges erfolgt über die nachfolgende Dephosphorylierung der STAT-Proteine, welche über Protein-Tyrosin-Phosphatasen vermittelt wird (tenHoeve et al. 2002, Heinrich et al. 2003). Das nicht mehr phosphorylierte STAT kann nach dem Rücktransport in das Zytoplasma Liganden-abhängig erneut am Rezeptor Tyrosin-phosphoryliert werden.

### 1.3 Die Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren

Die STATs sind latent zytoplasmatische Proteine, die über die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren von extrazellulären Botenstoffen aktiviert werden. Die weitere Signalübermittlung zu den Zielgenen im Zellkern erfolgt auf direktem Wege durch die STATs selbst (Chen et al, 1998, Levy & Darnell, 2002). Aufgrund ihrer unmittelbaren Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Signalübertragung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen sind STATs in verschiedene essentielle zelluläre Prozesse involviert, z.B. die embryonalen Entwicklung und Organogenese, die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung, die angeborene bzw. adaptive Immunität und die Angiogenese (Horvath 2000, Buettner et al. 2002).



**Abb. 1.2. Schematische Darstellung der Protein-Domänen-Struktur von STATs.** An eine Amino-terminale Domäne (N-Domäne) schließt sich eine 4 $\alpha$ -Helices enthaltende Domäne (4 $\alpha$ -Helix) an. Die DNS-Bindung vermittelnde Domäne ist über die Linker-Domäne mit der SH2-Domäne verbunden, die einen evolutionär konservierten und für die Aktivierung der STATs notwendigen Tyrosinrest enthält (Tyr). Ein für die Transaktivierung von STATs notwendigen Serinrest (Ser) befindet sich in der Carboxy-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne (TAD) (Darnell 1997).

In Säugetieren wurden der Familie der STAT-Proteine bislang sieben Mitglieder zugeordnet, die evolutionär konserviert sind: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Darnell 1997). Das alternative Spleißen vorläufiger STAT-mRNS (Boten-RNS) und posttranslationale proteolytische Prozesse führen jedoch zur Expression von elf verschiedenen STAT Isoformen: 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2, 3 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 3 $\gamma$ , 3 $\delta$ , 4, 5a, 5b, 6 (Benekli et al. 2003). Die einzelnen STATs sind aus ca. 750-850 Aminosäuren aufgebaut und besitzen eine evolutionär

und funktional konservierte Domänenstruktur (Abb. 1.2). Ein konservierter Tyrosinrest der SH2-Domäne wird bei der Aktivierung der STAT-Proteine phosphoryliert (Schindler et al. 1992, Shuai et al. 1993). Mit Ausnahme der Faktoren STAT2 und STAT6 erfolgt zusätzlich die Phosphorylierung eines Carboxy-terminal gelegenen Serinrestes (Zhang et al. 1995, Decker & Kovarik 2000). Die Amino-terminale Domäne (N-Domäne) ist, nach der SH2-Domäne, die am besten konservierte Domäne innerhalb der STAT-Familie. Die Hauptfunktion der 124-145 Aminosäuren umfassenden N-Domäne liegt hauptsächlich in der Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Unter anderem wurden in der N-Domäne des für diese Arbeit wichtigen STAT1-Proteins die Bereiche für die Interaktion mit Zytokin-Rezeptoren (Murphy 2000), mit PIAS1 (Liao et al. 2000) und CBP/p300 (Zhang et al. 1996) identifiziert. Eine über die N-Domänen vermittelte Homodimerisierung von STAT-Proteinen spielt insbesondere bei der kooperativen DNS-Bindung zweier Dimere an benachbarte GAS-Stellen eine Rolle (Vinkemeier et al. 1996, Vinkemeier et al. 1998, John et al. 1999). An die N-Domäne schließt sich die 149-187 Aminosäuren umfassende  $4\alpha$ -Helix-Domäne an, welche ebenfalls die Bindung an Zytokin-Rezeptoren vermittelt (Zhang et al. 2000). Zusätzlich wurde in dieser Domäne ein STAT1-Kernexportsignal (Begitt et al. 2000) bzw. ein STAT3-Kernlokalisierungssignal (Ma & Cao 2006) entdeckt. Die sich anschließende DNS-Bindungsdomäne der STAT-Proteine vermittelt die spezifische Interaktion mit der DNS. Dabei werden palindromische DNS-Sequenzen erkannt, wobei die einzelnen Moleküle des transkriptionell aktiven STAT-Dimers jeweils eine Hälfte des Palindroms binden (Seidel et al. 1995). Die DNS-Bindungsdomäne von STAT1 enthält außerdem eine Kernlokalisationssequenz, welche aber erst nach der Ausbildung des Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1-Dimers zugänglich ist (Meyer et al. 2002). Die 88-95 Aminosäuren umfassende Linker-Domäne verbindet die DNS-Bindungsdomäne und die SH2-Domäne. Durch Mutationsanalysen wurde gezeigt, dass die Linker-Domäne in der Ausbildung des transkriptionell aktiven STAT1-Komplexes (Yang et al. 1999) und bei dem Zytokin-unabhängigen Kerntransport von STAT1 eine Rolle spielt (Marg et al. 2004). Die SH2-Domäne ist die am stärksten konservierte Domäne innerhalb der STAT-Familie und enthält den für die Aktivierung der STATs notwendigen Tyrosinrest (Schindler et al. 1992, Shuai et al. 1993). Durch die Erkennung von Phosphor-Tyrosinresten ermöglicht sie nicht nur die spezifische Bindung der STATs an Zytokin-Rezeptoren, sondern auch die Homo- bzw. Heterodimerisierung über reziproke pTyr-SH2-Domänen Interaktionen (Shuai et al. 1993, Gupta et al. 1996). Die Carboxy-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne (TAD) weist die größte Heterogenität innerhalb

der STAT-Familie auf. Mit Ausnahme von STAT2 und STAT6 enthält die TAD einen konservierten Serinrest, dessen Phosphorylierung für die vollständige transkriptionelle Aktivierung der STAT-Proteine erforderlich ist (Zhang et al. 1995, Decker & Kovarik 2000).

Durch Studien an Mäusen, bei denen einzelne STAT-Gene selektiv ausgeschaltet wurden, konnte die Funktion der einzelnen STAT-Proteine identifiziert werden. Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit üben die einzelnen STAT-Proteine Zytokin-spezifisch eine große Vielfalt von Funktionen aus. STAT2 wird durch IFN $\alpha$  oder IFN $\beta$  aktiviert und bildet zusammen mit STAT1 und IRF9 den transkriptionellen ISGF3-Komplex (*IFN-Stimulated Gene Factor*). Dieser Komplex führt zu einer Aktivierung der Transkription von Genen mit einem ISRE-Motif (*IFN-Stimulated Response Element*; Levy et al. 1988) und ist unabkömmlich für die Vermittlung der antiviralen Immunantwort (Durbin et al. 1996, Park et al. 2000). STAT3 wird über die Gruppe der IL6-Zytokine aktiviert und spielt eine große Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung, verdeutlicht an der embryonalen Letalität von STAT3-*Knockout* Mäusen (Takeda et al. 1997). Über STAT3 reguliert das Zytokin LIF (Leukämie Inhibierender Faktor) die Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen und verhindert deren Ausdifferenzierung (Niwa et al. 1998). Nach der gewebespezifischen Blockierung der STAT3-Expression wurde die Wirkung von STAT3 generell als proliferativ, antiapoptotisch und entzündungshemmend beschrieben (Akira 1999). STAT4 ist essentiell für die Vermittlung der IL12-Antwort (Kaplan et al. 1996), die eine Rolle bei der Differenzierung von Th1-Zellen, der Erhöhung der Zytotoxizität von natürlichen Killer-Zellen und bei der Regulation der IFN $\gamma$ -Produktion spielt. Die Faktoren STAT5a und STAT5b werden über eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert und regulieren die Brustdrüsenentwicklung und Laktogenese (Liu et al. 1997). STAT6 wird in Antwort auf die Zytokine IL4 und IL13 aktiviert und beeinflusst u.a. die Expression der MHC-Klasse II Proteine, die Proliferation von T- und B-Zellen, die Entwicklung von Th2-Zellen und den Antikörper-Klassenwechsel zu IgE (Akira et al. 1999).

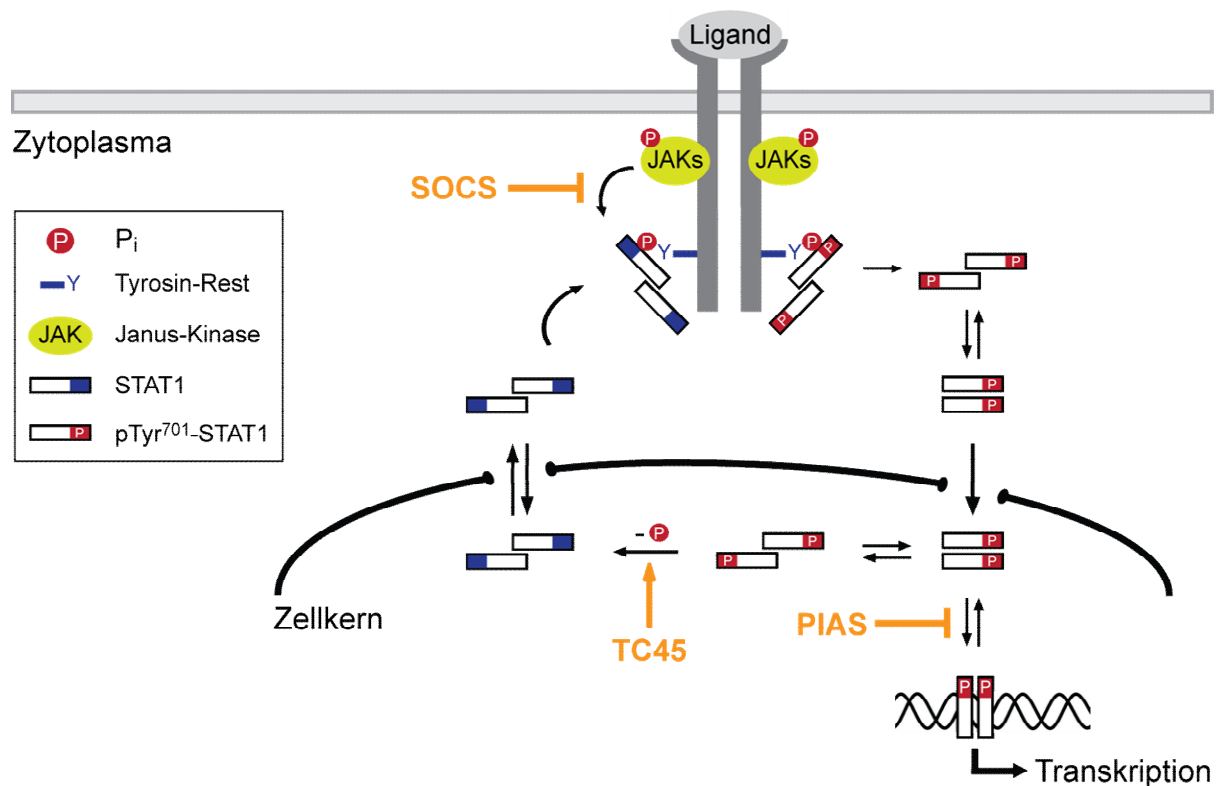
### **1.3.1 Der Transkriptionsfaktor STAT1**

Das humane STAT1-Protein besteht aus 750 Aminosäuren und besitzt die für die STAT-Familie typische Domänenstruktur (vgl. Abb. 1.2). Die Aktivierung kann über verschiedene Zytokine erfolgen, u.a. durch die Typ-I und Typ-II Interferone, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), den Tumornekrosefaktor  $\alpha$

(TNF $\alpha$ ) und IL27 (Darnell et al. 1994, Kumar et al. 1997, Takeda et al. 2003). Eine wichtige physiologische Bedeutung von STAT1 besteht in der Vermittlung der Immunantwort. In Antwort auf das Typ-II IFN $\gamma$  werden dabei Homodimere aus Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1-Molekülen gebildet (Schindler et al. 1992, Shuai et al. 1993, Stark et al. 1998). Über deren nachfolgende DNS-Bindung an GAS-Stellen (Gamma Aktivierte Sequenz) wird die antivirale und antibakterielle Immunantwort induziert (Durbin et al. 1996, Meraz et al. 1996). In Antwort auf Typ-I Interferone bilden sich zusätzlich Heterodimere mit Tyrosin-phosphoryliertem STAT2. In Verbindung mit IRF9 wird dabei der transkriptionelle Komplex ISGF3 gebildet, welcher über die DNS-Bindung von ISRE-Sequenzen die antivirale Immunantwort vermittelt (Durbin et al. 1996, Meraz et al. 1996, Park et al. 2000). Bestätigend wurde bei STAT1-defizienten Mäusen eine signifikant erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen festgestellt (Durbin et al. 1996, Meraz et al. 1996). Zudem wurde STAT1 eine Bedeutung bei der Suppression von Tumoren zugeschrieben. Die Tumorentwicklung von ErbB2/Neu-abhängigen Brustkrebs wurde durch STAT1 inhibiert (Raven et al. 2011) und STAT1-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Anfälligkeit zur Karzinogen-induzierten Tumorbildung (Kaplan et al. 1998). Allgemein wird die Wirkung von STAT1 als pro-apoptotisch und anti-proliferativ beschrieben. Gegenüber STAT1-exprimierenden Zellen ist der TNF $\alpha$ -induzierte Zelltod in STAT1-defizienten Zellen deutlich reduziert (Kumar et al. 1997). Zusätzlich ist die Regulation des Zell-Zyklus-Übergangs G<sub>2</sub>/M nach der Schädigung von DNS in STAT1-defizienten Zellen beeinträchtigt (Townsend et al. 2005).

Ursprünglich wurde angenommen, dass latentes STAT1 in Form von Monomeren im Zytoplasma der Zelle vorliegt und erst nach erfolgter Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung dimerisiert (Darnell et al. 1994). Allerdings konnte in den letzten Jahren von mehreren Forschungsgruppen gezeigt werden, dass auch das nicht phosphorylierte STAT1 bereits als Dimer vorliegt (Mao et al. 2005, Wenta et al. 2008). Dabei dimerisiert das nicht phosphorylierte STAT1 in einer sogenannten antiparallelen Konformation, die über reziproke N-Domänen und 4 $\alpha$ -Helix/DNS-Bindedomänen-Interaktionen stabilisiert wird. Diese Konformation scheint auch essentiell für die Rekrutierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen zu sein. Die Destabilisierung des antiparallelen STAT1-Dimers, z.B. durch N-terminale Mutationen bzw. Deletionen, führt zu einem Dephosphorylierungs-Defekt (Meyer et al. 2004, Zhong et al. 2005, Mertens et al. 2006). Nach der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung liegt STAT1 zusätzlich in einer parallelen Dimer-Konformation vor, die über reziproke pTyr<sup>701</sup>- und SH2-Domänen vermittelte Interaktionen stabilisiert wird (Shuai et al. 1994). Das parallele STAT1-Dimer stellt die DNS-

bindende und transkriptionell aktive Konformation dar (Darnell 1997, Chen et al. 1998). Allerdings wurde inzwischen auch das nicht phosphorylierte STAT1 mit einer konstitutiven Expression von Genen in Verbindung gebracht (Chatterjee-Kishore et al. 2000).



**Abb. 1.3. Die negative Regulation der STAT1-Signaltransduktion.** Latentes STAT1 liegt in der Zelle als ein antiparalleles Dimer vor (Mao et al. 2005) und transloziert fortwährend zwischen Zytoplasma und Zellkern (Meyer et al. 2004). Nach der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung liegt STAT1 zusätzlich in einer parallelen Dimer-Konformation vor. Das parallele STAT1-Dimer stellt die transkriptionell aktive Konformation dar und ist in der Lage die Expression von Zielgenen zu steuern (Darnell 1997, Chen et al. 1998). Die Dephosphorylierung durch die Phosphatase TC45 (orange) erfordert die antiparallele Dimerkonformation von STAT1 (Mertens et al. 2006). Weitere negative Regulatoren der STAT1-Signaltransduktion stellen die SOCS- und PIAS-Proteine (orange) dar (Yoshimura 2005).

Wie bereits erwähnt, katalysieren die JAKs die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des latenten STAT1 am Rezeptor. Daraufhin akkumuliert STAT1 innerhalb kurzer Zeit im Zellkern und beeinflusst die transkriptionelle Regulation von Zielgenen. Obwohl die Dauer der Kernakkumulation dabei mehrere Stunden andauern kann (Schindler et al. 1992, Shuai et al. 1993), ist die Dauer der Signaltransduktion selbst jedoch zeitlich beschränkt. Die Signaltermination wird in erster Linie über die direkte Dephosphorylierung von STAT1 durch nukleäre Phosphatasen erreicht (Haspel & Darnell 1999). Die Dimer-Konformation des Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1 spielt bei diesem Prozess eine besondere Rolle. Das parallele STAT1-Dimer wird über reziproke pTyr-SH2-Domänen-Interaktionen stabilisiert und die Phosphor-Tyrosine (pTyr) sind nicht frei zugänglich. Zusätzlich schützt die Bindung an DNS

das parallele Dimer vor dem Zugang von Phosphatasen (Meyer et al. 2003). Die Notwendigkeit einer funktionalen N-Domäne führte zu der Erkenntnis, dass für eine effiziente Dephosphorylierung von STAT1 eine räumliche Umorientierung des transkriptionell aktiven parallelen Dimers zu der antiparallelen Konformation erfolgen muss (Zhong et al. 2005, Mertens et al. 2006). In dieser Konformation liegen die SH2-Domänen mit den Phosphor-Tyrosinen räumlich exponiert vor und können ohne sterische Behinderung durch die Phosphatase TC45 dephosphoryliert werden (tenHoeve et al. 2002, Zhong et al. 2005, Mertens et al. 2006). Das nicht mehr Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1 kann anschließend zurück in das Zytoplasma exportiert werden (vgl. Abb. 1.3). Obwohl bei dem Exportprozess der Transportfaktor CRM1 eine tragende Rolle spielt, konnte dessen Inaktivierung den Export von STAT1 nicht vollständig unterbinden, was auf das Vorhandensein weiterer Exportmechanismen hindeutet (Marg et al. 2004).

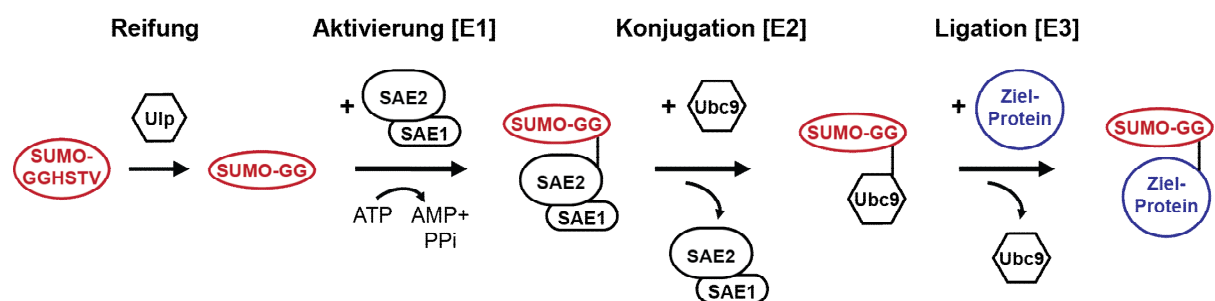
Die Dauer der STAT1-Signaltransduktion wird außerdem durch das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1 selbst begrenzt. Zum einen wird durch einen Rückkopplungsmechanismus die Expression der SOCS-Gene (*Suppressor of Cytokine Signaling*) induziert. Die SOCS-Proteine inhibierend anschließend die katalytische Aktivität der JAKs und verhindern dadurch am Rezeptor die erneute Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 (Naka et al. 1997, Song & Shuai 1998, Zimmerer et al. 2007). Einen weiteren negativen Regulator der STAT1-Signaltransduktion stellen die PIAS-Proteine (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) dar. Durch die Interaktion von PIAS1 mit dem Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 wird dessen DNS-Bindung an GAS-Sequenzen *in vitro* behindert (Liu et al. 1998, Liao et al. 2000). Aber auch im Maus-Modell behinderte PIAS1 selektiv die Rekrutierung des Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1 an IFN-induzierbare Gen-Promotoren (Liu et al. 2004). Die Assoziation von PIAS1 mit STAT1 scheint dabei besonders in der späten Phase der IFN-Antwort zu erfolgen (Weber et al. 2009). In den letzten Jahren wurde die posttranslationale SUMO-Modifikation (*Small Ubiquitin-like Modifier*) von STAT1 (Rogers et al. 2003) als eine zusätzliche Ebene der transkriptionellen Repression von STAT1 vorgeschlagen (Ungureanu et al. 2003, Ungureanu et al. 2005).

### **1.4 Die SUMO-Modifikation von Proteinen**

Posttranslationale Modifikationen erfolgen nach der Synthese des betreffenden Proteins an den Ribosomen und sind ein wichtiger Mechanismus eukaryotischer Zellen, um Funktion,



Aktivität oder Lokalisation von Proteinen dynamisch zu regulieren. Die kovalente Modifikation einer Aminosäure-Seitenkette des Zielproteins mit niedermolekularen Substanzen, wie z.B. Phosphat-, Azetat- oder Methylresten, sind weit verbreitet. In den letzten Jahren wurde zudem die Verknüpfung von kleinen Proteinen an ein Akzeptorlysins des Zielproteins beobachtet. Sehr gut charakterisiert wurde die kovalente Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin, welche eine Rolle bei der zellulären Proteinqualitätskontrolle und dem Abbau von kurzlebigen Proteinen spielt (Bonifacino & Weissman 1998). Der für diese Arbeit bedeutende „*Small Ubiquitin-like Modifier*“ (abgekürzt SUMO) besteht aus 100 Aminosäuren (ca. 11 kDa) und ist strukturell sehr eng mit Ubiquitin verwandt. Obwohl die Primärstrukturen der beiden Proteine nur zu ca. 18% übereinstimmen, besitzen beide Proteine eine charakteristische Tertiärstruktur aus  $\beta$ -Faltblättern, die über  $\alpha$ -Helices verknüpft sind:  $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  (Bayer et al. 1998). In Wirbeltieren konnten der Familie der SUMO-Proteine bislang vier Mitglieder zugeordnet werden: die ubiquitär vorkommenden SUMO1, SUMO2 und SUMO3 sowie das nur in Nierenzellen vorkommende SUMO4 (Melchior 2000, Bohren et al. 2004). SUMO2 und SUMO3 sind eng verwandt und weisen eine 97%-ige Homologie auf, während sie im Vergleich mit SUMO1 und SUMO4 (zu 90% homolog) nur zu ca. 50% identisch sind (Saitoh & Hinchev 2000, Bohren et al. 2004).



**Abb. 1.4. Schematische Darstellung des SUMO-Konjugations-Weges.** SUMO (rot) wird zunächst als eine Vorstufe an den Ribosomen translatiert. Die Abspaltung C-terminaler Aminosäuren durch Cystein-Proteinasen (Ulp) exponiert ein charakteristisches Glyzin-Glyzin-Motif (Reifung). Der E1-Enzymkomplex SAE1/SAE2 (*SUMO Activating Enzyme*) aktiviert das gereifte SUMO unter ATP-Verbrauch, indem eine energiereiche Thioester-Bindung zwischen einem E1-Cystein und der C-terminalen Carboxyl-Gruppe von SUMO ausgebildet wird. Im nächsten Schritt wird das aktivierte SUMO durch eine Transesterifizierung auf die E2-Konjugase Ubc9 übertragen, welche SUMO direkt mit einem Zielprotein (blau) konjugieren kann, indem eine Isopeptid-Bindung der C-terminalen Carboxylgruppe und der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Akzeptorlysins gebildet wird. Modifiziert übernommen aus Verger et al. 2003.

Die Konjugation von SUMO mit einem Zielprotein ist dem Mechanismus nach sehr ähnlich zu der Ubiquitylierung, allerdings ist das entsprechende Akzeptorlysins zumeist in einer Konsensus-Struktur von „ $\psi$  K x E“ lokalisiert. Dabei stellt  $\psi$  eine hydrophobe (zumeist

Isoleuzin oder Valin) und x eine beliebige Aminosäure dar (Rodriguez et al. 2001, Xue et al. 2006). Nachdem SUMO an den Ribosomen zunächst als Vorstufe translatiert wird, erfolgt nach einem Reifungsprozess die Übertragung auf das Zielprotein mittels einer Enzymkaskade (Details siehe Abb. 1.4). Obwohl *in vitro* Versuche gezeigt haben, dass die E2-Konjugase Ubc9 einen SUMO-Rest direkt auf ein Zielprotein übertragen kann, erscheint eine Sumolierung *in vivo* durch Ubc9 allein nicht ausreichend (Desterro et al. 1999, Kagey et al. 2003). Die Effizienz der SUMO-Konjugation kann durch die Beteiligung von spezifischen SUMO-E3-Ligasen teilweise erheblich gesteigert werden, welche nach der Bindung von Ubc9 und dem Zielprotein die Ausbildung der Isopeptid-Bindung katalysieren (Johnson & Gupta 2001, Pichler et al. 2002, Kagey et al. 2003). Die bisher identifizierten SUMO-E3-Ligasen RanBP2, PIAS und Pc2 zeigen jeweils eine individuelle subzelluläre Lokalisation und scheinen dadurch nur bestimmte Protein-Gruppen zu sumolieren. Während RanBP2 vorrangig mit dem Kernporenkomplex assoziiert und Pc2 in subnukleären Strukturen lokalisiert, den *Polycomb*-Partikeln, sind die PIAS-Proteine im Nukleoplasma verteilt (Sachdev et al. 2001, Pichler et al. 2002, Kagey et al. 2003). Die Modifikation von Proteinen mit SUMO ist ein dynamischer und reversibler Prozess. Bislang wurden sechs SUMO-spezifische Cystein-Proteinasen in Säugetieren entdeckt: SENP1, SENP2, SENP3, SENP5, SENP6 und SENP7 (Yeh 2009). Diese Cystein-Proteinasen spielen nicht nur eine Rolle bei der Reifung von SUMO, sie sind auch für die SUMO-Dekonjugation von Zielproteinen verantwortlich. Das Ausschalten der SUMO-Protease Ulp1 verhindert das Wachstum von Hefen. Aber auch die zusätzliche Bereitstellung von gereiftem SUMO reicht nicht aus, um ein Wachstum der Hefen zu ermöglichen (Li & Hochstrasser 1999, Taylor et al. 2002). Demnach ist die Dekonjugation von sumolierten Proteinen ebenso wichtig für die zelluläre Regulation, wie die SUMO-Konjugation selbst. In Analogie zu den SUMO-E3-Ligasen zeigen auch die SENP-Proteine eine individuelle Lokalisation innerhalb der Zelle, welches auf eine Bedeutung bei der Substrat-Selektion hinweist. Während SENP1 im Nukleoplasma und den Kernstrukturen lokalisiert ist (Gong et al. 2000), zeigt SENP2 vorrangig eine Assoziation mit dem Kernporenkomplex-Protein Nup153 (Zhang et al. 2002). SENP3 lokalisiert in den Nukleoli (Gong et al. 2000) und SENP6 zeigt eine zytoplasmatische Verteilung (Kim et al. 2000).

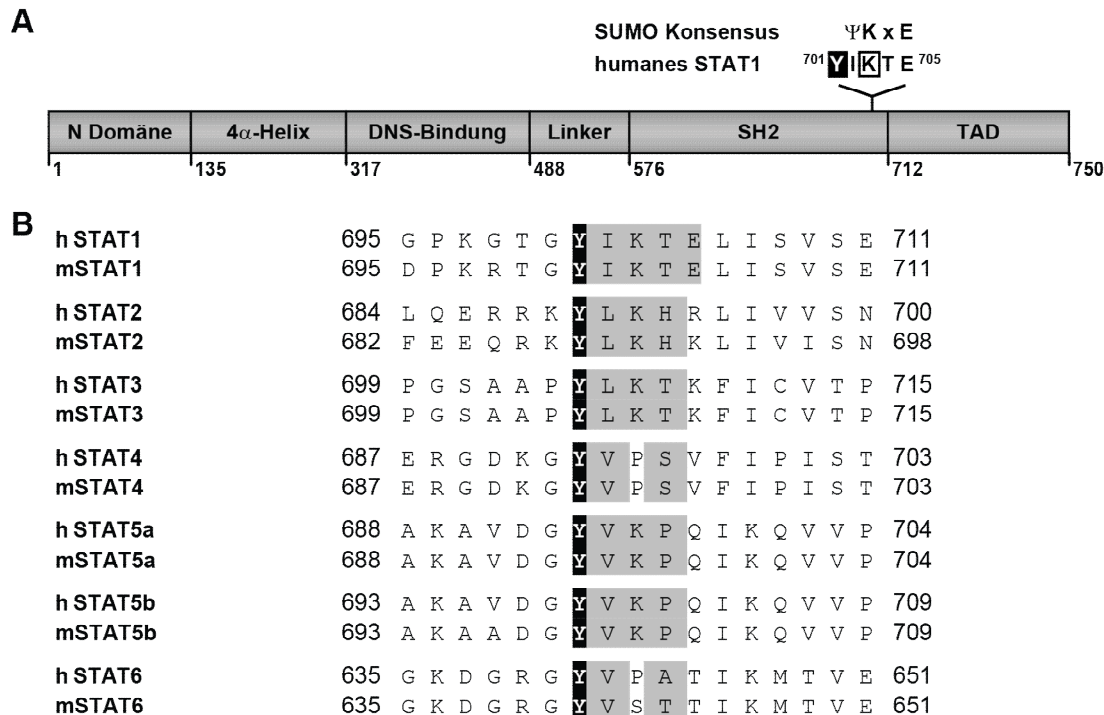
Die SUMO-Konjugation eines Zielproteins wurde erstmals 1996 anhand der zytoplasmatischen GTPase RanGAP1 beschrieben. Die Sumolierung führte zu einer Relokalisation von RanGAP1 innerhalb der Zelle, welches nach der Interaktion mit dem Nucleoporin 358 verstärkt mit dem Kernporenkomplex assoziiert war (Matunis et al. 1996, Mahajan et al. 1997).

Auch die SUMO-Konjugation des Promyelotischen-Leukämie-Proteins (PML) ist mit einer Relokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle verbunden. Das SUMO-konjugierte PML lokalisiert danach in nukleären Strukturen, welche als PML-Kernkörperchen beschrieben werden (Zhong et al. 2000a). Die Funktion vieler anderer SUMO-modifizierter Proteine ist von der Lokalisation in den PML-Kernkörperchen abhängig, darunter viele Transkriptionsfaktoren und für die Stabilität des Chromatins notwendige Proteine (Zhong et al. 2000b). Obwohl die genaue Funktion der PML-Kernkörperchen bis jetzt noch unklar ist, führt ihre Auflösung zu weitreichenden Veränderungen des Wachstums und der Differenzierung von Zellen (Zhong et al. 2000b, Best et al. 2002).

Bemerkenswerterweise sind eine große Anzahl von SUMO-Substraten Transkriptionsfaktoren. Die SUMO-Konjugation wurde dabei vorrangig mit einer transkriptionellen Repression in Verbindung gebracht (Sachdev et al. 2001, Ross et al. 2002, Verger et al. 2003). Einige Transkriptionsfaktoren werden durch die Sumolierung innerhalb der Zelle relokalisiert und stehen demnach nicht mehr für eine Genaktivierung zur Verfügung (Sachdev et al. 2001, Chalkiadaki & Talianidis 2005). Aber auch eine mögliche Beteiligung der Sumolierung auf die DNS-Bindung (Goodson et al. 2001), bei der Neu-Organisation des Chromatins und der Rekrutierung von Ko-Repressoren wurde diskutiert (Nayak et al. 2009, Ouyang & Gill 2009). Eine weitere Funktion der SUMO-Konjugation betrifft die Regulation der Proteinstabilität. Anhand des NF $\kappa$ B-Signalweges wurde entdeckt, dass SUMO und Ubiquitin teilweise um identische Akzeptorlysine konkurrieren. Dabei verhinderte die SUMO-Modifikation von I $\kappa$ B $\alpha$  dessen Poly-Ubiquitinylierung und damit letztendlich den proteasomalen Abbau des Proteins (Desterro et al. 1998). Obwohl durch die Sumolierung eine große Bandbreite von Proteinen reguliert wird, scheint eine physiologische Hauptbedeutung in der Vermittlung der zellulären Stressantwort zu liegen. Die Gesamtmenge an SUMO-Konjugaten ist bei Hitzeshock-Bedingungen oder bei hohem oxydativen bzw. Ethanol-Stress in der Zelle deutlich erhöht (Saitoh & Hinchey 2000, Mao et al. 2000, Zhou et al. 2004). Umgekehrt wird die SUMO-Konjugation durch geringe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) inhibiert, indem zwischen den katalytischen Cysteinresten des E1- und E2-Enzyms eine Disulfidbrücke ausgebildet wird (Bossis & Melchior 2006). Erst kürzlich konnte die Sumolierung auch mit der Beeinträchtigung der antibakteriellen Immunantwort in Verbindung gebracht werden. Leberhomogenisate *Listeria Monocytogenes*-infizierter Mäusen zeigten eine verringerte Menge an SUMO-Konjugaten gegenüber nicht infizierten Mäusen, eine Folge des verstärkten proteosomalen Abbaus des SUMO-E2-Enzyms Ubc9 (Ribet et al. 2010).

### 1.4.1 SUMO-Modifikation von STAT1

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 ist streng reguliert. Neben Protein-Protein-Interaktionen spielen posttranslationale Modifikationen eine große Rolle, u.a. sind die Tyr<sup>701</sup>- und die S<sup>727</sup>-Phosphorylierung von STAT1 für dessen Aktivierung notwendig (vgl. 1.3.1).



**Abb. 1.5 STAT1 ist das einzige Mitglied der STAT-Familie mit einem funktionalen SUMO-Konsensus.** (A) Schematische Darstellung der 750 Aminosäuren umfassenden Proteinstruktur von STAT1. Die ideale SUMO-Konsensus-Struktur bzw. die von STAT1 sind hervorgehoben. Der für die Aktivierung von STAT1 notwendige Tyrosinrest<sup>701</sup> ist schwarz unterlegt, das SUMO1-Akzeptorlysin<sup>703</sup> ist schwarz eingrahmt. Ψ - hydrophobe Aminosäure, x - beliebige Aminosäure. (B) Gegenüberstellung der entsprechenden Aminosäure-Reste von humanen bzw. murinen STATs in dem Bereich des für die Aktivierung notwendigen Tyrosin-Restes, welcher schwarz unterlegt ist. SUMO-Konsensus konforme Aminoester sind grau hervorgehoben.

Erst vor kurzem wurde STAT1 als Substrat der SUMO-Modifikation identifiziert (Rogers et al. 2003). Tatsächlich besitzt STAT1 in unmittelbarer Nähe zu dem konservierten Tyr<sup>701</sup>-Rest eine ideale SUMO-Konsensus-Struktur (Abb. 1.5A). Obwohl der Bereich um die Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle innerhalb der STAT-Familie stark konserviert ist, besitzen die anderen Mitglieder der STAT-Familie nur einen inaktiven SUMO-Konsensus. Dabei ist der SUMO-Konsensus von STAT2, STAT3, STAT5a und STAT5b nur durch eine Punktmutation an der Position Tyr<sup>+4</sup> zerstört (Abb. 1.5B). Die Sumolierung von STAT1 ist somit einzigartig innerhalb der STAT-Familie und die enge räumliche Nähe zum konservierten Tyr<sup>701</sup> lässt vermuten, dass die Sumolierung eine Rolle bei der Regulation der STAT1-Aktivität spielt. In Übereinstimmung ist der STAT1-SUMO-Konsensus in der Evolution konserviert und bereits seit den Knochenfischen in der STAT1-Proteinsequenz vorhanden (Abb. 1.6).

Homo sapiens	695	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Pan troglodytes	695	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Macaca mulatta	695	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Otolemur garnettii	695	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Equus caballus	695	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Canis familiaris	695	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Sus scrofa	695	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Pteropus vampyrus	694	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	710
Bos Taurus	693	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	709
Cervus elaphus	625	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	641
Rattus norvegicus	695	D P K R T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Mus musculus	695	D P K R T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	711
Ornithorhynchus anatinus	545	G P R G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	540
Monodelphis domestica	696	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	712
} Plazenta- und Säugetiere ( <i>Placentalia</i> und <i>Marsupialia</i> )					
Taeniopygia guttata	1116	G P K G N G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	1132
Gallus gallus	697	T P K G N G	<b>Y</b>	I R T E L I S V S E	713
} Vögel ( <i>Aves</i> )					
Xenopus laevis	694	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	710
Xenopus tropicalis	693	G P K G T G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	709
} Amphibien ( <i>Amphibia</i> )					
Tetraodon nigroviridis	692	N A D N S G	<b>Y</b>	I K T E L I S V S E	708
Salmo salar	689	S S S S T G	<b>Y</b>	M K T E L I S V S E	705
Oncorhynchus mykiss	689	G S S S T G	<b>Y</b>	M K T E L I S V S E	705
Paralichthys olivaceus	691	N Q L K R C	<b>Y</b>	M K T E L I S V S E	707
Oryzias latipes	689	S S Q P S G	<b>Y</b>	M K T E L I S V S E	705
Gasterosteus aculeatus	693	G P E K S S	<b>Y</b>	M K T V L I S V S E	709
Danio rerio	692	K K A D E G	<b>Y</b>	I S T T L I S I S E	708
Carassius auratus	693	D N P I K P	<b>Y</b>	I P R R M I S V S E	709
} Knochenfische ( <i>Osteichthyes</i> )					
Anopheles gambiae	647	K P R S K H	<b>Y</b>	I S A E M R T V L I	663
Drosophila melanogaster	698	Q D P V T G	<b>Y</b>	V K S T L H V H V C	714
Caenorhabditis elegans	582	G D S P T G	<b>Y</b>	I Q S E I V M V A K	598
} Neinflügler und Fadenwürmer ( <i>Neoptera</i> und <i>Nematoda</i> )					

**Abb. 1.6 Der STAT1-SUMO-Konsensus ist in der Evolution konserviert.** Darstellung der Aminosäure-Sequenzen verschiedener Spezies im SUMO-Konsensus-Bereich von STAT1. Der konservierte Tyrosin-Rest ist jeweils schwarz, SUMO-Konsensus konforme Aminosäurereste grau unterlegt. Die Spezies mit einem funktionalen SUMO-Konsensus sind schwarz eingrahmt. Die Mutation des SUMO-Akzeptorlysins bei *Gallus gallus* wurde per Sequenzierung in dieser Arbeit noch einmal bestätigt (Anhang 8.1).

Die Sumolierung von STAT1 wurde 2003 erstmals beschrieben, wobei die STAT1-Aminosäure<sup>703</sup> als das Akzeptorlysins identifiziert wurde (Rogers et al. 2003). PIAS $\alpha$ , aber nicht PIAS1, war in der Lage als SUMO-E3-Ligase die Effizienz der STAT1-Sumolierung zu erhöhen. Allerdings konnte die Vermutung nicht bestätigt werden, dass PIAS $\alpha$  die transkriptionelle Aktivität von STAT1 über dessen SUMO-Modifikation reduziert. Auch nach der Verhinderung der Sumolierung durch die Mutation des Akzeptorlysins (K<sup>703</sup>R) konnte kein unterschiedliches transkriptionelles Verhalten gegenüber dem sumolierten STAT1 beobachtet werden (Rogers et al. 2003). Die innerhalb der STAT-Familie einzigartige Sumolierung von STAT1 schien somit keine inhibierende Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von STAT1 auszuüben. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit STAT1-defizienten Maus-Fibroblasten beobachtet, welche stabil mit dem SUMO-freien STAT1-K<sup>703</sup>R rekonstituiert wurden (Song et al. 2006). Obwohl anschließend eine verbesserte DNS-Bindung beobachtet wurde, war entgegen den Erwartungen die transkriptionelle Aktivierung eines Reportergenes reduziert. Die ebenfalls untersuchte SUMO-freie E<sup>705</sup>A-Mutante zeigte dagegen keine Unterschiede zum sumolierten STAT1-WT. Auffällig an dieser Studie ist, dass trotz erfolgreich verhin-

derter Sumolierung die verwendeten STAT1-Mutanten sich funktionell erheblich unterscheiden (Song et al. 2006). Im Gegensatz dazu konnte unter Verwendung von STAT1-defizienten Fibrosarkoma-Zellen (U3A-Zellen) ein physiologischer Effekt der SUMO-Konjugation von STAT1 beobachtet werden. In Reporter-gen-Experimenten zeigten die SUMO-freien STAT1-Mutanten K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A eine signifikant erhöhte transkriptionelle Aktivität gegenüber dem sumolierten Wildtyp (Ungureanu et al. 2003, Ungureanu et al. 2005). Dieser Effekt wurde zusätzlich bei der Untersuchung der endogenen STAT1-Zielgene *GBP1*, *TAP1* und *IRF1* bestätigt, die eine erhöhte Genexpression in SUMO-freien STAT1 exprimierenden Zellen zeigten (Ungureanu et al. 2005). Diese widersprüchlichen Ergebnisse führen in Verbindung mit der unmittelbaren Nähe von Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle und SUMO-Akzeptorlysin<sup>703</sup> zu der Frage, inwieweit die Mutationen in diesem Bereich nur spezifisch die Sumolierung von STAT1 beeinflussen. Bemerkenswerterweise wurde bereits von Song et al. (2006) mit STAT1-Peptiden *in vitro* festgestellt, dass die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung die SUMO-Konjugation von STAT1 verhindert. Der dadurch erwartete physiologische Effekt der Sumolierung auf die Regulation der STAT1-Signaltransduktion konnte jedoch nicht ermittelt werden (Song et al. 2006). In einer späteren Studie wurde zudem festgestellt, dass die Sumolierung die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 *in vivo* verhindert. Dafür wurde erstmalig das UFDS-System (*Ubc9 fusion-directed Sumoylation*) eingesetzt, welches die Effizienz der SUMO-Konjugation in einer SUMO-E3-Ligase ähnlichen Weise verbessert (Jakobs et al. 2007). Dieses System erleichterte die Verfolgung der STAT1-Sumolierung deutlich, woraufhin festgestellt wurde, dass SUMO-konjugiertes STAT1 in Antwort auf IFN $\beta$  nicht mehr Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliert wird. In einer wichtigen Kontrolle mit radioaktiv markiertem Phosphat konnte zudem bestätigt werden, dass dieses Ergebnis tatsächlich eine Folge des fehlenden Phosphat-Einbaus war und nicht auf eine beeinträchtigte Bindung des bei dem immunchemischen Nachweis verwendeten pSTAT1-Antikörpers zurückzuführen war (Jakobs et al. 2007). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und die STAT1-Sumolierung gegenseitig ausschließen, welches in einer unabhängigen Studie nochmals bestätigt wurde (Zimnik et al. 2009). Dennoch konnte durch die Untersuchung von SUMO-freien Mutanten in den früheren Studien weder die physiologische Bedeutung der STAT1-Sumolierung, noch die erwartete Verbesserung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung festgestellt werden (Rogers et al. 2003, Song et al. 2006). Daraufhin wurde die Sumolierung als eine Modifikation beschrieben, die „unwahrscheinlich ist, eine wichtige Rolle bei der Regulation der STAT1-Aktivität *in vivo* zu spielen“ (übersetzt aus Song et al. 2006).

### 1.5 Fragestellung

Aus der Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren ist STAT1 das einzige Mitglied mit einem funktionalen und evolutionär konservierten SUMO-Konsensus. Tatsächlich konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass STAT1 ein Ziel der SUMO-Konjugation ist, auch wenn letztendlich nur ein kleiner Teil der verfügbaren STAT1-Menge modifiziert vorliegt. Die unmittelbare Nähe des SUMO-Akzeptorlysins<sup>703</sup> zu der für die Aktivierung von STAT1 bedeutenden Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle lässt vermuten, dass die Sumolierung einen Einfluss auf die STAT1-Aktivität ausübt. Dennoch blieb die physiologische Relevanz der STAT1-Sumolierung auch nach mehreren Studien unklar, da diese zu widersprüchlichen Resultaten führten. Allerdings scheinen die in bisherigen Studien verwendeten SUMO-freien STAT1-Mutanten neben der Sumolierung auch die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 zu beeinträchtigen, was eine Analyse der rein SUMO-abhängigen Effekte erschwert. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die SUMO-Modifikation von STAT1 auch durch eine strukturerhaltende Mutation, bei gleichzeitig minimaler Beeinträchtigung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung, verhindert werden kann. Mit Hilfe der STAT1-Mutante E<sup>705</sup>Q soll anschließend der Einfluss der Sumolierung auf die Regulation des Transkriptionsfaktors STAT1 geklärt werden. Der Schwerpunkt liegt dabei neben der Untersuchung der Aktivierungs-/Inaktivierungskinetik von STAT1 in der Beantwortung der Frage, ob eine nur ca. 2% der STAT1-Moleküle betreffende SUMO-Modifikation überhaupt eine wesentliche Rolle bei der posttranslationalen Regulation von STAT1 spielen kann.

## **2. Material**

### **2.1 Chemikalien**

Die verwendeten Feinchemikalien waren von analytischer Qualität und wurden bei den folgenden Anbietern erworben: *Calbiochem* (San Diego, USA), *Fisher Scientific* (Loughborough, UK), *Flowgen Bioscience* (Nottingham, UK), *Invitrogen* (Paisley, UK), *J. T. Baker* (Deventer, Niederlande), *Melford* (Ipswich, UK), *Merck* (Darmstadt), *MP Biomedicals* (Illkirch, Frankreich), *Raymond A Lamb* (Eastbourne, UK), *Repligen* (Waltham, USA), *Roche* (Mannheim), *Sigma-Aldrich* (Dorset, UK). Radiochemikalien wurden als  $\alpha$ -<sup>32</sup>P markierte Nukleotide (370 MBq/ml) von *GE Healthcare* (München) bezogen.

### **2.2 Puffer, Lösungen und Medien**

Die Herstellung von Puffer-Lösungen erfolgte mit deionisiertem und durch MilliQ-Filter (0,2  $\mu$ m, Roth, Karlsruhe) sterilisiertem Wasser. Bei Bedarf wurde der pH-Wert mit einem pH-Meter (GLP 540, WTW, Weilheim) überprüft und eingestellt. Gegebenenfalls wurden DTT (Dithiotreitol), NEM (N-Ethylmaleinimid), PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und *Complete*-Proteinaseinhibitoren (Roche, Mannheim) den Puffer-Lösungen unmittelbar vor Benutzung hinzugefügt. Steriles Wasser, PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), FKS (fetales Kälberserum) und DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) wurde gebrauchsfertig von der Firma *Sigma-Aldrich* (Dorset, UK) bezogen. Die genaue Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen ist in den entsprechenden Methoden (siehe 3.1-3.3) angegeben.

### **2.3 Antikörper**

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden bei den folgenden Anbietern erworben: *Santa Cruz* (Santa Cruz, USA), *Cell Signaling* (Danvers, USA), *Sigma-Aldrich* (Dorset, UK), *Invitrogen* (Paisley, UK), *BD* (Franklin Lakes, USA), *Licor Biosciences* (Lincoln, USA), *Strattech Scientific* (Newmarket, UK) und *Aurion* (Wageningen, Niederlande). Für den immunchemischen Nachweis von Proteinen wurden die entsprechenden Primär- bzw. Sekundärantikörper in TBS-T verdünnt und unter den angegebenen Inkubationsbedingungen verwendet (Tabelle 2.1). Die Verdünnung der Antikörper für den immunozytochemischen Nachweis (Tabelle 2.2) von Proteinen erfolgte in 20% (v/v) FKS/PBS.



**Tabelle 2.1. Inkubationsbedingungen der für den immunchemischen Nachweis von Proteinen verwendeten Antikörper.** IP – Immunpräzipitation, IB – Immunoblot.

Antigen	Antikörper	Konzentration	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
STAT1	C136 (Kaninchen)	2 mg/ml	IP (1:100)	2 h, RT	Santa Cruz
	C24 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IB (1:4000)	1 h, RT	Santa Cruz
	E23 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IB (1:2000)	1 h, RT	Santa Cruz
	M23 (Kaninchen)	2 mg/ml	IB (1:10000)	ü. N., 4 °C	Santa Cruz
STAT3	C20 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IB (1:2000)	ü. N., 4 °C	Santa Cruz
pSTAT1	#9171 (Kaninchen)	k. A.	IB (1:1000)	ü. N., 4 °C	Cell Signaling
pSTAT1-Ser727	44382G (Kaninchen)	k. A.	IB (1:1000)	ü. N., 4 °C	Invitrogen
pSTAT3	#9131 (Kaninchen)	k. A.	IB (1:1000)	ü. N., 4 °C	Cell Signaling
β-Aktin	A5441 (Maus)	k. A.	IB (1:8000)	30 min, RT	Sigma-Aldrich
SUMO1	GMP1 (Maus)	0,5 mg/ml	IB (1:500)	ü. N., 4 °C	Invitrogen
Ubc9	H81 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IB (1:1000)	ü. N., 4 °C	Santa Cruz
GFP	sc8334 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IB (1:1000)	ü. N., 4 °C	Santa Cruz
iNOS	610328 (Maus)	250 µg/ml	IB (1:4000)	ü. N., 4 °C	BD
Kaninchen	Irdye800 CW (Esel)	1 mg/ml	IB (1:10000)	30 min, RT	Licor Biosciences
Maus	Irdye800 CW (Esel)	1 mg/ml	IB (1:10000)	30 min, RT	Licor Biosciences

**Tabelle 2.2. Inkubationsbedingungen der für den immunzytochemischen Nachweis von Proteinen verwendeten Antikörper.** IF – Immunfluoreszenz, IG – Immunogold.

Antigen	Antikörper	Konzentration	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
STAT1	C24 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IF (1:5000)	1 h, RT	Santa Cruz
			IG (1:5)	ü. N., 4 °C	
STAT3	C20 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IF (1:2000)	ü. N., 4 °C	Santa Cruz
pSTAT1	#9171 (Kaninchen)	k. A.	IF (1:250)	ü. N., 4 °C	Cell Signaling
pSTAT3	#9131 (Kaninchen)	k. A.	IF (1:250)	ü. N., 4 °C	Cell Signaling
Ubc9	H81 (Kaninchen)	0,2 mg/ml	IB (1:1000)	ü. N., 4 °C	Santa Cruz
Kaninchen	Cy3 (Ziege)	1,5 mg/ml	IF (1:2000)	30 min, RT	Strattech Scientific
Kaninchen	Gold-15nm (Ziege)	k. A.	(1:20)	2 h, RT	Aurion

## 2.4 Proteine und Enzyme

Die rekombinant hergestellten Proteine STAT1 $\alpha$ , pTyr<sup>701</sup>-STAT1 $\alpha$  (pSTAT1), STAT1 $\beta$  und STAT1 $\gamma$  wurden freundlicherweise von Dr. Nikola Wenta (Universität Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt (Wenta et al. 2008). Die rekombinant hergestellten Proteine Aos1/Uba2 (P006), Ubc9 (P011) und SUMO1 (P012) wurden von *LAE Biotech* (Rockville, USA) erworben. Restriktionsenzyme, T4-DNS-Ligase, DNS-Polymerase 1 (Klenow-Fragment) und alkalische Kälberdarm Phosphatase inklusive Puffer-Lösungen und BSA wurden von *NEB* (Herts, UK) bezogen. Die DNS-Polymerase *Pfu Ultra High Fidelity* mit verbesserter Fehlerkorrektur stammte von *Stratagene* (La Jolla, USA). RNase A und Proteinase K wurden von *Sigma-Aldrich* (Dorset, UK) und Lysozym von *Eurobio* (Les Ulis Cedex, Frankreich) bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine sind in Tabelle 2.3 aufgelistet und wurden von *Calbiochem* (San Diego, USA) und *Roche* (Mannheim) bezogen.

Tabelle 2.3. Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine.

Zytokin	Konzentration	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
IFN $\gamma$ (Human)	5 $\mu$ g/ml	1:1000	1 h, 37 °C	Calbiochem
IFN $\gamma$ (Maus)	5 $\mu$ g/ml	1:1000	1 h, 37 °C	Calbiochem
IL6	100 $\mu$ g/ml	1:5000	20 min, 37 °C	Calbiochem
EPO	250 U/ml	1:36	1 h, 37 °C	Roche

## 2.5 Plasmide

Von anderen Personen hergestellte und in dieser Arbeit genutzte Plasmide sind in der Tabelle 2.4 beschrieben. Bei Bedarf wurden, unter Verwendung der in Tabelle 2.5 beschriebenen Mutagenese-Primer, Punktmutationen in die Plasmide eingeführt.

Tabelle 2.4. Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle/Referenz
pBluescript-KS	Expressionsplasmid	Stratagene (La Jolla, USA)
pcDNA3.1	Expressionsplasmid	Invitrogen (Paisley, UK)
pcDNA3.1 STAT1 $\alpha$	STAT1 $\alpha$	Dr. Uwe Vinkemeier
pEGFP-N1	CFP	Clontech (Mountain View, USA)
pEGFP-N1 STAT1 $\alpha$ -GFP	STAT1 $\alpha$ -GFP	Dr. Uwe Vinkemeier
pEGFP-N1 STAT1 $\beta$ -GFP	STAT1 $\beta$ -GFP	Dr. Uwe Vinkemeier
pEGFP-N1 STAT1 $\beta$ -NES-GFP	STAT1 $\beta$ -NES-GFP	Dr. Thomas Meyer (Universität Göttingen)
pEGFP-N1 mSTAT3-GFP	mSTAT3-GFP	Dr. Uwe Vinkemeier
pEGFP-N1 mSTAT3-Y705F-GFP	mSTAT3-Y705F-GFP	Dr. Francis Wolfram
pEGFP-N1 STAT1 $\alpha$ -F77A-GFP	STAT1-F77A-GFP	Dr. Thomas Meyer (Universität Göttingen)
pEGFP-N1 STAT1 $\alpha$ -F172W-GFP	STAT1-F172W-GFP	Dr. Thomas Meyer (Universität Göttingen)
pEGFP-N1 STAT1 $\alpha$ - $\Delta$ NLS-GFP	STAT1- $\Delta$ NLS-GFP	Dr. Thomas Meyer (Universität Göttingen)
pEGFP-N1 STAT1 $\alpha$ -R602L-GFP	STAT1-R602L-GFP	Dr. Curt M. Horvath (Northwestern University, USA)
pEGFP-N1 STAT1 $\alpha$ -Y701F-GFP	STAT1-Y701F-GFP	Dr. Curt M. Horvath (Northwestern University, USA)
pIRES-His-SUMO1	SUMO1 mit 6xHis-Marker	Dr. Peter O'Hare (Oxford)
pcDNA3.1-mUbc9	mUbc9	Dr. Frauke Melchior (Universität Heidelberg)
pRc/CMV-EgR	Rezeptorchimäre Eg-Rezeptor/gp130	Dr. Friedemann Horn (Universität Leipzig)
pGAS-3xLy6E	Luziferase	Dr. James E. Darnell Jr. (Rockefeller University, USA)
pSTAT3-Luc	Luziferase	Dr. Toshio Hirano (Osaka University, Japan)
pBABE	Puromyzin-Resistenz	Morgenstern & Land (1990)
pPNT- <i>frt3</i>	Rekombinationsplasmid	Dr. Klaus-Peter Knobeloch (Universität Freiburg)

## 2.6 Oligo-Nukleotide

Oligo-Nukleotide wurden von der Firmen *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg) und *Biotex* (Berlin) bezogen und in Oligonukleotid-Puffer (10 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Kaliumchlorid, 20 mM Tris, pH 7,5) aufgenommen. Kontroll- (#AM4611) und Zielgen-siRNS

(UBE2I/Ubc9 siRNS #4390824) wurden von der Firma *Ambion* (Austin, USA) bezogen und mit dem empfohlenen Transfektions-Reagenz siPort (#AM4511) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Mutagenese-Primer sind in der Tabelle 2.5 zusammengefasst, anderweitig verwendete PCR-Primer sind in der Tabelle 2.6 beschrieben.

**Tabelle 2.5. Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Mutagenese-Primer.**

Primer	Sequenz 5'-3'	Mutation
558	GTTATGCTGTAGCAAGGCGTTATTCTCCAAAG	F77A (hSTAT1)
559	CTTTGGAGAATAACGCCTTGCTACAGCATAAC	F77A (hSTAT1)
B072	GAAGTGGATATATCAGGACTGAGTTGATTTCT	K703R (hSTAT1)
B073	AGAAATCAACTCAGTCCTGATATATCCAGTTC	K703R (hSTAT1)
B240	GGATATATCAAGACTCAGTTGATTTCTGTGTCT	E705Q (hSTAT1)
B241	AGACACAGAAATCAACTGAGTCTTGATATATCC	E705Q (hSTAT1)
B248	CCCGTACCTGAAGACCGAGTTCATCTGTGTGACAC	K709E (mSTAT3)
B249	GTGTCACACAGATGAAGTTCGGTCTTCAGGTACGGG	K709E (mSTAT3)
B258	CAAGATGAATATGACTGGAAATGCAAAACCTTGC	F172W (hSTAT1)
B259	GCAAGGTTTTGCATTTCCAGTCATATTCATCTTG	F172W (hSTAT1)
B347	GGATACATCAAGACTCAGTTGATTTCTGTGTCTG	E705Q (mSTAT1)
B348	CAGACACAGAAATCAACTGAGTCTTGATGTATCC	E705Q (mSTAT1)
B391	CTAAAGGAACTGGATTTATCAAGACTCAGT	Y701F-E705Q (hSTAT1)
B392	ACTGAGTCTTGATAAATCCAGTTCCTTTAG	Y701F-E705Q (hSTAT1)
B426	GGATATATCAAGACTGCGTTGATTTCTGTGTCT	E705A (hSTAT1)
B426X	AGACACAGAAATCAACGCAGTCTTGATATATCC	E705A (hSTAT1)
B535	GGCTGAATTTCCGGCACCTGTGGTTGAAAGAACAGAAAAATG	Q408W (hSTAT1)
B536	CATTTTTCTGTTCTTTCAACCACAGGTGCCGAAATTCAGCC	Q408W (hSTAT1)
B571	CCCGTACCTGAAGACCCAGTTCATCTGTGTGACAC	K709Q (mSTAT3)
B572	GTGTCACACAGATGAAGTTCGGTCTTCAGGTACGGG	K709Q (mSTAT3)
B696	CTAAAGGAACTGGATATATGAAGACTGAGTTGATT	I702M (hSTAT1)
B697	AATCAACTCAGTCTTCATATATCCAGTTCCTTTAG	I702M (hSTAT1)

**Tabelle 2.6. Beschreibung der für PCR und Klonierungen verwendeten Primer.** Restriktions-Schnittstellen sind farbig gekennzeichnet: BamHI- rot, XhoI-blau, KpnI-orange.

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
B343	<b>CTCGAG</b> GGCACCTGCACAGGGT	Klonierung 5'Homologiearm, vorwärts (mSTAT1)
B344	<b>CTCGAG</b> GCTCACCTGGACAGA	Klonierung 5'Homologiearm, rückwärts (mSTAT1)
B349	CATTCTGTGGGATCATGATCTGTCAAGC	RFLP-Primer genomisches STAT1-E705Q, vorwärts
B350	GGACTAGTTACAAACTTTCCAGAATGTC	RFLP-Primer genomisches STAT1-E705Q, rückwärts
B581	AAAAAA <b>GGATCC</b> AAATGTCGGGGATCGCCCTC	Klonierung STAT1-Ubc9(-GFP) Fusionsprotein, vorwärts
B582	AAAAAA <b>GGATCC</b> TTATGAGGGGGCAAACCTTC	Klonierung STAT1-Ubc9 Fusionsprotein, rückwärts
B583	AAAAAA <b>GGATCC</b> TGAGGGGGCAAACCTCTTC	Klonierung STAT1-Ubc9-GFP Fusionsprotein, rückwärts
B615	GATCAAATCAAGACTGAGCTT	Klonierung STAT1-EQ <sup>SUMO</sup> , vorwärts (BamHI-Überhang)
B616	GATCAAGCTCAGTCTTGATTT	Klonierung STAT1-EQ <sup>SUMO</sup> , rückwärts (BamHI-Überhang)
B617	GATCAAATCAGAAGTCTGAGCTT	Klonierung STAT1-EQ <sup>KR</sup> , vorwärts (BamHI-Überhang)
B618	GATCAAGCTCAGTCTTGATTT	Klonierung STAT1-EQ <sup>KR</sup> , rückwärts (BamHI-Überhang)
B623	ATATAT <b>GGATCC</b> GATGTCTGACCAGGAGGCAAA	Klonierung STAT1-E705Q-SUMO1-GFP, vorwärts
B700	ATATAT <b>GGATCC</b> GTTTGTCTCTGATAAACTTC	Klonierung STAT1-E705Q-SUMO1-GFP, rückwärts
MD3	AGAGGAATTGTGCACGAGGGCCAGTA	Herstellung der Sonde S (Southern Blot), vorwärts
MD4	GCCCCAACACAAACACACCGCTAGAT	Herstellung der Sonde S (Southern Blot), rückwärts
MD8	ATTTTA <b>GGTACC</b> GGACAGAGCACATCGTGG	Klonierung 3'Homologiearm, rückwärts (mSTAT1)
MD13	ATTTTA <b>GGTACC</b> CGAGAGTCCACCACCTCAGG	Klonierung 3'Homologiearm, vorwärts (mSTAT1)

## 2.7 Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden entweder chemisch kompetente Bakterien (siehe 3.1.1) des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  (original bezogen von Invitrogen, Paisley, UK) bzw. hochkompetente Bakterien des *E. coli*-Stammes XL2-Blue der Firma *Stratagene* (La Jolla, USA) verwendet.

## 2.8 Zell-Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zell-Linien und deren Bezugsquelle sind in der Tabelle 2.7 zusammengefasst.

**Tabelle 2.7. Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linien.**

<b>Zell-Linie (human)</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle/Referenz</b>
HeLa S3	Zervix-Karzinoma-Zellen	ATCC CCL-2.2
PC3	Stat3-defiziente Prostatakrebs-Zellen	ATCC CRL-1435
HEK293T	embryonale Nierenzellen	ATCC CRL-1573
U3A	Stat1-defiziente Fibrosarkoma Zellen	Müller et al. 1993
primäre Hepatozyten	Leberbiopsie-Zellen (Gottschalg et al. 2006)	diese Arbeit, Droescher et al. 2011
<b>Zell-Linie (Maus)</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle/Referenz</b>
MEF7 <sup>+/+</sup>	embryonale Fibroblasten, Wildtyp	ten Hoeve et al. 2002
MEF-TC45 <sup>-/-</sup>	embryonale Fibroblasten, TC45-defizient	ten Hoeve et al. 2002
MEF STAT1-WT	embryonale Fibroblasten, Wildtyp	diese Arbeit, Begitt et al. 2011
MEF STAT1-E705Q	embryonale Fibroblasten, exprimieren STAT1-E705Q	diese Arbeit, Begitt et al. 2011
M $\Phi$ STAT1-WT	Knochenmarks-Makrophagen, Wildtyp	diese Arbeit, Begitt et al. 2011
M $\Phi$ STAT1-E705Q	Knochenmarks-Makrophagen, exprimieren STAT1-E705Q	diese Arbeit, Begitt et al. 2011
MEF <sup>Neo</sup>	Neomycin-resistente MEF-Zellen	Dr. Klaus-Peter Knobeloch (Universität Freiburg)
Sv129/ola (Subklon E14.1)	Stammzell-Linie	Dr. Klaus-Peter Knobeloch (Universität Freiburg)
<b>Zell-Linie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle/Referenz</b>
Cos7	Grünmeerkatze-Fibroblasten	ATCC CRL-1651

### **3. Methoden**

#### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien**

Chemisch kompetente *E.coli* Bakterien wurde nach einer Methode von Cohen (Cohen et al. 1972) vorbereitet. Dafür wurde zunächst eine 10 ml LB-Übernachtskultur mit Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  in einem Inkubator unter Schütteln kultiviert (37 °C, 180 rpm) und anschließend in 1 l LB-Medium überführt. Die Kontrolle des Bakterienwachstums erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 wurden die Bakterien für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (1800x g, 4 °C, 10 min) und in 300 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 4 °C wurden die Bakterien sedimentiert (1100x g, 4 °C, 10 min) und in 10 ml einer 100 mM CaCl<sub>2</sub>/35% (w/v) Glycerin Lösung aufgenommen. Die nun kompetenten Bakterien wurden abschließend in 100  $\mu$ l Portionen auf Trockeneis eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

LB-Medium: 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe Extrakt

##### **3.1.2 Hitzeschock-Transformation von DNS in kompetente Bakterien**

Die Amplifikation ligierter Plasmid-DNS und die Neu-Amplifikation bereits gereinigter Plasmid-DNS wurde in chemisch kompetenten Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  durchgeführt (siehe 3.1.1). Für Mutageneseansätze und Ligationen von PCR-Produkten wurden hochkompetente Bakterien des *E. coli*-Stammes XL2 Blue verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2  $\mu$ l einer 1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurden 5  $\mu$ l Ligations- oder Mutageneseprodukt bzw. 50 ng bereits gereinigter Plasmid-DNS zugemischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C und 5 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit 500  $\mu$ l LB-Medium für 1h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bevor 100-600  $\mu$ l der Suspension auf Antibiotika supplementierten LB-Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Abhängig von dem jeweiligen Resistenzgen der zu amplifizierenden Plasmid-DNS wurde entweder 100  $\mu$ g/ml Ampizillin oder 50  $\mu$ g/ml Kanamycin A (beide Sigma-Aldrich, Dorset, UK) als Antibiotikum verwendet.

#### 3.1.3 Gewinnung rekombinanter DNS aus transformierten Bakterien

Rekombinante DNS wurde aus transformierten E.coli Bakterien der Stämme DH5a oder XL2 Blue isoliert, welche durch Wachstum in einem Antibiotika-haltigen LB-Medium (siehe 3.1.2) selektioniert wurden. Für die Gewinnung von DNS im großen Maßstab wurde eine einzelne Bakterienkolonie in einer 100 ml Übernacht-Kultur inkubiert (37 °C, unter Schütteln). Die Isolation der DNS erfolgte nach Herstelleranweisung mit dem Plasmid Maxi Kit der Firma *Qiagen* (Hilden). Zur Gewinnung rekombinanter DNS im kleinen Maßstab wurde eine einzelne Bakterienkolonie in einer 2 ml LB-Kultur für 4-6 h inkubiert (37 °C, unter Schütteln). Anschließend wurden 1,5 ml Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (3300x g, 5 min, RT). Das Sediment wurde in 150 µl TELT-Puffer aufgenommen und mit 8 µl Lysozym (25 mg/ml) für 7 min bei Raumtemperatur, dann für 4 min bei 95°C und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (16100x g, 8 min, 4 °C) und der Abtrennung von Zelltrümmern wurde die im Überstand enthaltene DNS mit 100 µl Isopropanol gefällt und sedimentiert (16100x g, 15 min, 4 °C). Die erhaltene DNS wurde einmal mit 200 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und abschließend in 20 µl TE-Puffer mit 0,5 mg/ml RNase A aufgenommen.

TELT-Puffer (pH 7,5): 2,5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl, 62,5 mM EDTA,  
0,4% (w/v) Triton X-100

TE-Puffer (pH 8,0): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

#### 3.1.4 Auftrennung und Konzentrationsbestimmung von DNS

Die elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte in mit Ethidiumbromid versetzten (0,3 µg/ml) horizontalen Agarosegelen. Die 0,8-2%-igen (w/v) Agarosegele wurden je nach Verwendungszweck entweder mit NEEO Ultraqualität Agarose (analytisch) oder mit bei niedriger Temperatur schmelzender Agarose (präperativ) in 1x TAE-Puffer hergestellt. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 10x DNS-Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese mit 1x TAE-Laufpuffer in einer horizontalen *Owl EasyCast* Elektrophorese-Vorrichtung (Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 80-130 V durchgeführt. Als Molekulargewichts-Standard diente der 1 Kb DNS-Marker der Firma *Invitrogen* (Paisley, UK). Die separierten DNS-Banden wurden unter dem UV-Licht (312 nm) einer Gel-Dokumentationskammer der Firma *Herolab* (Wiesloch) visualisiert und mit dem Programm *EasyWIN32* ausgewertet. Im Anschluß an eine präperative Auftrennung wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS mit Hilfe des *Nucleospin Extract II*-Kit der

Firma *Machery-Nagel* (Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Güte der Aufreinigung und die DNS-Konzentration wurden mit dem Photospektrometer NanoDrop 1000 der Firma *Thermo Scientific* (Waltham, USA) bestimmt.

<u>1x TAE-Puffer (pH 8,0):</u>	40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA
<u>10x DNS-Probenpuffer:</u>	10x TAE-Puffer, 30% (w/v) Glycerin, 0.25% (w/v) Bromphenolblau

#### 3.1.5 DNS-Sequenzierung

Die Verifizierung von DNS-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* Kit der Firma *Applied Biosystems* (Carlsbad, USA). Dabei wird in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) zunächst ein spezifisch an die zu sequenzierende DNS gebundener Sequenzier-Primer mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden verlängert. Die PCR (siehe 3.1.6) von 50-200 ng der zu sequenzierenden DNS erfolgte unter Verwendung von 10 pmol Sequenzier-Primer, 4 µl 5x Sequenzierpuffer, 1 µl BigDye Terminator v3.1 und destilliertem Wasser (ad 20 µl). Nach einem 1-minütigen Denaturierungs-Schritt bei 94 °C wurden 30 Zyklen aus 16 s Denaturierung bei 94 °C, 16 s Hybridisierung bei 52 °C und 2 min Elongation bei 60 °C durchgeführt. Anschließend wurden die markierten Reaktionsprodukte mit 2 µl DNS-Fällungspuffer gemischt und durch Zugabe von 80 µl 95% (v/v) Ethanol für 15 Min. auf Eis präzipiziert. Die markierte DNS wurde abzentrifugiert (16100x g, 15 min, RT), einmal mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen und danach bei 37 °C getrocknet. Die Analyse der markierten DNS-Fragmente und die Erstellung der DNS-Sequenz erfolgten durch Frau Sonia Ouadi (School of Biomedical Sciences, Universität Nottingham, UK) und die Firma *Geneservice* (Nottingham, UK).

<u>DNS-Fällungspuffer (pH 8,5):</u>	1,5 M Natriumazetat, 250 mM EDTA
-------------------------------------	----------------------------------

#### 3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro* Amplifikation von DNS erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion. Bei diesem Verfahren wird ein von einem Primer-Paar flankierter DNS-Abschnitt spezifisch vervielfältigt. Dazu wurden 200 ng genomische DNS, bzw. in einer Standard-Reaktion 50 ng parentaler DNS, 10 pmol geeigneter PCR-Primer, jeweils 2,5 nmol der 4 natürlich vorkommenden Desoxynukleotid-Triphosphate, 5 µl 10x Pfu-Reaktionspuffer und 2,5 Einheiten *PfuUltra High-Fidelity* DNS-Polymerase (beide Stratagene, La Jolla, USA) in einem

Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in einem PCR-Automaten, sofern nicht anders angegeben, mit dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: nach einem 1-minütigen Denaturierungs-Schritt bei 94 °C wurden 35 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Hybridisierung bei 56 °C und 5 min Elongation bei 72 °C durchgeführt. Nach einem finalen 10-minütigen Elongationsschritt wurde die Probe bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

#### **3.1.7 Einführen von Punktmutationen in Plasmide (Mutagenese)**

Die ortsgerichtete Mutagenese zirkulärer DNS erfolgte nach dem Protokoll des *QuikChange* Verfahrens der Firma *Stratagene* (La Jolla, USA). In einer PCR-Reaktion wurden 50 ng der parentalen DNS mit entsprechenden Mutagenese-Primern amplifiziert, bevor die Ausgangs-DNS durch die methylierungsabhängige Restriktion mit 20 Einheiten DpnI zerstört wurde. Das mutierte und nicht methylierte DNS-Produkt wurde danach zur Amplifikation in hochkompetente XL-2 Blue Bakterien transformiert (siehe 3.1.2).

#### **3.1.8 Restriktionsverdau von DNS**

Die Restriktion von DNS erfolgte bei den vom Hersteller der Restriktionsenzyme empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Analytische Restriktionsansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Verwendung von 1-5 Einheiten Enzym für 1 h bei entsprechender Temperatur. Für präparative Restriktionsansätze wurden 0,5 µg Akzeptor-DNS bzw. 1 µg Donor-DNS in einem Gesamtvolumen von 50 µl unter Verwendung von 5-20 Einheiten Enzym für 2 Stunden bei entsprechender Temperatur inkubiert. Um nachfolgend eine Rezirkularisierung der Akzeptor-DNS zu verhindern, wurden kompatible Enden zusätzlich mit 2 Einheiten alkalischer Kälberdarm-Phosphatase bei 37 °C für 20 min dephosphoryliert. Abschließend erfolgte die Abtrennung von unerwünschten Proteinen, Pufferbestandteilen und DNS-Fragmenten mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.4).

#### **3.1.9 Ligation von DNS-Fragmenten**

Kompatible Enden linearer DNS-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNS-Ligase verbunden. Die Plasmid-DNS wurde in einem molaren Verhältnis von 1:8 zu dem einzubauenden DNS-Fragment in 20 µl 1x T4 DNS-Ligasepuffer mit 400 Einheiten T4 DNS-Ligase (beide



NEB, Herts, UK) bei 4 °C über Nacht inkubiert, bevor das Ligationsprodukt zur Amplifikation in kompetente Bakterien transformiert wurde (siehe 3.1.2).

#### 3.1.10 Klonierung von STAT1-Expressionsplasmiden

Für die Herstellung der STAT1-Varianten EQ<sup>SUMO</sup> und EQ<sup>KR</sup> wurde die DNS-Sequenz des STAT1-SUMO Konsensus dem Plasmid STAT1-E<sup>705</sup>Q-GFP zwischen STAT1 und GFP zugefügt. Dazu wurde eine doppelsträngige von GATC-Überhängen flankierte DNS-Sequenz generiert, welche einen funktionalen (Verwendung des Primerpaars B615/B616) bzw. inaktivierten SUMO-Konsensus von STAT1 (Verwendung des Primerpaars B617/B618) kodiert. Anschließend wurden diese DNS-Sequenzen über die C-terminal in der STAT1-Sequenz befindliche BamHI-Schnittstelle dem STAT1-GFP kodierenden Plasmides zugefügt (siehe auch 3.1.8 und 3.1.9), in deren Folge die BamHI-Schnittstelle zerstört wurde. Unter Verwendung der Primer B581/B583 wurde Ubc9 für die Klonierung des Fusionsproteins STAT1-Ubc9-GFP in einer PCR (siehe 3.1.6) von dem Plasmid pcDNA3.1-mUbc9 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die flankierenden BamHI-Schnittstellen in das Plasmid pEGFP-N1 STAT1 $\alpha$ -WT bzw. -E<sup>705</sup>Q am C-Terminus von STAT1 eingefügt (siehe 3.1.8-9). Mit dem PCR-Produkt der Primer B581/B582 wurden analog die entsprechenden Fusionsproteine hergestellt, bei dem ein in dem Primer B582 vorhandenes Stopcodon die Expression von GFP verhindert (siehe Abb. 4.26A für eine schematische Domänenstruktur). In einer PCR mit den Primerpaar B623/B700 wurde die von BamHI-Schnittstellen flankierte DNS-Sequenz für SUMO1 von dem Plasmid pIRES-His-SUMO1 amplifiziert (siehe 3.1.6). Anschließend wurde das PCR-Produkt mit BamHI-geschnitten (siehe 3.1.8) und in das mit BamHI geöffnete Plasmid pEGFP-STAT1 $\alpha$ -E<sup>705</sup>Q inkloniert (siehe 3.1.9).

#### 3.1.11 Gewinnung und Genotypisierung genomischer DNS

Für die Bestimmung des Genotyps von Mäusen wurde die genomische DNS aus Schwanzspitz- bzw. Ohrbiopsien isoliert (nach Laird et al. 1991) und anschließend mittels Sequenzierung oder RFLP-Analyse (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) der jeweilige Genotyp ermittelt. Die Biopsien wurden den Mäusen im Alter von ca. 4 Wochen vom Tierstallpersonal entnommen und entweder direkt verwendet oder bis zur Extraktion der DNS bei -20 °C gelagert. Das Gewebe wurde zunächst in 500  $\mu$ l DNS-Lysepuffer zusammen mit 100  $\mu$ g Proteinase K bei 58°C über Nacht lysiert. Nach der Abtrennung unlöslicher

Bestandteile durch Zentrifugation (16100x g, RT, 5 min), wurde die genomische DNS im Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt und präzipitiert (16100x g, 4 °C, 15 min). Die isolierte DNS wurde einmal mit 200µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend für 6-8 h bei 56°C in 40 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der genomischen DNS wurde photospektrometrisch ermittelt (siehe 3.1.4). Für die Genotypisierung der transgenen STAT1-E<sup>705</sup>Q Mauslinie wurde zunächst der Sequenz-Bereich um das Transgen in einer PCR mit den Primern B349 und B350 amplifiziert (siehe 3.1.6). Danach wurde das PCR-Produkt durch 2%-ige Agarose-Gelelektrophorese isoliert und in 20 µl Elutions-Puffer aufgenommen (siehe 3.1.4). Anschließend erfolgte entweder direkt die Sequenzierung des PCR-Produktes mit dem Sequenzier-Primer B349 (siehe 3.1.5) oder die für die RFLP-Analyse benötigte analytische Restriktion mit dem Enzym *Hinf I* (siehe 3.1.8). Die entstandenen DNS-Fragmente wurden nach 2%-iger Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Größe hin untersucht.

DNS-Lysepuffer (pH 8,5): 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2% (w/v) SDS

#### 3.1.12 Identifizierung transgener Stammzell-Kolonien

Bei der Erzeugung transgener embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) findet eine erfolgreiche homologe Rekombination nur bei einem sehr geringen Teil der behandelten Stammzellen statt. Das als „*Southern Blot*“ bezeichnete Verfahren dient dazu, im Agarosegel nach Größe aufgetrennte DNS auf eine Nylonmembran zu transferieren und durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNS-Probe spezifische Fragmente zu identifizieren. Der Southern Blot ermöglicht nicht nur die Identifizierung einer transgenen ES-Zellkolonie bei einer hohen Durchsatzrate, sondern läßt auch die Überprüfung des korrekten Integrationsortes zu. Dabei wird ein durch die homologe Rekombination hervorgerufenen geändertes Restriktionsmuster der genomischen DNS ausgenutzt.

Zunächst erfolgte die Isolation der genomische DNS aus ES-Zellkolonien (siehe 3.1.10), die anschließend durch einen PstI-Restriktionsverdau spezifisch fragmentiert wurde (siehe 3.1.8). Nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe 3.1.4) wurde das Agarosegel zusammen mit einem Lineal fotografiert, um eine nachfolgende Zuordnung der radioaktiven Signale zu ihrer Größe zu ermöglichen. Der Transfer der DNS auf die Nylonmembran erfolgte mit 0,4 M NaOH über einen Zeitraum von 16 h aufgrund von Kapillarkräften. Dafür wurde eine Konstruktion von 3 Whatman-Papieren, welche in Kontakt mit der NaOH-Lösung stehen, dem Agarosegel, der Nylonmembran, 3 Whatman-Papieren und einem Stapel saugfähigen Papiers

aufgebaut. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2x SSC-Lösung gewaschen und anschließend 6 h in Vorhybridisierungs-Puffer bei 65°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Für die Herstellung einer geeigneten Sonde S wurde ein 504 bp umfassender Teil des murinen Introns 24 durch eine PCR amplifiziert (siehe 3.1.6), bei der das Primerpaar MD3/MD4 und als Ausgangs-DNS der PAC-Klon *RPCI-21 209N6* des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD, Berlin) verwendet wurden. Die Markierung von 125 ng Sonde mit P<sup>32</sup>-dCTP erfolgte unter Verwendung des *Rediprime II*-Kit der Firma *GE Healthcare* (München) nach Herstellerangaben. Die Identifizierung der gesuchten Sequenz erfolgte mit der P<sup>32</sup>-markierten Sonde in Hybridisierungs-Puffer für ca. 16 h bei 65 °C. Nach dem Waschen der Membran mit 2x SSC/0,2 % (w/v) SDS für 5 min und 3-maligem Waschen mit 0,2x SSC/0,2 % (w/v) SDS für 20 min bei 65°C wurde die Membran zusammen mit einem feuchten Whatman-Papier in Folie eingeschlagen. Die markierte DNS wurde nach Exposition über Nacht in einer Expositionskassette mit einer Bildplatte (Fujifilm, Düsseldorf) mit dem *Phospho-Imager Storm 820* (GE Healthcare, München) detektiert.

<u>20x SSC (pH 7,0):</u>	0,3 M Natriumzitat, 3 M NaCl
<u>Hybridisierungs-Puffer:</u>	5x SSC, 0,5% (w/v) SDS, 0,1 mg/ml gescherte Heringssperma-DNS
<u>Vorhybridisierungs-Puffer:</u>	Hybridisierungs-Puffer, 5x Denhardt-Lösung

## **3.2 Biochemische Methoden**

### **3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE, einer modifizierten Version des 1970 von Laemmli beschriebenen Verfahrens. Polyacrylamid-Gele (PA-Gele) wurden mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem *Mini Protean II* der Firma *BioRad* (München) vorbereitet und wiesen eine Größe von 75 x 100 x 1,5 mm (Länge x Breite x Tiefe) auf. Dafür wurde zunächst ein 7 bzw. 10%-iges Polyacrylamid-Trenngel gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde darauf ein 4%-iges Polyacrylamid-Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingepasst. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden vor dem Beladen des Geles in 1x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert. Als Molekulargewichts-Standard diente die *SeeBlue Plus2* Proteinleiter (Invitrogen, Paisley, UK). Die Gelelektrophorese wurde für 50 min bei 150 V (entspricht einer Stromstärke von ca. 50 mA pro Gel) in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt.

<u>4x Trenngel-Puffer (pH 8,8):</u>	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS
<u>4x Sammelgel-Puffer (pH 6,8):</u>	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS
<u>Trenngel:</u>	1x Trenngel-Puffer, 0,1% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS, 7-15% 37,5:0,8 (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid
<u>Sammelgel:</u>	1x Sammelgel-Puffer, 0,1% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS, 4% 37,5:0,8 (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid
<u>4x SDS-Probenpuffer (pH 6,8):</u>	125 mM Tris-Base, 0,7 M DTT, 25% (w/v) Glyzerin, 4% (w/v) SDS, 1 Spatelspitze Bromphenolblau
<u>1x SDS-Laufpuffer:</u>	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glyzin, 0,1% (w/v) SDS

### 3.2.2 Western-Blot und immunchemischer Nachweis von Proteinen

Für die spezifische Identifizierung einzelner Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische zunächst von PA-Gelen auf Protran Nitrozellulose-Membranen übertragen. Hierfür wurden von Kathode zu Anode die folgenden mit Transferpuffer getränkten Lagen verwendet: 3 Whatman-Papiere, Nitrozellulose-Membran, Trenngel, 2 Whatman-Papiere. Anschließend erfolgte ein 50-minütiger Elektrotransfer im *Western Blot-Semi-Dry* Verfahren in einer *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*-Apparatur (Biorad, München). Durch Inkubation mit 4% (w/v) Milchpulver in TBS-Puffer (1 h, unter Schütteln) wurden freie Bindestellen auf den hoch Protein-affinen Membranen abgesättigt. Nach der Inkubation mit einem geeigneten Primär-Antikörper (siehe 2.3) in TBS-T-Puffer wurden nicht gebundene Antikörper jeweils durch kurzes Schwenken in TBS und 3-maligem Waschen in TBS-T (10 min, unter Schütteln) abgetrennt. Die Inkubation (30 min, unter Schütteln) mit einem gegen die Spezies des Primär-Antikörpers gerichteten Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärintikörpers (siehe 2.3) ermöglichte anschließend die Visualisierung der markierten Proteine mit dem *Odyssey Infrared Imaging System* der Firma *Licor Biosciences* (Lincoln, USA). Die quantitative Bestimmung von Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm *Odyssey 3.1* (Licor Biosciences). Bevor die Nitrozellulose-Membran erneut für einen immunchemischen Nachweis eingesetzt werden konnte, erfolgte das Ablösen der gebundenen Antikörper durch Inkubation mit Ablöse-Puffer für zweimal 30 min bei 65 °C im Wasserbad.

<u>Transferpuffer (pH 7,5):</u>	48 mM Tris/HCl, 39 mM Glyzin, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) Methanol
<u>10x TBS-Puffer (pH 7,3):</u>	100 mM Tris/HCl, 1,37 M NaCl
<u>TBS-T Puffer:</u>	1x TBS-Puffer, 0,05% (v/v) Tween 20
<u>Ablöse-Puffer (pH 2,0):</u>	25 mM Glyzin, 2% (w/v) SDS

#### 3.2.3 Herstellung von Zellextrakten

Die Herstellung von Gesamtzell-Extrakten (GZE) aus kultivierten Zellen erfolgte bei 4 °C. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend trockengesaugt. Nach Zugabe von 100 µl GZE-Puffer wurden die Zellen abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dort 5x auf- und abpipettiert. Nach Inkubation für 30 min bei 4 °C wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (16100x g, 15 min, 4 °C) und der Überstand in 1x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C gekocht.

GZE-Puffer (pH 7,4): 10 mM Tris/HCl, 280 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 1 mM Vanadat, 10% (w/v) Glycerin, 1 mM DTT, 1x Complete Proteinase-Inhibitor, 0,5% (v/v) Nonidet P40, 0,1 mM PMSF

#### 3.2.4 Affinitäts-Anreicherung von His-SUMO1 modifizierten Proteinen

Die Anreicherung Poly-Histidin markierter Proteine unter nativen Bedingungen erfolgte durch Metallionen-Chelat-Chromatographie, wobei die Histidinreste von immobilisierten Nickel-Ionen komplexiert werden. Als Matrix diente Nickel-NTA (Qiagen, Hilden), welche erstmals 1991 von Janknecht et al. für diesen Gebrauch beschrieben wurde. Für den Nachweis der STAT1-Sumolierung *in vivo* wurden HEK293- oder Cos7-Zellen (gewachsen auf 6 cm Zellkultur-Platten) mit den cDNS für STAT (1,5 µg), 6xHis-SUMO1 und Maus-Ubc9 (jeweils 0,75 µg) ko-transfiziert (siehe 3.3.2). Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen in 600 µl nativem Lyse-Puffer für 30 min auf Eis. Nach dem Abzentrifugieren von Zelltrümmern (16100x g, 4 °C, 15 min) wurden 50 µl des Überstandes als *Input* (Ausgangs-Extrakt) abgenommen und in 1x SDS-Probenpuffer gekocht. Von dem verbliebenen Überstand wurden 500 µl abgenommen und zusammen mit 24 µl equilibrierter Ni-NTA-Agarose (gesetztes Volumen) für 2 h rotiert (7 rpm, 4 °C). Danach wurde die Ni-NTA-Agarose sedimentiert (700x g, 4 °C, 2 min), mit 200 µl Lyse-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Sumolierte und über ihren Histidin-Marker an der Ni-NTA-Agarose komplexierte Proteine wurden mit 40 µl heißem 2x SDS-Probenpuffer von der Matrix eluiert, gefolgt von SDS-PAGE (siehe 3.2.1) und dem immunchemischen Nachweis von STAT1 bzw. SUMO1 (siehe 3.2.2).

Lyse-Puffer (pH 7,0): 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, 120 mM NEM, 2x Complete Proteinase-Inhibitor, 0,5% (v/v) Nonidet P40

#### 3.2.5 Dephosphorylierungs-Kinetik von STAT-Proteinen

Die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung von STAT-Proteinen ist von dem kinetischen Gleichgewicht zwischen Kinase- und Phosphatase-Aktivität abhängig. Die spezifische Analyse der Dephosphorylierungs-Kinetik wird durch die Behandlung von Zellen mit dem Rezeptorkinase-Inhibitor Staurosporin ermöglicht, welcher die erneute Tyrosin-Phosphorylierung des STAT-Proteins am Rezeptor verhindert. Die Analyse der STAT-Dephosphorylierung erfolgte in verschiedenen Zell-Linien mit endogenen bzw. transient transfiziertem STAT in 6-Loch Zellkulturschalen (siehe 3.3.2). Gegebenenfalls erfolgte 24 h nach der Transfektion die Stimulation der Zellen mit einem Zytokin für 1h, bevor die Zellen einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von 500 nM Staurosporin (Merck, Darmstadt) für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Nach der Herstellung von GZE (siehe 3.2.3) und deren elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der quantitative immunchemische Nachweis (siehe 3.2.2) des jeweiligen STAT-Proteins. Zur Bestimmung der spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung des zu untersuchenden STAT-Proteins wurde der Quotient aus pSTAT-Signal und Gesamt-STAT-Signal berechnet und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

#### 3.2.6 Immunpräzipitation (IP)

Der qualitative und quantitative Nachweis von Protein-Interaktionen erfolgte mittels Ko-Immunpräzipitation. Dabei wurde zunächst das Ziel-Protein spezifisch mit einem Antikörper markiert. Durch Ausnutzung der unter bestimmten pH- und Salzbedingungen hochaffinen Bindung des Fc-Bereichs von Antikörpern an die bakteriellen Proteine A bzw. G, erfolgte die Immobilisierung des Protein-Antikörper-Komplexes an Protein A bzw. G gekoppelten Agarosekügelchen. Bei einem Waschvorgang wurde danach das Ausgangs-Proteingemisch wieder abgetrennt und das Ziel-Protein, inklusive der damit assoziierten Proteine, isoliert und immunchemisch analysiert.

Die quantitative Bestimmung der Assoziation von nicht phosphorylierten und phosphorylierten STAT1-Monomeren erfolgte in HEK293-Zellen, welche die entsprechenden STAT1-Ubc9 Fusionsproteine transient exprimierten. Für die Immunpräzipitation wurden von konfluent bewachsenen 6 cm Zellkulturplatten GZE-Extrakte unter Verwendung von 500  $\mu$ l IP-Extrakt-Puffer hergestellt (vgl. 3.2.3). Die Immunpräzipitation erfolgte danach in Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach Zugabe von 0,6  $\mu$ g des spezifisch gegen STAT1 $\alpha$  gerichteten Antikörpers C24 bzw. von 10  $\mu$ g des spezifisch gegen nicht phosphoryliertes STAT1

gerichteten Antikörpers C136 für 2 h unter rotieren (4 °C, 8 rpm). Die Immobilisierung der Protein-Komplexe erfolgte bei Verwendung des C24-Antikörpers an Protein A (Repligen, Waltham, USA) bzw. bei Verwendung des C136-Antikörpers an Protein G (NEB, Herts, UK) gekoppelten Agarosekügelchen. Die Agarosekügelchen wurden zunächst in IP-Extrakt-Puffer equilibriert und ein gesetztes Volumen von 12 µl mit den Proben für 30 min unter Rotieren (4 °C, 8 rpm) inkubiert. Nach der Sedimentation der Agarosekügelchen (700x g, 4 °C, 2 min) erfolgte ein Waschschriff mit 200 µl IP-Extrakt-Puffer. Nach erneuter Sedimentation wurden die immobilisierten Proteine von den Agarosekügelchen durch Zugabe von heißen 2x SDS-Probenpuffer (50 µl) eluiert und für 5 min bei 95 °C gekocht. Der quantitative immunchemische Nachweis erfolgte nacheinander mit den Antikörpern pSTAT1 und STAT1-C24 auf derselben Nitrozellulose-Membran (siehe 3.2.2).

IP-Extrakt-Puffer (pH 7,4): 1x GZE-Puffer, 80 mM NEM

#### 3.2.7 *In vitro* Sumolierung und Monomer-Austausch-Reaktion

Rekombinant hergestelltes STAT1 $\alpha$ , pSTAT1 $\alpha$ , STAT1 $\beta$  und STAT1tc wurde freundlicherweise von Dr. Nikola Wenta (Universität Nottingham, UK) als Ammoniumsulfat-Präzipitat zur Verfügung gestellt (Wenta et al. 2008) und in Ovalbumin-Puffer aufgenommen. Rekombinant hergestelltes Aos1/Uba2, Ubc9 and SUMO1 wurde von *LAE Biotech* (Rockville, USA) bezogen und für die *in vitro* Sumolierung von STAT1 $\beta$  verwendet. Dafür wurden in einem Volumen von 220 µl SUMO-Puffer jeweils 1,5 µg STAT1 $\beta$ , Ubc9 und SUMO1, sowie 0,75 µg Aos1/Uba2 gemischt und für 12 h bei RT in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. Der immunchemische Nachweis mit dem STAT1-Antikörper C24 zeigte, dass ca. 10-15% des Ausgangsmaterials sumoliert wurden. Wurde die Reaktion ohne ATP durchgeführt, so konnte kein sumoliertes STAT1 $\beta$  detektiert werden.

Ko-Immunpräzipitationen wurden für die Bestimmung von Monomer-Austausch-Reaktionen zwischen rekombinant hergestelltem STAT1 $\beta$ , STAT1 $\beta$ -SUMO und STAT1tc mit STAT1 $\alpha$  durchgeführt. Die einzelnen Reaktionsschritte erfolgten in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei RT unter Rotation (8 rpm). Dafür wurden in einem Reaktionsvolumen von 80 µl Ovalbumin-Puffer jeweils 0,5 µg der angezeigten STAT1-Proteine (~ 70 nM) für 2,5 h inkubiert. Nach Zugabe von 0,6 µg des spezifisch gegen STAT1 $\alpha$  gerichteten Antikörpers C24 wurde die Mixtur erneut für 1 h inkubiert. Die Immobilisierung des Protein-Komplexes erfolgte mit 12 µl Protein A gekoppelten Agarosekügelchen (gesetztes Volumen, in Ovalbumin-Puffer

equilibriert) für 30 min. Nach der Sedimentation der Agarosekügelchen (700x g, 4 °C, 2 min) erfolgte ein Waschschriff mit 200 µl Ovalbumin-Puffer. Nach erneuter Sedimentation (700x g, 4 °C, 2 min) wurden die immobilisierten Proteine von den Agarosekügelchen durch Zugabe von 50 µl heißen 2x SDS-Probenpuffer eluiert und für 5 min bei 95 °C gekocht. Der qualitative immunchemische Nachweis (siehe 3.2.2) der mit STAT1 $\alpha$  interagierenden Proteine erfolgte abschließend mit dem STAT1-Antikörper E23, welcher sowohl STAT1 $\alpha$ , STAT1 $\beta$  und STAT1-tc erkennt.

Ovalbumin-Puffer (pH 7,3): 20 mM HEPES, 110 mM KOAc, 2mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 mM DTT,  
0,5 mM EGTA, 0,2 mg/ml Ovalbumin  
SUMO-Puffer (pH 7,3): 1x Ovalbumin-Puffer, 5 mM ATP

#### 3.2.8 Immunozytochemie

Für die mikroskopische Untersuchung von nicht fluoreszierenden Proteinen, wurden diese spezifisch mit einem Fluorophor markiert. Hierzu wurden Zellen zunächst auf Deckgläschen (15mm x 15mm) kultiviert, ggf. behandelt und abschließend einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Auf Objektträgern eingefrorene Gewebeschnitte wurden vor der Fixierung zunächst aufgetaut und unter Verwendung eines *ImmEdge*-Stiftes (Vector Laboratories, Burlingame, USA) mit einer hydrophoben Umrandung versehen. Die nachfolgenden Inkubationen erfolgten anschließend in einem Flüssigkeitstropfen. Die Fixierung der Zellen erfolgte sofern nicht anders angegeben (siehe Resultate) mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei RT. Nach 3-maligem Waschen mit PBS, 15-minütiger Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% (v/v) Triton X-100 und erneutem 3-maligen Waschen, wurde das Deckglas mit 20% (v/v) FKS/PBS-Lösung für 1h inkubiert. Das zu untersuchende Protein wurde anschließend spezifisch mit einem entsprechenden Primär-Antikörper (siehe 2.3) in 20% (v/v) FKS/PBS markiert. Nicht gebundene Antikörper wurden jeweils durch 3-maliges Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation mit einem gegen die Spezies des Primär-Antikörpers gerichteten Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper (siehe 2.3) erfolgte für 30 min bei RT. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte durch die Färbung chromosomaler DNS mittels einer 5-minütigen Inkubation mit 5 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, UK) in PBS, gefolgt von 2-maligem Waschen mit PBS und einem Waschschriff mit destilliertem Wasser. Abschließend wurde das gefärbte Zellpräparat mit einem Tropfen *Fluorescent Mounting Medium* (Polysciences, Warrington, USA) luftblasenfrei auf einem Objektträger eingebettet und konnte nach dem Trocknen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet werden (siehe 3.2.7).



#### 3.2.9 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die mikroskopische Standard-Untersuchung von Zell-Präparaten erfolgte mit dem Weitfeld-Mikroskop *Axioplan II* der Firma *Zeiss* (Jena). Die Mikroskop-Ausstattung beinhaltete einen motorisierten Objektisch und die Fluoreszenzfilter A, N2.1 und 13. Die Anregungswellenlänge für GFP-Fusionsproteine bzw. FITC-gekoppelte Proteine betrug 480 nm, für Cy3-gekoppelte Proteine 580 nm und für Höchst-gefärbte Zellkerne 280 nm. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einer integrierten *Sensicam-CCD*-Kamera und dem dazugehörigen Programm *Axiovision 4.52* (beide *Zeiss*, Jena) angefertigt. Die Anfertigung von Aufnahmen für die quantitative Untersuchung von Fluoreszenz-Intensitäten erfolgte mit dem Konfokal-Mikroskop *TCP-SP2* der Firma *Leica* (Milton Keynes, UK), welches mit einem motorisierten Objektisch (X-, Y- und Z-Richtung) und automatischer Blende ausgestattet war. Mit der integrierten Q-Imaging CCD-Kamera (12 Bit Graustufen-Auflösung) und dem dazugehörigen Programm *LCS Lite 2.61* (beide *Leica*, Milton Keynes, UK) wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. GFP-Fusionsproteine bzw. FITC-gekoppelte Proteine wurden bei 488 nm und Cy3-gekoppelte Proteine bei 568 nm unter Verwendung eines Ar/ArKr-Lasers angeregt, der Hoechst-Farbstoff mit dem Diode 405-Laser bei 461 nm. Die Quantitative Auswertung von Fluoreszenzintensitäten erfolgte ebenfalls mit dem Programm *LCS Lite 2.61* der Firma *Leica* (Milton Keynes, UK).

#### 3.2.10 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) ist eine Betriebsart für Elektronenmikroskope, die eine direkte Abbildung von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen ermöglicht. Eine in dem Elektronenstrahl befindliche Probe lenkt aufgrund seiner atomaren Zusammensetzung die Elektronen ab. Atome mit höherer Ordnungszahl sowie dickere Objektbereiche streuen den Elektronenstrahl stärker, welches zu einem höheren Kontrast führt. Durch eine Kontrastblende können nun selektiv die Elektronen, welche nicht gestreut wurden, in einer Ebene fokussiert werden. In Vorbereitung auf die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurden HeLa-Zellen für 2 h mit einer Lösung aus 3% (w/v) Paraformaldehyd und 0,25% (v/v) Glutaraldehyd bei RT fixiert. Alternativ wurde aus Mäusen die Leber präpariert und in 1 mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten (vgl. 3.3.6) und über Nacht bei 4 °C ebenfalls in einer Lösung aus 3% (w/v) Paraformaldehyd und 0,25% (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Die weitere Behandlung der Proben mit 2% Osmiumtetroxid, die Dehydrierung durch einen Ethanol-Gradienten, die Einbettung in einem Acrylharz und die anschließende Herstellung von 60 nm

Schnitten wurde durch Marie Smith (*Advanced Microscopy Unit*, Universität Nottingham, UK) durchgeführt (Lorenz et al. 2003). Nachdem die Schnitte auf Kupfer-Gitter präpariert wurden, erfolgte die Kontrastierung invers auf einem Flüssigkeitstropfen. Dazu wurden die Proben mit 2%-igen (w/v) Uranylazetat in Methanol für 8 min im Dunkeln inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift in 50% (v/v) Methanol und 3 Waschschriften in destilliertem Wasser. Danach erfolgte die Inkubation mit einer gesättigten Bleizitrat-Lösung für 30 s, gefolgt von 3 Waschschriften mit destilliertem Wasser. Abschließend wurden die Proben auf einem Filterpapier getrocknet und bis zur Analyse bei RT aufbewahrt. Die Visualisierung der Proben erfolgte an dem Elektronenmikroskop JEOL 1010 bei 100 kV (Tokio, Japan).

#### 3.2.11 Reporter-gen-Analyse

Die Zytokin-induzierte Genaktivierung von Transkriptionsfaktoren wurde mit Hilfe von Luziferase-kodierenden Reporter-gen-Konstrukten bestimmt. Für die Analyse von STAT1-Proteinen enthielt der Reporter-gen-Promotor drei Ly6E-GAS Bindestellen (Wen et al. 1995), für die Analyse von STAT3-Proteinen ein 2x Tandem APRE-Element aus dem  $\alpha$ 2-Macroglobulin Promotor (Matsui et al. 2002). Zusätzlich wurde ein konstitutiv exprimierendes  $\beta$ -Galactosidase-Gen in die Zellen ko-transfiziert. Für die Analyse wurden STAT1-defiziente U3A-Zellen bzw. STAT3-defiziente PC3-Zellen mit den Vektoren der entsprechenden STATs rekonstituiert. Dafür wurden die Zellen in 24-Loch Zellkulturschalen mit 250 ng des zu untersuchenden STAT-Expressionsplasmides zusammen mit 250 ng des jeweiligen Reporter-gen-Konstruktes und 200 ng des  $\beta$ -Galactosidase-Reporters ko-transfiziert (siehe 3.3.2). Gegebenenfalls erfolgte 24 h nach der Transfektion die Stimulation der Zellen mit einem Zytokin für 6h bei 37 °C. Die Zellen wurden nach einer Waschung mit PBS in 100  $\mu$ l Glyzylglyzin-Puffer für 15 min bei RT unter Schütteln (200 rpm) lysiert. Nach Abtrennung der Zellrümmer durch Zentrifugation (16100x g, 15 min, 4 °C) wurde die Luziferase-Aktivität von 10  $\mu$ l Zell-Lysat mit dem *Luciferase-Assay-System* der Firma *Promega* (Madison, USA) nach Herstelleranweisung bestimmt. Zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität erfolgte parallel die Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Nach der 30-minütigen Inkubation von 4  $\mu$ l Zell-Lysat mit 56  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Substratlösung wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu$ l 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung abgestoppt und die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Abschließend wurde die gemessene Luziferase-Aktivität durch die Bildung des Quotienten mit der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität normalisiert.

<u>Glyzylglyzin-Puffer (pH 7,8):</u>	25 mM Glyzylglyzin, 15 mM MgSO <sub>4</sub> , 4 mM EGTA, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT
<u>Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4):</u>	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<u>100x Magnesium-Lösung:</u>	100 mM MgCl <sub>2</sub> , 4,5 mM β-Mercaptoethanol
<u>β-Gal-Substratlösung:</u>	211 µl Natriumphosphat-Puffer, 66 µl ONPG (4 mg/ml), 3 µl 100x Magnesium-Lösung

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### **3.3.1 Kultivierung und Behandlung von Säugerzellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Säugetier-Zell-Linien (siehe 2.8) wurden ausnahmslos bei 37 °C in einer mit 5% CO<sub>2</sub> versetzten Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium (Vollmedium) wurde *Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium* (DMEM) verwendet, welches mit fetalem Kälberserum (FKS) und einer Antibiotika-Mischung ergänzt wurde (siehe unten). Das Passagieren nahezu konfluent bewachsener Zellkulturgefäße erfolgte alle 2-3 Tage. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und durch eine 3-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C abgelöst. Nach der Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von Vollmedium erfolgte die Verteilung der Zellen auf neue sterile Zellkulturgefäße. Wurde eine Zell-Linie nicht unmittelbar benötigt, wurden die Zellen nach dem Ablösen sedimentiert (700x g, 10 min, RT) und die überstehende Trypsin/Vollmedium-Lösung verworfen. Danach wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Einfrier Röhrchen transferiert. Nach Inkubation der Zellsuspension für 30 min bei 4 °C wurde die Zellen über Nacht bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefülltem Einfrierbehälter (*Cryo 1 °C Freezing Container*, Nalgene) eingefroren und für eine dauerhafte Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Bei Bedarf wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein anschließend in ein 15 ml Falkon-Röhrchen überführt. Nach der Resuspension mit 10 ml Vollmedium wurden die Zellen sedimentiert (700x g, 10 min, RT). Das erhaltene Zellpellet wurde danach in entsprechendem Medium resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert.

<u>Vollmedium:</u>	DMEM ( <i>D5796, Sigma-Aldrich</i> ), 10% (v/v) FKS ( <i>Sigma-Aldrich</i> ), 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin ( <i>P0781, Sigma-Aldrich</i> )
<u>Einfriermedium:</u>	10% (v/v) DMSO in FKS

#### 3.3.2 Transfektion von Säugerzellen

Zur transienten Expression von Proteinen wurden Säugetier-Zell-Linien bei einer Konfluenz von ca. 80% mit dem Lipofektamin/Plus-System der Firma *Invitrogen* (Paisley, UK) transfiziert. Die Transfektions-Lösung wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und je nach Bedarf wurden 0,4 µg DNS je 12-Loch-Zellkulturschalen, 0,8 µg DNS je 6-Loch-Zellkulturschalen oder 3 µg DNS je 6 cm Zellkulturplatte verwendet. Die Zellen wurden 3 h mit dem Transfektions-Mix inkubiert und sofern nicht anders angegeben (siehe Resultate) für weitere 24 h in Vollmedium kultiviert. Zur stabilen Integration von cDNS in das Genom von U3A-Zellen wurde eine 80% konfluente 10 cm Zellkulturplatte mit 5,4 µg Zielgen-DNS und 0,6 µg des Puromyzin-Resistenz vermittelnden Vektors pBABE ko-transfiziert. Nach einer 24-stündigen Ruhephase wurden die transfizierten Zellen in hoher Verdünnung (1:300-1:3000) auf 15 cm Zellkulturplatten passagiert und mit einem Puromyzin-haltigen (0,4 µg/ml) Vollmedium selektiert. Nach dem Absterben nicht resistenter Zellen, wurden gewachsene Zell-Kolonien passagiert und die Expression von STAT1 immunozytochemisch untersucht (siehe 3.2.8). Exprimierten weniger als 85% der Zellen einer Kolonie das STAT1-Protein, wurden diese verworfen.

#### 3.3.3 Behandlung von Zellen mit Zytokinen und Inhibitoren

Die Behandlung von Zellen mit Zytokinen, Inhibitoren und anderen Reagenzien erfolgte für die angegebenen Zeiten (siehe Resultate) in Vollmedium. Die Aktivierung von STAT1 wurde, sofern nicht anders angegeben (siehe Resultate), durch Stimulation der Zellen mit 5 ng/ml hIFN $\gamma$  induziert, die Aktivierung von STAT3 durch Stimulation mit 20 ng/ml IL6 erreicht bzw. nach Ko-Transfektion mit dem chimären EPO/gp130 Rezeptor durch 7 U/ml EPO (siehe auch 2.4). In Dephosphorylierungs-Analysen wurde der Kinase-Inhibitor Staurosporin in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt. Die Inhibierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen erfolgte mit 0,8 mM Pervanadat, die Hemmung von SUMO-Dekonjugasen mit 1 mM H $_2$ O $_2$ .

#### 3.3.4 Gewinnung primärer embryonaler Maus-Fibroblasten (MEF)

Für die Gewinnung embryonaler Maus-Fibroblasten wurde das trächtige Weibchen einer Heterozygot-Verpaarung 13,5 Tage nach Bildung des Verpaarungs-Pfropfen durch zervikale Dislokation getötet. In der Regel wurden 6-8 Embryonen einzeln aus dem Uterus präpariert

und bis zur weiteren Bearbeitung in eiskaltem PBS aufbewahrt. Da die Embryonen unterschiedliche Genotypen aufwiesen erfolgte die Behandlung der Embryonen strikt getrennt voneinander. Zunächst wurden Kopf, Gliedmaßen und Herz abgetrennt, bevor das verbleibende Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend in 2 ml 37 °C warmer Trypsin/EDTA-Lösung durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert wurde. Nach der Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 13 ml Vollmedium und Sedimentation der Zellen (700x g, 10 min, RT) wurden die Zellen in Vollmedium aufgenommen in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flasche überführt (als Passage 0 bezeichnet). Die so gewonnenen primären Fibroblasten konnten jeden zweiten Tag 1:4 passagiert werden. Für Experimente wurde Zellen der Passagen 2 bis 5 verwendet.

#### **3.3.5 Gewinnung von Knochenmarks-Makrophagen**

Für die Gewinnung von Knochenmark wurden Mäuse des entsprechenden Genotyps vom Tierstall-Personal durch zervikale Dislokation getötet und zur Verfügung gestellt. Ober- und Unterschenkelknochen der Mäuse wurden isoliert, von Muskel- und Sehnenresten befreit und in 4 °C kaltem PBS gewaschen. Die Knochenenden wurden mit einem Skalpell geöffnet und das Knochenmark beidseitig mit einer DMEM-gefüllten Spritze (20 ml Spritze, 26G Nadel) herausgespült. Nach der Sedimentation (700x g, 10 min, RT) wurden die Knochenmarkzellen entweder direkt in Kultur genommen oder bei -80 °C eingefroren. Zur Gewinnung von Knochenmarks-Makrophagen wurden die Knochenmarkszellen in Makrophagen-Medium kultiviert, welches sich aus 80% Vollmedium und 20% L-konditioniertem Medium (Davies & Gordon 2005) zusammensetzte. Nach 3-4 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei nicht-adhärenente Zellen nach Zentrifugation (700g, 10 min, RT) mit frischem Medium zurück auf die Zellkultur-Platten gegeben wurden. Nach weiteren 3-4 Tagen wurde erneut das Medium gewechselt und die nicht-adhärenente Zellen verworfen. Auf den Zellkultur-Platten befanden sich nun fast ausschließlich adhärenente Knochenmarks-Makrophagen.

#### **3.3.6 Induktion systemischer bakterieller Infektion in Mäusen**

Lipopolysaccharide (LPS) sind ein integraler Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien (Dumont et al. 1990, Kilian et al. 1995). Im Gegensatz zu dem inkorporierten und nicht schädlichen LPS wirkt nach Vermehrung, Tod oder Lyse des Bakteriums freigesetztes LPS als Endotoxin (Rietschel et al. 1994). Durch die intraperitoneale Injektion von LPS in

Mäusen wird eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst, in deren Folge eine Vielzahl von Zytokinen sezerniert werden, u.a. IL6, TNF $\alpha$ , IL10 (Rietschel et al. 1994, Ray et al. 2005, Wu et al. 2009). Nach einem modifizierten Protokoll von Ray et al. (2005) wurden Mäuse der Stämme Balb/c und Bl6/C57 mit einer niedrigen Konzentration LPS (7,35  $\mu$ g pro Gramm Gewicht, gelöst in 200  $\mu$ l sterilem PBS) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle dienten mit 200  $\mu$ l PBS injizierte Mäuse. Nach 2 Stunden wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Leber präpariert. Für die elektronenmikroskopische Analyse (siehe 3.2.10) wurde ein Teil der Leber in 1mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten und in 3% (w/v) Paraformaldehyd / 0,25% (v/v) Glutaraldehyd fixiert und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Die verbliebene Leber wurde mit *optimal cutting temperature formulation* (OCT, VWR International, Lutterworth, UK) in super-gekühltem Isopentan eingefroren. Nach der Herstellung von 8-10  $\mu$ m dünnen Kryo-Schnitten durch Marie Smith (*Advanced Microscopy Unit*; Universität Nottingham, UK) wurden diese auf Glas-Objektträger gebracht und anschließend für die immunozytochemische Analyse verwendet (siehe 3.2.8).

#### 3.3.7 IFN $\gamma$ -vermittelte Zytotoxizitäts-Analyse von Knochenmarks-Makrophagen

Um die physiologischen Auswirkungen der STAT1-Sumolierung zu untersuchen, wurde ein Zytotoxizitäts-Experiment mit Makrophagen durchgeführt, bei dem in Antwort auf LPS und IFN $\gamma$  die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) verfolgt wurde. Dazu wurden Duplikate von Knochenmarks-Makrophagen in 96-Loch Zellkulturschalen kultiviert ( $1 \times 10^4$  Zellen pro Loch) und nach 24 h mit 1 ng/ml LPS und verschiedenen IFN $\gamma$ -Konzentrationen für bis zu 60 h stimuliert. Die Produktion NO wurde indirekt über die Konzentration des Folgeprodukts Nitrit im überstehenden Zellmedium bestimmt. Bei dieser sogenannten Griess-Reaktion bildet das Nitrit nach jeweils 10-minütiger Inkubation mit 100  $\mu$ l Sulfanilamid und 100  $\mu$ l Naphthylethylendiamin ein rötliches Dioazonium-Salz, welches im Photospektrometer bei 550 nm quantifiziert wurde (Guevara et al. 1998). Abschließend wurde mit einer Eichgerade die Nitrit-Konzentration der Proben bestimmt und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Parallel dazu wurde die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen bestimmt. Dafür wurden diese nach dem Abnehmen des Überstandes mit einer 4%-igen (w/v) Paraformaldehyd-Lösung für 5 min bei RT fixiert. Danach erfolgte die Messung des ATP-Gehaltes der metabolisch aktiven Zellen nach Herstelleranweisungen mit dem *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay*-Kit der Firma Promega (Madison, USA). Für die graphische Darstellung wurden die Messwerte relativ zu der unbehandelten Probe (auf 100 gesetzt) berechnet.

### 3.3.8 Kultivierung und Behandlung von embryonalen Maus-Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) des Maus-Stammes Sv129/ola (Subklon E14.1), sowie für deren Kultivierung benötigte Maus-Fibroblasten des Stammes C57/Bl6, wurden freundlicherweise von Dr. Klaus-Peter Knobloch (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte auf gelatinisierten 10 cm Zellkulturplatten der Firma *Corning* (Amsterdam, Niederlande). Als Gewebe-Grundlage für die ES-Zellen diente eine subkonfluente Schicht von Neomycin-resistenten Maus-Fibroblasten (MEF<sup>Neo</sup>-Zellen), welche zuvor durch eine 3-stündige Behandlung mit 10 µg/ml Mitomycin D in ihrem Wachstum inhibiert wurden. Die Vermehrung der inaktivierten MEF<sup>Neo</sup>-Zellen erfolgte in MEF-Zell-Medium, die Kultivierung der ES-Zellen in ES-Zell-Medium. In Vorbereitung auf die Elektroporation der ES-Zellen wurden diese zunächst in einer Gesamtzahl von 10<sup>6</sup> Zellen auf eine mit inaktivierten MEF<sup>Neo</sup>-Zellen bedeckte 10 cm Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer 48-stündigen Ruhephase wurden diese in einem Verhältnis von 1:4 auf neue 10 cm Zellkulturplatten verteilt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die ES-Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden 2 · 10<sup>7</sup> ES-Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen sedimentiert (1500x g, 4 °C, 5 min), mit 10 ml HEPES-Puffer (10 mM in PBS gelöst) gewaschen und danach in 750 µl HEPES-Puffer aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension mit 20 µg des zu integrierenden Rekombinations-Konstruktes pPNT-*frt3*-STAT1-E<sup>705</sup>Q vermischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte anschließend bei 400 V und 250 µF, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die ES-Zellen mit ES-Zellmedium resuspendiert und auf 4 mit inaktivierten MEF-Zellen bedeckte 10 cm Zellkulturplatten verteilt. Die positive Selektion der ES-Zellen (siehe auch 4.5.1) begann nach 48 h durch Zugabe von 280 µg/ml des Antibiotikums Geneticin (G418) zum ES-Zell-Medium. Die negative Selektion (siehe auch 4.5.1) erfolgte nach weiteren 72 h durch die zusätzliche Behandlung mit 2 µM Gancyclovir. Nach 8 Tagen wurden gebildete ES-Zellkolonien isoliert. Hierzu wurden die einzelne ES-Zellklone mit PBS gewaschen, unter einem Präpariermikroskop mit einer gelben Pipettenspitze abgelöst und in eine 96-Loch Zellkulturschalen mit Rundboden transferiert, welche zuvor mit 40 µl Trypsin pro Kavität befüllt wurde. Die ES-Zellklone wurden für 5 min bei 37 °C in der Trypsinlösung inkubiert, resuspendiert und in eine 96-Loch Zellkulturschalen mit inaktivierten MEF<sup>Neo</sup>-Zellen überführt. Für die weitere Kultivierung wurde nun ES-Zellmedium verwendet, welches nur noch mit 280 µg/ml G418 supplementiert war. Nach einer 48-stündigen Vermehrungsphase wurde eine Replika-Platte angefertigt. Dazu wurden die Zellen einer Kavität

mit 40 µl Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und mit 200 µl ES-Zellmedium vermischt. Anschließend wurden 120 µl der Zellsuspension auf eine neue 96-Loch Zellkulturschale transferiert, mit 120 µl ES-Einfriermedium vermischt und bei -80 °C für die spätere Verwendung eingefroren. Die verbleibenden ES-Zellen wurden nach ihrer Vermehrung auf 24-Loch Zellkulturschalen transferiert, bevor die Lyse der Zellen und die Isolierung ihrer genomischen DNS erfolgten (siehe 3.1.11). Die Identifikation der ES-Zellen mit korrekter homologer Rekombination erfolgte danach per Southern Blot (siehe 3.1.12).

MEF-Zell-Medium: DMEM (*D5796, Sigma-Aldrich*), 10% (v/v) FKS, 0,1 mM L-Glutamin, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 0,2 mM nicht essentieller Aminosäuren, 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin (*P0781, Sigma-Aldrich*)

ES-Zell-Medium: DMEM (*D5796, Sigma-Aldrich*), 15% (v/v) FKS, 0,1 mM L-Glutamin, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 0,2 mM nicht essentieller Aminosäuren, 6 ml Nukleosid-Lösung, 3,2 U/ml LIF (*Leukemia-Inhibiting Factor*), 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin (*P0781, Sigma-Aldrich*),



## **4. Ergebnisse**

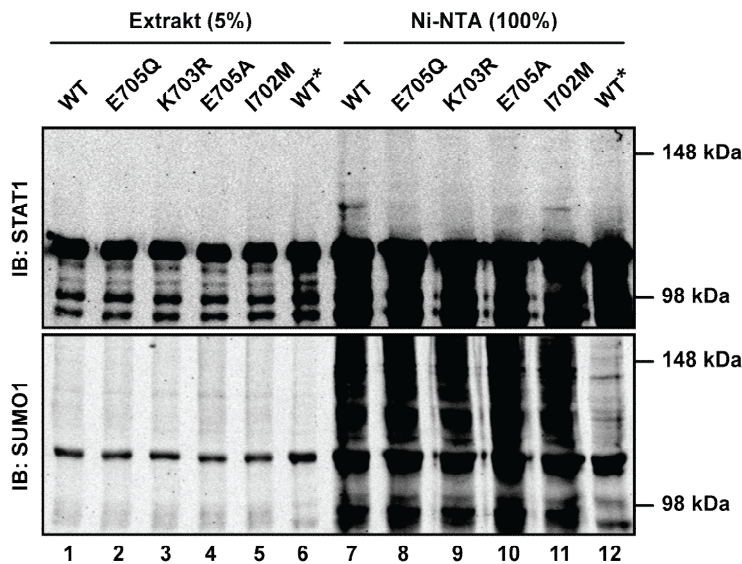
### **4.1 Die SUMO-Modifikation reduziert die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1**

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 wird durch mehrere unabhängige Mechanismen reguliert. Die posttranslationale SUMO1-Konjugation von STAT1 ist eine Form der Regulation, über die bisher nur sehr wenig bekannt und deren Bedeutung weiter unklar ist. Interessanterweise befindet sich das SUMO-Akzeptorlysins<sup>703</sup> in einer sehr engen räumlichen Nähe zu der für die Aktivierung von STAT1 wichtigen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle (vgl. Abb. 1.5). Eine physiologische Rolle der Sumolierung bei der Regulation der STAT1-Aktivität wurde vorgeschlagen, nachdem zusätzlich der gegenseitige Ausschluss der Lys<sup>703</sup>-Sumolierung und der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 gezeigt werden konnte (Zimnik et al. 2009). Allerdings wurde in den bisherigen funktionalen Studien unter Verwendung verschiedener SUMO-freier STAT1-Mutanten (K<sup>703</sup>R bzw. E<sup>705</sup>A) kein negativer Einfluss der Sumolierung auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung beobachtet (Ungureanu et al. 2003, Ungureanu et al. 2005, Song et al. 2006). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der engen räumlichen Nähe der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle und des SUMO-Konsensus (702I K T E<sup>705</sup>) von STAT1 liegen. Die Umgebung der Aminosäure Tyr<sup>701</sup> ist im Verlauf der Evolution hoch konserviert (vgl. Abb. 1.6). Zusätzlich wird die Bedeutung der strukturellen Integrität dieser Umgebung durch die in einem Patienten beobachtete STAT1-Mutation L<sup>706</sup>S verdeutlicht. Genauere Untersuchungen ergaben, dass diese Mutation die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 vollständig verhindert (Chapgier et al. 2006). Daher ist es vorstellbar, dass die Einführung einer SUMO-Konsensus-Mutation in diesem Bereich, neben der Verhinderung der STAT1-Sumolierung zusätzlich die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung beeinträchtigt. Mögliche SUMO-abhängige Effekte könnten somit verschleiert werden.

#### **4.1.1 Die Generierung einer für die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung spezifischen STAT1-Mutante**

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass in der Zelle das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des nicht SUMO-konjugierten STAT1 liegt (Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003, Jakobs et al. 2007). Jedoch kann die Aktivität von SUMO-Dekonjugasen durch die Verwendung eines NEM-haltigen Extrakt-Puffers beschränkt werden, welches die Detektion von SUMO-Konjugaten erleichtert (Kim et al. 2000, Ungureanu et al. 2003). Zusätzlich kann die Effizienz der SUMO-Konjugation durch die Ko-Transfektion der für die SUMO-

Konjugations-Kaskade notwendigen Enzyme (vgl. Abb. 1.4) erhöht werden (Song et al. 2006). Nach der Ko-Transfektion von Zellen mit dem zu untersuchenden Zielprotein, dem SUMO-E2-Enzym Ubc9 und Histidin-markiertem SUMO1 (His-SUMO1) besteht eine gängige und effiziente experimentelle Methode in der Anreicherung von His-SUMO1-Konjugaten in Zellextrakten durch Nickel-Ionen Affinitätschromatographie (Rogers et al. 2003, Song et al. 2006). Die SUMO-Konjugation des zu untersuchenden Zielproteins kann anschließend durch einen gegen das Zielprotein gerichteten immunchemischen Nachweis analysiert werden. Bevor der Einfluss von verschiedenen SUMO-Konsensus-Mutationen auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 untersucht wurde, erfolgte die Überprüfung der Mutanten auf ihre Fähigkeit zur SUMO-Konjugation. Neben den bereits in der Literatur beschriebenen STAT1-Mutanten K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A (Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003, Song et al. 2006) wurden zusätzlich die Mutanten I<sup>702</sup>M und E<sup>705</sup>Q generiert (siehe 3.1.7). Für die Herstellung einer nicht mehr sumolierten STAT1-Variante, wurde der SUMO-Konsensus (<sup>702</sup> I K T E <sup>705</sup>) zum Erhalt der strukturellen Integrität der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsdomäne distal zum Tyr<sup>701</sup> mutiert. Im Gegensatz zu dem bisherigen Ansatz, sowohl Seitenkette als auch Ladung der Aminosäure 705 zu entfernen (Song et al. 2006, Ungureanu et al. 2003), wurde bei der Generierung von STAT1-E<sup>705</sup>Q durch den Austausch **Glu**→**Gln** (Triplet GAG→CAG) lediglich die negative Ladung entfernt. Das Analyse-Programm *PolyPhen-2* (Adzhubai et al. 2010) der Universität Harvard bestätigte dabei, dass die Mutation E<sup>705</sup>Q im Vergleich mit der Mutante E<sup>705</sup>A einen geringeren Störeinfluss auf die STAT1-Struktur aufweist. STAT1-I<sup>702</sup>M wurde durch den Austausch von **Ile**→**Met** (Triplet ATC→ATG) generiert. Der so veränderte SUMO-Konsensus entspricht dem evolutionär in vielen Fischen vorkommenden SUMO-Konsensus „M K T E“ (vgl. Abb. 1.6). Die Untersuchung der SUMO-Konjugation erfolgte in HEK293T-Zellen, welche eine hohe Expression der transfizierten Proteine ermöglichen. Um dabei die transfizierten STAT1-Varianten von dem endogenen STAT1 zu unterscheiden, wurden die oben beschriebenen Mutanten als C-Terminale STAT1-GFP-Fusionsproteine eingesetzt (vgl. Begitt et al. 2000). HEK293T-Zellen wurden mit der cDNS für die zu testende STAT1-Mutante, mit Ubc9 und His-SUMO1 im Verhältnis 2:1:1 ko-transfiziert (siehe 3.3.2). Zell-Extrakte wurden nach 48 h unter Verwendung eines NEM-haltigen Puffers hergestellt und His-SUMO1-Konjugate durch Inkubation mit Ni-NTA Agarose angereichert (siehe 3.2.4). Nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 3.2.1), erfolgte der immunchemische Nachweis (siehe 3.2.2) von SUMO1 bzw. STAT1 in den angereicherten Fraktionen (Ni-NTA) und den Ausgangs-Extrakten.



**Abb. 4.1: Die funktionale Mutation des SUMO-Konsensus verhindert die Sumolierung von STAT1.** HEK293T-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Konstrukt, His-SUMO1 und Ubc9 ko-transfiziert. In Bahnen 6 und 12 wurde SUMO1 nicht ko-transfiziert (\*). Nach 48 h wurden Zellextrakte mit einem NEM-haltigen Puffer (120 mM) hergestellt und His-SUMO1-Konjugate durch  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie angereichert. Die Extrakte und die angereicherten Fraktionen (Ni-NTA) wurden in einem 7%-igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und SUMO1 bzw. STAT1 (C24) immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen.

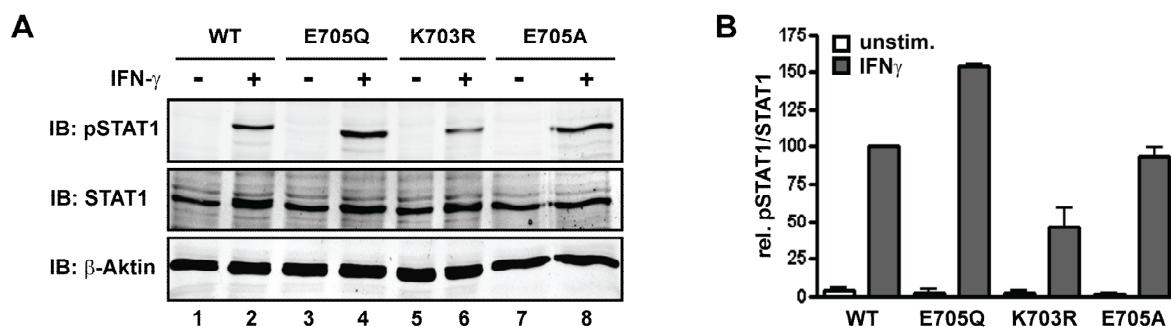
Nach der Anreicherung von His-SUMO1-Konjugaten wurde auch nicht SUMO1-konjugiertes STAT1 nachgewiesen. Die Ko-Anreicherung von nicht Histidin-markierten Proteinen unter nativen Bedingungen ist eine häufige Erscheinung (David et al. 2002), die auch für STAT1 nach der Anreicherung von His-SUMO1-Konjugaten beobachtet wurde (Song et al. 2006). Neben dem Vorhandensein von natürlichen Histidinresten innerhalb des Proteins trägt auch die Dimerisierung von STAT1 zu dieser Ko-Anreicherung bei.

Wie bereits beschrieben (Ungureanu et al. 2003), führte die ektopische Expression von SUMO1 zu einer deutlichen Zunahme der SUMO1-Konjugate in den Präzipitaten (Abb. 4.1, unten, Bahnen 7-11) gegenüber Zellen ohne transfiziertes His-SUMO1 (Abb. 4.1, unten, Bahn 12). Zusätzlich wurde nach dem immunchemischen Nachweis von STAT1, neben der Bande für STAT1-WT-GFP, eine zusätzliche langsamer migrierende Bande beobachtet (Abb. 4.1, Bahn 7, oben). Diese zusätzliche STAT1-reaktive Bande korreliert mit der erwarteten Proteingröße von STAT1-SUMO1-GFP. Sowohl das Weglassen von His-SUMO1 (Abb. 4.1, Bahn 12, oben), als auch die Mutation des SUMO1-Akzeptorlysins<sup>703</sup> (Abb. 4.1, Bahn 9, oben) verhinderten die Detektion eines solchen STAT1-SUMO1-Konjugates (vgl. Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003, Song et al. 2006). Ungeachtet eines intakten Akzeptorlysins<sup>703</sup> führte aber auch die Zerstörung der SUMO-Konsensus-Sequenz durch die Mutation E<sup>705</sup>A zur Verhinderung der STAT1-Sumolierung (Abb. 4.1, Bahn 10). Die in dieser Arbeit neu vorgestellte STAT1-Mutation E<sup>705</sup>Q genügte ebenfalls, um die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1 zu unterbinden (Abb. 4.1, Bahn 8, oben). Bemerkenswerterweise hatte die I<sup>702</sup>M-Mutation keinen Einfluss auf die Funktionalität des SUMO-Konsensus von STAT1, vergleichbar mit dem Wildtyp induzierte die modifizierte Form „M K T E“ die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1 (Abb. 4.1, Bahn 11, oben). Die Sumolierung von STAT1-WT und deren Verhinderung durch die E<sup>705</sup>Q-Mutation konnte auch in der Abwesenheit von endogenem STAT1 gezeigt werden. Die STAT1-defiziente Fibrosarkoma-Zell-Linie U3A wurde

zunächst mit dem jeweiligen STAT1-Konstrukt stabil transfiziert (siehe 3.3.2), bevor der Nachweis der STAT1-Sumolierung durch Nickel-Ionen Affinitätschromatographie erfolgte (Dr. Andreas Marg, Max-Delbrück-Zentrum Berlin, persönliche Kommunikation). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Mutation des SUMO-Konsensus nicht zwangsläufig zum Verlust der STAT1-Sumolierung führt. Mit einer idealen SUMO-Konsensus-Struktur konforme Mutationen (vgl. Abb. 1.4), haben keinen Einfluss auf die Effizienz der STAT1-Sumolierung. Jedoch kann die Sumolierung von STAT1, neben der Mutation des Akzeptorlysins<sup>703</sup>, bereits durch geringfügige Änderungen des SUMO-Konsensus unterbunden werden, wie anhand der Mutationen E<sup>705</sup>A und E<sup>705</sup>Q beobachtet wurde.

#### 4.1.2 Die strukturelle Integrität der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle wird durch die STAT1-Mutation E<sup>705</sup>Q nicht beeinträchtigt

Nachdem im letzten Kapitel der Sumolierungs-Status der einzelnen STAT1-Varianten charakterisiert wurde, erfolgte die Untersuchung der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung in Antwort auf IFN $\gamma$ . Aufgrund des gegenseitigen Ausschlusses von Lys<sup>703</sup>-Sumolierung und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 (Zimnik et al. 2009) wurde generell eine verschlechterte Phosphorylierung der sumolierten STAT1-Varianten erwartet. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch endogenes STAT1 zu vermeiden, wurde der folgende Versuch in STAT1-defizienten U3A-Zellen durchgeführt, die mit der jeweiligen STAT1-Mutante rekonstituiert wurden (siehe 3.3.2). Die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde 24 h nach der Transfektion durch eine 60-minütige Stimulation der Zellen mit dem Zytokin IFN $\gamma$  induziert.



**Abb. 4.2: Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1-SUMO-Konsensus Mutanten ist nicht nur abhängig von der SUMO1-Konjugation.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Konstrukt rekonstituiert und 24 h nach der Transfektion entweder unbehandelt belassen oder für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 10%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1, STAT1 (E23) und  $\beta$ -Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen. (B) Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Nach der Herstellung von Gesamtzell-Extrakten (siehe 3.2.3) erfolgten deren elektrophoretische Auftrennung (siehe 3.2.1) und die immunchemische Quantifizierung des Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten (pSTAT1) bzw. des Gesamt-STAT1 (siehe 3.2.2). Der immunchemische Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle und soll die Verwendung vergleichbarer Proteinmengen in den einzelnen Bahnen aufzeigen. Im Ruhezustand der Zellen konnte unabhängig vom Genotyp der transfizierten STAT1-Variante kein Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1 detektiert werden (Abb. 4.2, Bahnen 1, 3, 5 und 7). Jedoch wurde nach der Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$  deutliche Unterschiede in der spezifischen Phosphorylierung der SUMO-Konsensus-zerstörenden STAT1-Mutationen K<sup>703</sup>R, E<sup>705</sup>A und E<sup>705</sup>Q beobachtet, obwohl diese allesamt die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1 verhinderten (Abb. 4.1). Dabei übte die Mutation des SUMO-Akzeptorlysins<sup>703</sup> den größten negativen Effekt auf die STAT1-Phosphorylierung aus, welche im Vergleich mit dem STAT1-WT nur noch ~40% betrug (Abb. 4.2, vgl. Bahn 2 und 6). Die relativ zur Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle distal gelegene Mutation E<sup>705</sup>A wies dagegen ein mit dem STAT1-WT vergleichbares Phosphorylierungsniveau auf (Abb. 4.2, vgl. Bahn 2 und 8). Bedeutenderweise war die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung der SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q Mutante gegenüber dem STAT1-WT um ~50% erhöht (Abb. 4.2, vgl. Bahn 2 und 4). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem gegenseitigen Ausschluss von Lys<sup>703</sup>-Sumolierung und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 (Zimnik et al. 2009). Diese Ergebnisse belegen deutlich, dass bei der Modifikation des SUMO-Konsensus, der strukturelle Einfluss einer STAT1-Mutation auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung mit berücksichtigt werden muss. Die bisher verwendeten K<sup>703</sup>R- und E<sup>705</sup>A-Mutationen verhinderten zwar beide erfolgreich die Sumolierung von STAT1, hatten aber gleichzeitig einen signifikant negativen Einfluss auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1. Demzufolge sind diese beiden STAT1-Mutanten nicht geeignet die Effekte der STAT1-Sumolierung zu untersuchen. Im Gegensatz dazu zeigt die in dieser Arbeit neu vorgestellte Mutation E<sup>705</sup>Q eine signifikant verbesserte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (Abb. 4.2).

Aber auch alternative SUMO-unabhängige Ursachen, wie z.B. eine erhöhte Tendenz zur Dimerisierung oder eine verstärkte Bindung an DNS, können zu einer erhöhten Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung führen (Meyer et al. 2003). Jedoch konnten unter Verwendung der entsprechenden rekombinanten und *in vitro* hergestellten Proteine diese Ursachen ausgeschlossen werden. Dr. Nikola Wenta (Universität Nottingham, UK) stellte in Photonenkorrelations-Spektroskopie-Analysen in einem breiten Konzentrationsbereich kein Unterschied in dem Dimerisierungsverhalten der E<sup>705</sup>Q-Mutante gegenüber dem STAT1-Wildtyp fest (persönli-

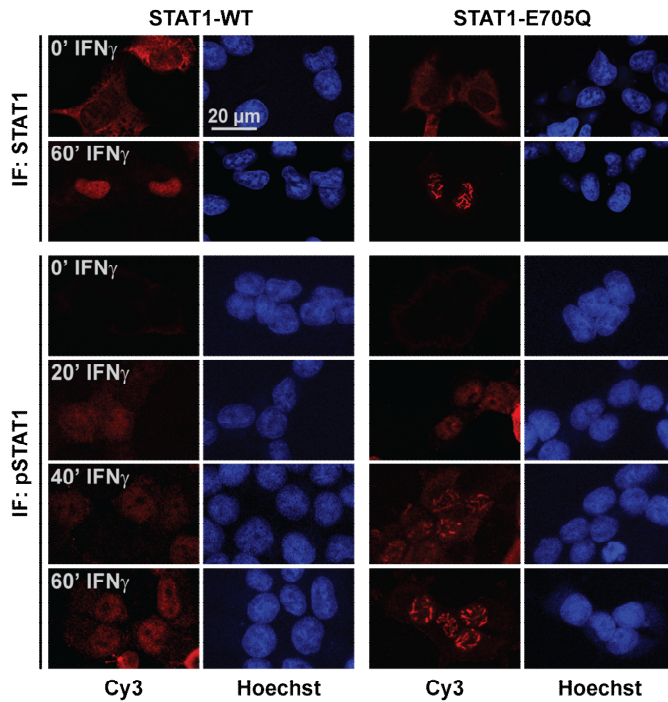
che Kommunikation; Droescher et al. 2011). In einem weitergehenden Kompetitions-Experiment wurde von Dr. Andreas Begitt (Universität Nottingham, UK) die Stabilität der DNS-Bindung dieser rekombinanten Proteine untersucht. Dabei wurden sowohl der STAT1-Wildtyp, als auch die SUMO-freie E<sup>705</sup>Q-Mutante in gleichem Maße zeitabhängig durch einen DNS-Kompetitor von der <sup>32</sup>P-markierten DNS-Sonde verdrängt (persönliche Kommunikation, Droescher et al. 2011). Demnach unterscheidet sich die E<sup>705</sup>Q-Mutante gegenüber dem STAT1-Wildtyp weder in seiner Tendenz zur Dimerisierung, noch in seiner Fähigkeit DNS zu binden. Die gegenüber dem Wildtyp verbesserte spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q wurde daher auf die fehlende Sumolierung zurückgeführt. Die STAT1-E<sup>705</sup>Q Mutante stellt somit ein geeignetes Mittel dar, die Effekte der STAT1-Sumolierung zu untersuchen.

### **4.2 Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung verändert die subzelluläre Verteilung von STAT1**

Die Sumolierung von Transkriptionsfaktoren wurde bereits mehrfach mit einer geänderten Lokalisation (Matunis et al. 1996, Mahajan et al. 1997) und Proteinassoziation in Verbindung gebracht (Sachdev et al. 2001, Ross et al. 2002). Ein Beispiel ist die nach der Sumolierung des Promyelotischen Proteins (PML) erfolgende Bildung von PML-Kernkörperchen (Seeler & Dejean 2001). Nachdem im letzten Kapitel der Zusammenhang der Sumolierung und der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 beschrieben wurde, erfolgte als nächstes die Untersuchung der subzellulären STAT1-Verteilung in Abhängigkeit von der SUMO-Modifikation.

#### **4.2.1 SUMO-freies STAT1 lokalisiert in Zytokin-induzierten nukleären Partikeln**

Laut Literatur verteilt sich STAT1 im Ruhezustand der Zelle homogen im Zytoplasma und lokalisiert nach Zytokin-Stimulation im Zellkern (Marg et al. 2004). Um einen Einfluss von endogenem STAT1 auszuschließen, wurde die immunozytochemische Untersuchung der subzellulären Verteilung in rekonstituierten U3A-Zellen durchgeführt. Dafür wurden STAT1-defiziente U3A-Zellen mit STAT1-Wildtyp oder SUMO-freiem STAT1-E<sup>705</sup>Q transient transfiziert (siehe 3.3.2). Die Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$  erfolgte 24 h nach der Transfektion für 60 min. Anschließend wurden die Zellen fixiert, STAT1 immunozytochemisch und die Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt (siehe 3.2.8). Danach wurde die subzelluläre Verteilung am Konfokal-Mikroskop untersucht (siehe 3.2.9).



**Abb. 4.3: SUMO-freies STAT1-E<sup>705Q</sup> lokalisiert in nukleären Partikeln.** (Oben) STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Konstrukt rekonstituiert und 24 h nach der Transfektion entweder unbehandelt belassen oder für die angegebenen Zeitpunkte mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (1:10000, 5 min, RT) und STAT1 immunocytochemisch angefärbt. (Unten) HEK293T-Zellen wurden wie in (A) transfiziert und behandelt, jedoch erfolgte die immunocytochemische Färbung von pSTAT1. Die Analyse der subzellulären Verteilung erfolgte am Konfokal-Mikroskop.

Dabei konnte bestätigt werden (Lillemeier et al. 1991), dass sich STAT1 im Ruhezustand der Zelle vorwiegend im Zytoplasma und nach IFN $\gamma$  Stimulation im Zellkern gleichmäßig außerhalb der Nukleoli verteilt (Abb. 4.3, oben). Das Fehlen der Sumolierung bei STAT1-E<sup>705Q</sup> änderte dieses Verteilungsmuster grundsätzlich nicht. Jedoch während STAT1-WT nach der Zytokin-Stimulation homogen im Zellkern verteilt war, lokalisierte SUMO-freies STAT1 zusätzlich in nadelförmigen und länglichen Strukturen (Abb. 4.3, oben), welche zunächst als nukleäre Partikel bezeichnet werden. Eine unterschiedlich hohe Expression der STAT1-Varianten als Ursache des beobachteten Phänomens konnte ausgeschlossen werden. In einem Parallelexperiment wurden unter Verwendung eines Teils der oben beschriebenen Zellen Gesamtzell-Extrakte hergestellt (3.2.3) und STAT1 bzw.  $\beta$ -Aktin immunchemisch nachgewiesen (3.2.2). Dabei konnte wie schon in Abb. 4.2 gezeigt, kein Unterschied der STAT1-Expression im Vergleich zur  $\beta$ -Aktin-Expression festgestellt werden. Der Verlust der Sumolierung führt somit zu einer Änderung der subnukleären Verteilung von STAT1 in Antwort auf IFN $\gamma$ . Bemerkenswerterweise ist es im Fall von STAT1 die SUMO-freie Variante, welche zu der Bildung von Parakristallen führt. Im Gegensatz dazu werden die in der Literatur beschriebenen PML-Kernkörperchen durch den Einbau von sumolierten PML induziert (vgl. Seeler & Dejean 2001).

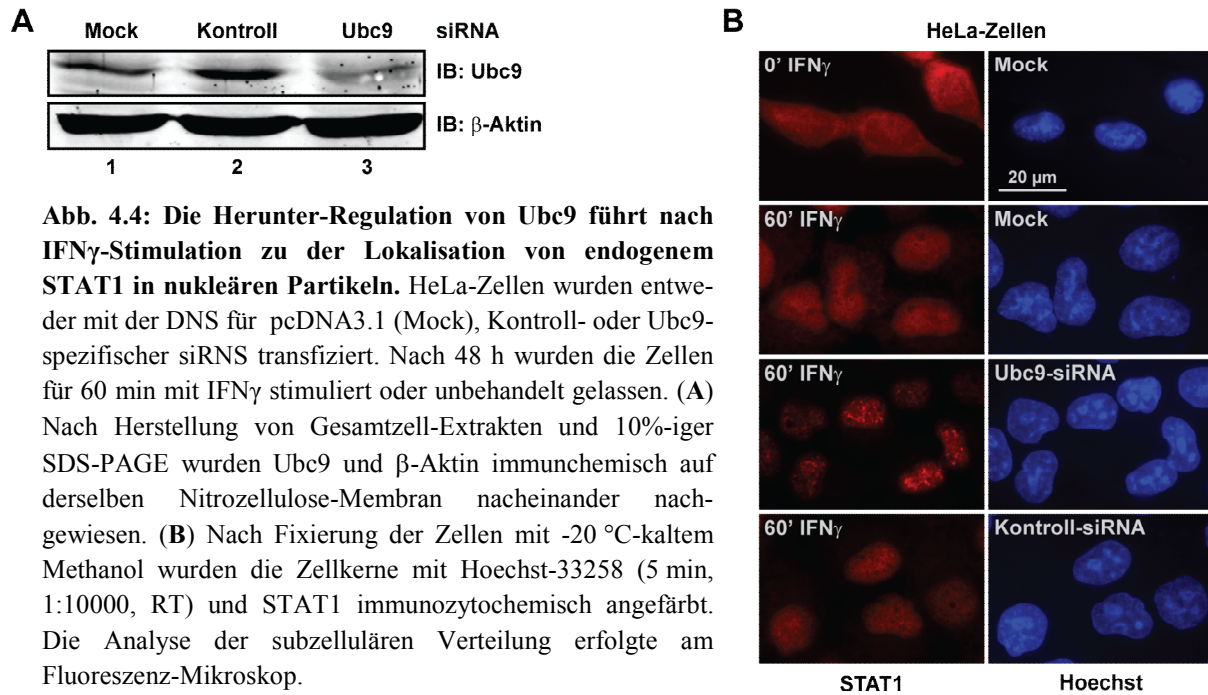
Die Notwendigkeit der Zytokin-abhängigen STAT1-Aktivierung deutet dabei auf eine Rolle von phosphoryliertem STAT1 (pSTAT1) bei der Bildung der nukleären Partikel hin. Um zu überprüfen, ob pSTAT1 ein direkter Bestandteil der Partikel ist, wurde das oben beschriebene



Experiment in HEK293T-Zellen wiederholt und das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1 (pSTAT1) immunozytochemisch angefärbt (siehe 3.2.8). Im Einklang mit der fehlenden Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 im Ruhezustand der Zellen (vgl. Abb. 4.2), konnte mit STAT1-Wildtyp bzw. dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q zunächst nur eine Hintergrundfärbung von pSTAT1 beobachtet werden. Nach 20-minütiger IFN $\gamma$ -Stimulation wurde mit beiden STAT1-Varianten eine kernbetonte Verteilung von pSTAT1 detektiert (Abb. 4.3, unten). Nukleäre Partikel wurden mit dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q zu diesem Zeitpunkt noch nicht beobachtet. Mit zunehmender Länge der IFN $\gamma$ -Stimulation nahm die Intensität der pSTAT1-Färbung in den Kernen STAT1-WT exprimierender Zellen stetig zu, zeigte aber weiterhin eine homogene Verteilung (Abb. 4.3, unten links). Im Gegensatz dazu wurden in der Mehrheit der STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Zellen nach 40-minütiger IFN $\gamma$ -Stimulation die Bildung von punktförmigen nukleären Partikeln beobachtet, welche mit zunehmender Stimulationsdauer eine nadelförmige und längliche Struktur annahmen. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q nicht nur nukleäre Partikel induziert werden, sondern auch dass dieses ein direkter Bestandteil dieser Partikel ist.

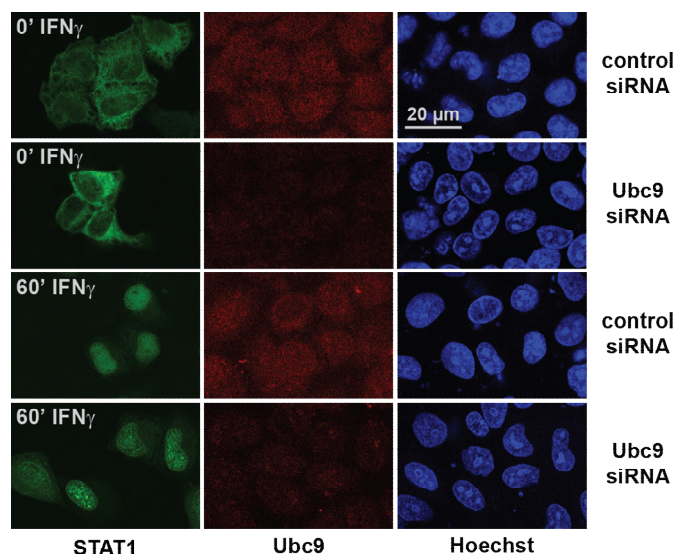
Um den Einfluss der Sumolierung auf die subnukleäre Verteilung von STAT1 zu bestätigen, wurde anschließend die subzelluläre Verteilung von endogenem STAT1 in HeLa-Zellen untersucht, deren Sumolierungs-Maschinerie beeinträchtigt wurde. Zu diesem Zweck wurde das für die Sumolierung benötigte E2-Enzym Ubc9 mittel RNS-Interferenz herunter reguliert. Die dafür verwendete siRNS der Firma *Ambion* (siehe 2.6) wurde zunächst auf ihre Wirksamkeit hin kontrolliert. HeLa-Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA3.1 (Mock), einer Kontroll-siRNS oder mit der Ubc9-spezifischen siRNS transfiziert (3.3.2). Die Herstellung von Gesamzell-Extrakten (3.2.3) erfolgte 48 h nach der Transfektion, gefolgt von der immunochemischen Quantifizierung der Ubc9 bzw.  $\beta$ -Aktin-Expression (3.2.2). Als Referenzwert diente das Expressions-Verhältnis von Ubc9 zu  $\beta$ -Aktin der mit Kontroll-siRNS behandelten Zellen. Während Ubc9 in Mock- und Kontroll-siRNS-behandelten Zellen deutlich exprimiert wurde, führte die Behandlung mit Ubc9-spezifischer siRNS zu einer ~70%igen Reduktion (Abb. 4.4A, Bahn 3). Die verwendete siRNS ist demnach geeignet, die Expression des SUMO-E2-Enzyms Ubc9 in der Zelle zu blockieren. Als nächstes wurden gleichsam behandelte Zellen auf ihre subzelluläre Verteilung hin untersucht. Jeweils bevor und nach 60-minütiger IFN $\gamma$ -Behandlung wurden die Zellen fixiert und STAT1 immunozytochemisch nachgewiesen (siehe 3.2.8).





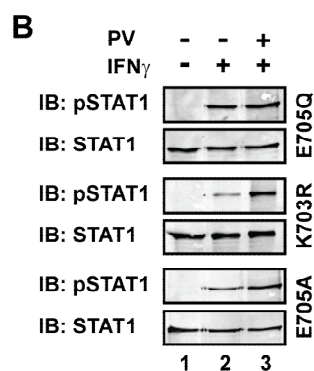
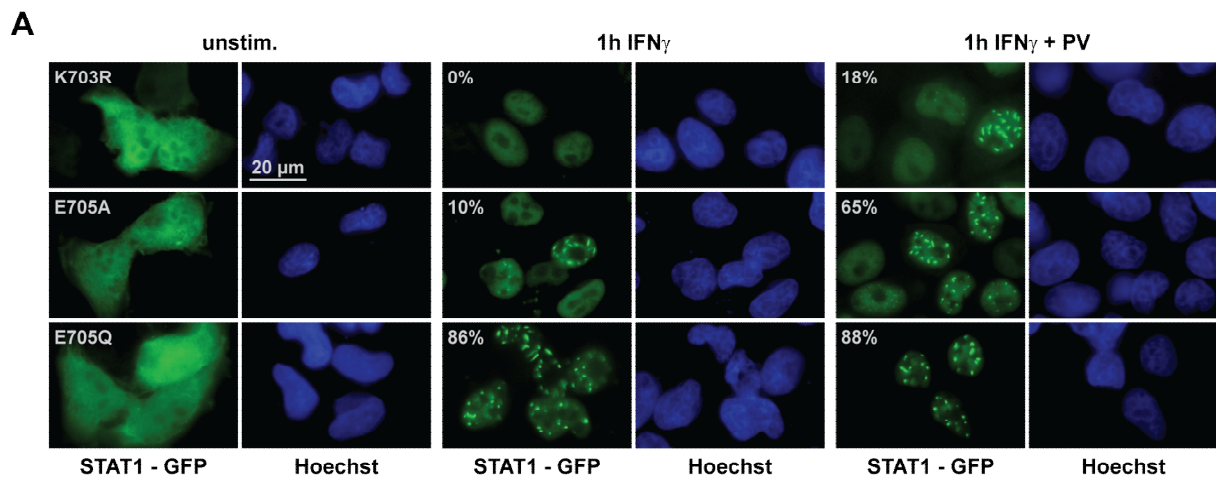
**Abb. 4.4:** Die Herunter-Regulation von Ubc9 führt nach IFN $\gamma$ -Stimulation zu der Lokalisation von endogenem STAT1 in nukleären Partikeln. HeLa-Zellen wurden entweder mit der DNS für pcDNA3.1 (Mock), Kontroll- oder Ubc9-spezifischer siRNS transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. (A) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 10%-iger SDS-PAGE wurden Ubc9 und  $\beta$ -Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen. (B) Nach Fixierung der Zellen mit  $-20^\circ\text{C}$ -kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) und STAT1 immunozytochemisch angefärbt. Die Analyse der subzellulären Verteilung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop.

Wie bereits zuvor beobachtet (Abb. 4.3), verteilte sich STAT1 im Ruhezustand der Zellen vorwiegend im Zytoplasma und translozierte nach IFN $\gamma$ -Behandlung in den Zellkern (Abb. 4.4B). Sowohl die mit dem Leervektor pcDNA3.1 (Mock) oder mit Kontroll-siRNS behandelte Zellen, zeigten nach der IFN $\gamma$ -Stimulation weiterhin eine homogene Verteilung des endogenen STAT1 im Zellkern. Obwohl STAT1 auch nach der Herunter-Regulation von Ubc9 in Antwort auf die IFN $\gamma$ -Stimulation im Zellkern akkumulierte, so konnten nun zusätzlich punkt- und nadelförmige STAT1-Partikeln in der Mehrheit der Zellkerne beobachtet werden (Abb. 4.4B).



**Abb. 4.5:** Die Herunter-Regulation von Ubc9 führt nach IFN $\gamma$ -Stimulation zu der Lokalisation von STAT1-GFP in nukleären Partikeln. HeLa-Zellen wurden entweder mit der DNS für Kontroll- oder Ubc9-spezifischer siRNS transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen mit  $-20^\circ\text{C}$ -kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) und Ubc9 immunozytochemisch angefärbt. Die Analyse der subzellulären Verteilung erfolgte am Konfokal-Mikroskop.

Die Wirksamkeit der Ubc9-siRNS konnte zusätzlich durch den immunozytochemischen Nachweis von Ubc9 (3.2.8) bestätigt werden. Dafür wurden HeLa-Zellen zunächst mit der DNS für das C-Terminale STAT1-GFP-Fusionsprotein transfiziert (vgl. 1.1, siehe 3.3.2) und anschließend, wie oben beschrieben, mit siRNS behandelt. Während Ubc9 eine panzelluläre Verteilung in den mit Kontroll-siRNS behandelten Zellen zeigte, konnte nach der Ubc9-siRNS-Behandlung Ubc9 fast nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.5). Analog zu dem in Abb. 4.3 beschriebenen Experiment zeigte auch das GFP-gekoppelte STAT1-WT zunächst eine zytoplasmatische Ruheverteilung und akkumulierte nach IFN $\gamma$ -Stimulation homogen im Zellkern (Abb. 4.5). Jedoch konnte die Bildung punktförmiger nukleärer Partikel nur in den mit Ubc9 spezifischer si-RNS behandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.5). Demzufolge verhält sich das GFP-gekoppelte STAT1 nicht unterschiedlich von der nicht markierten Variante (vgl. Abb. 4.4 und 4.5).



**Abb. 4.6. SUMO-freies STAT1 lokalisiert unabhängig von einer spezifischen SUMO-Konsensus-Mutation in nukleären Partikeln.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit der angegebenen STAT1-Mutante rekonstituiert. Nach 24 h wurden die Zellen unbehandelt belassen, für 1 h mit IFN $\gamma$  allein oder in Kombination mit dem Phosphatase-Inhibitor Pervanadat (PV, 0,8 mM) stimuliert. (A) Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 gefärbt (5 min, 1:10000, RT) und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (B) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1 und STAT1 (C24) immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen.

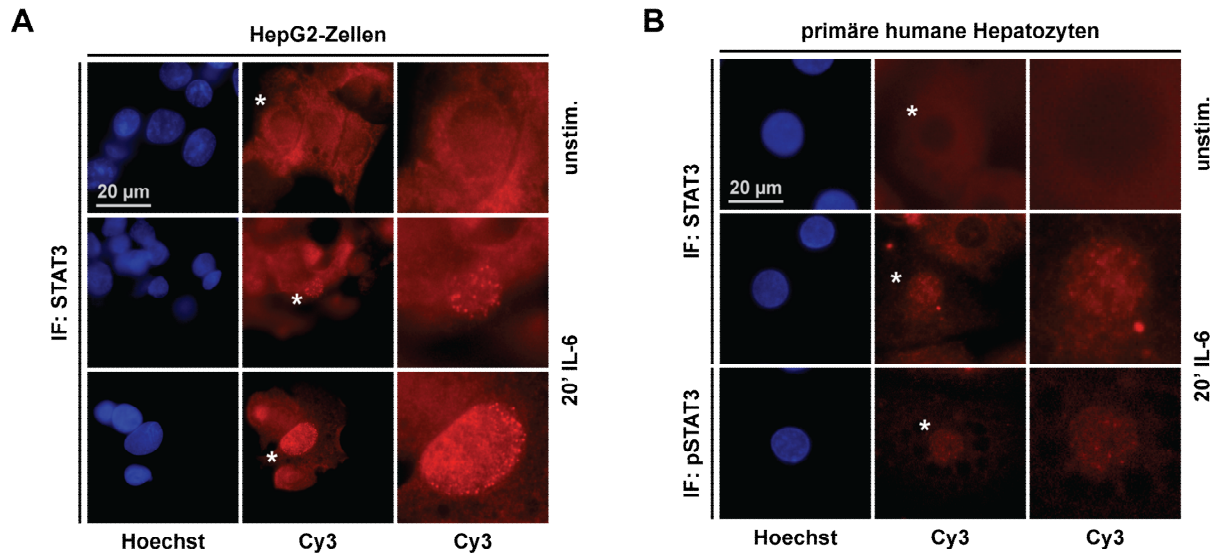
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung die Bildung nukleärer Partikel inhibiert, stellt sich die Frage warum dieser Phänotyp nicht schon in vorherigen Studien mit den Mutanten K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A beobachtet wurde (Ungureanu et al. 2003, Song et al. 2006). Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen spezifischen Tyr<sup>701</sup>-

Phosphorylierung der STAT1-Mutanten liegen (vgl. Abb. 4.2). Für die Beantwortung dieser Frage wurde die subzelluläre Verteilung der STAT1-Varianten als C-Terminale STAT1-GFP-Fusionsproteine untersucht. Dafür wurden U3A-Zellen transient mit der entsprechenden STAT1-SUMO-Konsensus Mutante transfiziert (siehe 3.3.2). Nach einer 60-minütigen Stimulation mit IFN $\gamma$  erfolgte die Fixierung der Zellen und die Untersuchung der subzellulären Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop (siehe 3.2.9). Im Ruhezustand der Zellen waren die STAT1-Varianten unabhängig vom Genotyp vorrangig im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4.6A, links). Die Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$  führte zu der Akkumulation aller STAT1-Varianten in den Zellkernen, jedoch traten nun gravierende Unterschiede in der subnukleären Verteilung auf (Abb. 4.6A, Mitte). Während STAT1-K<sup>703</sup>R außerhalb der Nukleoli homogen im Zellkern verteilt war, wurden mit STAT1-E<sup>705</sup>A und STAT1-E<sup>705</sup>Q Nadel-förmige nukleäre Partikel beobachtet. Im Gegensatz zu STAT1-E<sup>705</sup>A, wo die Partikel nur in 10% der Zellen beobachtet wurden, war dieser Phänotyp mit 86% bei STAT1-E<sup>705</sup>Q viel deutlicher ausgeprägt. Um Expressionsunterschiede bei den einzelnen STAT1-Varianten als Ursache der differentiellen subzellulären Verteilung auszuschließen, erfolgte parallel die immunchemische Bestimmung der pSTAT1- und Gesamt-STAT1-Level nach der Herstellung von Gesamtzell-Extrakten (Abb. 4.6B). Auffällig erscheint die Korrelation der nukleären Partikel mit der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung der STAT1-Varianten. Im Vergleich mit der E<sup>705</sup>Q-Mutante zeigt E<sup>705</sup>A nicht nur ein um 1,9-fach reduziertes Phosphorylierungs-Level, auch die Anzahl der Zellen mit nukleären Partikeln ist deutlich reduziert (E<sup>705</sup>Q: 86% ggü. E<sup>705</sup>A: 10%). Noch ausgeprägter ist dieser Sachverhalt bei der K<sup>703</sup>R-Mutante. Im Vergleich mit der E<sup>705</sup>Q-Mutante zeigt sie nur noch ca. 8% des Phosphorylierungs-Levels (Abb. 4.6B) und keine nukleären Partikel (Abb. 4.6A, Mitte). Um den Einfluss der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung auf die Bildung der nukleären Partikel näher zu untersuchen, wurde das Experiment wiederholt und die Zellen nach 30-minütiger IFN $\gamma$ -Stimulation zusätzlich für weitere 30 min mit 0,8 mM Pervanadat ko-inkubiert. Pervanadat ist ein Inhibitor der Protein-Tyrosin-Phosphatase TC45, welche hauptsächlich für die Dephosphorylierung von STAT1 verantwortlich ist (tenHoeve et al. 2002, Meng et al. 2002). Tatsächlich konnte durch diese Behandlung bei den STAT1-Mutanten eine Angleichung des Phosphorylierungsniveaus erreicht werden. Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von E<sup>705</sup>A war gegenüber E<sup>705</sup>Q nur noch geringfügig reduziert, während die von K<sup>703</sup>R nun das Niveau von E<sup>705</sup>A vor der Pervanadat-Behandlung erreichte (Abb. 4.6B). Die anschließende Auszählung von Partikel-bildenden Zellen zeigte eine Korrelation mit dem Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsniveau auf.

Einhergehend zeigten nach der Pervanadat-Behandlung nun über 65% der E<sup>705</sup>A- und 18% der K<sup>703</sup>R-exprimierenden Zellen die Bildung nukleärer Partikel. Demnach führt die Verhinderung der STAT1-Sumolierung bei allen SUMO-Konsensus Mutanten zu der Bildung nukleärer Partikel, jedoch ist die quantitative Ausprägung des Phänotyps abhängig von einer bestimmten Basis-Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung. Diese Ergebnisse verdeutlichen die geringe Eignung der K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A-Mutanten für die Untersuchung der STAT1-Sumolierung. In bisherigen Studien wurde durch die verwendeten STAT1-Mutanten K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A zwar die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1 verhindert, allerdings führte die parallele Reduktion der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung höchstwahrscheinlich zu der Maskierung der damit assoziierten phänotypischen Effekte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Sumolierung die subnukleäre Verteilung von STAT1 in der Zelle beeinflusst. Während SUMO-freies STAT1 nach IFN $\gamma$ -Stimulation in nukleäre Partikel lokalisiert, führt die SUMO-Konjugation zu einer homogenen Verteilung von STAT1 im Zellkern. Die Bildung der nukleären Partikel konnte dabei sowohl mit verschiedenen SUMO-freien STAT1-Mutanten, als auch mit endogenem STAT1 in Zellen beobachtet werden, in denen die SUMO1-Konjugation durch die Herunterregulierung des SUMO-E2-Enzyms Ubc9 beeinträchtigt wurde.

### **4.2.2 Die subzelluläre Verteilung von STAT3 gleicht der von SUMO-freiem STAT1**

STAT1 ist das einzige Mitglied der STAT-Familie, welches einen funktionalen SUMO-Konsensus in der unmittelbaren Nähe zur Tyrosin-Phosphorylierungsstelle besitzt (vgl. Abb. 1.5). Die im vorherigen Kapitel beschriebene Fähigkeit von SUMO-freiem STAT1 zur Bildung von nukleären Partikeln führt zu der Frage, ob dies eine generelle Eigenschaft der STAT-Proteine darstellt, welche im speziellen Fall von STAT1 durch die Sumolierung unterbunden wird. Tatsächlich wurde bereits die Bildung von nukleären STAT3-Partikeln in humanen Hepatoma-Zellen (HepG2) in Antwort auf IL6-Stimulation beschrieben (Herrmann et al. 2004). Erstaunlicherweise gleichen sich die dabei beobachteten Partikel sehr den in dieser Arbeit gezeigten nukleären Partikel von SUMO-freiem STAT1. Um die nukleären Partikel von STAT3 und SUMO-freiem STAT1 direkt miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst die subzelluläre Verteilung von endogenem STAT3 untersucht. Dazu wurden HepG2-Zellen kultiviert und für 20 min mit IL6 stimuliert. Nach der Fixierung der Zellen wurde STAT3 immunozytochemisch angefärbt (siehe 3.2.8) und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenzmikroskop analysiert (siehe 3.2.9).

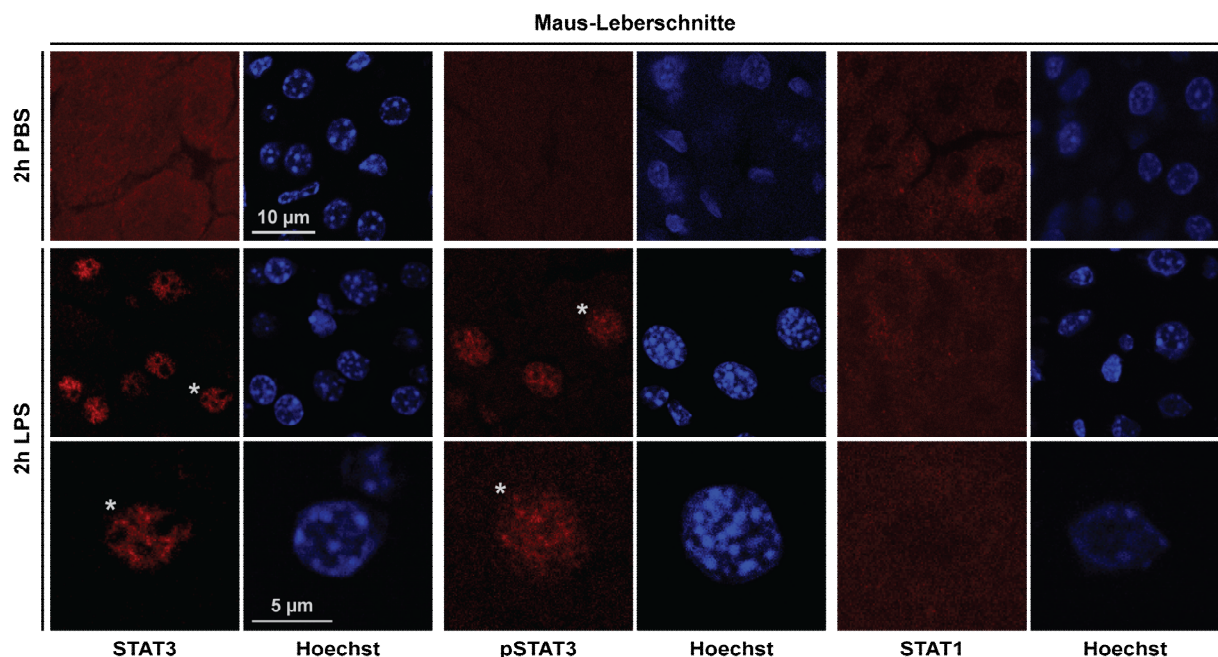


**Abb. 4.7. Aktiviertes STAT3 lokalisiert in nukleären Partikeln.** (A) HepG2-Zellen wurden entweder für 20 min mit IL6 stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen mit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -kaltm Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) und STAT3 immunozytochemisch angefärbt. (B) Primäre humane Hepatozyten wurden wie in (A) behandelt. Zusätzlich wurden Zellen mit pSTAT3 immunozytochemisch angefärbt. Die Analyse der subzellulären Verteilung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop. Mit einem Stern (\*) markierten Zellen wurden zusätzlich vergrößert dargestellt.

Wie bereits beschrieben (Zhang et al. 1995), wurde im Ruhezustand der Zelle bereits eine panzelluläre Verteilung von STAT3 beobachtet. Nach 20-minütiger IL6-Stimulation akkumulierte STAT3 im Zellkern (Abb. 4.7A). Zusätzlich konnten in einigen Zellen punktförmige nukleäre Strukturen (Abb. 4.7A) beobachtet werden (vgl. Herrmann et al. 2004). Um eine Assoziation dieses Phänotyps mit dem malignen Hintergrund der HepG2-Zellen auszuschließen, wurde die subzelluläre Verteilung von STAT3 zusätzlich in humanen Hepatozyten untersucht. In Übereinstimmung mit den örtlichen Ethik-Bestimmungen (*Nottingham Research Ethics Committee, REC 04/Q2403/70*) wurden humane Hepatozyten aus Leberbiopsien durch Dr. Elke Gottschlag (Universität Nottingham, UK) isoliert (Gottschlag et al. 2006) und in Kultur genommen. Die Zellen wurden nach einer 24-stündigen Ruhephase für 20 min mit IL6 behandelt, fixiert und STAT3 bzw. pSTAT3 immunozytochemisch angefärbt (siehe 3.2.8). Die Hepatozyten unterschieden sich von den HepG2-Zellen zunächst durch eine stark ausgeprägte zytoplasmatische Ruheverteilung von STAT3 (Abb. 4.7B). In Antwort auf die IL6-Stimulation akkumulierte STAT3 in ca. der Hälfte der beobachteten Zellen im Zellkern. Bemerkenswerterweise konnten nukleäre punktförmige Partikel sowohl in den STAT3-angefärbten als auch in den pSTAT3-angefärbten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.7B). Die in den Zellen beobachteten nukleären STAT3-Partikel sind, ebenso wie die Partikel von SUMO-freiem STAT1, Zytokin-induziert.



Desweiteren wurde das Auftreten von STAT3-Partikeln bereits mit dem physiologischen Prozess der Akute-Phase-Reaktion (APR) in Verbindung gebracht (Ray et al. 2005). Dabei wurde durch die intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) in Mäusen eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst, in deren Folge eine Vielzahl von Zytokinen sezerniert wird, u.a. IL6, TNF $\alpha$  und IL10 (Rietschel et al. 1994, Ray et al. 2005, Wu et al. 2009), in deren Folge auch STAT3 aktiviert wird. In den immungefärbten Leberschnitten wurde anschließend in nahezu jeder Zelle eine nicht homogene Verteilung von STAT3 und die Bildung von punktförmigen Partikeln beobachtet. Jedoch wurde dieser Umstand nicht näher diskutiert (Ray et al. 2005). Um die physiologische Relevanz der STAT3-Partikelbildung zu bestätigen, wurde die subzelluläre Verteilung von STAT3 während der APR in C57Bl/6-Mäusen untersucht (siehe 3.3.6). Dazu wurden die Mäuse intraperitoneal mit einer geringen Dosis LPS injiziert (7,35  $\mu$ g LPS je Gramm Körpergewicht in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l PBS). Anschließend erfolgte die Entnahme einer Leberbiopsie, welche durch Eintauchen in super-gekühltes Isopentan tiefgefroren wurde (siehe 3.3.6). Die Herstellung von 8-10  $\mu$ M dünnen Gewebeschnitten erfolgte durch Marie Smith (*Advanced Microscopy Unit*, Universität Nottingham, UK).

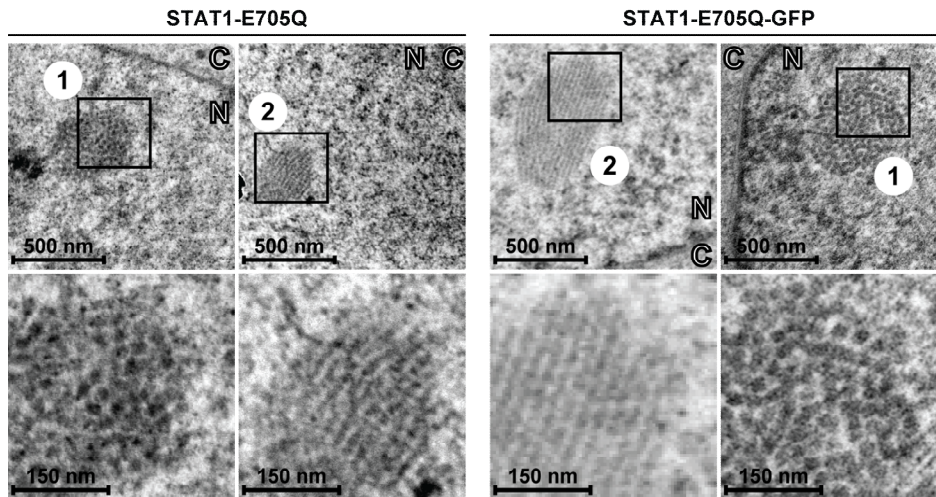


**Abb. 4.8. Aktiviertes STAT3 lokalisiert in nukleären Partikeln während der Akut-Phase-Reaktion in Mäusen.** C57Bl/6-Mäuse wurden entweder mit 200  $\mu$ l sterilem PBS oder zusätzlich mit LPS (7,35  $\mu$ g je Gramm Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Nach 2 h wurde die Leber präpariert, in super-kaltem Isopentane eingefroren und in 8-10  $\mu$ m dicke Sektionen unterteilt. Nach Fixierung der Leberschnitte mit 4% (w/v) Paraformaldehyd wurden die Zellkernen mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) angefärbt. Die immunzytochemische Färbung von STAT3 (links), pSTAT3 (Mitte) oder STAT1 (rechts) erfolgte auf verschiedenen Gewebeschnitten derselben Leber. Die Analyse der subzellulären Verteilung erfolgte am Konfokalmikroskop. Mit einem Stern (\*) markierten Zellen wurden zusätzlich vergrößert dargestellt.

Nach der Fixierung der Gewebeschnitte wurde STAT3 bzw. pSTAT3 immunozytochemisch angefärbt (siehe 3.2.8) und die subzelluläre Verteilung am Konfokal-Mikroskop analysiert (siehe 3.2.9). Zur Untersuchung der Ruheverteilung von STAT3 wurden die Mäuse nur mit sterilem PBS injiziert. Analog zu den HepG2-Zellen konnte dabei eine panzelluläre Verteilung von STAT3 beobachtet werden (Abb. 4.8, oben links). Zwei Stunden nach Induktion der Entzündungsreaktion befand sich STAT3 fast ausschließlich in den Kernen der Zellen (Abb. 4.8, unten links), wobei mehr als 80% der STAT3-akkumulierten Zellen punktförmige nukleäre Partikel zeigten. Analog zu den Beobachtungen mit SUMO-freiem STAT1 bestätigte die immunozytochemische Färbung von pSTAT3 den Einbau von phosphoryliertem STAT3 in die nukleären Partikel (Abb. 4.6, unten Mitte). Im Laufe der LPS-induzierten Entzündungsreaktion wurde STAT1 nur geringfügig aktiviert. Der immunozytochemische Nachweis zeigte in den PBS-behandelten Mäusen eine zytoplasmatische Verteilung von STAT1. Nach der Induktion der Entzündungsreaktion konzentrierte sich STAT1 weiterhin im Zytoplasma, jedoch konnten nun auch einige Signale im Zellkern detektiert werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass aktiviertes STAT3 sowohl unter Zellkultur-Bedingungen als auch während der physiologischen Akute-Phase-Reaktion in der Mausleber, in punktförmigen nukleären Partikeln lokalisiert. Die beobachteten Partikel ähneln dabei sehr den punktförmigen Strukturen von STAT1 nach Herunter-Regulation des SUMO-E2-Enzyms Ubc9 (siehe 4.2.1). Da STAT3 kein Ziel der SUMO-Modifikation darstellt, ist es erwähnenswert, dass ebenfalls die nicht sumolierte Form von STAT3 nukleäre Partikel bildet.

### **4.2.3 Nukleäre STAT-Partikeln besitzen eine parakristalline Ultrastruktur**

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Bildung von Zytokin-induzierten nukleären STAT1- bzw. STAT3-Partikeln beschrieben, welche sich auf fluoreszenzmikroskopischer Ebene sehr ähnlich sehen (vgl. Abb. 4.3, 4.7 und 4.8). In der Literatur sind bereits mehrere nukleäre Strukturen beschrieben wurden, deren Bildung abhängig von der Sumolierung bestimmter Proteine sind, u.a. bei den PML- (Sachdev et al. 2001) und Cajal-Kernkörperchen (Navascues et al. 2008). Im Gegensatz zu den Beobachtungen mit STATs lokalisierte dabei aber vorrangig das SUMO-modifizierte Protein in den nukleären Strukturen, während das nicht modifizierte Protein homogen in der Zelle verteilt war (Seeler & Dejean 2001). Weiterhin bilden die PML- und Cajal-Kernkörperchen charakteristische Grundstrukturen aus, welche sich mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) unterscheiden lassen.

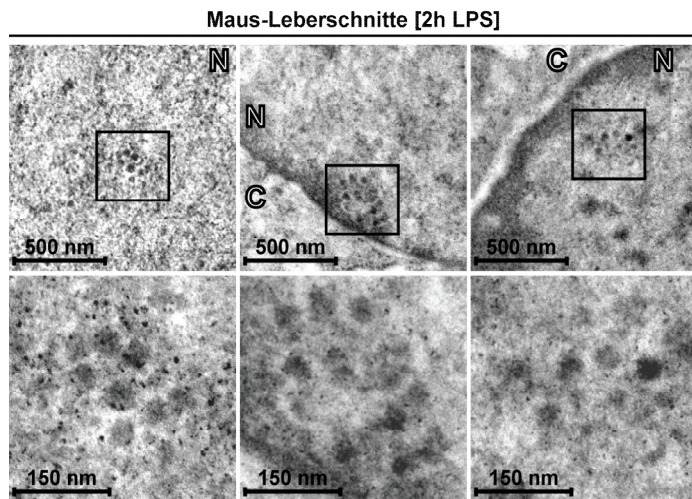


**Abb. 4.9. Nukleäre STAT1-Partikel besitzen eine hoch geordnete Ultra-Struktur.** HeLa-Zellen wurden mit dem angegebenen SUMO-freien STAT1-Konstrukt transfiziert und 48 h nach der Transfektion für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach der Fixierung der Zellen mit einer 3% (w/v) Paraformaldehyd/0,25% (v/v) Glutaraldehyd-Lösung erfolgte die Vorbereitung für die TEM-Analyse und die Präparation von 60 nm Schnitten auf Kupfer-Gitter. Die Kontrastierung erfolgte invers auf einem Flüssigkeitstropfen mit Uranyl-Azetat und Bleizitrat. Die Analyse der Ultrastruktur erfolgte am Elektronenmikroskop. Das Zytoplasma (C), der Zellkern (N), Querschnitte (1) und Längsschnitte (2) sind angedeutet. Gerahmte Bereiche wurden vergrößert dargestellt.

Um nähere Informationen über die Form und den Aufbau der nukleären STAT-Partikel zu erhalten, wurden Partikel-bildende Zellen bzw. Gewebeschnitte mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Zunächst wurde die Ultrastruktur der nukleären STAT1-Partikel in HeLa-Zellen untersucht, welche mit dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q bzw. STAT1-E<sup>705</sup>Q-GFP transient transfiziert wurden (siehe 3.3.2). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion entweder für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt belassen und danach für 2 h mit einer 3% (w/v) Paraformaldehyd / 0,25% (v/v) Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Nach der Vorbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie (siehe auch 3.2.10) wurden 60 nm dicke Zellschnitte auf Kupfer-Gitter präpariert und zur Kontrastierung mit Uranylazetat und Bleizitrat gefärbt (siehe auch 3.2.10). Anschließend erfolgte die Analyse am Transmissions-Elektronenmikroskop. Nach der Kontrastierung der Schnitte waren das Zytoplasma, der Zellkern, die Kernmembran und das Heterochromatin klar voneinander abgetrennt und Zellorganellen, wie Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum deutlich zu erkennen. Bei der Untersuchung von IFN $\gamma$ -stimulierten und SUMO-freien STAT1 exprimierenden Zellen konnte eine zusätzliche Ultra-Struktur in den Zellkernen beobachtet werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine im Längs- und Querschnitt hochgeordnete aus Fibrillen aufgebaute Struktur (Abb. 4.9), welche sich deutlich von dem diffus verteilten Heterochromatin unterschied. Der Durchmesser der einzelnen Fibrillen war sehr konstant und betrug im Querschnitt  $25,0 \pm 2,8$  nm für STAT1-E<sup>705</sup>Q und  $21,0 \pm 2,7$  nm



für STAT1-E<sup>705</sup>Q-GFP. Ebenso wie die Mittenentfernung der Fibrillen mit  $36,3 \pm 5,4$  nm für STAT1-E<sup>705</sup>Q und  $32,8 \pm 4,2$  nm für STAT1-E<sup>705</sup>Q-GFP im Querschnitt nur eine geringe Varianz auf. Im Gegensatz dazu konnten solche Strukturen nicht bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von unbehandelten Zellen, oder zur Kontrolle mitgeführten IFN $\gamma$ -stimulierten und STAT1-WT exprimierenden Zellen, beobachtet werden.

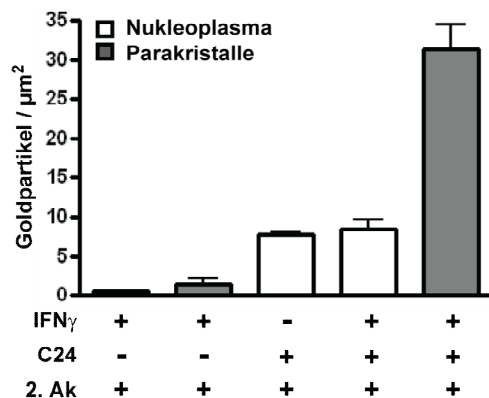
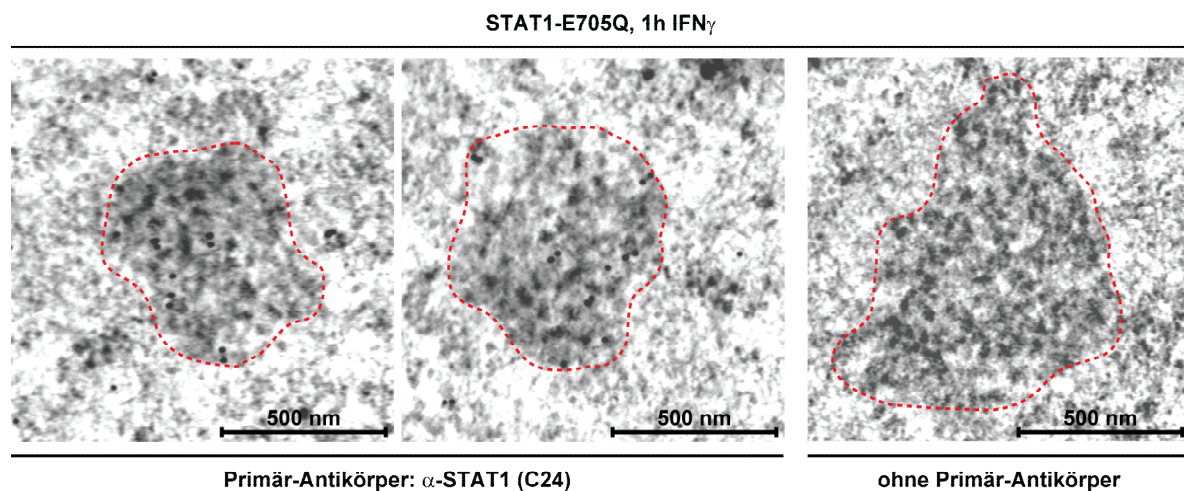


**Abb. 4.10. Nukleäre STAT3-Partikel besitzen eine hoch geordnete Ultrastruktur.** C57Bl/6-Mäuse wurden entweder mit 200  $\mu$ l sterilem PBS oder zusätzlich mit LPS (7,35  $\mu$ g je Gramm Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Nach 2 h wurde die Leber isoliert und mit einer 3% (w/v) Paraformaldehyd / 0,25% (v/v) Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Nach der Vorbereitung für die TEM-Analyse wurden 60 nm Gewebeschnitte auf Kupfer-Gitter präpariert. Die Kontrastierung erfolgte invers auf einem Flüssigkeitstropfen mit Uranyl-Azetat und Bleizitrat. Die Analyse der Ultrastruktur erfolgte am Elektronenmikroskop. Das

Zytoplasma (C) und der Zellkern (N) sind angedeutet. Gerahmte Bereiche wurden vergrößert dargestellt.

Als nächstes erfolgte die Untersuchung nukleärer STAT3-Partikel. Dafür wurden die bereits in 4.2.2 beschriebenen Leberbiopsien von LPS- bzw. PBS behandelten Mäusen in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Würfel zerteilt und in einer 3% (w/v) Paraformaldehyd/0,25% (v/v) Glutaraldehyd-Lösung bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben für die Untersuchung am Elektronenmikroskop vorbereitet. Nach der Kontrastierung waren im Elektronenmikroskop das Zytoplasma, der Zellkern, die Kernmembran und das Heterochromatin klar voneinander abgetrennt und Zellorganellen, wie Mitochondrien, Lipidtropfen, Vakuolen und das endoplasmatische Retikulum deutlich zu erkennen. Anschließend wurden die Zellkerne von Hepatozyten in den Gewebeschnitten am TEM untersucht. Bei der Untersuchung von Leberzellkernen LPS-stimulierter Mäuse wurden ebenfalls Querschnitte einer aus Fibrillen aufgebauten und hochgeordneten Struktur beobachtet (Abb. 4.10). Analog zu der STAT1-Ultrastruktur war sowohl der Durchmesser mit  $34,2 \pm 2,8$  nm und die Mittenentfernung mit  $68,4 \pm 7,9$  nm dieser Fibrillen sehr konstant. Ein Längsschnitt der STAT3-Partikel wurde jedoch nicht beobachtet. Bei der Untersuchung der zur Kontrolle mitgeführten Leberschnitte von nur mit sterilem PBS behandelten Mäusen konnten keine auffälligen Muster in den Zellkernen festgestellt werden. Demnach scheinen die in immunozytochemischen

Analysen beobachteten nukleären Partikel eine hochgeordnete Struktur zu besitzen, welche im Elektronenmikroskop visualisiert werden kann. Die Tatsache, dass die Ultra-Strukturen nur nach der Zytokin-Induktion und auch nicht bei dem SUMO-konjugierten STAT1-WT beobachtet werden konnten, unterstützt diese Vermutung. Unklar zu diesem Zeitpunkt ist jedoch, ob die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachteten hochgeordneten Strukturen tatsächlich STAT-Proteine enthalten. Allerdings kann mit Hilfe von kolloidalen Gold-gekoppelten Sekundär-Antikörpern die Anwesenheit der STATs in den nukleären Strukturen auch im Elektronenmikroskop immunchemisch nachgewiesen werden. Dafür wurden zunächst HeLa-Zellen mit dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q transfiziert (siehe 3.3.2) und nach 48 h für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert, gefolgt von der Fixierung der Zellen für 2 h mit 4% (w/v) Paraformaldehyd/0,25% (v/v) Glutaraldehyd. Da die Universität Nottingham kein geeignetes Gerät zur Gefriersubstitution der Proben besaß, wurden diese von Dr. Jeremy Skepper (Cambridge, UK) für die Elektronenmikroskopie präpariert. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte wie in 3.2.10 beschrieben, gefolgt von der Herstellung 60 nm dünner Zellschnitte auf Nickel-Gitter. Die Blockierung, Waschschrte und die Inkubation der Schnitte mit Antikörpern erfolgten danach invers auf einem Flüssigkeitstropfen (siehe auch 3.2.10).



**Abb. 4.11. Immunogold-Nachweis von STAT1 in nukleären Partikeln.** HeLa-Zellen wurden mit der cDNS für STAT1-E<sup>705</sup>Q transfiziert und 48 h danach für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach der Fixierung erfolgte die Präparation von 60 nm Schnitten auf Nickel-Gitter. Der immunchemische Nachweis von STAT1 wurde mit dem Kaninchen- $\alpha$ -STAT1 (C24) Antikörper und einem 10 nm Gold- $\alpha$ -Kaninchen Antikörper (2. Ak) durchgeführt. Nach der Kontrastierung mit Uranyl-Azetat und Bleizitrat erfolgte die Analyse der Parakristalle am Elektronenmikroskop (oben). Die Anzahl der Goldpartikel je  $\mu\text{m}^2$  wurde jeweils für das Nukleoplasma und die Parakristalle bestimmt (unten).

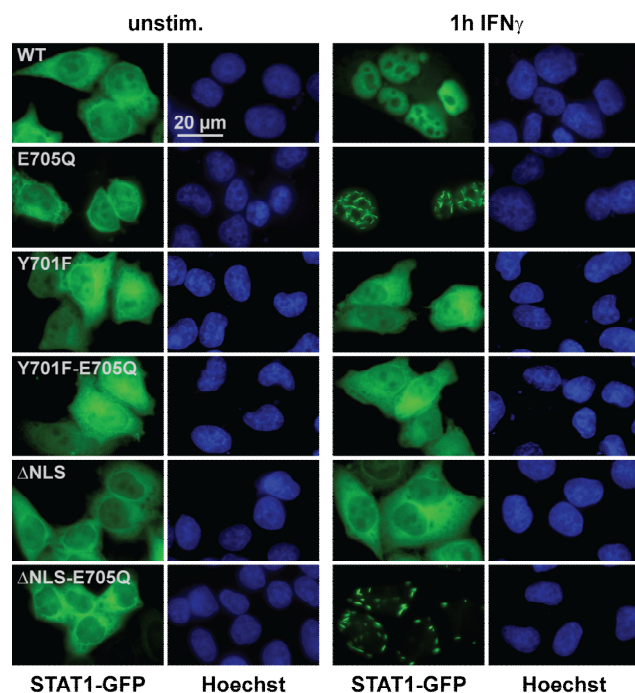
Für den immunchemischen Nachweis von STAT1 wurde als Primär-Antikörper der Kaninchen- $\alpha$ STAT1-Antikörper C24 und als Sekundär-Antikörper ein mit 15 nm kolloidalen Goldpartikeln gekoppelter  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper verwendet (siehe 2.3). Nach der Kontrastierung mit Uranylazetat und Bleizitrat erfolgte die Analyse der Proben am Elektronenmikroskop. Um zunächst die Spezifität des Sekundär-Antikörpers zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Probe ohne die Anwesenheit eines Primär-Antikörpers inkubiert. In diesen Zellen konnten zwar die IFN $\gamma$ -abhängigen nukleären Strukturen beobachtet werden, jedoch konnte keine spezifische Assoziation von Goldpartikeln festgestellt werden. Sowohl die mit den Strukturen assoziierten Menge an Goldpartikeln ( $1,4 \pm 0,8$  Goldpartikel je  $\mu\text{m}^2$ ) als auch die mit dem verbleibenden Nukleoplasma assoziierten Goldpartikel ( $0,6 \pm 0,1$  Goldpartikel je  $\mu\text{m}^2$ ) waren vergleichbar (Abb. 4.11, unten, vgl. Säulen 1 und 2). Wurde der immunchemische Nachweis jedoch unter Verwendung des spezifischen STAT1-Antikörpers durchgeführt, so assoziierten im Durchschnitt  $31,3 \pm 3,1$  Goldpartikel je  $\mu\text{m}^2$  mit den nukleären Strukturen, während nur  $8,5 \pm 1,1$  Goldpartikel je  $\mu\text{m}^2$  Nukleoplasma quantifiziert werden konnten (Abb. 4.11, unten, vgl. Säulen 4 und 5). Demnach ist STAT1 gegenüber dem Nukleoplasma deutlich in den nukleären Strukturen angereichert. Der analoge Nachweis von STAT3 konnte bereits in STAT3-GFP exprimierenden HeLa-Zellen von Dr. Francis Wolfram (persönliche Kommunikation, Droescher et al. 2011) gezeigt werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die in der immunozytochemischen Untersuchung beobachteten nukleären Partikel von STAT1 und STAT3 eine hochgeordnete und aus Fibrillen aufgebaute Struktur besitzen, welche mit dem Elektronenmikroskop beobachtet werden kann. Zusätzlich wurde in SUMO-freien STAT1 exprimierenden Zellen durch eine Immunogold-Analyse STAT1 als direkter Bestandteil der nukleären Partikel identifiziert. Bemerkenswerterweise weisen die beobachteten und hochgeordneten Ultrastrukturen der STAT-Partikel eine hohe Ähnlichkeit zu den kristallinen Strukturen von Viren-Partikeln (Roingear 2008) bzw. von Hämoglobin S in Sichelzellen (Finch et al. 1973) auf. Eine weitere Eigenschaft kristalliner Strukturen stellt die Doppelbrechung von polarisiertem Licht dar. In Kooperation mit Dr. Rudolf Oldenbourg (Woods Hole Marine Laboratory, USA) wurde die Doppelbrechung von nukleären Partikeln in fixierten und mit STAT1-E<sup>705</sup>Q-GFP rekonsituierten U3A-Zellen bestimmt. Der dabei gemessene Wert von 1 nm deutet auf eine kristalline Struktur hin (persönliche Kommunikation, Dr. Rudolf Oldenbourg, Woods Hole, USA). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff Parakristalle geprägt, der im Folgenden für die nukleären STAT-Partikel verwendet wird.

### **4.3 Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung verhindert die Polymerisierung und Parakristallbildung von STAT1**

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die SUMO-Modifikation die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung negativ beeinflusst (siehe 4.1) und zusätzlich den Aufbau von STAT1-Parakristallen behindert (siehe 4.2). Um näher zu untersuchen wie die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1 die Bildung von Parakristallen verhindern kann, ist es zunächst notwendig den molekularen Aufbau der Parakristalle zu verstehen. Initiale Untersuchungen haben bereits ergeben, dass die STAT-Parakristalle dynamische und reversible Strukturen darstellen, welche in einem Gleichgewicht mit ihrer Umgebung stehen. In einem Experiment wurden Parakristalle von SUMO-freiem STAT1-E<sup>705</sup>Q in HeLa-Zellen induziert. Der nachfolgende Entzug von IFN $\gamma$  führte innerhalb von 8 h größtenteils zu der Auflösung der Parakristalle. Durch die Verwendung des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) konnte Dr. Andreas Begitt (Universität Nottingham, UK) zeigen, dass nach wiederholter IFN $\gamma$ -Stimulation der Aufbau der Parakristalle unabhängig von einer erneuten Proteinsynthese ist (persönliche Kommunikation, Droescher et al. 2011). Zusätzlich wurde in einem FRAP-Experiment (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) eine hohe Mobilität der STAT-Proteine in den Parakristallen beobachtet (Dr. Andreas Begitt, persönliche Kommunikation, Droescher et al. 2011).

#### **4.3.1 Die Polymerisierung phosphorylierter STAT1-Dimere führt zu Parakristallen**

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass sich Parakristalle Zytokin-abhängig in den Zellkernen bilden. Zusätzlich wurde der Einbau von Tyr-phosphoryliertem STAT in die Parakristalle gezeigt (Abb. 4.3, 4.7 und 4.8). Jedoch ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar, ob die Zytokin-Abhängigkeit der Parakristalle von der dadurch induzierten STAT-Phosphorylierung oder aber von der nukleären Umgebung selbst abhängt. Um die Notwendigkeit der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung für die Bildung von STAT1-Parakristalle zu untersuchen, wurde die E<sup>705</sup>Q-Mutation mit der Phosphorylierungs-Mutante STAT1-Y<sup>701</sup>F (Shuai et al. 1993) kombiniert. Das resultierende STAT1-Konstrukt kann nun weder Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliert noch Lys<sup>703</sup>-sumoliert werden. Anschließend wurden HeLa-Zellen mit dem entsprechenden C-Terminalen STAT1-GFP-Fusionsprotein transfiziert (siehe 3.3.2) und 24 h nach der Transfektion unbehandelt belassen oder für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach der Fixierung der Zellen wurde die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht (siehe 3.2.9).

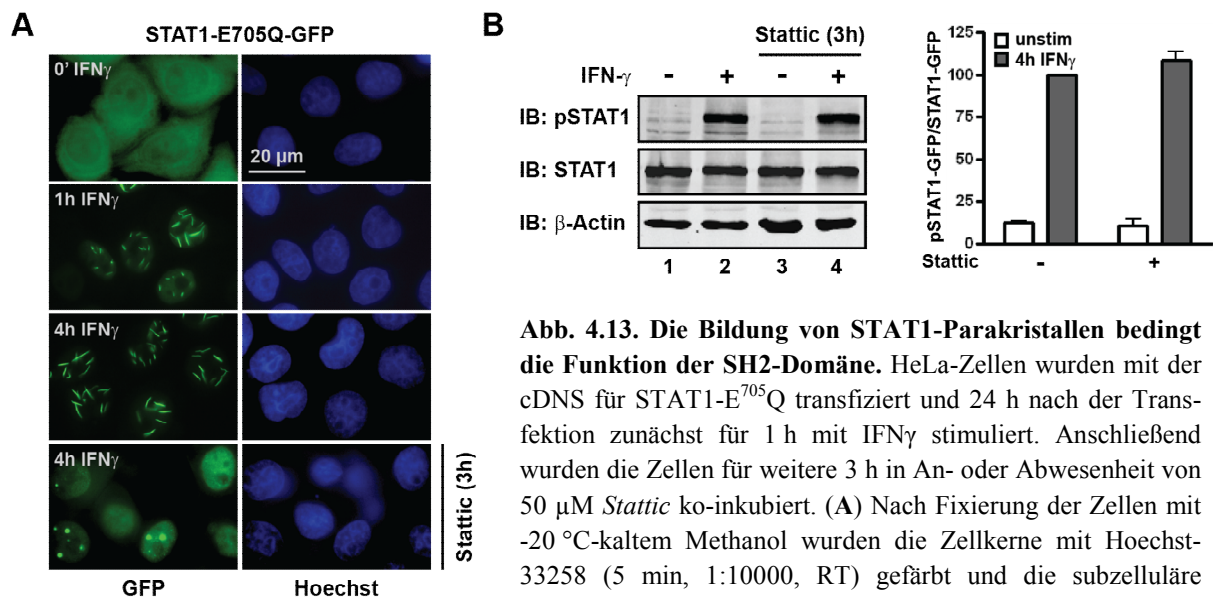


**Abb. 4.12. STAT1-Parakristalle sind abhängig von der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und nicht auf den Zellkern beschränkt.** HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen STAT1-Konstrukten transfiziert und 24 h später für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) gefärbt und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

Wie in dieser Arbeit bereits mehrfach beschrieben, zeigten alle STAT1-Varianten im Ruhezustand der Zelle eine zytoplasmatische Verteilung (Abb. 4.12, links). Nach der Stimulation mit IFN $\gamma$  akkumulierte STAT1-WT homogen im Zellkern, während SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q Parakristalle bildete (Abb. 4.12, rechts). Wie beschrieben (Shuai et al. 1993), zeigte die Tyrosin-Phosphorylierungs-Mutante Y<sup>701</sup>F auch nach der IFN $\gamma$ -Stimulation eine zytoplasmatische und homogene Lokalisation. Auch die Kombination mit der SUMO-freien E<sup>705</sup>Q-Mutation (STAT1-Y<sup>701</sup>F-E<sup>705</sup>Q) änderte diese Verteilung nicht (Abb. 4.12, rechts). Dieses Ergebnis bestätigt noch einmal die Notwendigkeit der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung für die Bildung der Parakristalle. Durch die Zerstörung der Kernlokalisations-Sequenz von phosphoryliertem STAT1 durch die Doppelmutation KK<sup>410,413</sup>EE (hier als  $\Delta$ NLS bezeichnet) wurde untersucht, ob die Bildung der Parakristalle mit Zellkern-Bestandteilen assoziiert ist oder auch in einem anderen Zellkompartiment stattfinden kann. Aufgrund der mutierten Kernlokalisations-Sequenz akkumuliert STAT1- $\Delta$ NLS nicht mehr im Zellkern in Antwort auf IFN $\gamma$ -Stimulation (Meyer et al. 2002) (Abb. 4.12, rechts). Bemerkenswerterweise führte die Verhinderung der Lys<sup>703</sup>-Sumolierung bei der Mutante STAT1-E<sup>705</sup>Q- $\Delta$ NLS zu der Bildung von nun zytoplasmatischen Parakristallen (Abb. 4.12). Die Bildung von Parakristallen ist demnach eine Eigenschaft der phosphorylierten STAT1-Moleküle und nicht auf das Vorhandensein von Zellkernkomponenten angewiesen. Aber auch die aufgrund der Sumolierung von STAT1 induzierte Auflösung der Parakristalle wird nicht durch spezifische Zellkernkomponenten vermittelt.



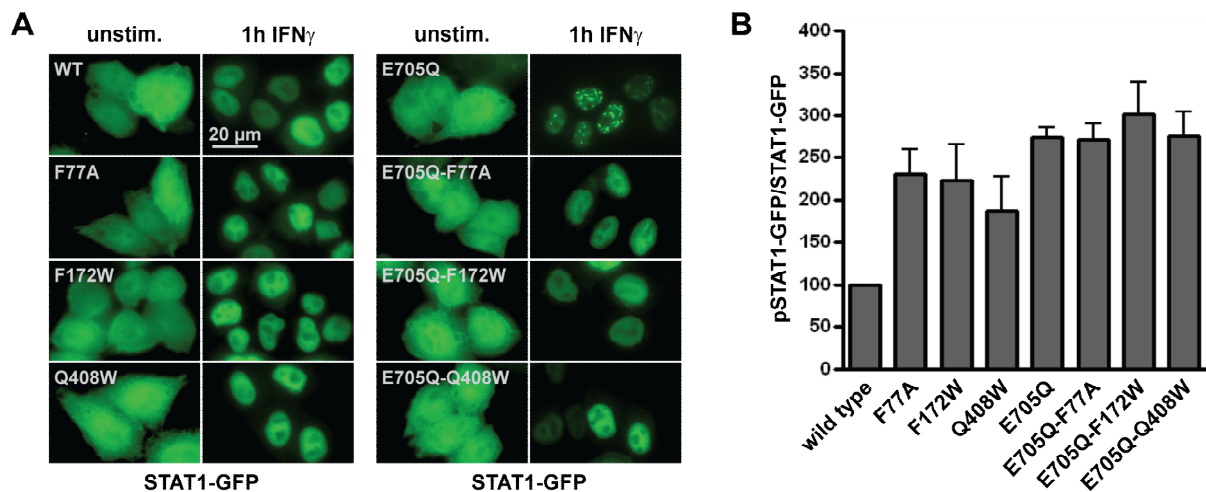
Die Notwendigkeit der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung bei der Bildung von STAT1-Parakristallen wirft allerdings die Frage auf, wie die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung deren Bildung überhaupt verhindern kann. Da sich die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung und die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 gegenseitig ausschließen (Zimmik et al. 2009), ist die Vorstufe der Parakristalle, das phosphorylierte STAT1, nicht von der Lys<sup>703</sup>-Sumolierung betroffen. Eine mögliche Erklärung könnte in der Fähigkeit von STAT1 zur Dimerisierung liegen. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass STATs im Ruhezustand der Zelle vorwiegend als über N-Domänen-Interaktionen vermittelte antiparallele Dimere vorliegen (Ota et al. 2004, Wenta et al. 2008). Nach der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung bildet STAT1 zusätzlich durch SH2-Domänen-Interaktionen vermittelte parallele STAT1-Dimere (Chen et al. 1998, Wenta et al. 2008). Die Notwendigkeit der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 für die Bildung von Parakristallen deutet an, dass SH2-Domänen-Interaktionen dabei eine tragende Rolle spielen. Mit Hilfe des kommerziell erhältlichen SH2-Domänen-Inhibitors *Stattic* (Schust et al. 2006) wurde zunächst der Einfluss blockierter SH2-Domänen-Interaktionen auf die Bildung von STAT1-Parakristallen untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q transfiziert (siehe 3.3.2). Nach der IFN $\gamma$ -induzierten Bildung von Parakristallen wurden die Zellen für weitere 3 h in An- bzw. Abwesenheit des *Stattic*-Inhibitors (50  $\mu$ M) inkubiert und die subzelluläre Verteilung von STAT1 am Fluoreszenzmikroskop analysiert (siehe 3.2.9).



**Abb. 4.13. Die Bildung von STAT1-Parakristallen bedingt die Funktion der SH2-Domäne.** HeLa-Zellen wurden mit der cDNS für STAT1-E<sup>705</sup>Q transfiziert und 24 h nach der Transfektion zunächst für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3 h in An- oder Abwesenheit von 50  $\mu$ M *Stattic* ko-inkubiert. (A) Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) gefärbt und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (B) Nach

Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1, STAT1 (C24) und  $\beta$ -Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen (links). Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit beobachtet, lokalisierte STAT1-E<sup>705</sup>Q in Antwort auf IFN $\gamma$  im Zellkern und bildete Parakristalle (Abb. 4.13A). In Abwesenheit des *Stattic*-Inhibitors, also nach 4-stündiger IFN $\gamma$ -Stimulation, nahmen die Parakristalle eine längliche und nadelförmige Struktur an. Die Behandlung der Zellen mit *Stattic* führte zu einem deutlichen Phänotyp. Die Parakristalle waren nun signifikant kleiner und nahmen eine eher globuläre Form an (Abb. 4.13A). Aber auch die Gesamtzahl der Zellen mit Parakristallen war gegenüber den unbehandelten Zellen reduziert. Einen Einfluss des Inhibitors auf die STAT1-Phosphorylierung konnte als Ursache für diesen Phänotyp ausgeschlossen werden, da die parallel durchgeführte Bestimmung der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung in entsprechenden Gesamtzell-Extrakten vergleichbar war (Abb. 4.13B). Die Bildung der Parakristalle war demnach von der Funktionalität der SH2-Domäne und in Verbindung mit der Notwendigkeit der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung auf die Bildung von parallelen STAT1-Dimeren angewiesen.

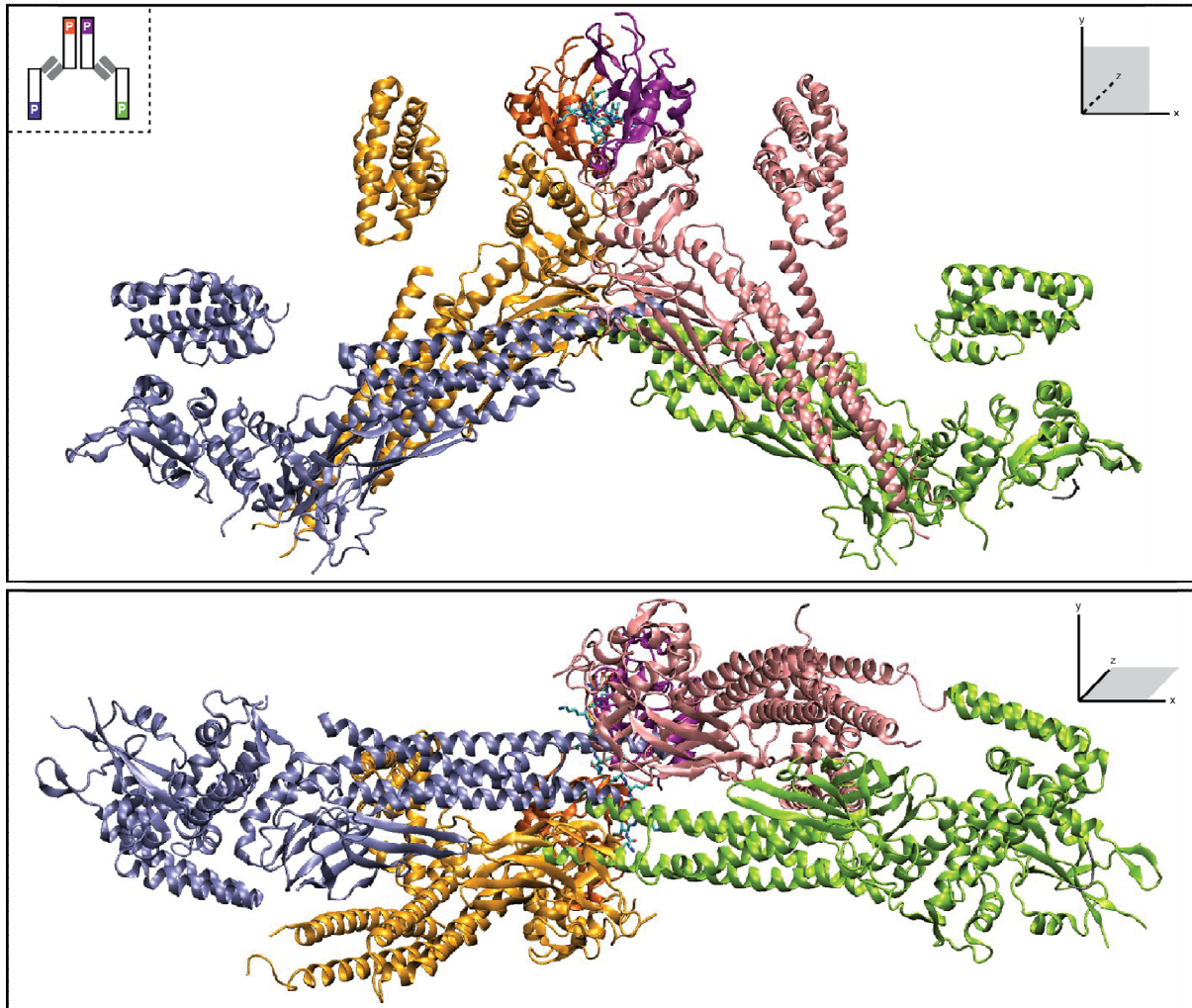


**Abb. 4.14. Die Bildung von STAT1-Parakristallen bedingt die Funktion der N-Domäne.** HeLa-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Konstrukt transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurde die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (B) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1, STAT1 (C24) und  $\beta$ -Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen und die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 als Mittelwert  $\pm$  SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Allerdings liegt das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1 vermutlich in einem Gleichgewicht zwischen anti- und parallelem Dimer vor (Wenta et al. 2008). Der Einfluss von antiparallelen Dimer-Interaktionen auf die Bildung der Parakristalle wurde daher als nächstes untersucht. In der Literatur sind bereits mehrere STAT1-Mutationen beschrieben, welche das antiparallele Dimer destabilisieren, u.a. F<sup>77</sup>A, F<sup>172</sup>W und Q<sup>408</sup>W (Mertens et al. 2006). Diese Dimer-

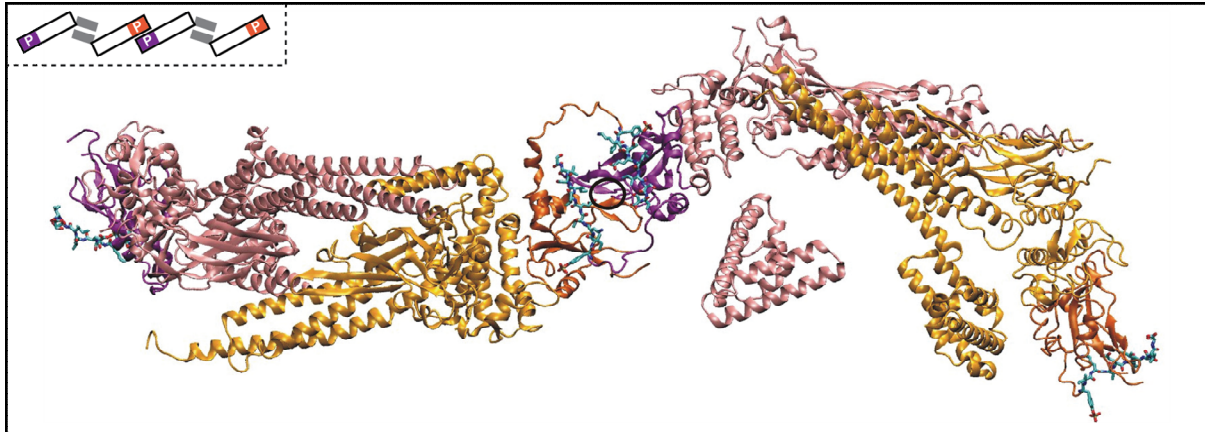
Mutationen wurden mit der E<sup>705</sup>Q-Mutation gekoppelt, in HeLa-Zellen transfiziert und nach IFN $\gamma$ -Stimulation ebenfalls auf ihre subzelluläre Verteilung hin untersucht. Alle STAT1-Varianten zeigten zunächst eine panzelluläre Ruheverteilung von STAT1 (Abb. 4.14A). Wie erwartet akkumulierte STAT1-WT nach der IFN $\gamma$ -Stimulation homogen im Zellkern. Die ebenfalls sumolierbaren STAT1-Varianten F<sup>77</sup>A, F<sup>172</sup>W und Q<sup>408</sup>W zeigten eine identische Verteilung (Abb. 4.14A, links). Die durch die E<sup>705</sup>Q-Mutation vermittelte Verhinderung der Lys<sup>703</sup>-Sumolierung führte zu der Bildung von Parakristallen (Abb. 4.14A, rechts oben). Bedeutenderweise verhinderte die Kombination der Dimer-Mutationen mit der SUMO-Konsensus Mutation E<sup>705</sup>Q ebenfalls die Bildung der Parakristalle (Abb. 4.14A, rechts). Eine durch die jeweilige Dimer-Mutation induzierte Reduktion der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung konnte als Ursache ausgeschlossen werden. Wie bereits beschrieben (Mertens et al. 2006), ist bei den N-terminalen Mutanten die Interaktion von STAT1 mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase TC45 gestört, welches in einem Dephosphorylierungs-Defekt und gegenüber STAT1-E<sup>705</sup>Q in einer vergleichbaren spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung resultiert (vgl. Abb. 4.14B). Die Bildung von STAT1-Parakristallen erfordert demnach nicht nur eine funktionale parallele Dimer-Schnittstelle, zusätzlich wird auch die antiparallele Dimer-Schnittstelle von STAT1 benötigt. Nach der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung weisen sowohl das parallele, als auch das antiparallele STAT1-Dimer eine vergleichbare Dissoziationskonstante von ~50 nM auf (Wenta et al. 2008). Basierend auf diesen Ergebnissen erscheint die Polymerisierung von STAT1-Dimeren als Grundlage für die Bildung von Parakristallen möglich. Eine Polymerisierung von Proteinen erfolgt in der Regel über die reversible Assoziation von Bildungsblöcken über nicht-kovalente Interaktionen (Eaton & Hofrichter 1990). Als Bildungsblock für die Polymerisierung von Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 sind daher zwei verschiedene Dimer-Konformere vorstellbar. Erstens ein paralleles STAT1-Dimer, welches über N-terminale vermittelte Interaktionen mit einem anderen parallelen STAT1-Dimer interagiert. Und zweitens ein über N-terminale Interaktionen stabilisiertes antiparalleles Dimer, welches über reziproke pTyr-SH2-Domänen Interaktionen mit einem anderen antiparallelen Dimer interagiert. In Zusammenarbeit mit Dr. Martin Zacharias (Technischen Universität München) wurden diese Möglichkeiten der STAT1-Oligomerisierung modelliert. Die daraus resultierenden Atom-Modelle wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt (vgl. Droescher et al. 2011). Die Möglichkeit des parallelen Dimers als Bildungsblock wurde als erstes untersucht. Dafür wurden an ein paralleles STAT1-Dimer zwei STAT1-Monomere über N-Domänen vermittelte Dimer-Interaktionen assoziiert.





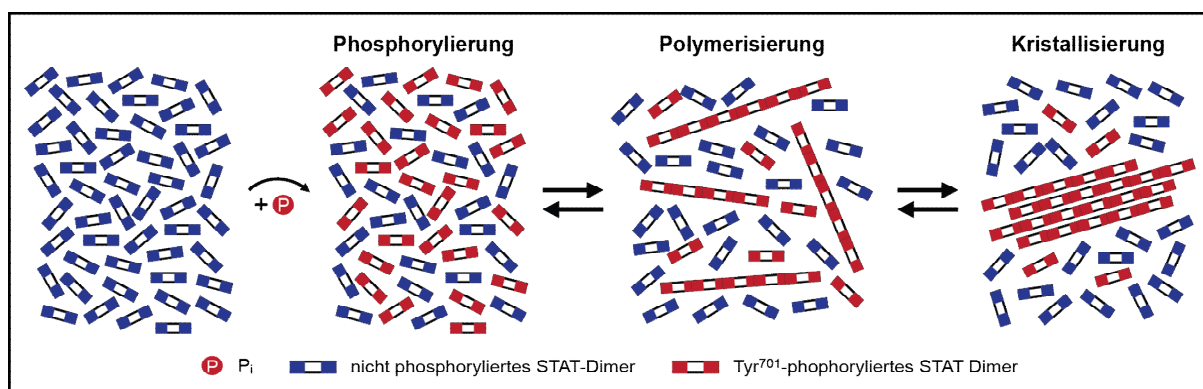
**Abb. 4.15. Atom-Modell der STAT-Polymerisierung über SH2- und N-terminal vermittelte Dimer-Dimer-Interaktionen mit einem parallelen Dimer als Bildungsblock.** Atom Modell eines parallelen STAT1-Dimers, bestehend aus einem roten und gelben Protomer, welche über N-Domänen vermittelte Interaktionen jeweils mit einem antiparallelen STAT1-Dimer assoziiert wurden. In dieser Darstellung wurden allerdings nur die STAT1-Monomere abgebildet (blau bzw. grün), welche in direktem Kontakt mit dem parallelen STAT1-Dimer stehen. In dieser Konformation besteht eine deutliche sterische Behinderung zwischen dem grün und blau eingefärbten STAT1-Monomeren. Ein schematisches Modell (unterbrochenes Rechteck) verdeutlicht die Farbkodierung der SH2-Domänen der einzelnen STAT1-Monomere. Das Koordinatensystem deutet die Front- bzw. Aufsicht der Struktur an. Entnommen aus Droescher et al. 2011.

Überraschenderweise war diese Form der Assoziation durch die räumliche Anordnung der jeweils benachbarten  $4\alpha$ -Helix-Domänen sterisch behindert, welches an der Überlagerung der grün und blau eingefärbten STAT1-Monomere zu erkennen ist (Abb. 4.15). Die alternative Form der STAT1-Oligomerisierung, die Interaktion von 2 antiparallelen STAT1-Dimeren über reziproke pTyr-SH2-Domänen Interaktionen, ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Bei dieser Form der Assoziation interagieren die zwei zentralen SH2-Domänen über van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken und bilden über die Aminosäurereste<sup>652-662</sup> zwei stabilisierende  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen aus (Abb. 4.16, Kreis).



**Abb. 4.16. Atom-Modell der STAT-Polymerisierung über SH2- und N-terminal vermittelte Dimer-Dimer-Interaktionen mit einem antiparallelen Dimer als Bildungsblock.** Atom Modell von zwei antiparallelen STAT1-Dimeren, jeweils bestehend aus einem roten und gelben Protomer, welche über pTyr-SH2 Domänen vermittelte Interaktionen assoziiert sind. Die Stabilisierung der Struktur wird von 2 interagierenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen unterstützt (Kreis). Ein schematisches Modell (unterbrochenes Rechteck) verdeutlicht die Farbkodierung der SH2-Domänen der einzelnen STAT1-Monomere. Entnommen aus Droescher et al. 2011.

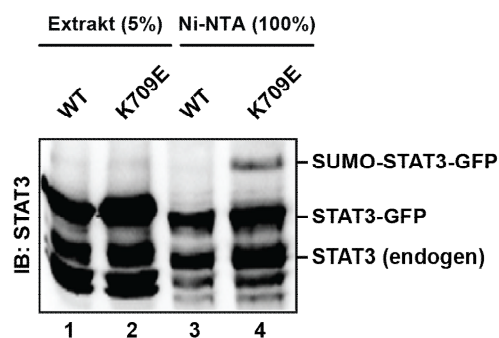
Diese Ergebnisse ermöglichen die Erstellung eines Modells, bei dem die Polymerisierung von STAT-Proteinen über die Verknüpfung von Tyrosin-phosphorylierten antiparallelen Dimeren via ihrer SH2-Domänen erfolgt. Die Rolle der STAT-Polymerisierung bei der Bildung von Parakristallen ist schematisch in Abbildung 4.17 zusammengefasst. Nach der Tyrosin-Phosphorylierung sind die STAT-Proteine in der Lage sowohl parallele als auch antiparallele Dimere zu formen. Antiparallele STAT1-Dimere können über reziproke pTyr-SH2-Domänen Interaktionen miteinander assoziieren (Polymerisierung). In der Folge bilden sich zunächst STAT-Polymere, welche letztendlich zu der Bildung von Parakristallen führen (Kristallisierung).



**Abb. 4.17. Schematisches Modell der STAT-Polymerisierung über SH2- und N-terminal vermittelte Dimer-Dimer-Interaktionen bei der Bildung von Parakristallen.** Nicht phosphorylierte STAT-Dimere (blaue Enden) werden Zytokin-abhängig phosphoryliert (rote Enden). Anschließend erfolgt über Dimer-Dimer-Interaktionen die Polymerisierung mehrerer phosphorylierter STAT-Dimere (Ketten mit roten Enden). Die Assoziation mehrerer phosphorylierter STAT-Dimerketten führt zur Bildung von STAT-Parakristallen.

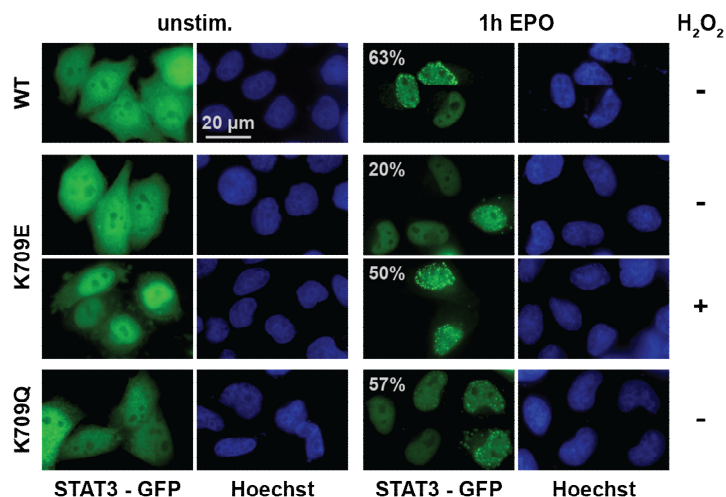
### 4.3.2 Auch die erzwungene Sumolierung von STAT3 verhindert die Parakristallbildung

Im letzten Kapitel wurde die Bildung von Parakristalle als Folge der Polymerisierung von phosphorylierten antiparallelen STAT-Dimeren beschrieben. Bereits in 4.2.1 wurde beobachtet, dass die SUMO-Konjugation von STAT1 die Bildung von Parakristallen verhindert. Innerhalb der STAT-Familie ist STAT1 der einzige Transkriptionsfaktor mit einem funktionalen SUMO-Konsensus. Die Faktoren STAT2, STAT3, STAT5a und STAT5b besitzen zwar eine SUMO-Konsensus ähnliche Struktur an gleicher Stelle, jedoch ist die Funktionalität jeweils durch eine Punktmutation in Position Tyr+4 inaktiviert (vgl. Abb. 1.4). Es stellt sich daher die Frage, ob die Auflösung von Parakristalle durch die Sumolierung über einen STAT1-spezifischen Prozess erfolgt oder auch auf andere STAT-Proteine übertragen werden kann. Zur Klärung dieser Frage wurde das Umkehrerperiment, die erzwungene SUMO-Konjugation des Transkriptionsfaktors STAT3 untersucht. Durch den Austausch von **Lys→Glu** (Triplett AAG→GAG) wurde mit STAT3-K<sup>709</sup>E eine Punkt-Mutante mit der SUMO-Konsensus Struktur von <sup>706</sup>L K T E <sup>709</sup> in Position Tyr+2 zur Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierungsstelle generiert, welche konform zu der beschriebenen idealen SUMO-Konsensus Struktur  $\psi$ -K-x-E ist (Verger et al. 2003). Die Herstellung dieser Mutante erfolgte als C-Terminales GFP-Fusionsprotein. Anschließend wurde die Fähigkeit der Mutante zur SUMO1-Konjugation, wie schon in 4.1.1 beschrieben, durch Nickel-Ionen Affinitätschromatographie getestet. Dieses Experiment wurde von Dr. Andreas Marg (Max-Delbrück-Zentrum Berlin) durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (siehe auch Droescher et al. 2011). Zu diesem Zweck wurden Cos7-Zellen neben der cDNS für die zu testende STAT3-Variante zusätzlich mit His-SUMO1 und Ubc9 im Verhältnis 2:1:1 ko-transfiziert (siehe 3.3.2). Nach 48 h wurden Zell-Extrakte mit einem NEM-haltigen Lyse-Puffer hergestellt und His-SUMO1-Konjugate durch Inkubation mit Ni-NTA Agarose angereichert (siehe 3.2.4). Nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 3.2.1) erfolgte der immunchemische Nachweis von STAT3 in den Extrakten und den angereicherten Fraktionen (siehe 3.2.2).



**Abb. 4.18: Die Rekonstitution des SUMO-Konsensus führt zur Sumolierung von STAT3-K<sup>709</sup>E.** Cos7-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT3-Konstrukt, His-SUMO1 und Ubc9 ko-transfiziert. Nach 24 h wurden Zellextrakte mit einem NEM-haltigen Puffer (120 mM) hergestellt und His-SUMO1-Konjugate durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie angereichert. Die Extrakte und die angereicherten Fraktionen (Ni-NTA) wurden in einem 7%-igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und STAT3 immunchemisch nachgewiesen. Für eine Erklärung der Ko-Anreicherung von nicht Histidin-markierten Proteinen siehe Abb. 4.1.

In den Extrakten konnte jeweils das endogene und das transfizierte STAT3-GFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 4.18, Bahn 1 und 2). Nach der Anreicherung von His-SUMO1-Konjugaten in Extrakten STAT3-WT exprimierender Zellen, wurde erwarteterweise keine langsamer migrierenden STAT3-Proteine detektiert (Abb. 4.18, Bahn 3). Im Gegensatz dazu wurde mit Extrakten STAT3-K<sup>709</sup>E exprimierender Zellen eine zusätzliche langsamer migrierende Bande angereichert. Diese zusätzliche STAT3-reaktive Bande korreliert mit der erwarteten Proteingröße von STAT3-SUMO1-GFP (Abb. 4.18, Bahn 4). Bemerkenswerterweise ist unter Voraussetzung eines funktionalen SUMO-Konsensus die SUMO-Konjugation auch auf STAT3 übertragbar. Durch diesen Umstand war es anschließend möglich, den Einfluss der Sumolierung auf die subzelluläre Verteilung von STAT3 zu untersuchen. Hierfür wurden STAT3-defiziente PC3-Zellen mit dem jeweiligen C-terminalen STAT3-GFP Fusionsprotein rekonstituiert und mit dem chimären Eg-Rezeptor ko-transfiziert (siehe 3.3.2). Dabei ermöglicht der chimäre Eg-Rezeptor die Aktivierung der STAT3-Rezeptor-Untereinheit gp130 durch das Zytokin EPO (Gerhartz et al. 1996). Die Stimulation der Zellen für 60 min mit EPO erfolgte 24 h nach der Transfektion. Danach erfolgten die Fixierung der Zellen und das Anfärben der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258. Die subzelluläre Verteilung wurde am Fluoreszenzmikroskop analysiert.



**Abb. 4.19. Die Sumolierung verhindert die Bildung von STAT3-Parakristallen.**  
 - STAT3-defiziente PC3-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT3-Konstrukt rekonstituiert und 24 h nach der Transfektion entweder unbehandelt belassen bzw. für die angegebenen Zeitpunkte mit EPO allein oder in Kombination mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) gefärbt und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

Wie in der Literatur beschrieben (Zhang et al. 1995) und in dieser Arbeit gezeigt, verteilte sich STAT3 im Ruhezustand der Zelle panzellulär und akkumulierte nach Zytokin-Stimulation innerhalb kurzer Zeit im Zellkern. Sowohl STAT3-Wildtyp als auch die nun sumolierte STAT3-K<sup>709</sup>E-Mutante zeigten dieses Verhalten (Abb. 4.19). Jedoch wurden zusätzlich in 63% der STAT3-WT exprimierenden Zellen Parakristalle beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Parakristall-Bildung mit 20% der STAT3-K<sup>709</sup>E exprimierenden

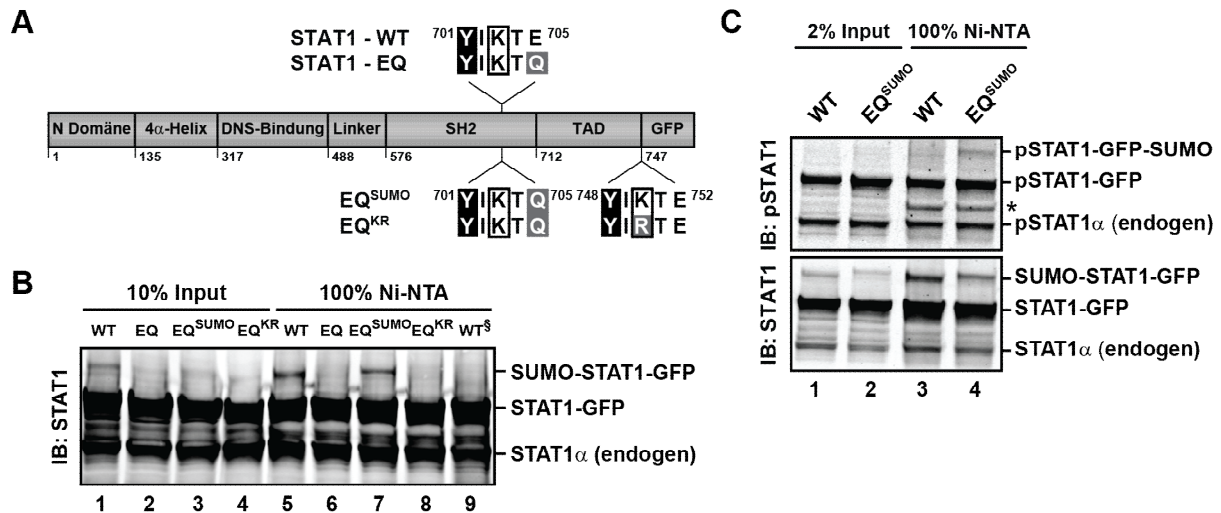


Zellen deutlich reduziert. Wurde allerdings das Gleichgewicht der SUMO-Konjugation durch die Behandlung der Zellen mit einer geringen Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Richtung Dekonjugation verschoben (Bossis & Melchior 2006), so zeigten nun über 50% der STAT3-K<sup>709</sup>E exprimierenden Zellen punktförmige Parakristalle im Zellkern (Abb. 4.19). Ein durch die Mutation des Aminosäurrestes<sup>709</sup> hervorgerufener strukturbedingter Einfluss auf die Parakristalle konnte ausgeschlossen werden, indem zusätzlich die Mutante STAT3-K<sup>709</sup>Q (siehe 3.1.7) untersucht wurde, deren SUMO-Konsensus wie bei STAT3-Wildtyp nicht funktional ist. Obwohl bei dieser Mutante die Ladung und die Seitenkette der Aminosäure<sup>709</sup> verändert wurden, zeigte sie unverändert eine mit STAT3-WT vergleichbare Bildung von Parakristallen in 57% der Zellen. Dies lässt vermuten, dass die Mutationen in der Position Tyr+4 die strukturelle Integrität der Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierungsstelle nicht beeinträchtigen. Desweiteren bestätigen diese Ergebnisse den Parakristall-zerstörenden Einfluss der Sumolierung für den Transkriptionsfaktor STAT3. Obwohl STAT1 das einzige Mitglied der STAT-Familie mit einem funktionalen SUMO-Konsensus ist, bewirkt die erzwungene Sumolierung von STAT3 einen vergleichbaren Phänotyp. Dies deutet auf einen allgemeinen Mechanismus hin, bei der die Regulation des Transkriptionsfaktors STAT1 von den anderen Mitgliedern der STAT-Familie durch die Sumolierung unterschieden wird.

### **4.3.3 Die Auflösung von Parakristallen erfordert die Sumolierungs-abhängige Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung**

Die Konjugation von SUMO1 an das Akzeptorlysin von STAT1 bzw. STAT3-K<sup>709</sup>E erfolgt in unmittelbarer Nähe (Position Tyr+2) der für die Aktivierung der STATs wichtigen Tyrosin-Phosphorylierungsstelle (vgl. Abb. 1.4). Da sich die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung und die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 gegenseitig ausschließen (Zimnik et al. 2009), wird demzufolge ausschließlich das nicht phosphorylierte STAT sumoliert. Allerdings wurden die mit der Sumolierung von STAT1 assoziierten Effekte, namentlich die verschlechterte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und die Verhinderung von Parakristallen, ausschließlich nach der Aktivierung von STAT1 beobachtet. Es stellt sich daher die Frage, ob die Präsenz von SUMO1 für die Auflösung von STAT1-Polymeren überhaupt notwendig ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine STAT1-Mutante generiert, welche sowohl sumoliert als auch Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliert werden kann. Dafür wurde ein STAT1-Konstrukt generiert (siehe 3.1.10), dass neben dem inaktivierten natürlichen SUMO-Konsensus von STAT1 zusätzlich einen idealen

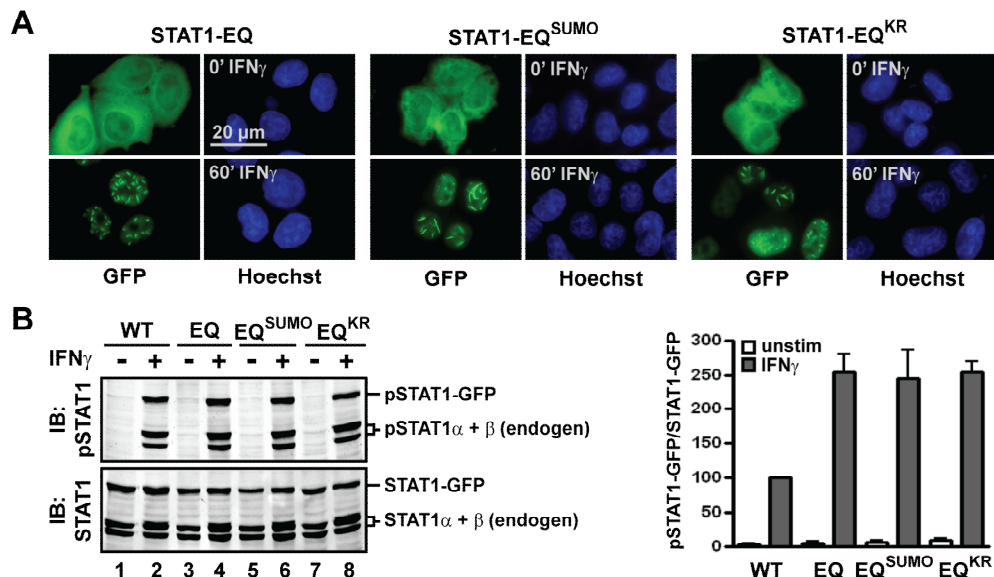
SUMO-Konsensus „IKTE“ (EQ<sup>SUMO</sup> bezeichnet) bzw. die inaktivierte Form „IRTE“ (EQ<sup>KR</sup>) am Carboxy-terminalen Ende besitzt (siehe Abb. 4.20A für eine schematische Darstellung). Anschließend wurde die Funktionalität des C-terminal eingefügten SUMO-Konsensus überprüft. Dazu wurden, analog zu dem in 4.1.1 beschriebenen Experiment, His-SUMO1-Konjugate in transfizierten HEK293T-Zellen durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie angereichert (siehe 3.2.4) und STAT1 immunchemisch nachgewiesen (siehe 3.2.2).



**Abb. 4.20. Der gegenseitige Ausschluss von Sumolierung und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung bedingt die Sumolierung *in cis*.** (A) Schematische Darstellung der STAT1-Proteinstruktur mit proximalem bzw. distalem SUMO-Konsensus. SUMO-Konsensus inaktivierende Mutationen (grau), Lys-Akzeptorreste (Rahmen) und die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle (schwarz) sind hervorgehoben. (B) HEK293T-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Konstrukt, His-SUMO1 und Ubc9 ko-transfiziert. In Bahn 9 wurde SUMO1 nicht ko-transfiziert (WT<sup>S</sup>). Nach 48 h wurden Zellextrakte mit einem NEM-haltigen Puffer (120 mM) hergestellt und His-SUMO1-Konjugate durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie angereichert. Die Extrakte und angereicherten Fraktionen (Ni-NTA) wurden in einem 7%-igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und STAT1 (C24) immunchemisch nachgewiesen. (C) Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie von Histidin-markiertem SUMO1 in HEK293T-Zellen nach 60-minütiger IFN $\gamma$  Behandlung wie in (B) beschrieben. Der immunchemische Nachweis von pSTAT1 und STAT1 (C24) erfolgte nacheinander auf der gleichen Nitrozellulose-Membran. Eine Kreuzreaktive Bande ist mit \* markiert. Für eine Erklärung der Ko-Anreicherung von nicht Histidin-markierten Proteinen siehe Abb. 4.1.

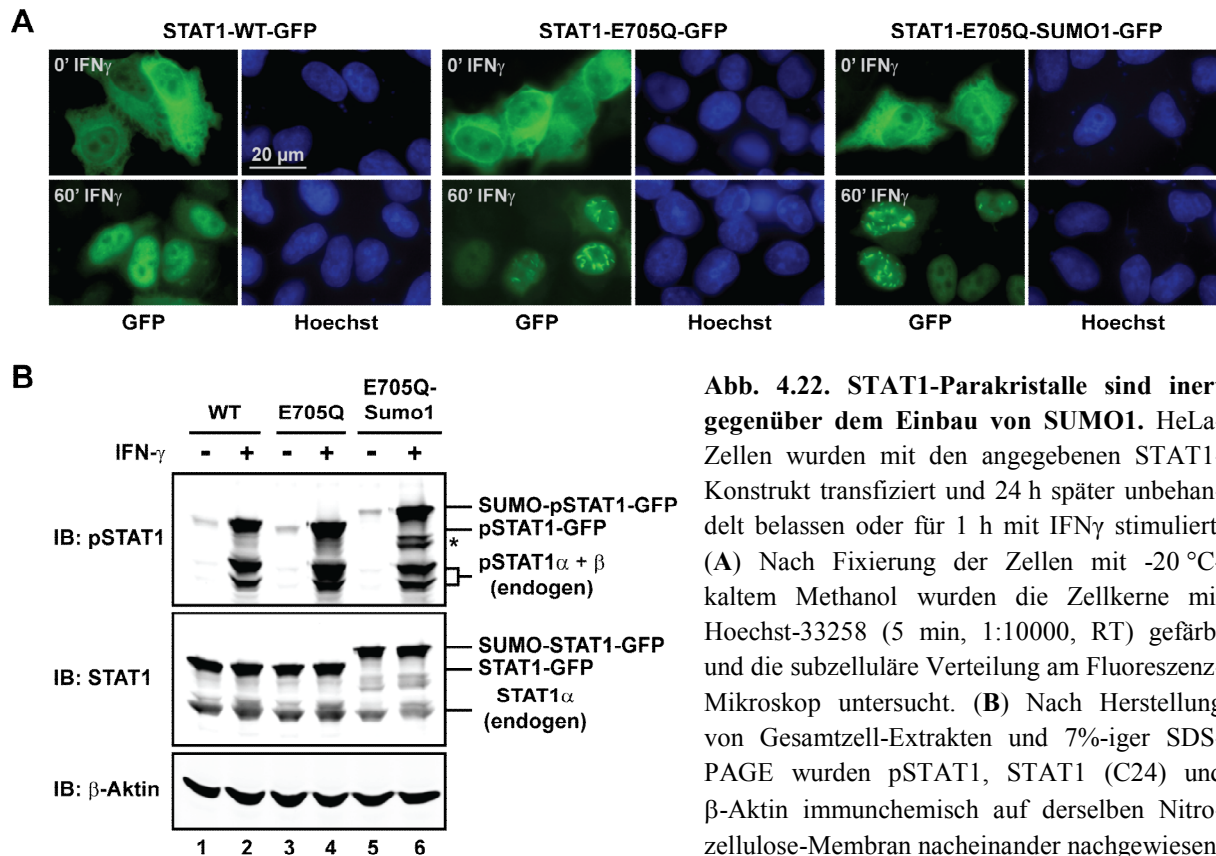
Wie schon in 4.1.1 gezeigt, wurde nach der Anreicherung von His-SUMO1-Konjugaten in Extrakten von STAT1-WT exprimierenden Zellen eine zusätzlich langsamer migrierende Bande detektiert (Abb. 4.20, Bahn 5). Diese STAT1-reaktive Bande korreliert mit der erwarteten Proteingröße für SUMO-STAT1-GFP, welche bei Weglassen von His-SUMO1 ausblieb (Abb. 4.20, Bahn 9). Im Gegensatz dazu konnte nach der Präzipitation von His-SUMO1 kein konjugiertes STAT1-E<sup>705</sup>Q angereichert werden, welches deutlich durch das Fehlen dieser Bande in Bahn 6 angezeigt ist (Abb. 4.20). Bemerkenswerterweise konnte die Sumolierung von STAT1 auf den C-terminalen SUMO-Konsensus übertragen werden. Die Mutante EQ<sup>SUMO</sup>, welche nicht am Lys<sup>703</sup> sumoliert werden kann, wurde nun am entsprechenden

Lys<sup>750</sup> SUMO-konjugiert (Abb. 4.20B, Bahn 7), während bei der Mutante EQ<sup>KR</sup> der inaktivierte SUMO-Konsensus dies erfolgreich verhinderte (Abb. 4.20B, Bahn 8). Anschließend wurde das Experiment unter Verwendung von IFN $\gamma$ -stimulierten HEK293T-Zellen wiederholt und neben der Expression, auch die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 immunchemisch nachgewiesen. Nach der Anreicherung von His-SUMO1-Konjugaten in Extrakten von EQ<sup>SUMO</sup>-exprimierenden Zellen wurde, neben dem Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten endogenen und transfizierten STAT1, zusätzlich eine langsamer migrierende Bande detektiert (Abb. 4.20C, oben, Bahn 4). Diese pSTAT1-reaktive Bande korrelierter mit der Größe von SUMO-STAT1-GFP und wurde auch mit dem Gesamt-STAT1-Antikörper detektiert (Abb. 4.20C, unten, Bahn 4). In Übereinstimmung mit dem gegenseitigen Ausschluss von Lys<sup>703</sup>-Sumolierung und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 (Zimnik et al. 2009) konnte in den angereicherten Fraktionen kein doppelmodifiziertes STAT1-WT beobachtet werden, deutlich durch das Fehlen der pSTAT1 reaktiven Bande in Bahn 3 angezeigt (Abb. 4.20C, oben). Eine Blockierung der Antikörper-Reaktivität durch die unmittelbare Nähe des Lys<sup>703</sup>-Akzeptorlysins zu dem pTyr<sup>701</sup> im Fall von STAT1-WT konnte bereits früher ausgeschlossen werden (Jakobs et al. 2007). Demzufolge kann mit der hier vorgestellten STAT1-Variante EQ<sup>SUMO</sup> der direkte Einfluss der Sumolierung auf die subzelluläre Verteilung untersucht werden.



**Abb. 4.21. Die proximale, aber nicht die distale Sumolierung von STAT1 verhindert die Bildung von Parakristallen.** (A) HeLa-Zellen wurden mit der angegebenen STAT1-Mutante transfiziert und 24 h später entweder unbehandelt belassen oder für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) gefärbt und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (B) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1 und STAT1 (C24) immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen (links). Die dazugehörige spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt (rechts).

HeLa-Zellen wurden mit der entsprechenden STAT1-Variante transfiziert (siehe 3.3.2) und 24 h später für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach der Fixierung der Zellen und der Färbung der Zellkerne mit dem Farbstoff Hoechst 33258, erfolgte die Untersuchung der subzellulären Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop (siehe 3.2.9). Die Verteilung von STAT1 im Ruhezustand der Zellen erfolgte unabhängig vom Genotyp vorwiegend im Zytoplasma. Nach Stimulation der Zellen akkumulierte SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q im Zellkern und bildete Parakristalle (Abb. 4.21A, links). Das Vorhandensein eines zusätzlichen aber inaktivierten SUMO-Konsensus (EQ<sup>KR</sup>) hatte keinen Einfluss auf die Parakristalle (Abb. 4.21A, rechts). Interessanterweise führte aber auch das Vorhandensein des funktionalen und distal gelegenen SUMO-Konsensus (EQ<sup>SUMO</sup>) ebenfalls zu der Bildung von Parakristallen (Abb. 4.21A, Mitte). Demzufolge wird der Aufbau von Parakristallen nicht durch den Einbau von SUMO1-Resten selbst gestört. Weiterhin zeigte die Untersuchung der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von EQ<sup>SUMO</sup>, dass die distale Sumolierung von STAT1 auch keinen negativen Einfluss auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung ausübt. Von analog behandelten HeLa-Zellen (siehe oben) wurden nach der IFN $\gamma$ -Stimulation Gesamtzell-Extrakte hergestellt (siehe 3.2.3) und die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung ermittelt.



**Abb. 4.22. STAT1-Parakristalle sind inert gegenüber dem Einbau von SUMO1.** HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen STAT1-Konstrukt transfiziert und 24 h später unbehandelt belassen oder für 1 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. (A) Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) gefärbt und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (B) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1, STAT1 (C24) und  $\beta$ -Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen.

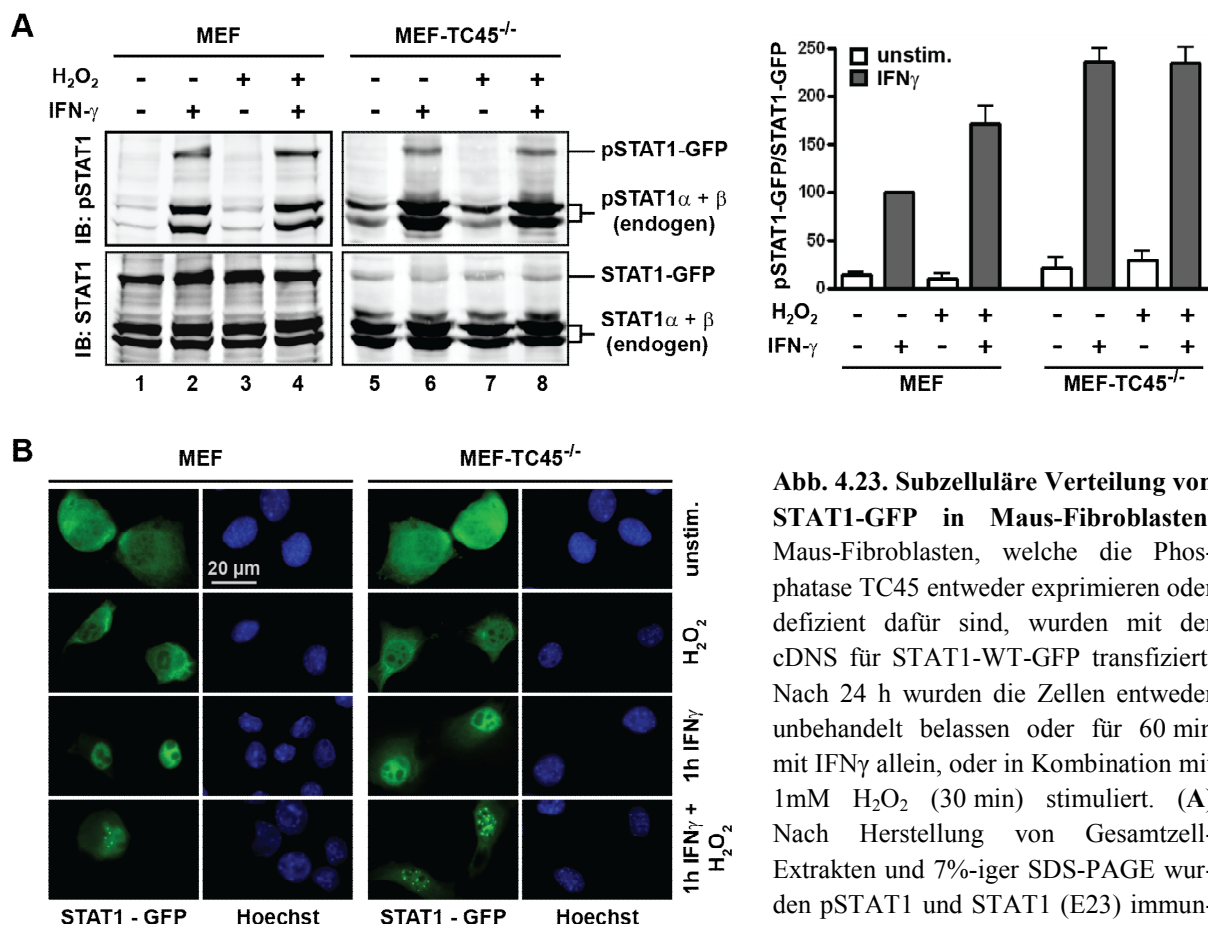


Dabei wurde festgestellt, dass die Lys<sup>750</sup>-Sumolierung keinen negativen Einfluss auf die STAT1-Phosphorylierung ausübt. Sowohl die STAT1-Mutanten E<sup>705</sup>Q, EQ<sup>SUMO</sup> als auch EQ<sup>KR</sup> wiesen eine deutlich verbesserte spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung im Vergleich mit dem proximal sumolierten STAT1-WT auf (Abb. 4.21B). Demzufolge werden die Sumolierungs-abhängigen Effekte über die direkte Blockierung der proximalen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 vermittelt. Dieser Sachverhalt wurde zusätzlich durch die Untersuchung eines an STAT1-E<sup>705</sup>Q-GFP gekoppeltem SUMO1 Fusionsprotein bestätigt, bei dem SUMO1 C-terminal von STAT1 und N-Terminal vom GFP eingefügt wurde (siehe 3.1.10). Anschließend wurde analog zu dem in Abb. 4.21 beschriebenen Experiment die Parakristall-Bildung und die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 untersucht. Bei der Analyse der subzellulären Verteilung konnte bestätigt werden, dass der Einbau von SUMO1 die Bildung von Parakristallen nicht verhindert. Obwohl bei dem untersuchten Fusionsprotein das SUMO-freie STAT1 quantitativ mit SUMO1 gekoppelt war, konnte nach der IFN $\gamma$ -Stimulation der Zellen die Bildung von Parakristallen beobachtet werden (Abb. 4.22A, rechts). Auch die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung wurde durch die C-terminale Fusion mit dem SUMO1-Rest nicht beeinträchtigt und war mit der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q vergleichbar. Im Gegensatz dazu führte die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1-WT zu einer reduzierten Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (Abb. 4.22B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass nicht die SUMO-Konjugation *per se*, sondern die unmittelbare Nähe von SUMO-Akzeptorlysin<sup>703</sup> und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle für die Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung notwendig ist. Zusätzlich lässt die Notwendigkeit der unmittelbaren Nähe von Lys<sup>703</sup>-Sumolierungsstelle und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle vermuten, dass die Blockierung der STAT1-Phosphorylierung durch den SUMO1-Rest eine tragende Rolle bei der Verhinderung von Parakristallen spielt.

### **4.3.4 Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung induzierte Reduktion der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Auflösung von STAT1-Parakristallen**

Nachdem im letzten Kapitel gezeigt wurde, dass die Auflösung von STAT1-Parakristallen über die spezifische Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung vermittelt wird, stellt sich nun die Frage, ob die Sumolierung über die alleinige Reduktion des Phosphorylierungs-Levels die Bildung von Parakristallen verhindern kann. Zur Klärung dieser Frage wurde der Einfluss der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung auf die Parakristall-Bildung von STAT1 in einer Zell-Linie unter-

sucht, welche defizient für das Protein TC45 ist (tenHoeve et al. 2002). Die Protein-Tyrosin-Phosphatase TC45 ist hauptverantwortlich für die Dephosphorylierung von STAT1 (Meng et al. 2002). Die Abwesenheit von TC45 führt in Zellen zu einer deutlich erhöhten spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 (tenHoeve et al. 2002). Somit kann untersucht werden, ob allein ein erhöhter Phosphorylierungs-Level zur Bildung von Parakristallen in STAT1-WT exprimierenden Zellen führen kann. Hierfür wurde die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und die subzelluläre Verteilung von transient transfiziertem (siehe 3.3.2) STAT1-WT-GFP in embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF) untersucht, welche die Phosphatase TC45 entweder exprimierten oder dafür defizient waren (MEF-TC45<sup>-/-</sup>) (tenHoeve et al. 2002). Die beiden MEF-Zell-Linien wurden nach ihrer Transfektion aufgeteilt und ein Teil für die Herstellung von Gesamtzell-Extrakten (siehe 3.2.3), der andere Teil für die Untersuchung der subzellulären Verteilung verwendet (siehe 3.2.9).



**Abb. 4.23. Subzelluläre Verteilung von STAT1-GFP in Maus-Fibroblasten.** Maus-Fibroblasten, welche die Phosphatase TC45 entweder exprimieren oder defizient dafür sind, wurden mit der cDNS für STAT1-WT-GFP transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 60 min mit IFN $\gamma$  allein, oder in Kombination mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) stimuliert. (A) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1 und STAT1 (E23) immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-

Membran nacheinander nachgewiesen (links). Die dazugehörige spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt (rechts). (B) Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurden die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) gefärbt und die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

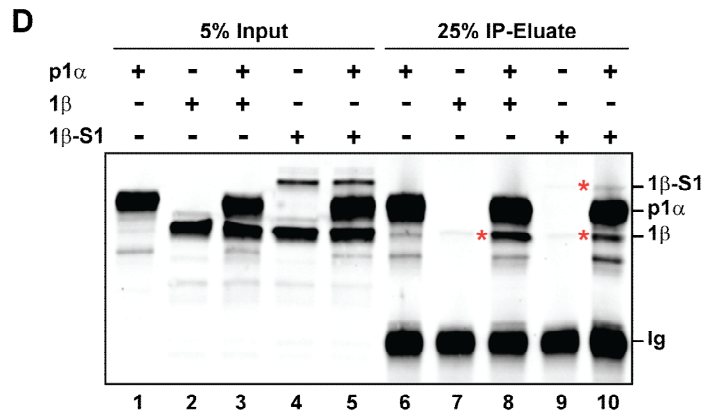
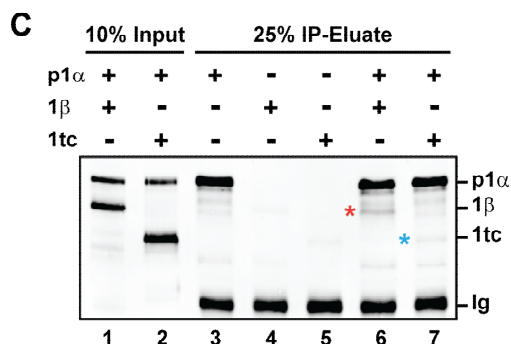
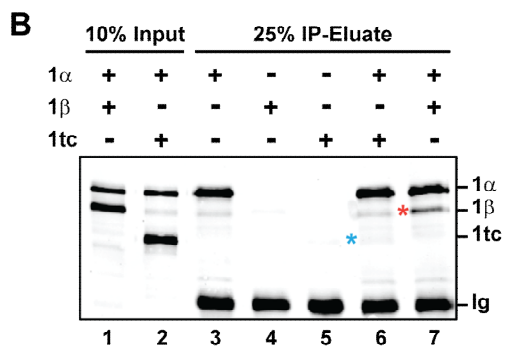
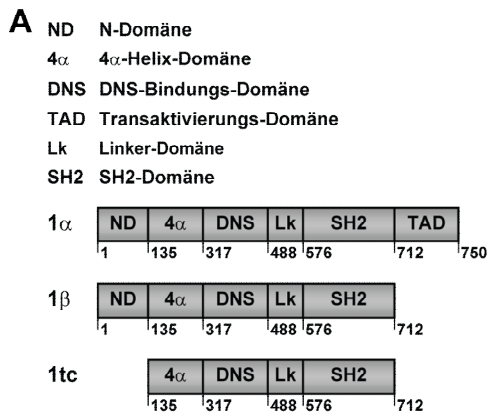
Die Stimulation erfolgte 24 h nach der Aufteilung der Zellen entweder für 1h mit IFN $\gamma$ , 30 min H $_2$ O $_2$  (1 mM), oder einer Kombination aus beiden, wobei die Zellen nach 30-minütiger IFN $\gamma$ -Stimulation zusätzlich für weitere 30 min mit H $_2$ O $_2$  ko-inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die parallele Bestimmung der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung durch den immunchemischen Nachweis von pSTAT1 und STAT1 (siehe 3.2.2) und die Untersuchung der subzellulären Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop (siehe 3.2.9). Nach der Stimulation mit IFN $\gamma$  konnte in den MEF-TC45<sup>-/-</sup>-Zellen ein deutlicher Anstieg (~2,5-fach) der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung gegenüber den Wildtyp-MEF-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.23A, vgl. Bahn 2 und 6). Dieser Anstieg wurde dabei sowohl mit dem endogenen als auch mit dem transient transfizierten STAT1-GFP beobachtet. Trotz des deutlich erhöhten Phosphorylierungs-Levels lokalisierte STAT1-GFP in den IFN $\gamma$ -stimulierten MEF-TC45<sup>-/-</sup>-Zellen weiterhin homogen im Zellkern außerhalb der Nukleoli (Abb. 4.23B). Die einfache Erhöhung des Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungs-Levels reicht demnach nicht für die Bildung von Parakristallen aus. Wie bereits in 4.3.2 erwähnt, besteht die Möglichkeit die Menge an SUMO-Konjugaten in der Zelle durch oxydativen Stress deutlich zu senken, welches experimentell durch eine Behandlung der Zellen mit einer niedrigen Konzentration von H $_2$ O $_2$  erreicht wird (Bossis & Melchior 2006). Nach Behandlung der transfizierten Wildtyp-MEF-Zellen mit IFN $\gamma$  und H $_2$ O $_2$  konnte tatsächlich die Bildung von Parakristallen in den Zellkernen beobachtet werden (Abb. 4.23B). Allerdings wirkt H $_2$ O $_2$  in der eingesetzten Konzentration ebenfalls als ein Inhibitor der Protein-Tyrosin-Phosphatase TC45 (Meng et al. 2002, tenHoeve et al. 2002). Demzufolge wurde gegenüber den allein mit IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen nach der H $_2$ O $_2$ -Behandlung eine erhöhte spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung beobachtet (Abb. 4.23A, vgl. Bahnen 2 und 4). Im Gegensatz dazu schien die STAT1-Phosphorylierung in den MEF-TC45<sup>-/-</sup>-Zellen durch die IFN $\gamma$ -Stimulation bereits gesättigt zu sein, da die zusätzliche Behandlung der Zellen mit H $_2$ O $_2$  nicht zu einer weiteren Erhöhung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung führte (vgl. Abb. 4.23A, Bahn 6 und 8). Während die alleinige IFN $\gamma$ -Behandlung der Zellen für die Parakristallbildung nicht ausreichte, konnte nach der Inhibierung der SUMO-Dekonjugasen durch die H $_2$ O $_2$ -Behandlung nun Parakristalle in den Zellkernen der MEF-TC45<sup>-/-</sup>-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.23B), obwohl die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung konstant blieb (Abb. 4.23A). Bedeutenderweise konnte auch nach der alleinigen IFN $\gamma$ -Stimulation der transfizierten MEF-TC45<sup>-/-</sup>-Zellen keine beobachtet werden, obwohl die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung gegenüber den Parakristall-bildenden MEF-Zellen nach der IFN $\gamma$ /H $_2$ O $_2$ -Behandlung erhöht war (Abb. 4.23B, vgl. Bahn 4 und 6).

In Verbindung mit Abb. 4.6 belegen diese Ergebnisse deutlich, dass eine bestimmte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Bildung von Parakristallen ist. Eine durch die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1 vermittelte alleinige Reduktion der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung genügt demnach nicht, die Bildung von STAT1-Parakristallen zu verhindern. Ein weiterer unabhängiger Mechanismus ist daher für die Vermittlung des Parakristall-auflösenden Effektes verantwortlich.

### **4.3.5 Die Sumolierung fördert die Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren**

Der Aufbau von Parakristallen ist nicht nur auf STAT3 und SUMO-freies STAT1 beschränkt. Ähnliche Strukturen wurden auch mit STAT2 (Truchet et al. 2004, Frahm et al. 2006) und STAT5 (Herrington et al. 1999) beobachtet. Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Bildung von Parakristallen die Polymerisierung von phosphorylierten STATs erfordert (Abb. 4.17). Allerdings wird die Bildung von STAT1-Parakristallen durch die Sumolierung von STAT1 effektiv verhindert. Der Einbau von sumolierten STAT1 in die Parakristalle ist dafür aber nicht verantwortlich (Abb. 4.21 und 4.22). Obwohl die Auflösung der Parakristalle die spezifische Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung durch die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung bedingt (siehe 4.3.3), ist die damit assoziierte Reduktion der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung dafür nicht ausreichend (siehe 4.3.4). Letztendlich transformiert die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung spezifisch das nicht phosphorylierte STAT1, ein gegenüber Parakristallen inertes Molekül, zu einem potenten Inhibitor der Parakristall-Bildung. Eine mögliche Lösung für dieses Rätsel besteht in Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren durch die Sumolierung. Im Einklang mit dem Modell der STAT-Polymerisierung (Abb. 4.17), würde ein semi-phosphoryliertes STAT1-Dimer weiterhin über das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte Monomer mit einem STAT1-Oligomer interagieren, jedoch über das assoziierte nicht phosphorylierte STAT1-Monomer zu einem Kettenabbruch führen. Semi-phosphorylierte STAT-Dimere wurden bereits beobachtet, jedoch blieb ihre physiologische Rolle bislang ungeklärt (Gupta et al. 1996). Die Möglichkeit eines kompetitiven Polymerisierungs-Inhibitors in Form von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren wurde deshalb als nächstes untersucht. Zur Überprüfung der Hypothese wurde zunächst ergründet, ob sich Dimere aus sumolierendem und nicht sumolierendem STAT1 überhaupt bilden können. Zu diesem Zweck wurden gereinigte rekombinant hergestellte Proteine *in vitro* miteinander inkubiert und nachfolgend die STAT1-Dimerbildung durch Ko-Immünpräzipitation immunchemisch untersucht. Um die einge-

setzten STAT1-Proteine nach einer solchen Monomer-Austausch-Reaktion zu unterscheiden, wurde die Dimerbildung von STAT1 $\alpha$ , pSTAT1 $\alpha$ , STAT1 $\beta$  und STAT1-tc untersucht, welche freundlicherweise von Dr. Nikola Wenta (Universität Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt wurden. STAT1 $\beta$  ist eine natürlich vorkommende C-terminal verkürzte STAT1-Spleißvariante, während STAT1-tc C- und N-terminal verkürzt vorliegt (Abb. 4.24A). Durch Immunpräzipitation mit dem STAT1-Antikörper C24 kann aus einer Mischung spezifisch die STAT1 $\alpha$ -Variante isoliert werden, da dessen Epitop in der Transaktivierungs-Domäne (TAD) von STAT1 liegt, welche bei STAT1 $\beta$  und STAT1tc fehlt. Mit STAT1 $\alpha$  dimerisierende Varianten können anschließend mit dem STAT1-Antikörper E23 immunchemisch nachgewiesen werden, welches ein in allen STAT1-Varianten vorhandenes Epitop erkennt. Das unterschiedliche Molekulargewicht der einzelnen STAT1-Varianten ermöglicht zudem die eindeutige Zuordnung der entsprechenden nachgewiesenen Banden.

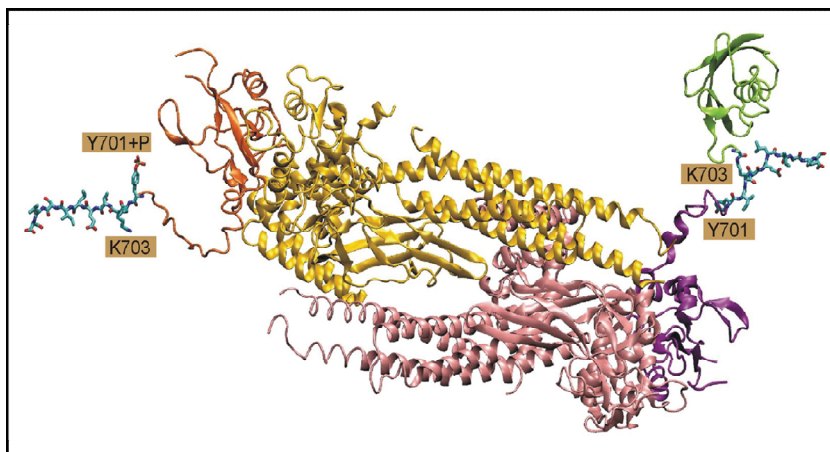


**Abb. 4.24. Die Bildung semi-phosphorylierter STAT1-Dimere wird über N-Domänen vermittelte Interaktionen vermittelt.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten rekombinant hergestellten STAT1-Proteine. (B-C) Monomer-Austausch-Experiment von rekombinant hergestellten STAT1 $\beta$  (1 $\beta$ ) und STAT1tc (1tc) mit nicht phosphoryliertem (B, 1 $\alpha$ ) bzw. Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  (C, p1 $\alpha$ ). Nach Inkubation der angegebenen Proteine (jeweils 70 nM) für 2,5 h bei Raumtemperatur wurde spezifisch STAT1 $\alpha$  (C24) immunpräzipitiert. Die Proteine vor (Input) und nach der Immunpräzipitation (IP-Eluate) wurden in einem 7%-igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und STAT1 $\alpha$ , STAT1 $\beta$  und STAT1tc mit dem STAT1-Antikörper E23 immunchemisch nachgewiesen. Die Ko-Präzipitation von nicht phosphoryliertem STAT1 (rot) bzw. deren Fehlen (blau) ist durch Sterne angezeigt (B-D). (D) Monomer-Austausch-Experiment von rekombinant hergestellten STAT1 $\beta$  und *in vitro* sumolisiertem STAT1 $\beta$  (1 $\beta$ -S1) mit phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  wie in (B) beschrieben. „Ig“ markiert die vom Sekundärantikörper erkannte schwere Kette des zur Immunpräzipitation eingesetzten Primärantikörpers.

Für das Experiment wurden die rekombinanten STAT1-Proteine in einer Konzentration von 70 nM eingesetzt (siehe auch 3.2.7), welches leicht über der ermittelten  $K_D$  der STAT1-Proteine liegt (~50 nM, Wenta et al. 2008), um einen Austausch der hoch gereinigten Proteine zu ermöglichen. Nach Inkubation der Proteine für 2,5 h bei Raumtemperatur, wurde STAT1 $\alpha$  spezifisch immunpräzipitiert und die damit dimerisierten STAT1-Proteine immunchemisch nachgewiesen. Zunächst wurde die Spezifität des verwendeten STAT1-Antikörpers C24 für die STAT1 $\alpha$ -Variante bestätigt. Nach der Präzipitation von STAT1 $\alpha$ -enthaltenen Proben konnte jeweils nur die mit STAT1 $\alpha$  korrespondierende Bande immunchemisch nachgewiesen werden (Abb. 24B-C, Bahn 3 bzw. 24D, Bahn 2). Weder angebotenes STAT1 $\beta$  (Abb. 24B-C, Bahn 4) noch STAT1-tc (Abb. 24B-C, Bahn 5) wurde von dem C24-Antikörper erkannt. Anschließend wurde die Notwendigkeit der N-Domäne für die Bildung antiparalleler STAT1-Dimere untersucht. Wurde STAT1 $\alpha$  zusammen mit STAT1 $\beta$  inkubiert, konnte nach der folgenden Präzipitation von STAT1 $\alpha$  nun zusätzlich STAT1 $\beta$  nachgewiesen werden (Abb. 4.24B, Bahn 7). Im Gegensatz dazu konnte in diesem Zusammenhang STAT1-tc nicht mit STAT1 $\alpha$  ko-präzipitiert werden (Abb. 4.24B, Bahn 6). Diese Ergebnisse belegen nicht nur die Bildung von STAT1-Heterodimeren, sondern auch die Notwendigkeit der N-Domäne bei der Dimerisierung von nicht Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten Varianten. Damit konnte die bevorzugte Bildung von N-Domänen-Interaktionen vermittelten antiparallelen Dimeren durch nicht phosphoryliertes STAT1 bestätigt werden (Mao et al. 2005, Wenta et al. 2008). Als nächstes wurde dieses Experiment mit phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  wiederholt. Abermals konnte aus einer Mischung nur STAT1 $\beta$  mit dem phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  präzipitiert werden (Abb. 4.24C, Bahn 6), während STAT1tc nicht mit dem phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  interagiert (Abb. 4.24B, Bahn 7). Diese *in vitro* Ergebnisse zeigen zunächst, dass sich Heterodimere aus einerseits phosphoryliertem und andererseits nicht phosphoryliertem STAT1 überhaupt bilden können. Zusätzlich deutet die Notwendigkeit der N-Domäne auf eine antiparallele Konformation des semi-phosphorylierten STAT1-Heterodimers hin.

Die Möglichkeit der Interaktion von phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  mit nunmehr sumolierem STAT1 $\beta$  wurde als nächstes untersucht. Zu diesem Zweck wurde STAT1 $\beta$  zunächst einer *in vitro* Sumolierung unterzogen (siehe 3.2.7) und zusammen mit den Sumolierungskomponenten Ubc9, Aos1/Uba2, SUMO1 und ATP für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch konnten durchschnittlich 21% des Ausgangsmaterials sumoliert werden (vgl. Abb. 4.24D, Bahn 4), welches anschließend in der Monomer-Austausch-Reaktion eingesetzt

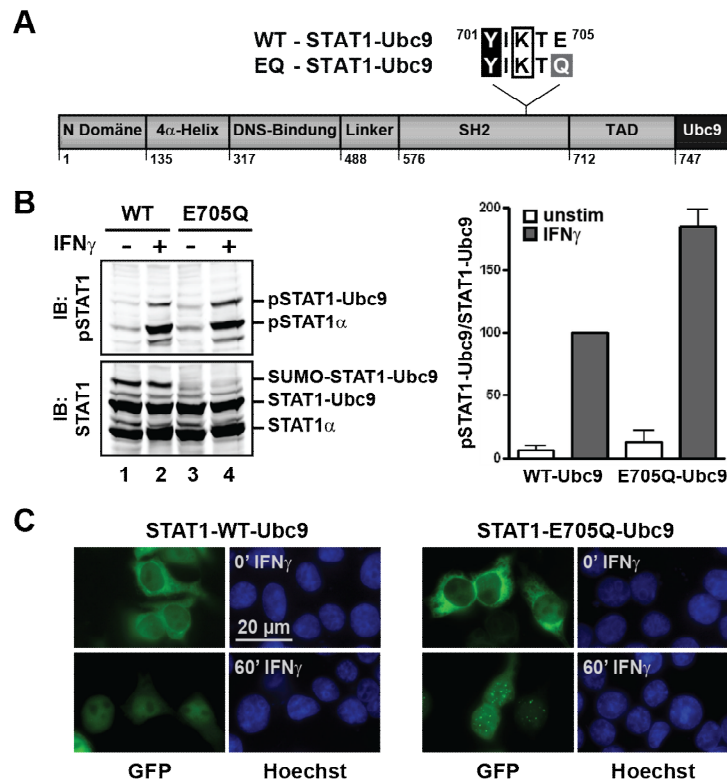
wurde. Beachtlicherweise konnte zusammen mit dem phosphoryliertem STAT1 $\alpha$  neben STAT1 $\beta$  (Abb. 4.24D, Bahn 8 und 10) auch sumoliertes STAT1 $\beta$  (Abb. 4.24D, Bahn 10) präzipitiert werden, obwohl in dem Reaktionsansatz nur ca. 21% der STAT1 $\beta$ -Menge sumoliert war. Eine unspezifische Bindung des präzipitierenden STAT1-Antikörpers C24 an das sumolierte STAT1 $\beta$  konnte ausgeschlossen werden, welches durch das Fehlen einer Bande in Bahn 9 der Abb. 4.24D verdeutlicht wurde. Somit konnte *in vitro* die Existenz von STAT1-Heterodimeren gezeigt werden, bei der ein Monomer phosphoryliert und das andere sumoliert vorliegt. Die Notwendigkeit der N-Domäne für die Bildung von semi-phosphorylierten Dimeren (Abb. 4.24C) deutet auf eine antiparallele Konformation des semi-phosphorylierten-sumolierten STAT1-Heterodimers hin. Zusätzlich konnten nach der Herstellung eines 3D-Modells durch Dr. Martin Zacharias (Technische Universität München) keine sterischen Komplikationen bei der Bildung eines solchen Heterodimers festgestellt werden (persönliche Kommunikation, Droescher et al. 2011) (Abb. 4.25).



**Abb. 4.25. Die Bildung eines antiparallelen semi-Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten - sumolierten STAT1-Dimers ist sterisch nicht behindert.** Atom Modell eines antiparallelen STAT1-Dimers, bestehend aus einem gelb eingefärbten Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1-Monomer und einem rot eingefärbten sumolierten STAT1-Monomer. Entnommen aus Droescher et al. 2011.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Sumolierung die Häufigkeit von semi-phosphorylierten Dimeren *in vivo* beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde der Wildtyp bzw. die SUMO-freie E<sup>705</sup>Q-Mutante von STAT1 als STAT1-Ubc9-Fusionsprotein generiert (siehe 3.1.10), welches den Nachweis der Sumolierung deutlich vereinfacht (Jakobs et al. 2007, Zimnik et al. 2009). Die Funktionalität der somit generierten Proteine STAT1-WT-Ubc9 und STAT1-E<sup>705</sup>Q-Ubc9 wurde anschließend durch die Bestimmung der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und der subzellulären Verteilung von STAT1 in HEK293T-Zellen überprüft. Zu diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen mit dem entsprechenden STAT1-Konstrukt transfiziert (siehe 3.3.2) und 24 h später für 60 min mit IFN $\gamma$  behandelt oder unbehandelt belassen.



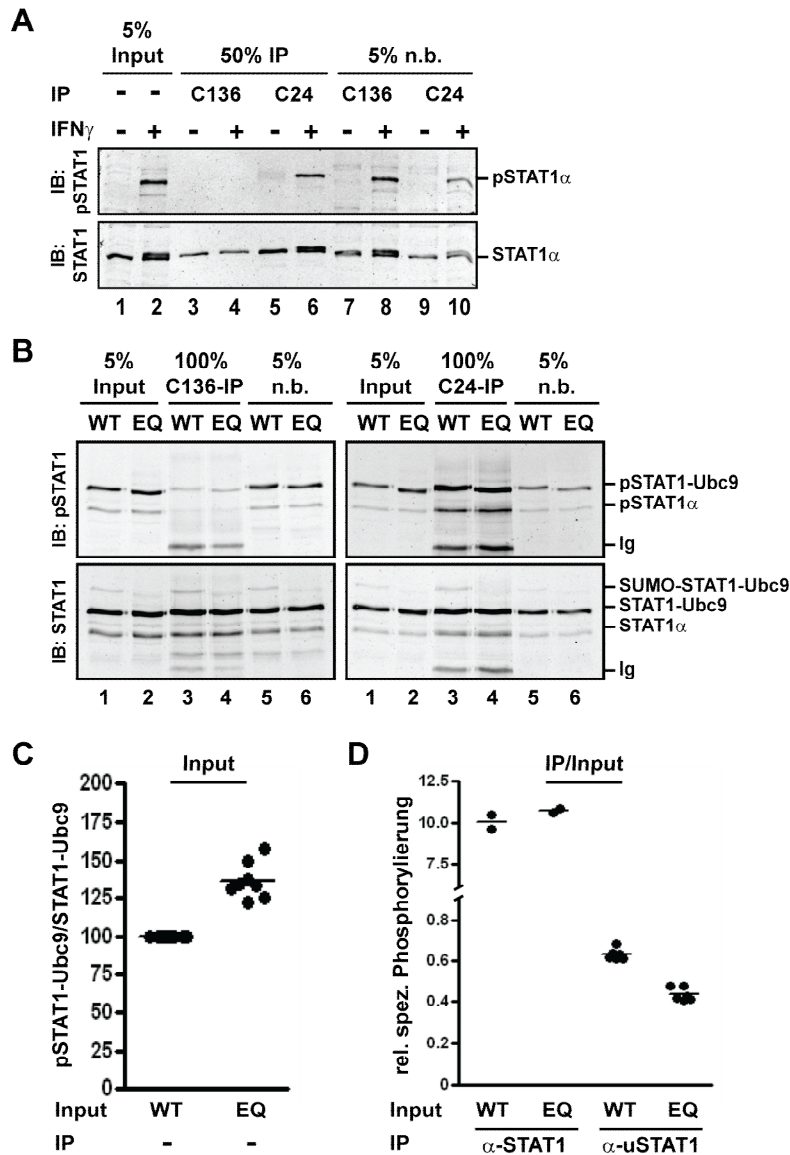


**Abb. 4.26. Die Charakterisierung von STAT1-Ubc9 Fusionsproteinen.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten STAT1-Ubc9-Fusionsproteine. (B-C) HEK293T-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Ubc9 Fusionsprotein transfiziert und 24 h später für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1 und STAT1 (C24) immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen (B, links). Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt (B, rechts). Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurde die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht (C).

Nach der Herstellung von Gesamtzell-Extrakten (3.2.3, zusätzlich versetzt mit 120 mM NEM) konnte eine effiziente Sumolierung des STAT1-WT-Ubc9 Fusionsproteins immunchemisch nachgewiesen werden (Abb. 26B, links unten, Bahn 1). Im Gegensatz dazu wurde die Sumolierung von STAT1 vollständig verhindert, wenn der SUMO-Konsensus durch die Mutation E<sup>705</sup>Q zerstört wurde (Abb. 26B, links unten, Bahn 3). Demnach bewirkt die Fusion von STAT1 mit Ubc9 nicht eine willkürliche Sumolierung von Lysinresten, sondern die spezifische Sumolierung einer funktionalen SUMO-Konsensus-Struktur. Zusätzlich konnte bestätigt werden (Jakobs et al. 2007, Zimnik et al. 2009), dass die Sumolierung die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung blockiert. Das sumolierte STAT1-WT-Ubc9 zeigte keine Reaktivität gegenüber einem pTyr<sup>701</sup>-spezifischen STAT1-Antikörper (Abb. 26B, links oben, Bahn 2). Somit liegt das sumolierte STAT1-Ubc9 in der nicht phosphorylierten Form vor. Dementsprechend war auch die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des sumolierten STAT1-WT-Ubc9 gegenüber der SUMO-freien E<sup>705</sup>Q-Variante reduziert (Abb. 4.26B, rechts). Somit verhalten sich die STAT1-Ubc9 Fusionsproteine bezüglich der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung nicht unterschiedlich zu den nicht markierten STAT1-Proteinen (vgl. Abb. 4.2). Im nächsten Schritt wurde die subzelluläre Verteilung der Ubc9-Fusionsproteine analysiert. Auch hier konnte keine Abweichung der STAT1-Ubc9 Fusionsproteine gegenüber den nicht markierten STAT1-Proteinen festgestellt werden (vgl. Abb. 4.3). Das sumolierbare STAT1-WT-Ubc9



akkumulierte nach IFN $\gamma$ -Stimulation homogen im Zellkern, während die SUMO-freie Variante zusätzlich nukleäre Parakristalle bildete (Abb. 4.26C). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Fusion von Ubc9 die Funktion der STAT1-Proteine hinsichtlich ihrer Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und subzellulären Verteilung nicht verändert.



#### Abb. 4.27. Die Sumolierung fördert die Bildung semi-phosphorylierter STAT1-Dimere.

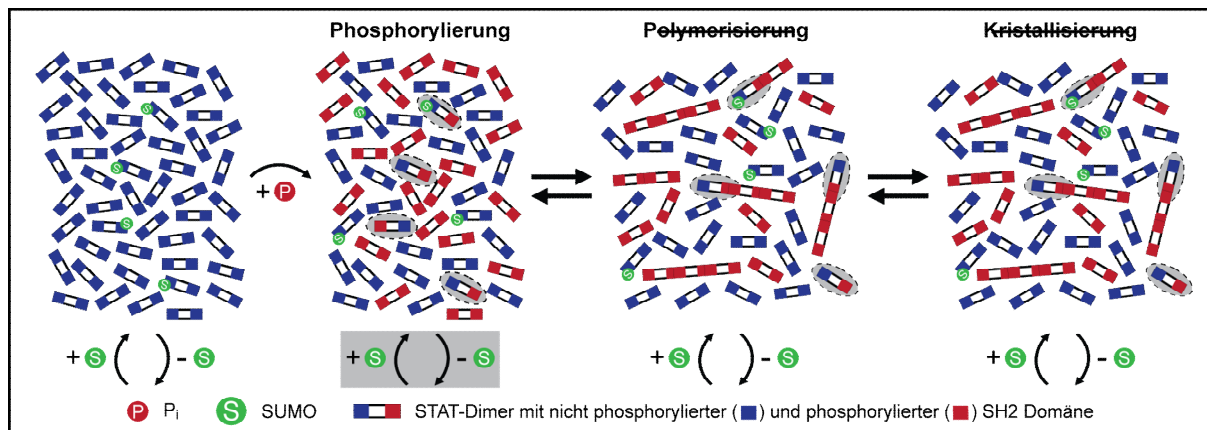
(A) Gesamtzell-Extrakte wurden von unbehandelten bzw. IFN $\gamma$ -stimulierten HEK293T-Zellen hergestellt und anschließend STAT1 mit dem Antikörper C24 bzw. C136 immunpräzipitiert (IP). Nach Auftrennung der Proteine in einem 7%-igen SDS-PA-Gel, wurden pSTAT1 und STAT1 (C24) immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen. „n. b.“ - Überstand (B) HEK293T-Zellen wurden mit STAT1-Ubc9-WT bzw. -E<sup>705</sup>Q (EQ) transfiziert und 24 h später für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert. Gesamtzell-Extrakte wurden unter Verwendung von 80 mM NEM hergestellt und STAT1 mit dem Antikörper C24 bzw. C136 immunpräzipitiert. Die Auftrennung und der immunchemische Nachweis der Proteine erfolgten wie in (A) beschrieben. (C) Quantifizierung der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1-Ubc9 in den Gesamtzell-Extrakten (n=8). (D) Quantifizierung des relativen Phosphorylierungs-Verhältnisses in den Präzipitaten (IP/Extrakt, n<sub>C24</sub>=2, n<sub>C136</sub>=6).

Für die nachfolgende Untersuchung der Häufigkeit von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren in Abhängigkeit der Sumolierung wurde die Tatsache genutzt, dass nur das nicht phosphorylierte STAT1 ein Ziel der SUMO-Modifikation darstellt. Nach der spezifischen Immunpräzipitation von nicht phosphoryliertem STAT1 wurde danach das assoziierte Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1 quantitativ bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Eigenschaft des STAT1-Antikörpers C136, spezifisch nur das nicht phosphorylierte STAT1 (uSTAT1) zu

erkennen (Marg et al. 2008), zunächst bestätigt. Dafür wurden Gesamtzell-Extrakte unbehandelter bzw. von 60 min mit IFN $\gamma$ -stimulierten HEK293T-Zellen vor der Immunpräzipitation von STAT1 aufgeteilt. Nach Verwendung des C136-Antikörpers konnte kein Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1 in den Präzipitaten (IP) detektiert werden (Abb. 4.27A, Bahn 4). Das für die IP angebotene pSTAT1 (vgl. Abb. 4.27A, Bahn 2) befand sich quantitativ im Überstand (n.b.; Abb. 4.27A, Bahn 8). Im Gegensatz dazu unterscheidet der STAT1-Antikörper C24 nicht zwischen uSTAT1 und pSTAT1, welche beide in dem Präzipitat immunchemisch nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 4.27A, Bahn 6). Für das eigentliche Experiment wurden HEK293T-Zellen zunächst mit dem entsprechenden STAT1-Ubc9 Fusionsprotein transfiziert (siehe 3.3.2), für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert und Gesamtzell-Extrakte (zusätzlich versetzt mit 80 mM NEM) hergestellt (siehe 3.2.3). Anschließend wurde das nicht phosphorylierte STAT1 mit dem STAT1-Antikörper C136 spezifisch präzipitiert (Abb. 4.27B, links) und damit assoziiertes phosphoryliertes STAT1 immunchemisch quantitativ nachgewiesen (siehe 3.2.2). Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation ebenfalls mit dem STAT1-Antikörper C24 durchgeführt (Abb. 4.27B, rechts). Als Erstes wurde die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 in den Gesamtzell-Extrakten bestimmt. Das Phosphorylierungs-Niveau des SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q-Ubc9 war dabei um ca. 40% gegenüber dem von STAT1-WT-Ubc9 erhöht (Abb. 4.27C). Nach der Immunpräzipitation mit dem STAT1-Antikörper C24, welcher nicht zwischen phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem STAT1 unterscheidet, wurde der Phosphorylierungs-Quotient (IP/Input) bestimmt (Abb. 4.27D). Dieser Quotient gibt die relative Menge an Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 in den Präzipitaten unter Berücksichtigung der zur Präzipitation zur Verfügung stehenden Menge an. Die Unfähigkeit des STAT1-Antikörpers C24 zwischen phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem STAT1 zu unterscheiden wurde durch die fast identischen Phosphorylierungs-Quotienten der WT-Präzipitate von  $10,0 \pm 0,6$  und E<sup>705</sup>Q-Präzipitate von  $10,7 \pm 0,2$  noch einmal verdeutlicht (Abb. 4.27D, IP  $\alpha$ -STAT1). Unabhängig von der angebotenen Menge an pSTAT1 wurde durch den Antikörper immer das gleiche Verhältnis von pSTAT1 zu uSTAT1 präzipitiert. Im Gegensatz dazu wurde nach der Immunpräzipitation des nicht phosphorylierten STAT1 (IP  $\alpha$ -uSTAT1) mit  $0,64 \pm 0,03$  ein überproportional hoher Phosphorylierungs-Quotient in den WT-Präzipitaten festgestellt, während der Quotient in den E<sup>705</sup>Q-Präzipitaten nur  $0,45 \pm 0,03$  betrug (Abb. 4.27D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch die Sumolierung von STAT1 tatsächlich die Menge an semiphosphorylierten STAT1-Dimeren in der Zelle erhöht wird.

### 4.3.6 Die Bildung von STAT1-Parakristallen wird über die Sumolierungs-abhängige Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren verhindert

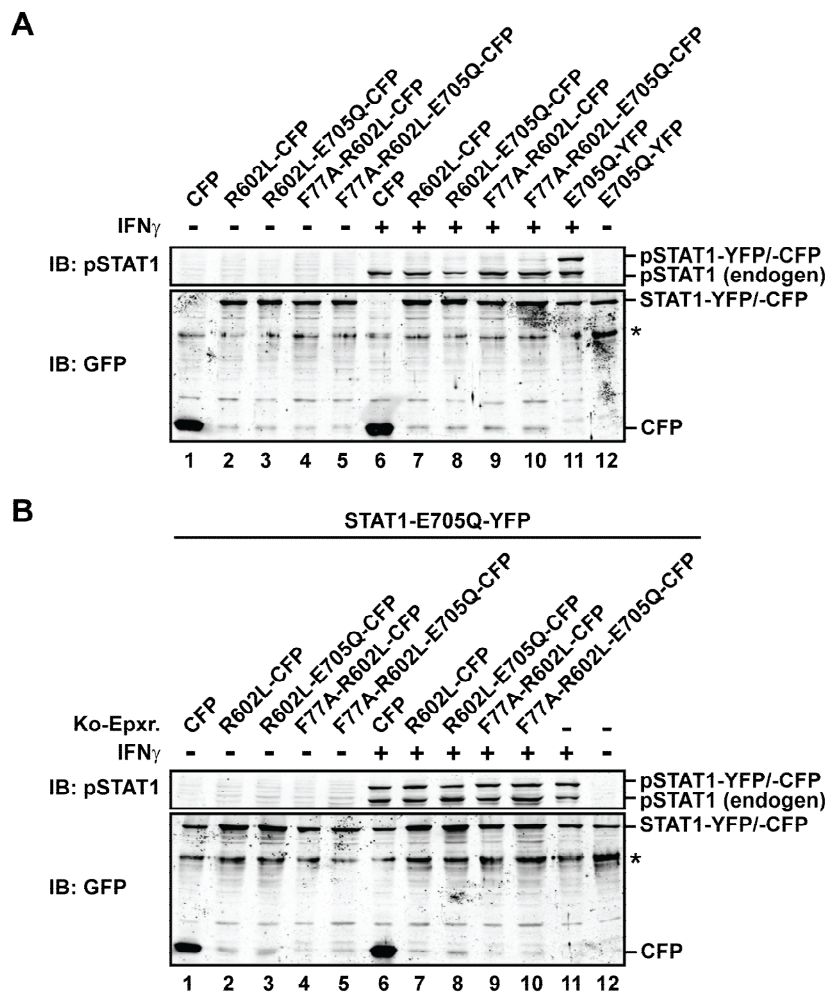
Die Existenz von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren eröffnen ein Modell, bei dem die Polymerisierung der STAT-Proteine durch den fehlenden pTyr-Rest des zuletzt verknüpften Dimers unterbunden wird (siehe Modell Abb. 4.28).



**Abb. 4.28. Schematisches Modell zum Einfluss der STAT1-Sumolierung auf die Polymerisierung von STAT1.** Nicht phosphorylierte STAT-Dimere (blaue Enden) werden Zytokin-abhängig phosphoryliert (rote Enden), welches jedoch durch die Anwesenheit eines SUMO1-Restes verhindert wird. In der Folge entstehen semi-phosphorylierte STAT1-Dimere (gestrichelte Ellipsoiden), welche die anschließende Polymerisierung von antiparallelen phosphorylierten STAT1-Dimeren kompetitiv inhibieren. Dadurch wird die Bildung von STAT1-Parakristallen effektiv verhindert und das aktivierte STAT1 im Zellkern bleibt löslich. In dem vorgestellten Modell ist die STAT1-Sumolierung nur für die Generierung semi-phosphorylierter STAT1-Dimere von funktioneller Bedeutung (angedeutet durch ein graues Rechteck). Die STAT1-Sumolierung kann jedoch jederzeit erfolgen, bleibt dann aber ohne einen funktionalen Einfluss.

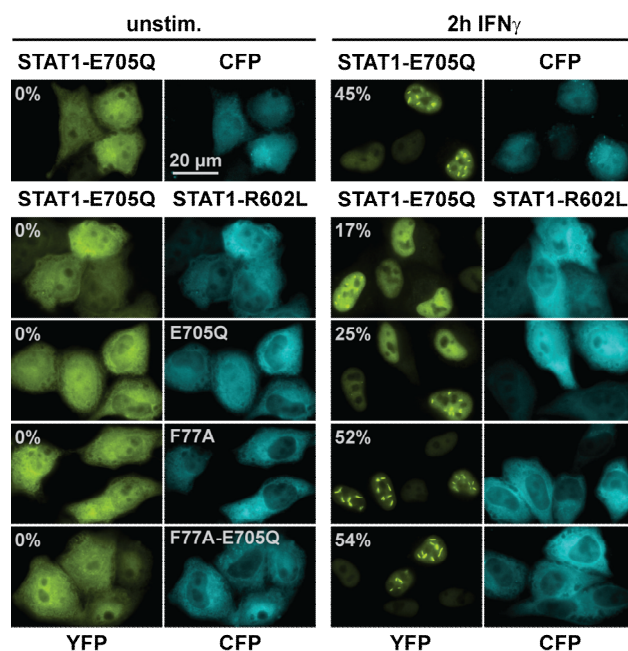
Bedeutenderweise beschränkt sich dabei die Rolle der STAT1-Sumolierung auf die Generierung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren (Abb. 4.28, grau unterlegtes Gleichgewicht der Sumolierung) und ist zu jedem anderen Zeitpunkt ohne funktionelle Konsequenz. So ist die SUMO-Modifikation für die weitere Verhinderung der STAT1-Polymerisierung und der damit verbundenen Parakristallbildung nicht mehr notwendig, da diese durch das fehlende pTyr des zuletzt eingebauten semi-phosphorylierten STAT1-Dimers vermittelt wird (Abb. 4.28). In dem vorgeschlagenen Modell stellt das nicht phosphorylierte STAT1 kein Inhibitor der Parakristallbildung dar. Erst die Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung durch die Sumolierung erzeugt über die semi-phosphorylierten Dimere einen kompetitiven Inhibitor der STAT1-Polymerisierung. Demzufolge müsste nicht phosphorylierbares STAT1 ebenfalls die Parakristallbildung verhindern. Während dabei die Inhibierung der STAT1-Polymerisierung unabhängig von der SUMO-Modifikation sein sollte, ist die Fähigkeit zur Bildung von antiparallelen Dimeren mit phosphorylierbaren STAT1 unerlässlich.

Um diese Hypothese zu testen, wurde in einem Kompetitions-Experiment der Einfluss von nicht Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierbaren STAT1 auf die Parakristallbildung von ko-exprimierten SUMO-freien STAT1 untersucht. Zu diesem Zweck wurde die STAT1-Mutante R<sup>602</sup>L verwendet, welche die Bindung an Zytokinrezeptoren und damit verbunden die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 verhindert (Shuai et al. 1993). Ein weiterer Vorteil der R<sup>602</sup>L-Mutante besteht darin, dass aufgrund der fehlenden Rezeptorbindung die Aktivierung von ko-exprimierten STAT1 nicht beeinträchtigt wird. Um zusätzlich die Ausbildung von anti-parallelen STAT1-Dimeren zu verhindern, wurde die bereits in 4.3.1 beschriebene STAT1-Mutation F<sup>77</sup>A verwendet. Die Fähigkeit der R<sup>602</sup>L-Mutation die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 zu verhindern sowie die nicht beeinträchtigte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von ko-exprimierten SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP wurde zunächst überprüft (Abb. 4.29, zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Begitt, Universität Nottingham, UK). Dafür wurden HeLa-Zellen neben dem Parakristalle bildenden STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP zusätzlich mit einer zu testenden STAT1-CFP-Variante bzw. CFP selbst ko-transfiziert (siehe 3.3.2).



**Abb. 4.29. Der Einfluss von nicht phosphorylierbaren STAT1-R<sup>602</sup>L-Mutanten auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q.** (A) HeLa-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Konstrukt oder CFP transfiziert und 24 h nach der Transfektion entweder unbehandelt belassen oder für 2 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1 und GFP immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen. (B) HeLa-Zellen wurden mit dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP und den angegebenen STAT1-CFP-Konstrukten oder CFP im molaren Verhältnis 1:2 ko-transfiziert. Die immunchemische Analyse erfolgte wie in (A). Der  $\alpha$ -GFP Antikörper erkennt neben GFP auch YFP und CFP. Eine Kreuzreaktive Bande ist mit \* markiert.

Nach der Stimulation der Zellen für 2 h mit IFN $\gamma$  wurden Gesamtzell-Extrakte hergestellt (siehe 3.2.3) und das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte bzw. das Gesamt-STAT1 immunchemisch nachgewiesen (siehe 3.2.2). Die Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$  induzierte die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des endogenen STAT1 (Abb. 29A oben, Bahnen 6-11). Während das SUMO-freie STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP ebenfalls Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliert wurde (Abb. 29A oben, Bahn 11), verhinderte die R<sup>602</sup>L-Mutation dies vollständig (Abb. 29A oben, Bahnen 7-10). Somit konnte die Verhinderung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung durch die STAT1-Mutation R<sup>602</sup>L bestätigt werden (Shuai et al. 1993). Wichtigerweise hatte die Ko-Expression von CFP oder R<sup>602</sup>L-Varianten keinen Einfluss auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP (Abb. 4.29B oben, Bahnen 6-11). Die bei der anschließenden Untersuchung des Einflusses von nicht phosphorylierbaren STAT1 auf die Parakristallbildung von SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP gewonnenen Ergebnisse konnten daher nicht durch eine unterschiedliche Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung verzerrt werden.



**Abb. 4.30. Die Oligomerisierung von STAT1-Dimeren via ihrer antiparallelen- und parallelen Dimer-Schnittstellen führt zur Bildung von Parakristallen unabhängig vom Sumolierungs-Status.** HeLa-Zellen wurden mit der cDNS für STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP und mit der für CFP bzw. den angegebenen STAT1-R602L-Varianten in einem Verhältnis von 1:3 ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 2 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit -20 °C-kaltem Methanol. Die subzelluläre Verteilung wurde am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die Anzahl der Zellen mit Parakristallen ist angegeben.

Für die Untersuchung wurden HeLa-Zellen zunächst wie oben beschrieben behandelt und danach fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen hergestellt (siehe 3.2.9). Nach der Stimulation der Zellen für 2 h mit IFN $\gamma$  wurde die Anzahl der Zellen mit Parakristallen quantifiziert. Als Vergleichswert dienten Zellen, die nur mit dem CFP-Protein selbst ko-transfiziert wurden, da dieses aufgrund der fehlenden Dimerisierungs-Schnittstellen nicht mit STAT1 interagieren und somit keinen Einfluss auf die Parakristalle ausüben sollte. In den HeLa-Zellen, welche STAT1-E<sup>705</sup>Q-YFP und CFP ko-exprimierten, konnten nach IFN $\gamma$ -Stimulation

in 45% der Zellen Parakristalle beobachtet werden (Abb. 4.30, oben). Wurde nun anstatt CFP die STAT1-R<sup>602</sup>L-CFP Mutante ko-exprimiert, war dieser Wert mit 17% deutlich reduziert (Abb. 4.30). Dies bestätigt die Vermutung, dass STAT1-R<sup>602</sup>L-CFP zwar über seine anti-parallele Dimer-Schnittstelle mit den Parakristallen interagieren konnte, die weitere Oligomerisierung via paralleler Dimer-Interaktionen aber durch das fehlende pTyr verhindert wurde. Wurde zusätzlich noch die antiparallele Dimer-Schnittstelle durch die F<sup>77</sup>A-Mutation zerstört, so entstand ein gegenüber den Parakristallen inertes Molekül, das nicht mehr zu einer Interaktion mit einem naszierenden Parakristall in der Lage war. In Übereinstimmung konnte in STAT1-R<sup>602</sup>L-F<sup>77</sup>A-CFP exprimierenden Zellen kein hemmender Einfluss auf die Parakristall-Bildung festgestellt werden, welche in über 52% der beobachteten Zellen beobachtet wurden (Abb. 4.30). Bedeutenderweise war der beschriebene Phänotyp auch unabhängig von der STAT1-Sumolierung. Auch die Kombination von E<sup>705</sup>Q- und R<sup>602</sup>L-Mutation führte zu einer Verringerung der Parakristalle zeigenden Zell-Zahl (25%), während STAT1-F<sup>77</sup>A-R<sup>602</sup>L-E<sup>705</sup>Q ko-exprimierende Zellen weiterhin in 54% der Zellen Parakristalle bildeten (Abb. 4.30). Dieses Ergebnis bestätigt das vorgeschlagene Modell (vgl. Abb. 4.28), bei der die Sumolierung ausschließlich für die Generierung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren benötigt wird. Danach wird die SUMO-Modifikation für die eigentliche Verhinderung der STAT1-Polymerisierung nicht mehr benötigt, da diese durch das fehlende pTyr des zuletzt eingebauten semi-phosphorylierten STAT1-Dimers vermittelt wird (Abb. 4.28).

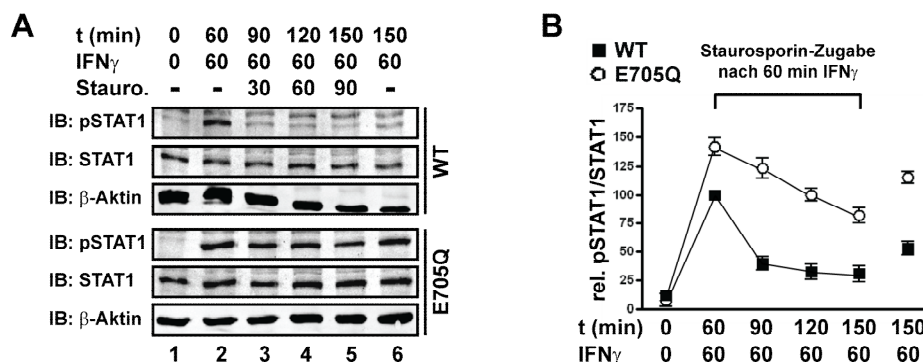
### **4.4 Parakristalle verlängern die Dauer der Zytokin-induzierten STAT-Aktivierung**

Nachdem im letzten Kapitel die Bildung und die Sumolierungs-induzierte Auflösung von STAT-Parakristalle mechanistisch erklärt wurde, erfolgte als nächstes die Untersuchung der physiologischen Relevanz auf die Kinetik der STAT-Aktivierung. Der gegenseitige Ausschluss der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und Lys<sup>703</sup>-Sumolierung von STAT1 lässt zunächst vermuten, dass die in 4.1.1 beobachtete reduzierte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1-WT durch dessen Sumolierung hervorgerufen wird. Jedoch erscheint dies aufgrund der geringen Menge von sumoliertem STAT1 in der Zelle (vgl. 4.1.1, Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003, Jakobs et al. 2007) als eher unwahrscheinlich. Es stellt sich daher die Frage, wie die Sumolierung einer Minderheit von nicht phosphorylierten STAT1-Molekülen eine signifikante Reduktion der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung hervorrufen kann.



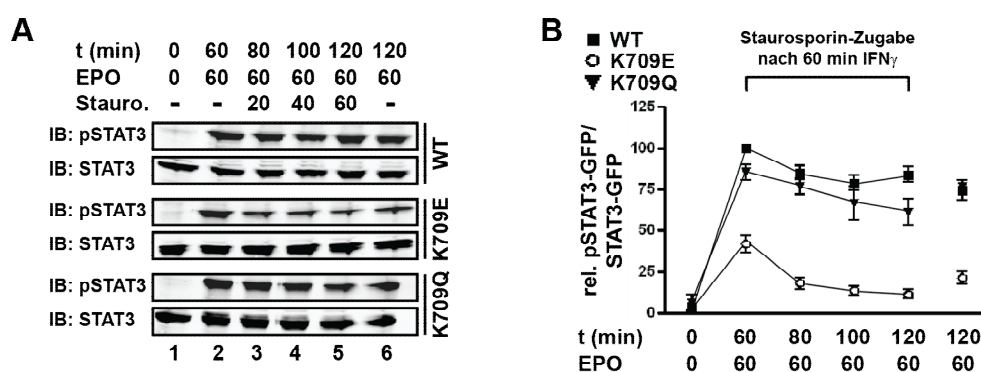
#### 4.4.1 Parakristalle schützen STAT-Proteine vor der Dephosphorylierung

Die Aktivität der STAT-Transkriptionsfaktoren unterliegt einer strengen Regulation und mehrere verschiedene Mechanismen zur Inaktivierung der STATs wurden bisher beschrieben (siehe auch 1.3.1). Zum Einen führt die Aktivierung der STATs selbst zu einer klassischen Rückkopplungs-Inhibierung des JAK-STAT-Signalweges durch die SOCS-Proteine, welche die Aktivierung des Rezeptors beeinträchtigen (Starr et al. 1997). Durch einen weiteren Mechanismus wird die Inaktivierung von STAT1 durch die PIAS-Proteine gefördert, welche spezifisch das phosphorylierte STAT1-Dimer erkennen (Liao et al. 2000). Eine Gemeinsamkeit der verschiedenen Inaktivierungs-Ebenen stellt die Dephosphorylierung des aktiven Tyrosinrestes durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen im Zellkern dar (Haspel et al. 1996). Zunächst wurde untersucht, ob die Sumolierung ebenfalls einen Einfluss auf die Dephosphorylierung von STAT1 ausübt. Eine elegante Methode zur Untersuchung der Dephosphorylierungs-Kinetik stellt der Rezeptorkinase-Inhibitor Staurosporin dar. Nach Zytokin-Stimulation stellt sich in der Zelle ein Gleichgewicht von Tyr-Phosphorylierung am Rezeptor und Tyr-Dephosphorylierung im Zellkern ein. Durch die Behandlung der Zellen mit Staurosporin wird die erneute Phosphorylierung der STATs am Rezeptor unterbunden und ausschließlich die Kinetik der Tyr-Dephosphorylierung kann verfolgt werden (Haspel et al. 1996). Zu diesem Zweck wurden STAT1-defiziente U3A-Zellen mit STAT1-WT oder dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q rekonstituiert (siehe 3.3.2). Nach einer initialen Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$  für 60 min erfolgte die Behandlung der Zellen mit Staurosporin für unterschiedlich lange Zeiträume (siehe 3.2.5).



**Abb. 4.31. Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung beschleunigt die Tyr<sup>701</sup>-Dephosphorylierung von STAT1.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit STAT1-WT oder SUMO-freiem STAT1-E<sup>705</sup>Q rekonstituiert. Nach 24 h wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 60 min mit IFN $\gamma$  stimuliert, gefolgt von einer Staurosporin-Behandlung für unterschiedlich lange Zeiträume. (A) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 10%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1, STAT1 (E23) und  $\beta$ -Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen. (B) Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

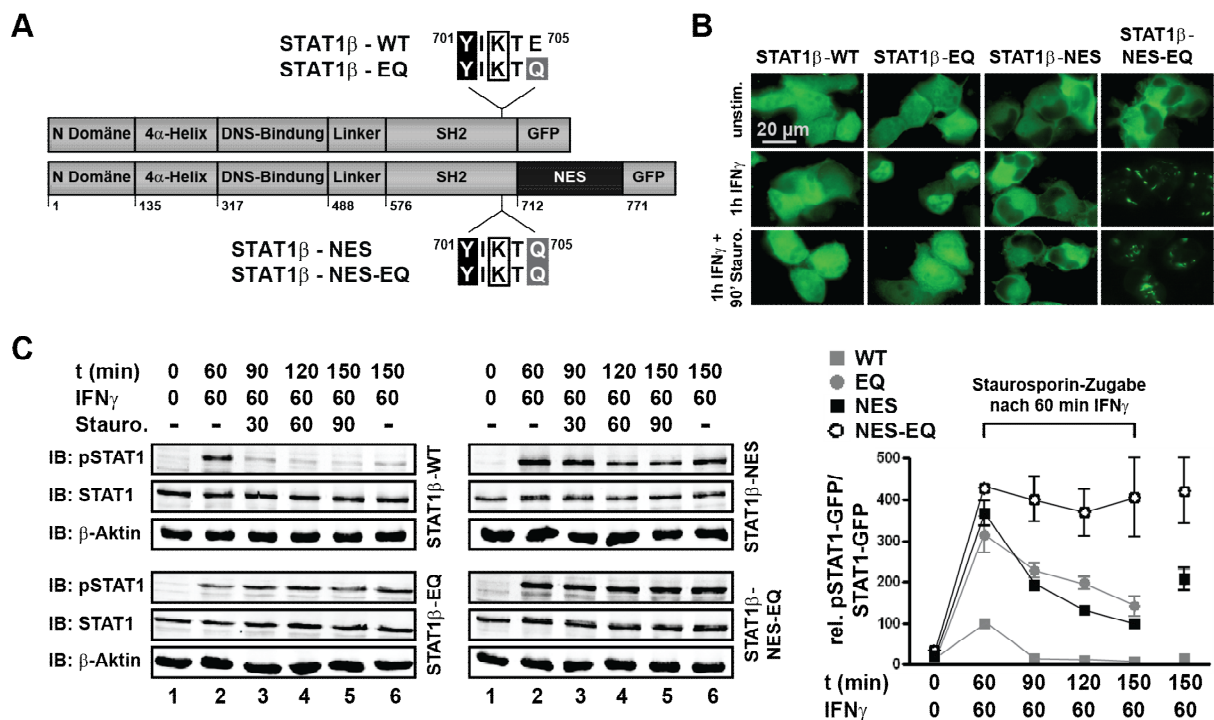
Gesamtzell-Extrakte wurden hergestellt (siehe 3.2.3) und die Kinetik der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde immunchemisch quantifiziert (siehe auch 3.2.2). In Übereinstimmung mit den bisherigen Beobachtungen (vgl. Abb. 4.2, 4.21 und 4.22) wurde unabhängig von der transfizierten STAT1-Variante kein Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1 in Extrakten unbehandelter Zellen beobachtet (Abb. 4.31, Bahn 1). Nachfolgend auf die IFN $\gamma$ -Stimulation konnte erneut die reduzierte spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des sumolierten STAT1-WT gegenüber dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q beobachtet werden (Abb. 4.31B). Wurde jedoch die erneute Phosphorylierung von STAT1 am Rezeptor durch die Staurosporin-Behandlung unterbunden, erfolgte eine zügige Dephosphorylierung des sumolierten STAT1-WT. Innerhalb von nur 30 min war der größte Teil von STAT1 dephosphoryliert (Abb. 4.31A, Bahn 3). Im Gegensatz dazu verlief die Dephosphorylierung des SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q deutlich langsamer. Innerhalb der ersten 30 min erfolgte nur eine geringfügige Dephosphorylierung (Abb. 4.31A, Bahn 3) und selbst nach 90-minütiger Staurosporin-Behandlung war nur ca. 1/3 des Ausgangsmaterials dephosphoryliert (Abb. 4.31B, Bahn 5). Demzufolge beruht die beobachtete Reduktion der spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung durch die STAT1-Sumolierung nicht nur auf einer direkten Blockierung des Tyr<sup>701</sup>-Restes (Zimnik et al. 2009), sondern zusätzlich auf einer beschleunigten Dephosphorylierungs-Kinetik. Diese Hypothese wurde anschließend anhand der Dephosphorylierungs-Kinetik von STAT3 überprüft. Dazu wurden STAT3-defiziente PC3-Zellen mit den GFP-Fusionsproteinen für die SUMO-freien STAT3-Varianten WT und K<sup>709</sup>Q bzw. mit dem nun sumolierbaren K<sup>709</sup>E rekonstituiert (siehe 3.3.2).



**Abb. 4.32. Die Sumolierung beschleunigt die Tyr<sup>705</sup>-Dephosphorylierung von STAT3.** STAT3-defiziente PC3-Zellen wurden mit den SUMO-freien STAT3-Varianten -WT oder -K<sup>709</sup>Q bzw. mit dem sumolierbaren -K<sup>709</sup>E rekonstituiert. Nach 24 h wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 60 min mit EPO stimuliert, gefolgt von einer Staurosporin-Behandlung für unterschiedlich lange Zeiträume. (A) Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 10%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT3 und STAT3 immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen. (B) Die spezifische Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung von STAT3 wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 2 (K709Q) bzw. 6 (WT und K709E) unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.



Nach einer EPO-Stimulation für 60 min erfolgte die Untersuchung der Dephosphorylierungs-Kinetik mit Staurosporin (siehe 3.2.5) über die Bestimmung der spezifischen Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung von STAT3 (siehe 3.2.2). Analog zu den Beobachtungen mit STAT1 (Abb. 4.31), führte auch die Sumolierung von STAT3-K<sup>709</sup>E zu einer beschleunigten Dephosphorylierungs-Kinetik. Die spezifische Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung der SUMO-freien STAT3-Varianten WT und K<sup>709</sup>Q betrug selbst nach 60-minütiger Staurosporin-Behandlung immer noch mehr als 75% des Ausgangswertes (Abb. 4.32B). Im Gegensatz dazu erfolgte mit dem nun sumolierbaren STAT3-K<sup>709</sup>E innerhalb der ersten 20 min bereits die Dephosphorylierung von über 50% des Tyr<sup>705</sup>-phosphorylierten Materials (Abb. 4.32B). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die Sumolierung die Tyr-Dephosphorylierung der STATs beschleunigt. Jedoch ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar, ob bzw. welche Rolle die nukleären Parakristalle bei diesem Prozess spielen. Vorstellbar wäre, dass die konstant erhöhte Menge an phosphoryliertem STAT zur Bildung von Parakristallen führt oder umgekehrt das Vorhandensein von Parakristallen eine verzögerte Dephosphorylierungs-Kinetik bedingt.



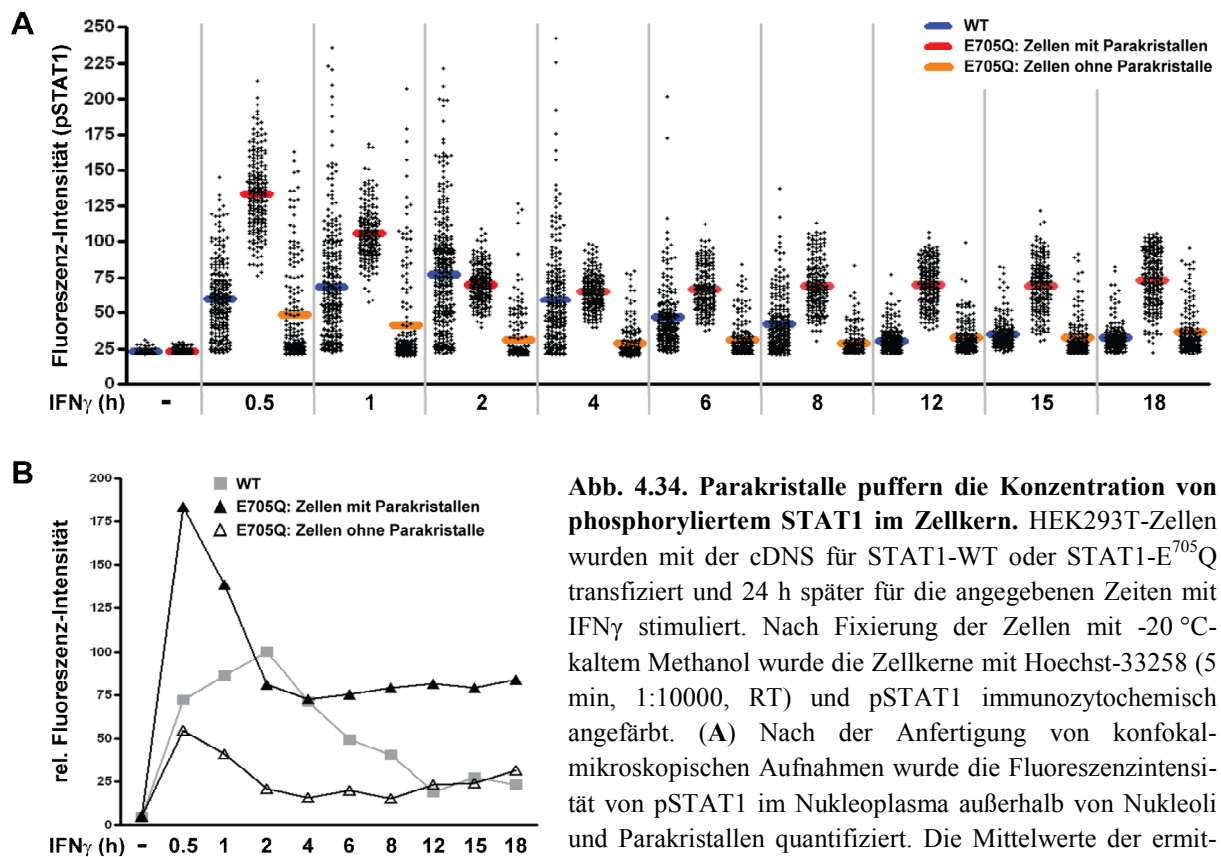
**Abb. 4.33. Parakristalle schützen STAT-Proteine vor der Dephosphorylierung.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten STAT1β-GFP Fusionsproteine. (B-C) STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1β-Konstrukt rekonstituiert. Nach 24 h wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 60 min mit IFN<sub>γ</sub> stimuliert, gefolgt von einer Staurosporin-Behandlung für unterschiedlich lange Zeiträume. Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurde die subzelluläre Verteilung am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht (B). Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1, STAT1 (E23) und β-Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen (C, links). Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde als Mittelwert ± SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt (C, rechts).

Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurde als nächstes der Einfluss der Sumolierung auf die Dephosphorylierungs-Kinetik von STAT1 $\beta$  untersucht. Die zeitlich verzögerte Kinetik des Zellkern-Exportes von STAT1 $\beta$  resultiert in verminderter Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung und ausbleibender Akkumulation im Zellkern nach IFN $\gamma$ -Stimulation (Lödige et al. 2005). Jedoch kann durch die Fusion eines Kernexportsignals (NES) dieser Export-Defekt von STAT1 $\beta$  überwunden werden, welches zu einer wiederhergestellten Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung führt (Lödige et al. 2005). Die Grundlage für dieses Experiment besteht darin, dass bei der nicht sumolierten STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q-Mutante aufgrund der geringen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung keine Parakristalle beobachtet werden konnten. Somit kann die Kinetik der Tyr<sup>701</sup>-Dephosphorylierung in Abwesenheit von Parakristallen studiert werden. Die Fusion des SUMO-freien STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q mit dem NES führte nun zu der Bildung von Parakristallen, welches den direkten Vergleich der Dephosphorylierungs-Kinetik in Anwesenheit von Parakristallen erlaubt. Die Abbildung 4.33A fasst die für dieses Experiment hergestellten STAT1 $\beta$ -Varianten zusammen. Neben der Dephosphorylierungs-Kinetik (siehe oben) wurde parallel die subzelluläre Verteilung der STAT1 $\beta$ -Konstrukte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop verfolgt (siehe 3.2.9). Die in der Literatur beschriebene reduzierte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 $\beta$  (Lödige et al. 2005) führte dabei in einer gegenüber STAT1 $\alpha$  fehlenden Kernakkumulation nach IFN $\gamma$ -Stimulation (Abb. 4.33B). Die Verhinderung der Sumolierung bei STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q verbesserte die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (Abb. 4.33C), welches mit einer Kernakkumulation von STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q einherging, jedoch nicht für die Bildung von Parakristallen ausreichte (Abb. 4.33B). Die Fusion des NES-Signals mit STAT1 $\beta$  führte nach IFN $\gamma$ -Behandlung zu einem ähnlich hohen Phosphorylierungs-Level wie bei STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q (Abb. 4.33C), lokalisierte aber aufgrund der Export-Mutation ausschließlich im Zytoplasma (Abb. 4.33B). Die Kombination von verbessertem Export und veränderter Sumolierung führte bei STAT1 $\beta$ -NES-E<sup>705</sup>Q trotz einer vergleichbaren Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (Abb. 4.33C) zu der Bildung von Parakristallen, welche sich aufgrund des Export-Signals aber im Zytoplasma formten (Abb. 4.33B). Somit ist es möglich die Dephosphorylierungs-Kinetik von SUMO-freien STAT1 in Zellen mit und ohne Parakristall-Bildung direkt miteinander zu vergleichen. Die durch IFN $\gamma$  induzierte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 $\beta$ -WT erreicht nach nur 30-minütiger Staurosporin-Behandlung wieder das Ausgangsniveau (Abb. 4.33C, Bahnen 1-3). Wie bereits beschrieben (Lödige et al. 2005), verbesserte die Fusion des NES-Signals die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 $\beta$  deutlich, aber auch die Verhinderung der Sumolierung von STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q hatte den gleichen Effekt (Abb. 4.33C). Obwohl die Tyr<sup>701</sup>-

Phosphorylierung von STAT1 $\beta$ -NES und STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q gegenüber dem Wildtyp deutlich verbessert war, zeigten alle drei Varianten, abgesehen von der verschiedenen hohen Ausgangs-Phosphorylierung, eine vergleichbar schnelle und effiziente Dephosphorylierung im beobachteten Zeitraum (Abb. 4.33C). Die Verhinderung der STAT1-Sumolierung scheint demnach nicht auszureichen, um die Dephosphorylierung von STAT1 zu verlangsamen. Erst das Vorhandensein von Parakristallen mit der STAT1 $\beta$ -NES-E<sup>705</sup>Q Mutante führte zu einer deutlich verlangsamten Inaktivierungs-Kinetik (Abb. 4.33C). Diese schützende Wirkung der Parakristalle vor der Dephosphorylierung wurde zusätzlich durch ihr Vorhandensein nach 90-minütiger Staurosporin-Behandlung bestätigt (Abb. 4.33B), während STAT1 $\beta$ -E<sup>705</sup>Q bereits erneut eine panzelluläre Verteilung zeigte. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die beobachtete reduzierte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung der sumolierten STAT-Varianten durch zwei unabhängige Prozesse hervorgerufen wird. Einerseits verhindert die Sumolierung direkt die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des gleichen STAT-Moleküls (vgl. 4.3.3), andererseits wird zusätzlich die STAT-Dephosphorylierung, über die erhöhte Löslichkeit des aktivierten STATs im Zellkern, noch beschleunigt.

### **4.4.2 Parakristalle puffern die Konzentration von aktiviertem STAT1 im Nukleoplasma**

Wie bereits in 4.3 beschrieben sind STAT-Parakristalle dynamische Gebilde, welche in einem Gleichgewicht mit ihrer Umgebung stehen. Durch die Verwendung des Translationsinhibitors CHX konnte Dr. Andreas Begitt (Universität Nottingham, UK) zeigen, dass der Aufbau von Parakristallen nach IFN $\gamma$ -Stimulation unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese ist (persönliche Kommunikation, Droescher et al. 2011). In Verbindung mit dem durch die Parakristalle vermittelte Schutz der STATs vor der Dephosphorylierung (vgl. 4.4.1) deuten diese Ergebnisse auf eine Konservierung der STAT-Aktivität über einen längeren Zeitraum hin. Vorstellbar wäre sogar eine Speicherfunktion der Parakristalle für aktiviertes STAT im Zellkern, dessen genregulatorisches Potential über eine langen Zeitraum aufrechterhalten wird, während die Sumolierung von STAT1 dies unterbindet. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurde die Wirkung der Parakristalle auf die Konzentration von phosphoryliertem STAT1 im Zellkern durch quantitative Konfokal-Mikroskopie bestimmt. Dafür wurde HEK293T-Zellen entweder mit STAT1-WT oder dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q transfiziert (siehe 3.3.2), für unterschiedlich lange Zeiten mit IFN $\gamma$  stimuliert und anschließend pSTAT1 immunozytochemisch angefärbt (siehe 3.2.8).



**Abb. 4.34. Parakristalle puffern die Konzentration von phosphoryliertem STAT1 im Zellkern.** HEK293T-Zellen wurden mit der cDNS für STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q transfiziert und 24 h später für die angegebenen Zeiten mit IFN $\gamma$  stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurde die Zellkerne mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) und pSTAT1 immunozytochemisch angefärbt. (A) Nach der Anfertigung von konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde die Fluoreszenzintensität von pSTAT1 im Nukleoplasma außerhalb von Nukleoli und Parakristallen quantifiziert. Die Mittelwerte der ermittelten Intensitäten sind farbig gekennzeichnet. (B) Nach der

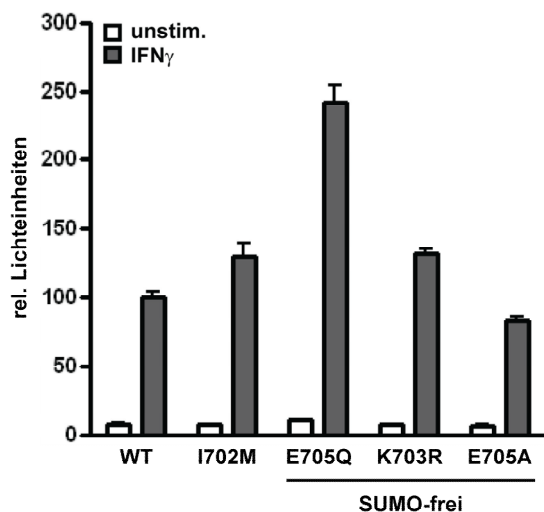
Subtraktion des Hintergrundes der in (A) dargestellten Rohdaten wurden zusätzlich die niedrigsten 15% der Intensitäten von Zellen ohne Parakristallen ausgeschlossen, um den ca. 15% Anteil an nicht IFN $\gamma$  responsiven Zellen zu berücksichtigen. Die Mittelwerte der Fluoreszenz-Intensität wurden relativ zu der von STAT1-WT nach 2 h IFN $\gamma$  Stimulation (auf 100 gesetzt) dargestellt.

Nach Anfertigung von konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde die Konzentration von phosphoryliertem STAT1 in den Zellkernen außerhalb von Nukleoli und Parakristallen mit dem Programm *LCS Lite 2.61* der Firma *Leica* quantifiziert (siehe 3.2.9). Für die Auswertung der Messdaten wurde die mit dem SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q transfizierten Zellen in 2 unterschiedliche Fraktionen eingeteilt. Einerseits in Zellen mit Parakristallen, welche je nach Zeitpunkt einen Anteil von 20-50% ausmachten. Die andere Fraktion stellten Zellen ohne Parakristalle dar. Diese Fraktion bestand aus Zellen deren Parakristalle sich im Laufe des Experiments bereits wieder aufgelöst hatten sowie aus Zellen die nicht auf die IFN $\gamma$ -Stimulation ansprachen (ca. 15%). Die quantifizierten Rohdaten (Abb. 4.34A) und eine Zusammenfassung der Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten, abzüglich des Hintergrundes und dem 15% Anteil an nicht IFN $\gamma$ -responsiven Zellen (Abb. 4.34B), sind dargestellt. Einen Einfluss der STAT1-Sumolierung auf die nukleäre Konzentration von Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 (pSTAT1) konnte bereits nach 30-minütiger IFN $\gamma$ -Stimulation deutlich beobachtet werden. Die Stimulation von STAT1-WT exprimierenden Zellen mit

IFN $\gamma$  führte zu einer zügigen Akkumulation von pSTAT1 im Zellkern, dessen Konzentration nach 2-stündiger Stimulation das Maximum erreichte (Abb. 4.34B, auf 100 gesetzt). Anschließend sank die pSTAT1-Konzentration stetig und erreichte ein basales Plateau nach 12-stündiger Stimulationsdauer (ca. 25% des Maximums). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation von SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Zellen zu einer mehr als 2-fach höheren Anreicherung von pSTAT1 nach nur 30-minütiger IFN $\gamma$ -Behandlung (Abb. 4.34B). Jedoch sank die Konzentration von phosphoryliertem STAT1-E<sup>705</sup>Q innerhalb sehr kurzer Zeit auf ca. 75% des maximalen WT-Niveaus ab, welches mit der verstärkten Bildung von Parakristallen einherging. Bemerkenswerterweise blieb die Konzentration von phosphoryliertem STAT1-E<sup>705</sup>Q im weiteren Zeitverlauf nahezu konstant, während die WT-Konzentration rasch abnahm und nach 12-stündiger IFN $\gamma$  Stimulation nicht mehr von der STAT1-E<sup>705</sup>Q-Konzentration ohne Parakristalle zu unterscheiden war (Abb. 4.34B). Die Sumolierung von STAT1 verhindert demnach nicht nur die Bildung der Parakristalle. Damit verbunden wird auch die zur Transkription zur Verfügung stehende Menge an pSTAT1 zeitlich moduliert. Die Parakristalle schützen phosphoryliertes STAT1 vor der Dephosphorylierung und fungieren als eine Art Speicher- und Puffersystem. Übersteigt die Konzentration an pSTAT1 eine bestimmte Schwelle (hier ca. 75% der maximalen WT-Konzentration) bilden sich Parakristalle, wodurch die pSTAT1-Konzentration auf einen konstanten Wert gepuffert wird. Sinkt jedoch die Konzentration an pSTAT1 in der Zelle über die Zeit unter diesen Schwellwert, beginnt der Abbau der Parakristalle, wodurch die pSTAT1-Konzentration gegenüber Zellen ohne Parakristalle über einen deutlich längeren Zeitraum konstant erhöht bleibt. Das Vorhandensein eines Schwellwertes für die pSTAT1-Konzentration konnte durch Beobachtung von STAT1-E<sup>705</sup>Q-GFP exprimierenden Zellen nach IFN $\gamma$  Stimulation bestätigt werden. Im Zeitraffer beobachtete Zellen zeigten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop nach 30-35 Minuten die simultane Bildung von Parakristallen an mehreren Stellen im Zellkern (Ian Ward, Universität Nottingham, UK; persönliche Kommunikation). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sumolierung von STAT1 dessen Aktivierung und Inaktivierung durch mehrere unabhängige Mechanismen beeinflusst. Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung verhindert einerseits direkt die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung des gleichen STAT1-Moleküls (Zimnik et al. 2009, Droescher et al. 2011) und führt zur Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren (vgl. 4.3.5). Diese wiederum reduzieren in einem unabhängigen Mechanismus die Löslichkeit von phosphoryliertem STAT1. Dadurch wird die Bildung von nukleären Parakristallen effektiv verhindert, welches letztendlich die Kinetik der STAT1-Dephosphorylierung beschleunigt (vgl. 4.4.1).

#### 4.4.3 Die Sumolierung reduziert die transkriptionelle Aktivität von STAT-Proteinen

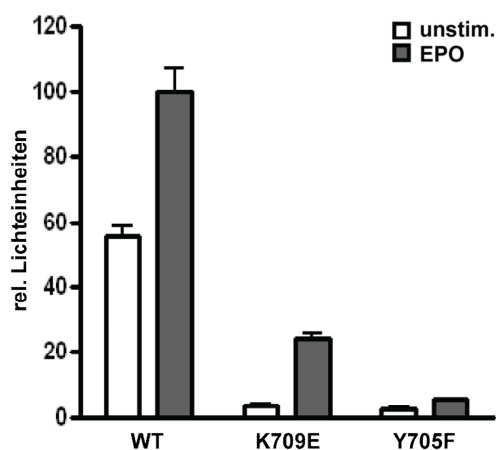
Der Einfluss der Sumolierung von Transkriptionsfaktoren wird in der Regel als inhibierend beschrieben (Verger et al. 2003). Die durch die Sumolierung induzierte Verringerung der STAT1-Phosphorylierung über einen längeren Zeitraum (4.4.2) lässt vermuten, dass auch bei STAT1 die Sumolierung die transkriptionelle Aktivität von STAT1 beeinträchtigt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden verschiedene STAT1-Mutanten unter Verwendung eines IFN $\gamma$ -responsiven Luziferase-gekoppelten Reportergenkonstruktes getestet (Wen et al. 1995). Hierfür wurden STAT1-defiziente U3A-Zellen mit den jeweiligen STAT1-Proteinen rekonstituiert und zusätzlich mit DNS-Konstrukten für das Ly6E-Reportergen (Wen et al. 1995) und das  $\beta$ -Galaktosidasegen (Meyer et al. 2003) ko-transfiziert (siehe 3.3.2). Nach 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN $\gamma$  stimuliert, Zell-Extrakte hergestellt und anschließend die STAT1-vermittelte Luziferase-Expression bestimmt (siehe 3.2.11). Die bestimmte Luziferase-Aktivität wurde abschließend mit der ebenfalls gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität normalisiert.



**Abb. 4.35: Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung beeinträchtigt die transkriptionelle Aktivität von STAT1.** STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT1-Konstrukt rekonstituiert und mit dem Luziferase gekoppelten Ly6E-Reportergen sowie dem  $\beta$ -Galaktosidase-Gen ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit IFN $\gamma$  stimuliert. Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte mit dem *Luciferase-Assay-System* der Firma Promega (Mannheim) und anschließender Normalisierung der Werte durch die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die transkriptionelle Reporter-Gen-Aktivität wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 4 unabhängigen durchgeführten Experimenten dargestellt.

In Einklang mit der im Ruhezustand der Zelle fehlenden Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung der getesteten STAT1-Varianten (vgl. Abb. 4.2) konnte zunächst nur eine geringe Hintergrundaktivität der Luziferase gemessen werden (Abb. 4.35, weiße Säulen). Die IFN $\gamma$ -Stimulation der Zellen induzierte die Luziferase-Aktivität deutlich (Abb. 4.35, graue Säulen), welche jedoch abhängig von dem getesteten STAT1-Konstrukt unterschiedlich stark ausfiel. Im Vergleich mit den STAT1-WT exprimierenden Zellen wiesen die Extrakte der SUMO-freien STAT1-K<sup>703</sup>R bzw. STAT1-E<sup>705</sup>A exprimierenden Zellen eine vergleichbare Luziferase-Aktivität nach IFN $\gamma$ -Stimulation auf (ca. 85-130%). Wie vermutet, war die Luziferase-Aktivität der

SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Zellen gegenüber dem STAT1-WT um mehr als das 2,5-fache erhöht (Abb. 4.35). Obwohl STAT1-K<sup>703</sup>R nur ca. 50% der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung im Vergleich mit dem Wildtyp aufweist (4.1.2), ist die transkriptionelle Aktivität der beiden STAT1-Varianten vergleichbar (Abb. 4.35). Dieses Ergebnis unterstützt die in 4.1.2 aufgestellte Hypothese, dass die strukturelle Integrität der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle durch SUMO-unabhängige Effekte bestimmter SUMO-Konsensus-Mutation beeinträchtigt wird. Die eigentlich mit der Sumolierung verbundenen Effekte wurden dadurch maskiert. Im Gegensatz dazu führt die Verhinderung der STAT1-Sumolierung durch die E<sup>705</sup>Q-Mutation, welche die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung nicht beeinträchtigt (4.1.2), gegenüber STAT1-WT zu einer deutlich verbesserten transkriptionellen Aktivierung von STAT1. Übereinstimmend zeigte auch die weiterhin sumolierbare Mutante I<sup>702</sup>M keinen signifikanten Unterschied zur transkriptionellen Aktivität des Wildtyps (siehe 4.35).



**Abb. 4.36: Die Sumolierung von STAT3-K<sup>709</sup>E reduziert die transkriptionelle Reporter-gen-Aktivität von STAT3.** STAT3-defiziente PC3-Zellen wurden mit dem angegebenen STAT3-GFP Fusionsprotein rekonstituiert und mit dem Luziferase gekoppelten APRE-Reporter-gen sowie dem  $\beta$ -Galaktosidase-Gen ko-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen unbehandelt belassen oder für 6 h mit EPO stimuliert. Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte mit dem *Luciferase-Assay-System* der Firma Promega (Mannheim) und anschließender Normalisierung der Werte durch die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die transkriptionelle Reporter-gen-Aktivität wurde als Mittelwert  $\pm$  SD von 6 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

Um den Einfluss der Sumolierung auf die transkriptionelle Aktivität der STATs zu bestätigen, wurde im nächsten Versuch die in 4.3.2 beschriebene STAT3-Variante K<sup>709</sup>E untersucht. Die Mutante STAT3-Y<sup>705</sup>F wurde als Negativ-Kontrolle mitgeführt und sollte durch die Zytokin-Stimulation, aufgrund ihrer fehlenden Tyr<sup>705</sup>-Phosphorylierung (Zhong et al. 1994), transkriptionell nicht induziert werden. Für die Analyse wurde ein Luziferase-gekoppelte Reporter-genkonstrukt verwendet, dessen Promotor ein APRE-Tandem (*Acute Phase Response Element*) des  $\alpha$ 2-Macroglobulin Promotors enthält (Matsui et al. 2002). Analog zu dem oben beschriebenen Versuch wurden STAT3-defiziente PC3-Zellen mit der zu testenden STAT3-Variante rekonstituiert und zusätzlich mit DNS-Konstrukten für das APRE-Reporter-gen und das  $\beta$ -Galaktosidasegen ko-transfiziert (siehe 3.3.2). Nach 24 h wurden die Zellen für 6 h mit Epo stimuliert, Zell-Extrakte hergestellt und anschließend die

STAT3-vermittelte Luziferase-Expression bestimmt (siehe 3.2.11). In Extrakten von STAT3-WT-GFP exprimierenden Zellen konnte bereits im Ruhezustand der Zelle eine hohe Luziferase-Aktivität gemessen werden. Jedoch induzierte die Stimulation der Zellen mit EPO nochmals eine Verdopplung der Luziferase-Aktivität (Abb. 4.36). Wie erwartet zeigten Extrakte, welche die dominant negative STAT3-GFP-Mutante Y<sup>705</sup>F exprimierten, im Ruhezustand und nach EPO-Stimulation nur eine schwache Hintergrund-Aktivität (Abb. 4.36). Analog zu STAT1 beeinträchtigte die Sumolierung von STAT3-K<sup>709</sup>E die transkriptionelle Aktivität deutlich. Nach Stimulation der Zellen mit EPO zeigte STAT3-K<sup>709</sup>E eine gegenüber dem Wildtyp um das 4-fache reduzierte Luziferase-Aktivität. Aber auch die konstitutive Luziferase-Aktivität im Ruhezustand konnte mit der K<sup>709</sup>E-Mutante nicht mehr beobachtet werden (Abb. 4.36). Demnach beeinflusst die Sumolierung von STAT3 dessen transkriptionelle Aktivität auf die gleiche negative Weise, welche bereits mit STAT1 beobachtet wurde (Abb. 4.35).

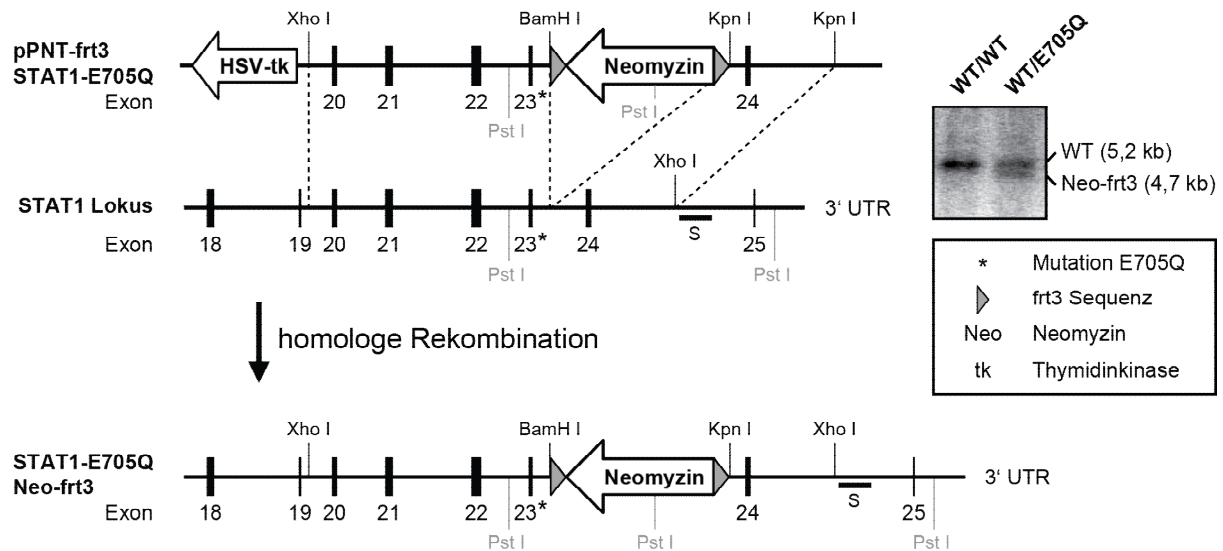
### **4.5 Physiologische Relevanz der STAT1-Sumolierung im transgenen Tier-Modell**

In dieser Arbeit wurde bisher der mechanistische Einfluss der Sumolierung auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 dargelegt. Durch die direkte Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (4.3.3) wurde die Generierung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren gefördert (4.3.5), welche in einem indirekten Mechanismus die Löslichkeit von aktiviertem STAT1 erhöhte (4.4.2). Die damit assoziierte Verhinderung von Parakristallen führte zu einer beschleunigten Dephosphorylierung (4.4.1) und einer reduzierten transkriptionellen Aktivität von STAT1 (4.4.3). Um die physiologische Relevanz dieser Sumolierungs-induzierten Effekte auf den Transkriptionsfaktor STAT1 zu untersuchen, wurde eine *Knock-in* Maus-Modell generiert, welches auf der E<sup>705</sup>Q-Mutation basiert.

#### **4.5.1 Generierung einer transgenen Maus, welche SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q unter der Kontrolle des endogenen STAT1-Promotors exprimiert**

Die Auswirkung der STAT1-Sumolierung unter physiologischen Bedingungen wurde anhand eines Maus-Modells untersucht. Basierend auf dem FLP/frt3-Rekombinase System (Dymecki et al. 1996, Takeuchi et al. 2002) wurde eine transgene Maus generiert, welche SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q unter der Kontrolle des endogenen STAT1-Promotors exprimiert.





**Abb. 4.37. Knock-in Strategie zur genomischen Integration der STAT1-E<sup>705</sup>Q Mutation in Mäusen.** Schematische Darstellung der homologen Rekombination des STAT1-Lokus mit der Gen-Fähre pPNT-frt3-STAT1-E<sup>705</sup>Q. Die Restriktions-Schnittstellen zur Klonierung des 5'-Homologiearmes (Xho I/BamH I) und des 3'-Homologiearmes (Kpn I) in die Gen-Fähre pPNT-frt3 sind eingezeichnet. Die für die *Southern Blot*-Analyse relevanten Pst I-Schnittstellen sind grau unterlegt. Nach erfolgter homologer Rekombination (gestrichelte Linien) ist das Restriktions-Schnittmuster der genomischen DNS nach Pst I-Verdau durch eine zusätzliche Schnittstelle in dem Neomycin-Gen gegenüber dem WT-Lokus verändert. In der Southern Blot Analyse mit der radioaktiv markierten Sonde S erscheint das Neo-frt3 Fragment als eine schneller migrierende Bande (rechts).

Der STAT1-Lokus der Maus befindet sich auf dem Chromosom 2 und umspannt 25 Exons, wobei die Aminosäure Glu<sup>705</sup> durch das Exon 23 codiert wird (Abb. 4.37). Bei der hier verwendeten *Knock-in* Strategie wurde das genomische Exon 23 mit dem analogen für Gln<sup>705</sup> codierenden Exon ersetzt (Triplet GAG→CAG). Der Vorteil dieser Strategie besteht in der Regulation des nicht sumolierten STAT1-E<sup>705</sup>Q von dem natürlichen STAT1-Promotor aus. Die Generierung einer *Knock-in* Maus erfordert ein Rekombinations-Konstrukt, mit dem die modifizierte DNS-Sequenz in das Genom von murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) integriert werden kann. Bei dem hier verwendeten FLP/frt3-Rekombinase System enthält dieses Konstrukt, neben dem Gen für eine virale Thymidinkinase, die modifizierte aber ansonsten homologe genetische Information des Gen-Lokus, welche zusätzlich in einem Intron-Bereich von einem mit frt3-Rekombinations-Sequenzen flankierten Resistenzgen unterbrochen wird (vgl. Abb. 4.37). Das Ziel ist der Austausch der genetischen Information zwischen Gen-Fähre und genomischer DNS der ES-Zellen durch homologe Rekombination, bei der die modifizierte genetische Information inklusive eines Resistenzgens in das Zellgenom integriert wird, jedoch nicht der Rest des Rekombinations-Konstrukt inklusive des Thymidinkinasegens. Anschließend bedingt die Seltenheit erfolgreicher Rekombinations-Ereignisse eine duale Selektion der Zellen. Durch Verwendung eines Antibiotikum-haltigen

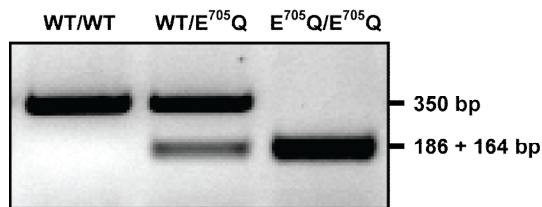
Mediums können die Zellen positiv selektiert werden, welche das Rekombinations-Konstrukt mit dem entsprechenden Resistenzgen in das Zellgenom integriert haben. Die oft vorkommende aber unerwünschte vollständige Integration des Rekombinations-Konstrukts kann durch eine parallele Gancyclovir-Behandlung negativ selektiert werden. In diesem Fall katalysiert die exprimierte virale Thymidinkinase spezifisch die Phosphorylierung des für eukaryotische Zellen unschädlichen Substrates Gancyclovir. Das Produkt ist ein für die Zelle toxisches Nukleotid-Analogon, welches zum Absterben mitotischer Zellen führt (Heyman et al. 1989). Die doppelt selektierten ES-Zellen werden daraufhin vermehrt und danach in Blastozysten von C57Bl/6-Mäusen eingesetzt, welche zu chimären Mäusen heranwachsen. Die Nachkommen der anschließenden Verpaarung einer chimären mit einer WT-Maus werden auf die Keimbahntransmission der Mutation hin untersucht und selektiert. Das nun nicht mehr benötigte Resistenzgen wird durch Verpaarung mit einer FLP-Rekombinase exprimierenden Maus-Linie (Rodriguez et al. 2000) entfernt. Für die Mutation homozygote Tiere werden anschließend durch die Verpaarung von Heterozygoten erzeugt.

Für die Herstellung des Rekombinations-Konstruktes wurde die genomische DNS-Sequenz von Maus-STAT1 in Form des PAC-Klones *RPCI-21 209N6* vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) erworben. Mit Hilfe der Primer MD8 und MD13 wurde zunächst der 3'-Homologiearm mit dem Exon 24 (vgl. Abb. 4.37) in einer PCR-Reaktion amplifiziert (3.1.6) und nach Kpn I-Verdau in den Vektor pBS-KS<sup>-</sup> zwischenkloniert (3.1.8-9). Analog wurde in einer weiteren PCR-Reaktion mit den Primern B343 und B344 der 5'-Homologiearm mit den Exons 20-23 (vgl. Abb. 4.37) amplifiziert und nach einem Xho I-Verdau in den Vektor pBS-KS<sup>-</sup> zwischenkloniert. Die Einführung der E<sup>705</sup>Q Mutation erfolgte danach durch eine Mutagenese (3.1.7) mit den Primern B347 und B348. Für die Herstellung des Rekombinations-Konstruktes wurde von Dr. Klaus-Peter Knobloch (Universität Freiburg) freundlicherweise das Plasmid pPNT-frt3 zur Verfügung gestellt, welches das Thymidinkinase-Gen des *Herpes Simplex Virus* (HSV-tk) und ein von frt3-Rekombinations-Sequenzen flankiertes Neomycin-Geneticin-Resistenzgen besitzt. Zunächst wurde der 3'-Homologiearm durch einen Kpn I-Verdau wieder aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und 3'-terminal vom Neomycin-Gen in den pPNT-frt3 Vektor kloniert (3.1.8-9). Anschließend erfolgte die Klonierung des modifizierten 5'-Homologiearmes, welcher nach einem sequentiellen Xho I/BamH I-Verdau 5'-terminal zum Neomycin-Gen eingesetzt wurde (Abb. 4.37). Nach der Sequenz-Verifizierung der genomischen DNS-Bereiche wurden 50 µg des gereinigten Rekombinations-Konstruktes durch Restriktion mit Not I (150 U) für

5 h bei 37 °C linearisiert (siehe 3.1.8) und die DNS mit einer Chloroform/Phenol-Fällung aufgereinigt und in sterilem PBS aufgenommen. Für die Integration der genomischen STAT1-E<sup>705</sup>Q-DNS wurden embryonale Stammzellen des Typs Sv129/ola (Subklon E14.1) von Dr. Klaus-Peter Knobeloch (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt (siehe auch 3.3.8). Die homologe Rekombination wurde induziert indem  $2 \cdot 10^7$  ES-Zellen mit 20 µg des mit Not I-linearisierten Rekombinations-Konstrukts pPNT-frt3-STAT1-E<sup>705</sup>Q elektroporiert (400V, 250 µF, 3,2 s) wurden. Nach der positiven und negativen Selektion mit dem Antibiotikum Geneticin (280 µg/ml) und Gancyclovir (2 µM) wurden insgesamt 264 einzelne ES-Zell-Klone isoliert (siehe auch 3.3.8). Nach ihrer Vermehrung wurde jeweils ein Teil der ES-Zellkolonien für die mögliche spätere Verwendung auf Trockeneis eingefroren, der andere Teil für die Selektion der Klone mit korrekt erfolgter homologer Rekombination verwendet. Dafür wurde zunächst die genomische DNS der einzelnen Klone isoliert und danach mit dem Enzym Pst I geschnitten (siehe 3.1.8). Unter Verwendung der <sup>32</sup>P-markierten Sonde S, welche einen genomischen Sequenzabschnitt außerhalb des homolog rekombinierten Bereiches erkennt, konnte per *Southern Blot*-Analyse eine Differenzierung zwischen korrekter homologer Rekombination und einer Zufalls-Integration des Rekombinations-Konstrukts erfolgen (siehe 3.1.12). Nur bei der korrekten homologen Rekombination des STAT1-Lokus entsteht durch die zusätzliche vorhandene Pst I-Schnittstelle im Neomycin-Gen ein verkürztes 4,7 kb Fragment, welches sich von dem 5,2 kb des WT-Lokus unterscheidet (Abb. 4.37).

Auf diese Weise konnten 2 positive ES-Zellklone isoliert werden, wobei der Klon B4 für die nächsten Schritte wieder aufgetaut und vermehrt wurde. Das Einsetzen dieser ES-Zellen in Blastozysten von C57Bl/6-Mäusen wurde von Dipl.-Ing. Ronald Naumann am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden durchgeführt. Die Blastozysten wurden danach Ammentieren eingesetzt, welche chimäre Nachkommen produzierten. Diese wurden anschließend mit FLP-Rekombinase exprimierenden *FLP-deleter* Mäusen verpaart (Rodriguez et al. 2000), um das nun nicht mehr benötigte Neomycin-Resistenzgen in dem Intron 23 zu entfernen. Die resultierenden Nachkommen wurden auf die Keimbahn-Transmission der E<sup>705</sup>Q-Mutation hin untersucht und untereinander bis zur Homozygotie hin verpaart. Für die Genotypisierung wurde in einer PCR-Reaktion mit den Primern B349 und B350 das Exon 23 der genomischen DNS amplifiziert. Durch die Mutation des für die Aminosäure 705 kodierenden Basentriplets von GAG→CAG wurde eine zusätzliche Hinf I-Restriktionsschnittstelle generiert. Durch die Restriktion mit Hinf I konnte nach der anschließenden Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2%-igen Agarosegel durch eine

RFLP-Analyse (Restriktions-Fragments-Längen-Polymorphismus) die verschiedenen Genotypen identifiziert werden (Abb. 4.38). Alternativ erfolgte die Sequenzierung des nicht Hinf I-geschnittenen PCR-Produktes mit dem Primer B349.



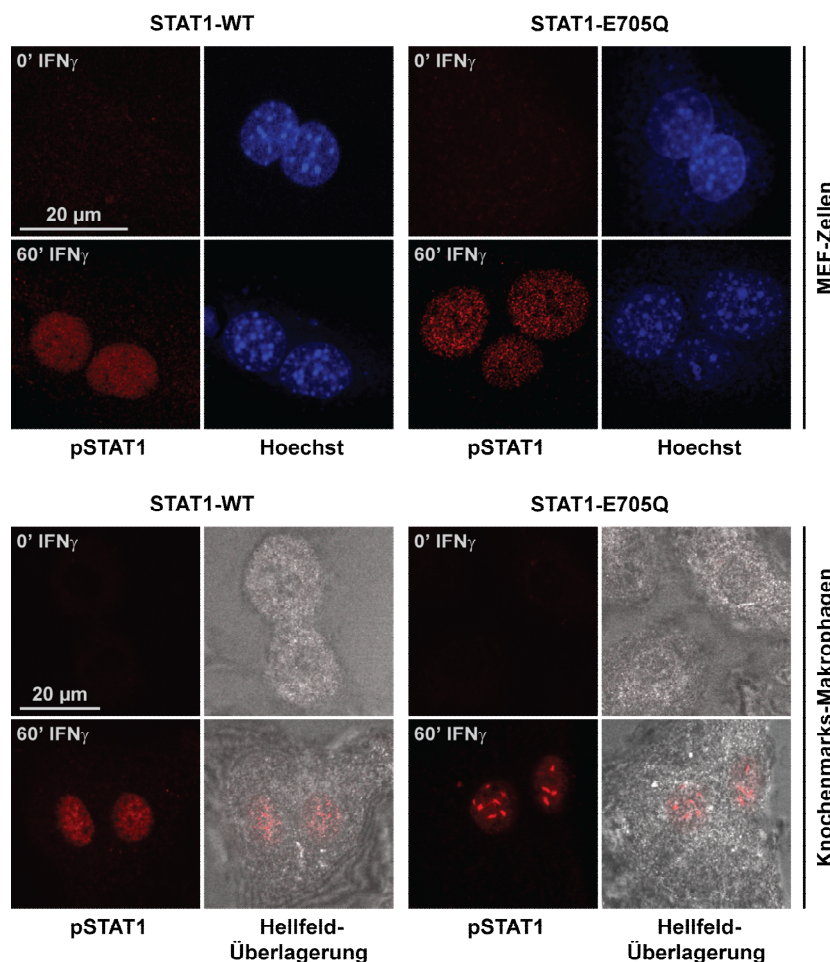
**Abb. 4.38. RFLP-Analyse zur Bestimmung der genomischen STAT1-E<sup>705</sup>Q-Mutation.** Die genomische DNS der zu genotypisierenden Maus wurde aus einer Ohr-Biopsie isoliert. Ein 350 bp großer Bereich, welcher die STAT1-E<sup>705</sup>Q-Mutation umfasst, wurde durch eine *Nested*-PCR mit den Primern B349 und B350 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend durch Zugabe von 3 U Hinf I-

Enzym für 2 h bei 37 °C verdaut und die DNS-Fragmente mittels 2%-iger Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Einführung der E<sup>705</sup>Q-Mutation führte zu der Generierung einer Hinf I-Schnittstelle, aufgrund dessen das 350 bp große PCR-Produkt (WT/WT) in 2 Fragmente geschnitten wird, welche aufgrund Ihrer ähnlichen Fragmentlänge als eine Bande erscheinen (E<sup>705</sup>Q/E<sup>705</sup>Q).

#### **4.5.2 Die Sumolierung von STAT1 reduziert die Sensitivität von Knochenmarks-Makrophagen gegenüber IFN $\gamma$**

Die Haltung der generierten transgenen *Knock-in* Maus-Linie STAT1-E<sup>705</sup>Q sowie der zu Vergleichszwecken mitgeführten STAT1-WT-Linie, erfolgte unter SPF-Bedingungen (Spezifisch Pathogen Frei) in Isolator-Käfigen der Firma *PFI Systems* (Milton Keynes, UK) im Tierstall des *Queens Medical Centre's* (Nottingham, UK). Bis Dezember 2010 wurden nach der Verpaarung von heterozygoten Tieren bei 131 Nachkommen der Genotyp bestimmt, deren Homozygot:Heterozygot:WT-Verhältnis mit 20% : 55% : 25% annähernd eine Mendel-Verteilung ergab. Zusätzlich wurden 33 für die E<sup>705</sup>Q-Mutation homozygote Tiere aus reinen Homozygot-Verpaarungen gewonnen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zunächst nur die Charakterisierung der transgenen *Knock-in* Tiere auf zellulärer Ebene. Dafür wurden MEF-Zellen und Knochenmarks-Makrophagen von den Tieren präpariert und anschließend in funktionalen Experimenten analysiert. Für die Gewinnung von MEF-Zellen wurden aus einem trächtigen Weibchen einer rein Heterozygot-Verpaarung 13,5-Tage alte Embryonen isoliert und nach Abtrennung von Kopf und Gliedmaßen Fibroblasten in Kultur genommen (siehe 3.3.4). Nach der Genotypisierung wurden für Versuche Zellen von Wurfgeschwistern verwendet, welche entweder STAT1-WT oder SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q unter der Kontrolle des endogenen STAT1-Promotors exprimierten. Für die Gewinnung von Makrophagen wurde zunächst das Knochenmark adulter Tiere isoliert. Nach Vereinzelung der Zellen und Kultivierung für 8 Tage in „L Zell-konditioniertem Medium“ (Davies und Gordon 2005), differenzierten die Zellen zu Knochenmarks-Makrophagen (siehe 3.3.5).

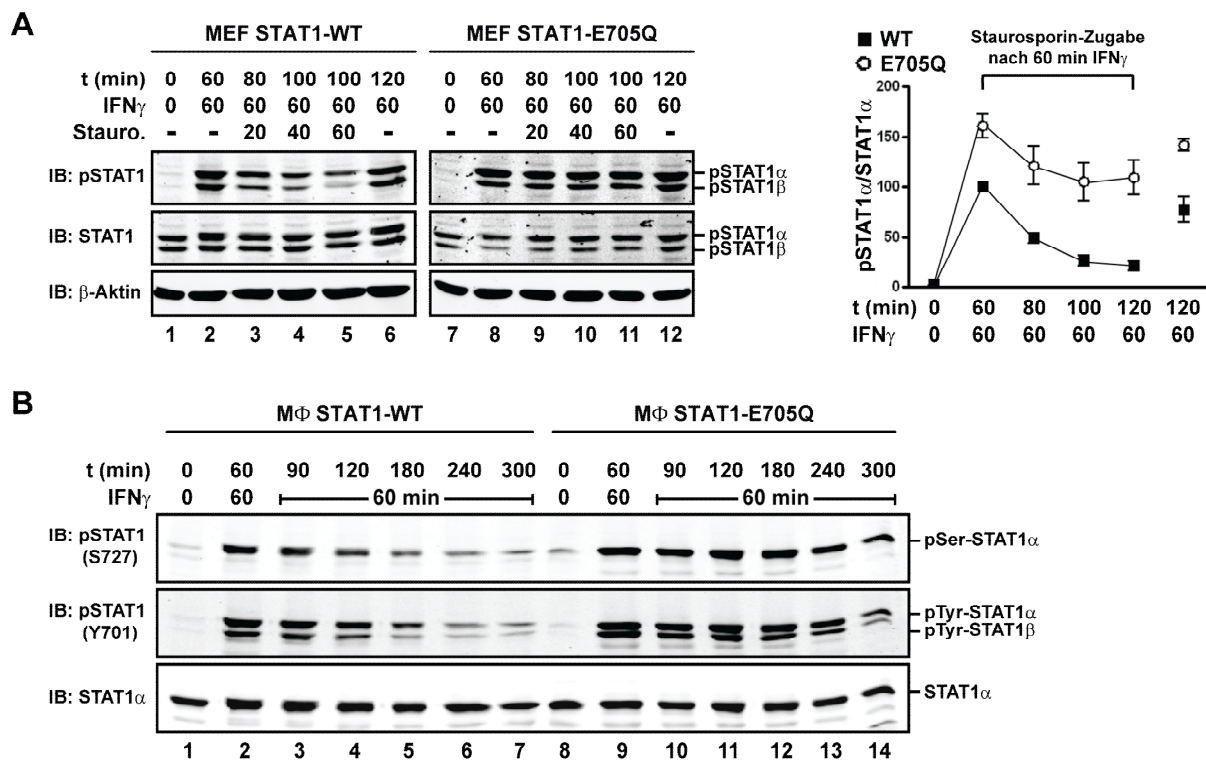
Als erstes wurde der Einfluss der verhinderten STAT1-Sumolierung auf die Bildung der Parakristalle in Antwort auf mIFN $\gamma$ -Stimulation untersucht. Mehrere Fixierungs-Methoden und STAT1-Antikörper wurden für den immunozytochemischen Nachweis getestet. Jedoch war ein Großteil der Antikörper aufgrund unspezifischer oder unzureichender Anfärbung nicht für die Detektion von mSTAT1 geeignet, u.a. die Antikörper C24, M23, SM2 und M22 der Firma *Santa Cruz* (Santa Cruz, USA) sowie die Antikörper #9172 und #9175 der Firma *Cell Signaling* (Danvers, USA). Einzig der pSTAT1-Antikörper der Firma *Cell Signaling* (Danvers, USA) wurde positiv getestet, welcher bereits mehrfach in dieser Arbeit für die immunozytochemische Detektion von humanen pSTAT1 eingesetzt wurde (vgl. Abb. 4.3, 4.7 und 4.8).



**Abb. 4.39. Die Sumolierung verhindert die Bildung von Parakristallen auch unter der Kontrolle des endogenen STAT1-Promotors.** MEF-Zellen (oben) bzw. Knochenmarks-Makrophagen (unten), welche entweder STAT1-WT oder SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimieren, wurden unbehandelt belassen oder für 60 min mit mIFN $\gamma$  stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit -20 °C-kaltem Methanol wurde pSTAT1 immunozytochemisch angefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte entweder mit Hoechst-33258 (5 min, 1:10000, RT) oder im Hellfeld (unten). Die Analyse der subzellulären Verteilung erfolgte am Konfokal-Mikroskop.

Für die folgende immunozytochemische Detektion von pSTAT1 (siehe 3.2.8-9) wurden MEF-Zellen bzw. Knochenmarks-Makrophagen, welche entweder STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierten, für 1 h mit mIFN $\gamma$  stimuliert. Im Ruhezustand der Zellen konnte erwartungsgemäß kein pSTAT1 detektiert werden. Nach der Stimulation mit mIFN $\gamma$  zeigten

die Zellen unabhängig vom Genotyp ein deutliches pSTAT1-Signal, welches sich im Zellkern außerhalb der Nukleoli verteilte (Abb. 4.39). Während die Verteilung des Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1 in den Zellkernen von STAT1-WT exprimierenden MEF-Zellen homogen war (Abb. 4.39, oben links), zeigten STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierende MEF-Zellen eine konzentrierte Lokalisation von pSTAT1 in kleinen punktförmigen Parakristallen (Abb. 4.39, unten links). Dieser Effekt war bei STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Knochenmarks-Makrophagen noch ausgeprägter, wo langgestreckte nadelförmige Parakristalle beobachtet werden konnten (Abb. 4.39, unten rechts). Somit führt die Sumolierung von STAT1 auch unter der Kontrolle des natürlichen STAT1-Promotors zur Auflösung von STAT1-Parakristallen.

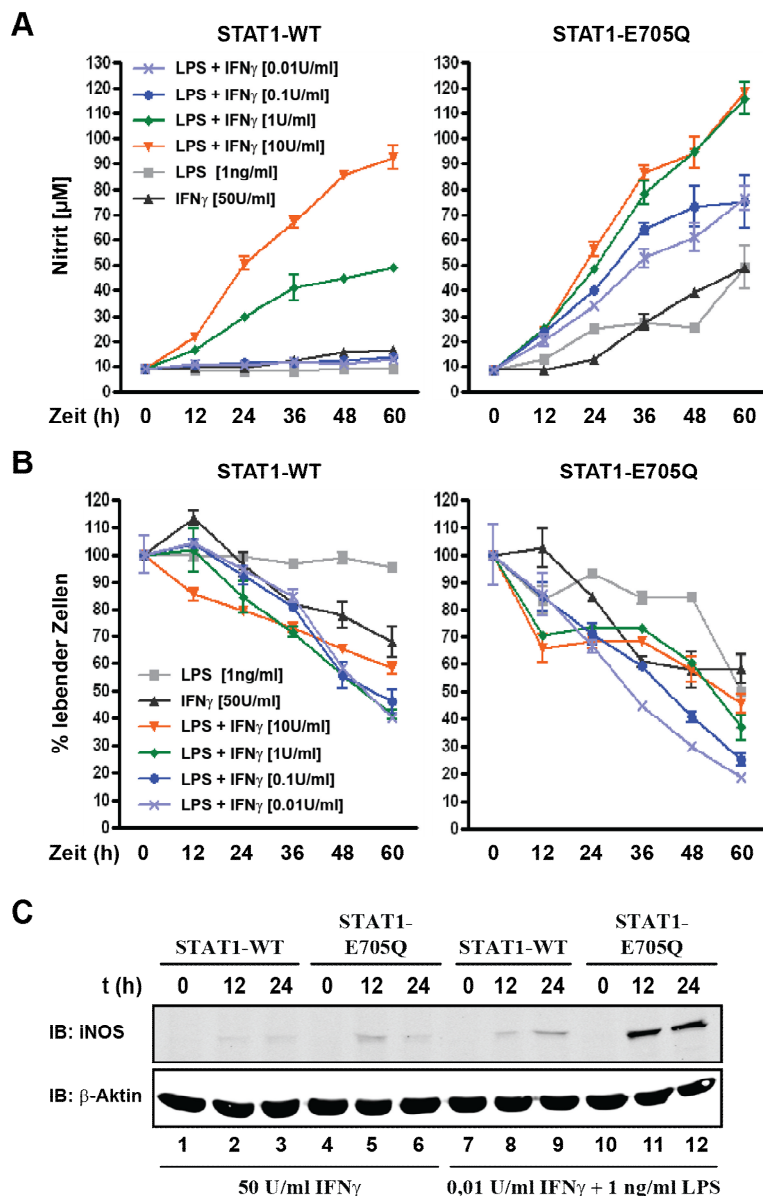


**Abb. 4.40. Die Sumolierung von STAT1 beschleunigt die Kinetik der Tyr<sup>701</sup>-Dephosphorylierung auch unter der Kontrolle des endogenen STAT1-Promotors. (A)** Primäre MEF-Zellen von Wurfgeschwistern, welche entweder STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierten, wurden für 60 min mit mIFN<sub>γ</sub> stimuliert, gefolgt von einer Staurosporin-Behandlung für unterschiedlich lange Zeiträume. Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1, STAT1 (E23) und β-Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen (links). Die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 wurde als Mittelwert ± SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt (rechts). **(B)** Knochenmarks-Makrophagen (MΦ) von Wurfgeschwistern, welche entweder STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimieren, wurden für 60 min mit mIFN<sub>γ</sub> stimuliert, mit PBS gewaschen und anschließend für unterschiedlich lange Zeiträume in Voll-Medium inkubiert. Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden pSTAT1(S727), pSTAT1(Y701) und STAT1 (M23) immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen.



Nachdem in 4.4.1 der schützende Einfluss der Parakristalle vor der STAT1-Dephosphorylierung gezeigt werden konnte, wurde als nächstes die Kinetik der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung untersucht. MEF-Zellen, welche entweder STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierten, wurden für 1 h mit mIFN $\gamma$  stimuliert. Durch die anschließende Inkubation mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin wurde die Kinetik der STAT1-Dephosphorylierung untersucht (siehe 3.2.5). Im Ruhezustand der Zellen konnte mit beiden Genotypen abermals kein Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1 beobachtet werden (vgl. Abb. 4.2 und 4.31 mit 4.40). Nach erfolgter mIFN $\gamma$ -Stimulation wurde die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1-WT induziert, welche aber gegenüber der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1-E<sup>705</sup>Q deutlich abgeschwächt war (Abb. 4.40A). Diese Beobachtung deckt sich mit der Untersuchung der STAT1-Phosphorylierung in rekonstituierten U3A-Zellen (vgl. Abb. 4.2 und 4.31). Die anschließende Behandlung der Zellen mit Staurosporin führte bei STAT1-WT zu einer zügigen Reduktion der spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von anfänglich 100 auf letztendlich  $20,4 \pm 5,1$  (Abb. 4.40A rechts, vgl. Bahnen 2 und 5). Im Gegensatz dazu war STAT1-E<sup>705</sup>Q vor der Dephosphorylierung geschützt. Zwar wurde die spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung in den ersten 20 min der Staurosporin-Behandlung von relativen  $160,5 \pm 12,3$  auf  $121,2 \pm 19,9$  reduziert (Abb. 4.40A rechts, vgl. Bahn 2 und 3), sank aber in den nächsten 40 min nicht weiter ab und stabilisierte sich bei  $109,1 \pm 17,4$  (Abb. 4.40A rechts, Bahn 4 und 5). Der schützende Effekt der Parakristalle vor der STAT1-Dephosphorylierung zeigte sich demnach auch in MEF-Zellen, welche aus der transgenen STAT1-E<sup>705</sup>Q *Knock-in* Maus gewonnen wurden. Ein ähnliches Bild zeigte sich, als die natürliche STAT1-Dephosphorylierung in Knochenmarks-Makrophagen in Antwort auf mIFN $\gamma$  verfolgt wurde. Dazu wurden Knochenmarks-Makrophagen, welche entweder STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierten, nach einer 60-minütigen mIFN $\gamma$ -Stimulation einmal mit PBS gewaschen und danach für unterschiedlich lange Zeiten in Vollmedium weiter inkubiert. Während bei STAT1-WT exprimierenden Makrophagen die durch mIFN $\gamma$  induzierte Tyr<sup>701</sup>- und Ser<sup>727</sup>-Phosphorylierung (Abb. 4.40B, Bahn 3) nach 3 h kaum noch zu beobachten war (Abb. 4.40B, Bahn 11), zeigte STAT1-E<sup>705</sup>Q nach 3 h immer noch eine robuste STAT1-Phosphorylierung (Abb. 4.40B, vgl. Bahn 4 und 12). Demzufolge wurde der Einfluss der Sumolierung auf die Bildung von STAT1-Parakristallen und die damit verbundene Beschleunigung der Dephosphorylierungs-Kinetik auch unter der Kontrolle des endogenen STAT1-Promotors im transgenen Tier-Modell bestätigt. Zusätzlich konnte der schützende Effekt der Parakristalle auf die Ser<sup>727</sup>-Phosphorylierung von STAT1 erweitert werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten deutlich, dass bei einer verminderten Lys<sup>703</sup>-Sumolyerung von STAT1, die Stimulation von Zellen mit IFN $\gamma$  zu einer deutlich verbesserten und verlängerten STAT1-Aktivierung führt. Weiterhin gilt IFN $\gamma$  als eines der wichtigsten Makrophagen-aktivierenden Zytokine (Virelizier & Arenzana-Seisdedos 1985) und induziert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), welches eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Tumorzellen (Keller et al. 1990) und bei der Kontrolle von Infektionen (Meraz et al. 1996) spielt. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) der Makrophagen katalysiert dabei die massive NO-Produktion, welche zytotoxisch auf Zellen wirkt (Albina et al. 1993, MacMicking et al. 1997). Ein wichtiger Ko-Aktivatoren der Makrophagen sind Lipopolysaccharide (LPS), welche ein integraler Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien sind (Dumont et al. 1990, Kilian et al. 1995).



**Abb. 4.41. Die Sumolyerung von STAT1 reduziert die Sensitivität von Knochenmarks-Makrophagen gegenüber IFN $\gamma$ .** Knochenmarks-Makrophagen, welche entweder STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimieren, wurden von 17 Wochen alten Wurfgeschwistern isoliert und entweder unbehandelt belassen oder für die angegebenen Zeiten mit mIFN $\gamma$ , LPS, oder einer Kombination von beiden stimuliert. (A) Der Nitrit-Gehalt der jeweiligen Zell-Überstände wurde anschließend mit Hilfe des Griess-Reagens bestimmt und unter Verwendung einer Eichgerade die Konzentration berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten. (B) Korrespondierende Lebensfähigkeit der Zellen, welche nach ihrer Fixierung mit Kristallviolett bestimmt wurde. (C) Knochenmarks-Makrophagen wurden wie angegeben mit mIFN $\gamma$  oder mIFN $\gamma$ /LPS behandelt. Nach Herstellung von Gesamtzell-Extrakten und 7%-iger SDS-PAGE wurden iNOS und  $\beta$ -Aktin immunchemisch auf derselben Nitrozellulose-Membran nacheinander nachgewiesen.



Um die physiologischen Auswirkungen der durch die STAT1-Sumolierung regulierten STAT1-Aktivierung zu untersuchen, wurde ein Zytotoxizitäts-Experiment mit Makrophagen durchgeführt, bei dem die NO-Produktion in Antwort auf IFN $\gamma$  und einer niedrigen LPS-Konzentration verfolgt wurde. Dazu wurden Knochenmarks-Makrophagen in 96-Loch Zellkulturschalen kultiviert ( $1 \times 10^4$  Zellen pro Loch), welche entweder STAT1-WT oder STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierten. Nach einer 24-stündigen Ruhephase wurden die Zellen mit einer Kombination aus 1 ng/ml LPS und verschiedenen IFN $\gamma$ -Konzentrationen für bis zu 60 h stimuliert. Parallel wurden mit 1 ng/ml LPS oder mit 50 U/ml IFN $\gamma$  allein behandelte Makrophagen als Kontrolle mitgeführt. Nach der Inkubation wurde die NO-Produktion der Makrophagen durch die Verwendung des Griess-Tests indirekt bestimmt (siehe 3.3.7). Bei dieser etablierten Nachweismethode wird die Konzentration des Folgeprodukts Nitrit im Zellüberstand bestimmt, welches nach Zugabe von Sulfanilamid und Naphthylethylendiamin zu einem rötlichen Dioazonium-Salz reagiert und im Photospektrometer bei 550 nm quantifiziert werden kann (Guevara et al. 1998). Zusätzlich wurde die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen nach ihrer Fixierung durch die Verwendung des *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay*-Kits bestimmt, welches den ATP-Gehalt von metabolisch aktiven Zellen misst (siehe 3.3.7). Die Stimulation von STAT1-WT exprimierenden Makrophagen mit LPS oder mIFN $\gamma$  allein führte nicht zu einer Aktivierung und die Nitrit-Konzentration blieb konstant niedrig bei  $\sim 10 \mu\text{M}$  (Abb. 4.41A, links). Auch die Ko-Stimulation mit LPS und niedrigen Konzentrationen an mIFN $\gamma$  reichte für eine Aktivierung nicht aus. Erst bei Verwendung von 1 U/ml und 10 U/ml mIFN $\gamma$  konnte ein Anstieg der Nitrit-Konzentration über den Zeitverlauf beobachtet werden (Abb. 4.41A, links), welche nach 60-stündiger Ko-Stimulation von 10 U/ml mIFN $\gamma$  mit  $\sim 90 \mu\text{M}$  den höchsten Wert erreichte. Die Lebensfähigkeit der STAT1-WT exprimierenden Makrophagen wurde durch Behandlung mit LPS alleine nicht beeinträchtigt, während das Vorhandensein von mIFN $\gamma$  die Zellpopulation bereits auf 75% des Ausgangswertes reduzierte (Abb. 4.41B, links). Dieser Wachstumsdefekt wurde in Übereinstimmung mit anderen Studien (Zhuang und Wogan 1997) durch eine erhöhte NO-Produktion noch verstärkt. Die Ko-Stimulation der STAT1-WT-Makrophagen mit LPS und IFN $\gamma$  reduzierte die Zellpopulation auf  $\sim 50\%$  des Ausgangswertes (Abb. 4.41B, links). Bermerkenswerterweise reagierten die STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Makrophagen deutlich sensibler und stärker auf die Behandlung. Bereits die alleinige Stimulation mit LPS oder mIFN $\gamma$  führte zu einer Nitrit-Konzentration von  $\sim 50 \mu\text{M}$  nach 60 h, eine Menge die STAT1-WT exprimierenden Makrophagen erst nach Ko-Stimulation mit 1 U/ml mIFN $\gamma$  erreichten (vgl. Abb. 4.41A, links und

rechts). Die Ko-Stimulation mit mIFN $\gamma$  führte zu einer robusten Aktivierung der Makrophagen, welche nach 60-stündiger Behandlung bereits mit den niedrigen Konzentrationen von 0,01 bzw. 0,1 U/ml eine Nitrit-Konzentration von  $\sim 75 \mu\text{M}$  und für 1 bzw. 10 U/ml mIFN $\gamma$   $\sim 115 \mu\text{M}$  ergab (Abb. 4.41A, rechts). Da NO in hohen Konzentrationen toxisch auf Zellen wirkt (Zhuang & Wogan 1997), wurden in Einklang mit den erhöhten Nitrit-Konzentrationen im Überstand der STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Makrophagen deutlich weniger metabolisch aktive Zellen beobachtet, welche nur noch 20-50% des Ausgangswertes ausmachten (Abb. 4.41B, rechts). Die erhöhte Sensitivität der STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Makrophagen gegenüber mIFN $\gamma$  konnte ebenfalls auf Proteinebene, durch den immunchemischen Nachweis der iNOS-Expression, gezeigt werden. Nach 12 bzw. 24 h Ko-Stimulation von Zellen mit 1 ng/ml LPS und 0,01 U/ml mIFN $\gamma$  zeigten STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Makrophagen eine robuste Induktion der iNOS-Expression gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 4.41C, Bahn 11 und 12), währenddessen in STAT1-WT exprimierenden Makrophagen kaum eine Expression von iNOS zu detektieren war (Abb. 4.41C, Bahn 8 und 9). Dieser Effekt war in abgeschwächter Form bereits in Makrophagen zu beobachten, welche nur mit 50 U/ml mIFN $\gamma$  stimuliert waren (Abb. 4.41C, Bahnen 1-6). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Sumolierung von STAT1 nicht nur die Sensitivität von Knochenmarks-Makrophagen gegenüber mIFN $\gamma$  reduziert, sondern auch genregulatorische Effekte ausübt, die das Expressionsmuster von Proteinen in der Zelle verändert.

## **5. Diskussion**

Die Aktivität von STAT1 wird über mehrere unabhängige Mechanismen positiv und negativ gesteuert (Levy & Darnell 2002). Dabei spielen posttranslationale Modifikationen des Transkriptionsfaktors eine tragende Rolle. Unter anderem erfordert die vollständige transkriptionelle Aktivierung von STAT1 dessen Tyr<sup>701</sup>- und Ser<sup>727</sup>-Phosphorylierung (Zhang et al. 1995, Decker & Kovarik 2000). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss der Sumolierung, einer weiteren posttranslationalen Modifikation, auf die Aktivität von STAT1. Die SUMO-Modifikation von STAT1 wurde 2003 zum ersten Mal beschrieben (Rogers et al. 2003) und als eine zusätzliche Ebene der Regulation von STAT1 vorgeschlagen (Ungureanu et al. 2003, Ungureanu et al. 2005). Jedoch blieb die physiologische Relevanz umstritten und die Sumolierung von STAT1 wurde als eine Modifikation beschrieben, die „unwahrscheinlich ist, eine wichtige Rolle bei der Regulation der STAT1-Aktivität *in vivo* zu spielen“ (übersetzt aus Song et al. 2006).

### **5.1 Die SUMO-Modifikation reduziert die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der SUMO-Modifikation für die Regulation des Transkriptionsfaktors STAT1 näher untersucht, im Besonderen die Beeinflussung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung. Bisherige Studien untersuchten die Bedeutung der STAT1-Sumolierung anhand von SUMO-freien STAT1-Mutanten (Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2005, Song et al. 2006), u.a. durch die Mutation des SUMO-Akzeptorlysins (K<sup>703</sup>R), als auch mit der SUMO-Konsensus zerstörenden Mutante E<sup>705</sup>A. Allerdings wurde gegenüber dem sumolierten STAT1-WT entweder eine unveränderte (Ungureanu et al. 2005) bzw. eine verminderte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (Song et al. 2006) der SUMO-freien Mutanten festgestellt. Diese frühen Beobachtungen stehen im Widerspruch zu dem mit STAT1-Ubc9 Fusionsproteinen festgestellten gegenseitigen Ausschluss von Lys<sup>703</sup>-Sumolierung und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (Jakobs et al. 2007, Zimnik et al. 2009), welcher im Rahmen dieser Arbeit und der assoziierten Veröffentlichung auch auf nicht fusioniertes STAT1 erweitert werden konnte (Abb. 4.20; Droescher et al. 2011, Fig. S4B). Demnach hätte die Verhinderung der STAT1-Sumolierung eine verbesserte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung zur Folge haben müssen. Zusätzlich ließen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der transkriptionellen Aktivität des SUMO-freien STAT1 bereits Zweifel an der Tauglichkeit der verwendeten Mutanten aufkommen. Obwohl die STAT1-Mutanten K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A beide nicht mehr

sumoliert wurden, induzierte STAT1-K<sup>703</sup>R in MEF-Zellen eine stark reduzierte, STAT1-E<sup>705</sup>A jedoch eine signifikant verbesserte Genexpression von *IRF1* und *GBP1* gegenüber dem Wildtyp (Song et al. 2006). Die Umgebung der für die Aktivierung von STAT1 wichtigen Aminosäure Tyr<sup>701</sup> ist im Verlauf der Evolution stark konserviert geblieben (Abb. 1.5). Wichtigerweise liegt der SUMO-Konsensus von STAT1 (Aminosäuren 702-705) in enger räumlicher Nähe zu dem konservierten Tyr<sup>701</sup> (Abb. 1.5). Die Bedeutung der strukturellen Integrität dieser Umgebung wurde bereits anhand der in einem Patienten beobachteten STAT1-Mutation L<sup>706</sup>S erkannt, welche zu einer stark verminderten Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 führt (Chapgier et al. 2006). Auch die in bisherigen Studien verwendeten STAT1-Mutanten des SUMO-Konsensus übten einen SUMO-unabhängigen Einfluss auf die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 aus. Im Fall der bisher publizierten STAT1-Mutationen K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A konnte hier gezeigt werden, dass die mit der fehlenden Sumolierung assoziierten regulatorischen Effekte (Abb. 4.6 und 4.35) durch eine parallel beeinträchtigte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 (Abb. 4.2) maskiert wurden. Demnach stellen diese STAT1-Mutanten kein geeignetes Mittel, um den spezifischen Einfluss der Sumolierung auf die Regulation von STAT1 zu untersuchen.

In einem alternativen Ansatz wurde in dieser Arbeit die STAT1-Mutation E<sup>705</sup>Q erstmalig beschrieben. Dabei wurde der SUMO-Konsensus von STAT1 distal von dem konservierten Tyr<sup>701</sup> in der bestmöglichen strukturerhaltenden Weise mutiert. Durch den Austausch des Glutamats<sup>705</sup> durch das strukturell verwandte Glutamin wurde lediglich eine Ladungsänderung in die STAT1-Struktur eingeführt. Dennoch reichte diese strukturell moderate Mutation aus, um die SUMO-Konjugation von STAT1 vollständig zu unterbinden (Abb. 4.1). Bedeutenderweise konnte nun keine Beeinträchtigung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung mehr festgestellt werden. Im Gegenteil, das SUMO-freie STAT1-E<sup>705</sup>Q wies gegenüber dem sumolierten STAT1-WT eine verbesserte spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung auf (Abb. 4.2). Ein Effekt, der aufgrund des gegenseitigen Ausschlusses von STAT1-Sumolierung und Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung erwartet wurde (Jakobs et al. 2007, Zimnik et al. 2009, Droescher et al. 2011). Mögliche SUMO-unabhängige Ursachen, welche eine verbesserte spezifische Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung der Mutante zur Folge hätten, konnten ausgeschlossen werden. Sowohl das Dimerisierungs-Verhalten als auch die Stabilität der DNS-Bindung (Meyer et al. 2003) der STAT1-Mutante waren mit dem Wildtyp-Protein vergleichbar (4.1.2). Mit Hilfe des SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q war es nun erstmalig möglich, die spezifischen Effekte der SUMO-Konjugation von STAT1 zu untersuchen.

### 5.2 Aktiviertes STAT lokalisiert in nukleären Parakristallen

Die Sumolierung von Transkriptionsfaktoren wurde bereits mehrfach mit einer geänderten subzellulären Verteilung des SUMO-konjugierten Proteins in Verbindung gebracht, in deren Folge auch die Funktionalität des Transkriptionsfaktors moduliert wurde (Sachdev et al. 2001, Chalkiadaki & Talianidis 2005). Das Promyelotische Protein (PML) und die zytoplasmatische GTPase RanGAP1 sind dafür prominente Beispiele (Seeler & Dejean 2001, Matunis et al. 1996). Für die transkriptionelle Aktivität von STAT1 ist dessen Zytokin-induzierte Kernlokalisation von großer Bedeutung. Im Ruhezustand der Zelle überwiegt die Exportrate den Import von STAT1, welches in einer zytoplasmatische Verteilung von STAT1 resultiert (Meyer et al. 2004). Nach der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung erfolgt zusätzlich ein energieabhängiger Import des phosphorylierten STAT1 (Sekimoto et al. 1996), woraufhin STAT1 innerhalb kurzer Zeit im Zellkern akkumuliert (Zhang et al. 1995, Meyer et al. 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sumolierung ebenfalls die subzelluläre Lokalisation von STAT1 beeinflusst. Jedoch hatte die Verhinderung der STAT1-Sumolierung weder einen Einfluss auf die Ruheverteilung von STAT1 noch auf die Zytokin-induzierte Akkumulation im Zellkern. Allerdings lokalisierte SUMO-freies STAT1 nach ca. 30-minütiger IFN $\gamma$ -Behandlung nun zusätzlich in distinkten Strukturen im Zellkern (4.2.1), welche als Parakristalle identifiziert wurden (4.2.3). Dabei war die Bildung der Parakristalle unabhängig von einer bestimmten STAT1-Mutation und beruhte nicht auf einem Überexpressions-Artefakt. Neben allen getesteten SUMO-freien STAT1-Mutanten (Abb. 4.6), bildete auch STAT1-WT Parakristalle (Abb. 4.23), jedoch erst nachdem durch milden oxydativen Stress das Gleichgewicht der Zelle in Richtung Desumolierung verschoben wurde (Bossis et al. 2006). Aber auch endogenes STAT1 lokalisierte in Parakristallen, nachdem das für die SUMO-Konjugation notwendige E2-Enzym Ubc9 durch RNS-Interferenz herunter reguliert wurde (Abb. 4.4). Zusätzliche immunozytochemische Untersuchungen ergaben, dass das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1 ein Bestandteil der Parakristalle ist (Abb. 4.3), wodurch die Zytokin-Abhängigkeit erklärt werden kann. Im Gegensatz dazu war das Vorhandensein von DNS oder anderen Zellkernkomponenten für die Bildung bzw. die Auflösung der Parakristalle nicht notwendig. Die Kombination der SUMO-freien Mutation E<sup>705</sup>Q mit  $\Delta$ NLS führte zu einer Mutante, deren phosphoryliertes STAT1 nicht mehr in den Zellkern importiert werden konnte (vgl. Meyer et al. 2002). Dennoch bildete die STAT1-Mutante  $\Delta$ NLS-E<sup>705</sup>Q Zytokin-abhängig Parakristalle, nun allerdings im Zytoplasma, während STAT1- $\Delta$ NLS sich homogen im Zellkern verteilte (Abb. 4.12).

Bedeutenderweise scheint die Bildung von Parakristallen nicht nur auf STAT1 beschränkt zu sein. Vergleichbare Strukturen wurden immunozytochemisch auch mit STAT2 (Truchet et al. 2004, Frahm et al. 2005), STAT3 (Bartlett et al. 2004, Herrmann et al. 2004, Tonozuka et al. 2004) und STAT5 (Herrington et al. 1999) beobachtet. Zusätzlich konnten die als „punktartige STAT3-Partikel“ beschriebenen Strukturen während der Akute-Phase Reaktion in Leberzellen von LPS-behandelten Mäusen (Ray et al. 2005) in dieser Arbeit als Parakristalle identifiziert werden (siehe 4.2.2-4.2.3). Die nähere Untersuchung der nukleären Partikel von STAT3 und SUMO-freiem STAT1-E<sup>705</sup>Q zeigte eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Im Elektronenmikroskop wurden aus Fibrillen aufgebaute Strukturen mit einem hohen Ordnungsgrad beobachtet. Dabei zeigten die Fibrillen eine parallele Ausrichtung im Längsschnitt sowie einen konstanten Durchmesser und gleichmäßige Abstände zueinander im Querschnitt. Obwohl mit STAT3 nur Fibrillen im Querschnitt beobachtet wurden, zeigten auch sie einen vergleichbaren konstanten Durchmesser und gleichmäßige Abstände zueinander (4.2.3). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der elektronenmikroskopischen STAT1-Strukturen zu parakristallinen Strukturen von Hämoglobin S in Sichelzellen (Finch et al. 1973) und Viren-Proteinen (Roingear 2008) wurde der Begriff Parakristalle für die nukleären Partikel geprägt. Mit Hilfe einer Immunogold-Analyse wurde zudem die Korrelation zwischen den immunozytochemisch beobachteten Parakristallen und der im Elektronenmikroskop beobachteten Ultrastrukturen hergestellt. Sowohl STAT3 (Droescher et al. 2011) als auch das SUMO-freie STAT1-E<sup>705</sup>Q (Abb. 4.11) waren in den fibrillären Strukturen gegenüber dem umgebenden Nukleoplasma angereichert.

### **5.3 Die Polymerisierung phosphorylierter STAT1-Dimere führt zu Parakristallen**

Die Sumolierung von Transkriptionsfaktoren wurde bereits mehrfach mit der Organisation von nukleären Proteinkomplexen in Zusammenhang gebracht, welche die Aktivität des jeweiligen Transkriptionsfaktors positiv bzw. negativ beeinflussen können (Sachdev et al. 2001, Ross et al. 2002). Ein Beispiel hierfür ist die nach der SUMO-Modifikation von PML erfolgende Bildung von PML-Kernkörperchen (Seeler & Dejean 2001). Jedoch während das sumolierte PML in den Kernkörperchen lokalisiert, bildet im Fall von STAT1 die SUMO-freie Variante Parakristalle. Die innerhalb der STAT-Familie einzigartige Sumolierung von STAT1 scheint demnach spezifisch die Löslichkeit von aktiviertem STAT1 im Zellkern zu erhöhen. Grundsätzlich existieren zwei Modelle, mit denen die Entstehung supramolekularer

Strukturen erklärt werden kann: *self-assembly* und *self-organization* (Misteli 2001). Durch *self-assembly* entsteht eine stabile und statische Struktur, die in einem thermodynamischen Gleichgewicht mit der Umgebung steht. Im Gegensatz dazu wird im Rahmen der *self-organization* eine komplexe supramolekulare Struktur ausgebildet, deren einzelne Komponenten in kontinuierlichem Austausch mit dem umgebenden löslichen Milieu stehen (Misteli 2001). Mit Hilfe eines FRAP-Experiments (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) wurde die Mobilität von STAT3 bzw. SUMO-freiem STAT1-E<sup>705</sup>Q in den Parakristallen untersucht (Droescher et al. 2011). Die Ergebnisse waren nahezu identisch, innerhalb der Parakristalle geblicheses STAT-GFP wurde innerhalb kurzer Zeit wieder von umgebenden STAT-Molekülen aufgefüllt. Der rapide Austausch von STAT-Molekülen zeigt, dass Parakristalle durch *self-organization* entstehen und aufrechterhalten werden.

Die Bildung der Parakristalle ist abhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung des STAT-Proteins. Nach der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung liegt STAT1 vermutlich in einem Gleichgewicht aus antiparallelem und parallelem Dimer vor (Wenta et al. 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Bildung von Parakristallen die Funktionalität der antiparallelen und parallelen Dimer-Schnittstelle von STAT1 benötigt wird. Sowohl die Inhibierung der SH2-Domänen vermittelten Dimerisierung durch den Inhibitor Stattic (Abb. 4.13) als auch die Destabilisierung des antiparallelen Dimers durch Punktmutationen (Abb. 4.14) verhinderten die Bildung von Parakristallen. Diese Ergebnisse lassen in Verbindung mit den elektronenmikroskopischen Ultrastrukturdaten vermuten, dass die Parakristalle letztendlich Polymere von aktiviertem STAT1 darstellen. In Übereinstimmung mit dieser Theorie weist Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1 sowohl in der antiparallelen als auch in der parallelen Dimer-Konformation eine vergleichbare Dissoziationskonstante von ~50 nM auf (Wenta et al. 2008). Die Polymerisierung von Proteinen erfolgt in der Regel über die reversible Assoziation von Bildungsblöcken über nicht-kovalente Interaktionen (Eaton & Hofrichter 1990). Im Falle von STAT1 sind nach der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung zwei verschiedene Dimer-Konformere als Bildungsblock vorstellbar. Die erste Möglichkeit besteht in einem parallelen STAT1-Dimer, welches über N-terminal vermittelte Interaktionen mit einem anderen parallelen STAT1-Dimer interagiert. Alternativ ist als Bildungsblock ein antiparalleles Dimer vorstellbar, welches über reziproke pTyr-SH2-Domänen Interaktionen mit einem anderen antiparallelen Dimer interagiert. Während die Assoziation von parallelen STAT1-Dimeren sterisch behindert wird (Abb. 4.15), so ist die Polymerisierung von antiparallelen STAT1-Dimeren durchaus möglich (Abb. 4.16). Bei dieser Form der Assoziation interagieren die

zwei zentralen SH2-Domänen über van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken und bilden über die Aminosäurereste<sup>652-662</sup> zwei stabilisierende  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen aus. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Modell erstellt, bei dem phosphorylierte STAT-Proteine in der antiparallelen Dimer-Konformation über reziproke pTyr-SH2-Domänen-Wechselwirkungen interagieren. In der Folge bilden sich zunächst Polymere aus STAT-Proteinen, welche sich letztendlich zu Parakristallen zusammenlagern (Abb. 4.17).

#### **5.4 Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung verhindert die Polymerisierung von STAT1**

Die Konjugation von SUMO1 an das Akzeptorlysin<sup>703</sup> erfolgt in unmittelbarer Nähe der für die Aktivierung von STAT1 wichtigen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierungsstelle (vgl. Abb. 1.4). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Nähe zum gegenseitigen Ausschluss der beiden STAT1-Modifikationen führt (Zimnik et al. 2009, Droscher et al. 2011). In Übereinstimmung zeigte SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q in Antwort auf IFN $\gamma$  eine verbesserte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung (Abb. 4.2). Zusätzlich führte die verhinderte Sumolierung zu der Lokalisation von phosphoryliertem STAT1 in Parakristallen (Abb. 4.3-4.6). Allerdings konnte die Sumolierungs-induzierte Verhinderung von STAT1-Parakristallen nicht allein durch eine reduzierte Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung erklärt werden. Die Untersuchung von MEF-Zellen, welche die für die Dephosphorylierung von STAT1 notwendige Phosphatase TC45 nicht exprimierten (tenHoeve et al. 2002), deutete auf einen zweiten unabhängigen Mechanismus hin. In MEF-TC45<sup>+/+</sup>-Zellen verteilte sich STAT1-WT nach der IFN $\gamma$ -Stimulation homogen im Zellkern. Erst eine durch oxydativen Stress induzierte Verschiebung des Gleichgewichts in der Zelle zur Desumolierung hin (Bossis et al. 2006) ermöglichte eine Parakristallbildung (Abb. 4.23). Im Gegensatz dazu führte die IFN $\gamma$ -Stimulation in MEF-TC45<sup>-/-</sup>-Zellen bereits zu einer deutlich verbesserten spezifischen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung. Obwohl dadurch die Menge an phosphoryliertem STAT1 für eine Parakristall-Bildung ausreichte, verteilte sich STAT1-WT weiterhin homogen im Zellkern. Erst die Verhinderung der Sumolierung durch milden oxydativen Stress führte zur Parakristallbildung (Abb. 4.23). Demzufolge kann ein Fehlen von Parakristallen nicht durch eine alleinige Reduktion der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 erklärt werden. Dennoch erfordert die Verhinderung von Parakristallen durch die Sumolierung die spezifische Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1. Nachdem die SUMO-Konjugation bei der Mutante EQ<sup>SUMO</sup> vom Akzeptorlysin<sup>703</sup> auf das Lysin<sup>750</sup> verschoben wurde, erfolgte nun die parallele Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung dieser STAT1-Mutante



(Abb. 4.20). Bemerkenswerterweise bildete diese Mutante, trotz der distalen Lys<sup>750</sup>-Sumolierung (Abb. 4.20), Parakristalle im gleichen Maße wie das SUMO-freie STAT1-E<sup>705</sup>Q (Abb. 4.21). Die Präsenz des SUMO-Restes hatte somit keinen Einfluss auf den Aufbau der Parakristalle, ein Umstand der zusätzlich mit einem GFP-Fusionsprotein von STAT1-E<sup>705</sup>Q und SUMO1 bestätigt wurde (Abb. 4.22).

Demzufolge verhindert die Sumolierung von STAT1 die Bildung von Parakristallen nicht direkt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Sumolierungs-induzierte Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung die Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren gefördert wird (4.3.5). Obwohl semi-phosphorylierte STAT-Dimere bereits seit langem bekannt sind (Gupta et al. 1996), konnte ihre physiologische Relevanz bislang nicht erklärt werden. Im Fall von STAT1 fungieren die semi-phosphorylierten Dimere als kompetitive Inhibitoren der Polymerisierung, in deren Folge die Bildung von STAT1-Parakristallen verhindert wird. Im Einklang mit dem Modell der STAT-Polymerisierung (Abb. 4.17) können semi-phosphorylierte STAT1-Dimere über das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte Monomer mit einem STAT1-Oligomer interagieren. Jedoch wird über das assoziierte nicht phosphorylierte STAT1-Monomer die Verknüpfung weiterer STAT1-Dimere unterbunden (Abb. 4.28). Im Gegensatz dazu können vollständig Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1-Dimere polymerisieren, während die vollständige Sumolierung eines Dimers zu nicht phosphorylierten STAT1-Dimeren führen, welche überhaupt nicht mit einem naszierenden Polymer interagieren können. Somit wird die Polymerisierung von STAT1 nicht durch die Präsenz von SUMO *per se*, sondern über das Fehlen einer pTyr-Schnittstelle verhindert. In Übereinstimmung mit dieser Theorie verhindert auch die erzwungene Sumolierung der STAT3-Mutante K<sup>709</sup>E die Bildung von Parakristallen (Abb. 4.19). Analog zu STAT1 besitzt STAT3 in der gleichen relativen Position zur konservierten Tyrosin-Phosphorylierungsstelle einen SUMO-Konsensus, welcher jedoch durch eine Punktmutation in Position Tyr<sup>+4</sup> inaktiviert vorliegt (vgl. Abb. 1.4). Die Wiederherstellung des SUMO-Konsensus durch die STAT3-Mutation K<sup>709</sup>E ermöglichte die Untersuchung von sumolierten STAT3 (Abb. 4.18). Im Vergleich mit STAT1 weist das sumolierte STAT3-K<sup>709</sup>E die gleiche räumliche Nähe zwischen Tyrosin-Phosphorylierungsstelle und SUMO-Akzeptorlysin auf (Abb. 1.4), wodurch eine verstärkte Bildung von semi-phosphorylierten STAT3-Dimeren erwartet wird. Im Einklang mit dieser Theorie reduzierte die Sumolierung von STAT3 die Bildung von Parakristallen (Abb. 4.19). Bestätigend führte die Verschiebung des Gleichgewichts in der Zelle zur Desumolierung hin (Bossis et al. 2006) zu einer Wiederherstellung der Parakristall-Bildung (Abb. 4.19).

Das Modell der Sumolierungs-induzierten Bildung von kompetitiven Polymerisierungs-Inhibitoren ermöglicht erstmalig eine Erklärung für die Tatsache, warum das Gleichgewicht in der Zelle auf der Seite des nicht sumolierten STAT1 liegt (Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003, Jakobs et al. 2007). Eine effizientere Sumolierung von STAT1 würde verstärkt zu der Bildung von vollständig sumolierten STAT1-Dimeren führen, welche nicht mehr Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliert werden können (vgl. Zimnik et al. 2009, Droescher et al. 2011). Allerdings stellen nicht Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1-Dimere einen inerten Kompetitor dar, welcher aufgrund der fehlenden pTyr-Reste nicht mit einem naszierenden STAT1-Polymer interagieren kann und dementsprechend dessen Bildung nicht stört (vgl. Abb. 4.17). Weiterhin würde eine effizientere Sumolierung die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 deutlich stärker reduzieren und die Funktion von STAT1 als Transkriptionsfaktor erheblich beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu genügt bereits die nur eine Minderheit der Moleküle betreffende SUMO-Modifikation von STAT1 (Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003), um die Bildung von Parakristallen zu verhindern. Die Bedeutung der SUMO-Modifikation liegt dabei einzig in der Erzeugung einer Menge von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren. Für die anschließende Inhibierung der STAT1-Polymerisierung wird der SUMO-Rest selbst nicht mehr benötigt. Die Parakristall-auflösende Wirkung wird allein über das fehlende pTyr<sup>701</sup> des zuletzt eingebauten semi-phosphorylierten STAT1-Dimers vermittelt, ein Prozess der unabhängig von der Präsenz des SUMO-Restes abläuft (Abb. 4.29). Somit konnte mit dieser Arbeit erstmalig ein Beispiel für das sogenannte „SUMO-Enigma“ (Hay et al. 2005) beschrieben werden. Dieser Begriff wurde geprägt, da die SUMO-Modifikation oftmals nur eine sehr geringe Menge der jeweiligen Transkriptionsfaktoren betraf. Dennoch wurde eine effiziente Repression des Transkriptionsfaktors erreicht, welche durch die gezielte Verhinderung der SUMO-Modifikation wieder aufgehoben werden konnte. Als eine mögliche Erklärung wurde vorgeschlagen, dass ein Molekül trotz der aktuellen Abwesenheit eines SUMO-Restes, eine Art Erinnerungsvermögen an die zuvor erfolgte SUMO-Modifikation besitzt (Hay et al. 2005). Die durch die Sumolierung von STAT1 induzierten semi-phosphorylierten STAT1-Dimere stimmen mit dieser Theorie überein. Die Sumolierung generiert durch die Blockierung der Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung eine Menge an semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren. Auch nach der anschließenden Dekonjugation von SUMO bleibt diese Information durch das fehlende pTyr<sup>701</sup> des STAT1-Dimers erhalten und stellt somit das Erinnerungsvermögen dar. Mit dem hier vorgestellten Modell (Abb. 4.28) kann demnach nicht nur die effiziente Verhinderung der Polymerisierung und Parakristallbildung von STAT1 beschrieben werden, sondern auch die in der Zelle beobachtete geringere

Menge an SUMO-modifizierten STAT1 (Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003, Jakobs et al. 2007).

### **5.5 Die Sumolierung als Modulator der Löslichkeit von Proteinen**

In dieser Arbeit wurde die Sumolierung als ein Regulator der Löslichkeit des Transkriptionsfaktors STAT1 identifiziert (4.4.2). Die Sumolierung induzierte die verstärkte Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren, welche als kompetitive Inhibitoren die Polymerisierung von STAT1 verhinderten (Abb. 4.28). In der Folge wurde die Bildung von STAT1-Parakristallen unterbunden und die Löslichkeit des phosphorylierten STAT1 im Zellkern erhöht. Parakristalle puffern die Konzentration des phosphorylierten STAT-Proteins im Zellkern und schützen dieses vor der Dephosphorylierung (Abb. 4.32-4.33). Durch diesen Mechanismus der Löslichkeitsregulierung beeinflusste die Sumolierung auch die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 (Begitt et al. 2011). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein allgemeines Kompetititons-Modell ableiten, bei der die Sumolierung die Löslichkeit des Zielproteins reguliert. Im Besonderen Proteine, die über die Ausbildung stabiler Dimer-Einheiten polymerisieren können, sind für eine Regulation durch die SUMO-Modifikation prädisponiert. Durch die Aktivierung bzw. Inaktivierung einer spezifischen Interaktions-Schnittstelle kann die SUMO-Konjugation zu der Bildung eines kompetitiven Polymerisierungs-Inhibitors beitragen. In der Folge wird die Löslichkeit und damit verbunden die subzelluläre Verteilung des Zielproteins verändert. Die Bedeutung einer geänderten subzellulären Verteilung durch die SUMO-Konjugation des Proteins wurde dabei schon mehrfach festgestellt, u.a. mit PML (Seeler & Dejean 2001) und RanGAP1 (Matunis et al. 1996). Im Einklang mit diesem Modell wird auch die Löslichkeit von zytoplasmatischen Intermediärfilamenten positiv durch die Sumolierung reguliert (Kaminsky et al. 2009). In Analogie zu STAT1 wird das zytoplasmatische Intermediärfilament-Protein IFB-1 nur zu einem sehr geringen Grad sumoliert. Dennoch reichte diese geringe Konzentration aus, um die Löslichkeit von IFB-1 zu erhöhen und eine zytoplasmatische Fraktion von IFB-1 zu erhalten. Im Gegensatz dazu führte die Verhinderung der Sumolierung von IFB-1 zu dem Verlust der zytoplasmatischen IFB-1 Fraktion und der Lokalisation von IFB-1 in nicht funktionalen Aggregaten. IFB-1 stand anschließend nicht mehr für die Ausbildung von zytoplasmatischen Intermediärfilamenten zur Verfügung (Kaminsky et al. 2009). Somit stellt die Regulierung der Löslichkeit eines Zielproteins ein Modell für dessen negative Regulation

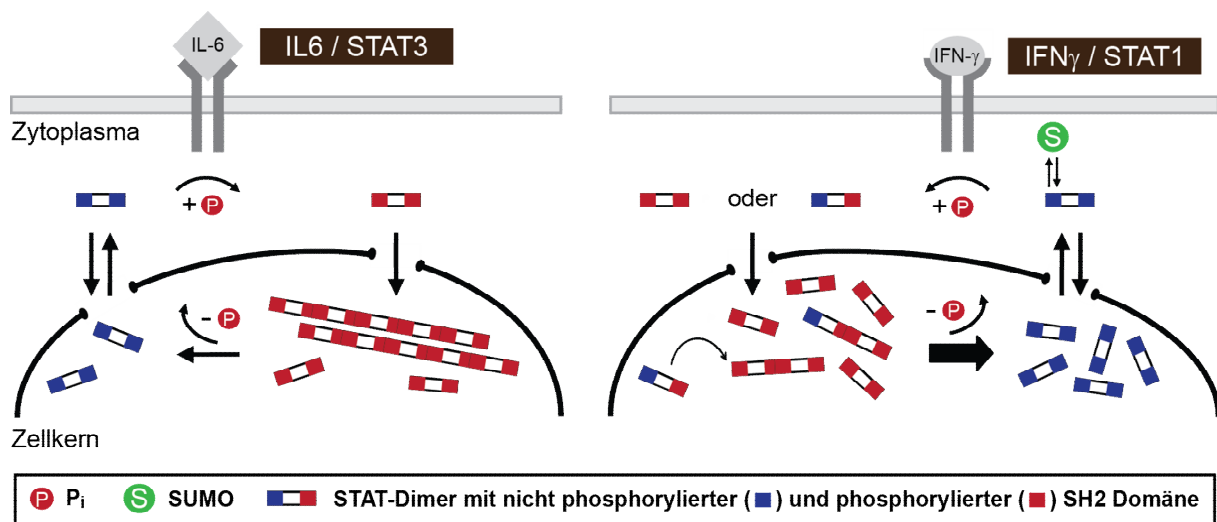
durch die SUMO-Modifikation dar. Zusätzlich kann die oft beobachtete geringe Menge an sumolierten Zielprotein erklärt werden (Hay 2005). Die Sumolierung wird nur für die Bildung des kompetitiven Polymerisations-Inhibitors benötigt und ist für die Vermittlung der weiteren Effekte nicht mehr notwendig. Somit kann auch eine geringe Konzentration des SUMO-konjugierten Proteins die Funktion des Zielproteins nachhaltig beeinflussen.

### **5.6 Die physiologische Bedeutung von STAT-Parakristallen und ihrer Verhinderung durch die Sumolierung**

Die SUMO-Konjugation verhindert effektiv die Bildung von STAT1-Parakristallen in Antwort auf IFN $\gamma$ . Dennoch scheinen STAT1-Parakristalle während der Embryogenese eine Rolle zu spielen. In Maus-Oozyten wurde u.a. die Bildung von nukleären Strukturen aus Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1 beobachtet (Truchet et al. 2004). Die elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Strukturen zeigte eine Ultrastruktur im Querschnitt, welche eine große Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit beschriebenen STAT1-Parakristallen aufweist (4.2.3). Unter der Annahme, dass in der frühen Embryogenese die Sumolierung von STAT1 nicht erfolgt, ist eine physiologische Rolle von STAT1-Parakristallen vorstellbar. Aber auch die Lokalisation von phosphorylierten STAT-Proteinen in nukleären Strukturen wurde bereits in mehreren Studien beobachtet, u.a. mit STAT2 (Frahm et al. 2005), STAT3 (Herrmann et al. 2004) und STAT5 (Herrington et al. 1999). Dennoch blieb die physiologische Bedeutung dieser Strukturen bislang ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit konnten STAT-Parakristalle als ein Modulator der STAT1-Dephosphorylierung ermittelt werden. Der direkte Vergleich der Dephosphorylierungs-Kinetik von sumolierten und SUMO-freiem STAT1 zeigte, dass Parakristalle einen Schutz vor der Dephosphorylierung vermitteln (Abb. 4.32). Die durch die Sumolierung von STAT1 verhinderte Bildung von STAT1-Parakristallen wurde dagegen als ein Regulations-Mechanismus der STAT1-Inaktivierung identifiziert (4.4.2). Obwohl Parakristalle dynamische und reversible Strukturen sind, besitzen sie eine immobile Fraktion, welche nicht mit der Umgebung in Kontakt steht (Droescher et al. 2011). Die in dieser Fraktion enthaltenen aktivierten STAT-Moleküle sind daher höchstwahrscheinlich nicht zugänglich für die Phosphatase TC45, welches zu einer verlangsamten Dephosphorylierung führt (Abb. 4.32). In Übereinstimmung wurde die antiparallele Dimer-Konformation des phosphorylierten STAT als Voraussetzung für eine effiziente Dephosphorylierung beschrieben (Zhong et al. 2005, Mertens et al. 2006). In dieser Konformation sind die pTyr-Reste der

Umgebung exponiert und der Phosphatase zugänglich. Obwohl bei STAT-Parakristallen ebenfalls ein antiparalleles Dimer den Bildungsblock darstellt, ist dabei nur der pTyr-Rest des zuletzt eingebauten STAT-Dimers der Umgebung exponiert. Der andere pTyr-Rest des zuletzt eingebauten Dimers ist durch die Interaktion mit einer SH2-Domäne des STAT-Polymers nicht mit der Umgebung in Kontakt. Somit werden durch die Parakristalle die Anzahl der zur Dephosphorylierung zugänglichen pTyr-Reste reduziert und die Kinetik der STAT-Inaktivierung verlangsamt. Im Einklang mit dieser Hypothese wurde auch die Ser<sup>727</sup>-Phosphorylierung von STAT1 durch die Parakristall-Bildung geschützt (Abb. 4.39), welche für die vollständige transkriptionelle Aktivierung von STAT1 benötigt wird (Zhang et al. 1995, Decker & Kovarik 2000). Die Polymerisierung von SUMO-freien STAT1 führt zu der Bildung einer immobilen Fraktion, welche nicht mehr im Kontakt mit dem umgebenden Nukleoplasma steht (Droescher et al. 2011). Analog zur Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung wird daher auch die Ser<sup>727</sup>-Phosphorylierung vor dem Zugang von Phosphatasen geschützt, welches in einer verlängerten spezifischen Ser<sup>727</sup>-Phosphorylierung resultiert (Abb. 4.39). In Übereinstimmung wurde neben dem Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1, auch die S<sup>727</sup>-Phosphorylierung in den Parakristall-ähnlichen Strukturen von Maus-Oozyten beobachtet (Truchet et al. 2004).

Die verlangsamte Dephosphorylierung der Parakristall-bildenden STAT-Proteine führt dazu, dass die Konzentration von aktivierten STAT-Proteinen im Zellkern gepuffert wird (Abb. 4.33). Überschreitet die Konzentration an phosphoryliertem STAT1 eine bestimmte Konzentration im Nukleoplasma, erfolgte die Bildung von Parakristallen und das frei verfügbare und lösliche STAT1 wurde auf eine Schwellwert-Konzentration beschränkt. Im Gegensatz dazu wurde aktiviertes STAT1 durch den Abbau von Parakristallen in das Nukleoplasma freigegeben, wenn dessen Konzentration durch die Aktivität von Phosphatasen unter die Schwellwert-Konzentration fiel (Abb. 4.33). Demzufolge stellen die Parakristalle der Funktion nach Reservoir für aktiviertes STAT dar, welche die Konzentration des transkriptionell aktiven phosphorylierten STAT auf eine konstante Schwellwert-Konzentration über einen längeren Zeitpunkt puffern. Im Gegensatz dazu verhindert die unter den Mitgliedern der STAT-Familie einzigartige SUMO-Modifikation von STAT1 die Bildung von Parakristallen. Die damit verbundene erhöhte Löslichkeit des phosphorylierten STAT1, führt zu einem ungehinderten Phosphatase-Zugang und resultiert in einer ungehinderten und zügigen Inaktivierung (Abb. 4.33). Der Einfluss der Parakristall-Bildung und deren Sumolierungs-induzierten Verhinderung auf die STAT-Dephosphorylierung ist schematisch in Abbildung 5.1 zusammengefasst.



**Abb. 5.1. Der Einfluss der Parakristall-Bildung und deren Sumolierungs-induzierten Verhinderung auf die STAT-Dephosphorylierung.** Die Zytokin-induzierte Phosphorylierung von STAT-Proteinen induziert deren Translokation in den Zellkern. Phosphorylierte STAT-Dimere in der antiparallelen Dimer-Konformation sind in der Lage über reziproke pTyr-SH2-Domänen-Interaktionen zu polymerisieren. In der Folge bilden sich Parakristalle, welche das STAT-Protein vor einer effizienten Dephosphorylierung schützen (links). Im Gegensatz dazu führt die Sumolierung von STAT1 zur Bildung von semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren. Diese wirken als kompetitive Inhibitoren und verhindern die Polymerisierung. Die damit assoziierte erhöhte Löslichkeit von STAT1 führt zu einer beschleunigten Dephosphorylierungs-Kinetik (rechts).

Der Einfluss der Sumolierung auf Transkriptionsfaktoren wird in der Regel als inhibierend beschrieben (Verger et al. 2003). In Übereinstimmung damit beeinträchtigt die Sumolierung die Aktivität von STAT1 durch zwei unabhängige Mechanismen. Zum einen wird durch die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung direkt inhibiert (Jakobs et al. 2007, Zimnik et al. 2009). Zum anderen wird durch die Verhinderung von STAT1-Parakristallen die Kinetik der STAT1-Dephosphorylierung erhöht (Abb. 4.31 und 4.33). Somit reguliert die Sumolierung nicht die Aktivität des Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1 selbst, vielmehr wird die für die Transkription zur Verfügung stehende Menge von STAT1 reduziert. Da das Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierte STAT1 das transkriptionell aktive Molekül darstellt (Darnell et al. 1997, Chen et al. 1998), wird durch die Sumolierung von STAT1 dementsprechend auch die transkriptionelle Aktivität eines Reportergenes beeinträchtigt (Abb. 4.34). Obwohl in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die STAT1-Mutanten K<sup>703</sup>R und E<sup>705</sup>A nicht für die spezifische Untersuchung der STAT1-Sumolierung geeignet sind (vgl. 4.1.2), wurden damit vergleichbare Ergebnisse festgestellt. Sowohl in Reportergen-Experimenten (Rogers et al. 2003, Ungureanu et al. 2003) als auch in Analysen der Expression von verschiedenen Genen (Ungureanu et al. 2005, Song et al. 2006) wurde eine repressive Wirkung der STAT1-Sumolierung festgestellt. In weiterführenden Experimenten konnte die zuvor festgestellte Pufferfunktion der Parakristalle für das aktivierte STAT1 (Abb. 4.33) auf die transkription-

elle Ebene übertragen werden. Obwohl nur ein Teil der analysierten Gene durch die Sumolierung beeinflusst wurde, zeigten im Besonderen die Gene *Icam1* und *Cxcl9* ein gemeinsames Muster. In MEF-Zellen, welche das sumolierbare STAT1-WT exprimierten, wurde nach 6-stündiger IFN $\gamma$ -Stimulation eine erhöhte Genexpression beobachtet, welche im weiteren Zeitverlauf wieder auf das Ausgangsniveau abfiel. Im Gegensatz dazu wurde in SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden MEF-Zellen eine konstant erhöhte Genexpression auch nach 18-stündiger IFN $\gamma$ -Stimulation beobachtet (Begitt et al. 2011). Demnach induziert die Sumolierung von STAT1 eine verkürzte Expression der IFN $\gamma$ -responsiven Gene *Icam1* und *Cxcl9*. Im Gegensatz dazu wurden die Gene *Irf1*, *Gbp1*, *Tap1* und *Cxcl10* nicht durch die Sumolierung von STAT1 reguliert. Unabhängig von dem Sumolierungs-Status der STAT1-exprimierenden Zellen wurde nach 6 h bzw. 18 h IFN $\gamma$ -Stimulation keine Unterschiede in der Genexpression festgestellt (Begitt et al. 2011). Die Sumolierung von STAT1 beeinflusst die Konzentration des frei beweglichen STAT1 im Zellkern. Gene, dessen Expression von einer bestimmten Konzentration an phosphoryliertem STAT1 im Nukleoplasma abhängen, sind demnach die wahrscheinlichsten Kandidaten für eine Sumolierungs-abhängige Regulation. Warum jedoch nur ein Teil der IFN $\gamma$ -responsiven Gene durch die Sumolierung von STAT1 beeinflusst wird, sollte in weiteren Studien ermittelt werden.

Die Aktivität der STAT-Transkriptionsfaktoren unterliegt einer strengen Regulation und es wurden bereits mehrere verschiedene Mechanismen zur Inaktivierung der STATs beschrieben (Abb. 1.3). Zum einen führt die Aktivierung der STATs selbst zu einer klassischen Rückkopplungs-Inhibierung des JAK-STAT-Signalweges durch die SOCS-Proteine. Nach ihrer Expression verhindern diese die erneute Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 am Rezeptor, wobei durch die Bindung der SOCS-Proteine an die Rezeptor-assoziierten JAK-Proteine deren katalytische Aktivität inhibiert wird (Naka et al. 1997, Song & Shuai 1998, Zimmerer et al. 2007). Über einen weiteren Mechanismus wird die Inaktivierung von STAT1 durch die PIAS-Proteine gefördert. Die Interaktion von PIAS1 mit Tyr<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 behindert die DNS-Bindung an GAS-Sequenzen *in vitro* (Liu et al. 1998, Liao et al. 2000), aber auch die Rekrutierung von STAT1 an IFN-induzierbare Gen-Promotoren wurde selektiv durch PIAS1 verhindert (Liu et al. 2004). Eine Gemeinsamkeit der verschiedenen Inaktivierungs-Ebenen stellt die Dephosphorylierung des aktiven Tyrosinrestes durch die Protein-Tyrosin-Phosphatase TC45 im Zellkern dar (Haspel et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Sumolierung von den anderen bislang beschriebenen Inhibitoren des STAT1-Signalweges deutlich unterscheidet. Die inhibierende Wirkung

der Phosphatase TC45, der SOCS- und der PIAS-Proteine auf die STAT1-Aktivität erfordert zunächst die Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 (Yoshimura 2005). Im Gegensatz dazu erfolgt die Sumolierung von STAT1 konstitutiv, wobei ausschließlich das nicht phosphorylierte STAT1 SUMO-konjugiert wird. Die Bedeutung dieser konstitutiven Inhibierung des STAT1 Signalweges wurde bei der Untersuchung von transgenen Mäusen entdeckt. Unter der Kontrolle des natürlichen STAT1-Promotors exprimiertes SUMO-freies STAT1-E<sup>705</sup>Q (vgl. Abb. 4.37) zeigte ebenfalls die Bildung von Parakristallen (Abb. 4.39) und die damit assoziierte verlangsamte Dephosphorylierung von STAT1 (Abb. 4.40). Anschließend ergab die funktionale Untersuchung von Knochenmarks-Makrophagen, dass die Sumolierung von STAT1 die Sensitivität der Zellen konstitutiv gegenüber IFN $\gamma$  reduziert. In dem Versuchsaufbau wurden Knochenmarks-Makrophagen mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS in Kontakt gebracht und die IFN $\gamma$ -abhängige Aktivität der Makrophagen über deren zytotoxisches Produkt Stickstoffoxid (NO) gemessen (Chan & Riches 2001). Während in SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Knochenmarks-Makrophagen bereits die geringe IFN $\gamma$ -Konzentration von 0,01 U/ml eine robuste Aktivierung induzierte, erhöhte die Sumolierung von STAT1 die dafür benötigte IFN $\gamma$ -Konzentration um den Faktor 100 (Abb. 4.41). Eine aufgrund der zytotoxischen Wirkung von NO induzierte erhöhte Mortalität der sumolierten STAT1-WT exprimierenden Makrophagen (Sarih et al. 1993) konnte ausgeschlossen werden. Im Gegenteil, die erhöhte Aktivität der SUMO-freien STAT1-E<sup>705</sup>Q exprimierenden Makrophagen führte durch die verstärkte Produktion von zytotoxischem NO zu einem verstärkten Absterben der Zellen (Abb. 4.41). Demnach schützt die Sumolierung von STAT1 Makrophagen vor einer selbstzerstörerischen Überaktivität, indem die Sensitivität der Zellen gegenüber dem aktivierenden Zytokin IFN $\gamma$  konstitutiv reduziert wird. Somit konnte die Sumolierung, im Gegensatz zu den anderen negativen Regulatoren, als die erste konstitutiv inaktivierende Modifikation von STAT1 identifiziert werden.



## **6. Zusammenfassung**

Die Regulation von STAT-Transkriptionsfaktoren ist für die Funktion von Zellen von zentraler Bedeutung, und die Fehlfunktion dieser Proteine ist oft mit schwerwiegenden Erkrankungen verbunden. Die STATs sind dimere Proteine, deren transkriptionelle Aktivität die Phosphorylierung eines konservierten Tyrosinrestes erfordert. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass vollständig Tyrosin-phosphorylierte STAT-Dimere über reziproke pTyr-SH2-Domänen-Interaktionen polymerisieren können. Diese Polymerisierung ist die Grundlage für die Bildung von Parakristallen, einer hochgeordneten Proteinstruktur in den Zellkernen Zytokin-stimulierter Zellen. Parakristalle sind dynamische Reservoirs für aktiviertes STAT-Protein, welche dieses vor der Dephosphorylierung schützen. Der Transkriptionsfaktor STAT3 bildet Parakristalle während der Akute-Phase Reaktion in Maus-Leberzellen. Aber auch STAT2 und STAT5 bilden Zytokin-abhängig nukleäre Partikel, die vermutlich Parakristalle darstellen. Im Gegensatz dazu verteilt sich phosphoryliertes STAT1 homogen im Zellkern und bildet keine Parakristalle. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten durch die unter den STAT-Proteinen einzigartige SUMO-Modifikation von STAT1 hervorgerufen wird. Die Lys<sup>703</sup>-Sumolierung hat einen direkten Effekt: durch die Blockierung der proximalen Tyr<sup>701</sup>-Phosphorylierung wird in der Zelle die Anzahl an semi-phosphorylierten STAT1-Dimeren erhöht. Diese stehen in Konkurrenz zu vollständig phosphorylierten STAT1-Dimeren und verhindern dadurch die Polymerisierung und Parakristall-Bildung von STAT1. Darauf basierend wird ein allgemeines Wettbewerbsmodell vorgeschlagen, welches die Regulation der Protein-Löslichkeit durch eine unverhältnismäßig kleine Fraktion an sumolierten Molekülen beschreibt. Dieses stellt gleichzeitig die erste Lösung für das sogenannte „SUMO-Enigma“ dar. Im Fall von STAT1 führt die Sumolierung zu einer erhöhten Löslichkeit des Tyr<sup>701</sup>-phosphorylierten STAT1 und dessen beschleunigter Dephosphorylierung, wodurch gleichfalls die Menge von aktiviertem STAT1 reduziert wird. In dieser Arbeit wird zudem die Herstellung eines *Knock-in* Mausstammes beschrieben, welcher SUMO-freies STAT1 exprimiert. Makrophagen aus diesen Tieren zeigen, dass die Sumolierung von STAT1 die IFN $\gamma$ -Sensitivität von Zellen dauerhaft herabsetzt. Bislang war ein solcher Mechanismus nicht bekannt. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte die SUMO-Modifikation von STAT1 als ein zentraler Mechanismus der Interferon-Signaltransduktion identifiziert werden.

### **6.1 Summary**

STAT proteins are an essential component of the immune response of cells and their misregulation is often associated with severe diseases. In order to elicit transcriptional activity, the dimeric STAT proteins require activation by phosphorylation of a single tyrosine residue. In this work, it is revealed that fully tyrosine-phosphorylated STAT dimers can polymerize via reciprocal pTyr-SH2 domain interactions. This polymerization leads to the assembly of paracrystals, a highly ordered protein structure in the nucleus of cytokine stimulated cells. Paracrystals are dynamic reservoirs which protect activated STATs from dephosphorylation. STAT3 readily forms such paracrystals in acute phase liver cells. But also STAT2 and STAT5 form cytokine-dependent nuclear particles which are most likely paracrystals. Activated STAT1, in contrast, distributes homogenously in the nucleus and normally does not form paracrystals. Here, it is shown that this is due to the unique ability of STAT1 among the STATs to conjugate to SUMO1. The Lys<sup>703</sup> sumoylation has one direct effect: it obstructs proximal Tyr<sup>701</sup> phosphorylation, which leads to an increase in the abundance of semi-phosphorylated STAT1 dimers. These in turn compete with their fully phosphorylated counterparts and interfere with their polymerization into paracrystals. Based on these results, a generally applicable competition model is proposed which describes the regulation of protein solubility by a disproportionate small fraction of SUMO-modified molecules. This also constitutes the first solution to the so called “SUMO-Enigma”. In case of STAT1, the sumoylation leads to increased solubility of the activated STAT1 and thereby to an accelerated dephosphorylation kinetics thus diminishing the pool of the transcriptionally available STAT1. Moreover, in this work the generation of a knock-in mice strain expressing SUMO-free STAT1 is described. Using macrophages from these animals, it was demonstrated that the sumoylation of STAT1 constitutively reduced the IFN $\gamma$ -sensitivity of cells. Such a mechanism was not known so far. Therefore this work identifies the SUMO modification of STAT1 as a central instrument of interferon signalling.

## **7. Literaturverzeichnis**

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., and Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7, 248-249.

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

Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., and Reichner, J. S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 150, 5080-5085.

Ank, N., and Paludan, S. R. (2009). Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors* 35, 82-87.

Bartlett, N. W., Dumoutier, L., Renauld, J. C., Kotenko, S. V., McVey, C. E., Lee, H. J., and Smith, G. L. (2004). A new member of the interleukin 10-related cytokine family encoded by a poxvirus. *J Gen Virol* 85, 1401-1412.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-286.

Begitt, A., Droscher, M., Knobloch, K. P., and Vinkemeier, U. (2011). SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyper-responsiveness to interferon-gamma. *Blood*. DOI 10.1182/blood-2011-04-347930.

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

Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H., and Wetzler, M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 101, 2940-2954.

Best, J. L., Ganiatsas, S., Agarwal, S., Changou, A., Salomoni, P., Shirihai, O., Meluh, P. B., Pandolfi, P. P., and Zon, L. I. (2002). SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell* 10, 843-855.

- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H., and Owerbach, D. (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279, 27233-27238.
- Bonifacino, J. S., and Weissman, A. M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 19-57.
- Bossis, G., and Melchior, F. (2006). Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* 21, 349-357.
- Buettner, R., Mora, L. B., and Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 8, 945-954.
- Cavaillon, J. M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48, 445-453.
- Cebulla, C. M., Miller, D. M., and Sedmak, D. D. (1999). Viral inhibition of interferon signal transduction. *Intervirology* 42, 325-330.
- Chalkiadaki, A., and Talianidis, I. (2005). SUMO-dependent compartmentalization in promyelocytic leukemia protein nuclear bodies prevents the access of LRH-1 to chromatin. *Mol Cell Biol* 25, 5095-5105.
- Chan, E. D., and Riches, D. W. (2001). IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C441-450.
- Chapgier, A., Boisson-Dupuis, S., Jouanguy, E., Vogt, G., Feinberg, J., Prochnicka-Chalufour, A., Casrouge, A., Yang, K., Soudais, C., Fieschi, C., et al. (2006). Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet* 2, e131.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., and 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., and Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827-839.
- Clemens, M. J., and Elia, A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 17, 503-524.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.
- Czajkowski, R., Drewa, T., Wozniak, A., and Krzyzyska-Malinowska, E. (2002). Cell cycle in sporadic melanoma. *Int J Dermatol* 41, 550-556.
- Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- David, G., Neptune, M. A., and DePinho, R. A. (2002). SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem* 277, 23658-23663.
- Davies, J. Q., and Gordon, S. (2005). Isolation and culture of murine macrophages. *Methods Mol Biol* 290, 91-103.
- Decker, T., and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628-2637.
- Decker, T., Kovarik, P., and Meinke, A. (1997). GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 17, 121-134.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., Kemp, G. D., and Hay, R. T. (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 274, 10618-10624.

- Droescher, M., Begitt, A., Marg, A., Zacharias, M., and Vinkemeier, U. (2011). Cytokine-induced Paracrystals Prolong the Activity of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) and Provide a Model for the Regulation of Protein Solubility by Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO). *J Biol Chem* 286, 18731-18746.
- Dumont, S., Mabondzo, A., Hartmann, D., Gilgenkrantz, J. L., Kessler, R., Poindron, P., and Bartholeyns, J. (1990). Study of the dependence of human monocytes and macrophages antitumoral properties upon TNF-alpha expression or release. *Anticancer Res* 10, 949-954.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C., and Levy, D. E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443-450.
- Dymecki, S. M. (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6191-6196.
- Eaton, W. A., and Hofrichter, J. (1990). Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 40, 63-279.
- Finch, J. T., Perutz, M. F., Bertles, J. F., and Dobler, J. (1973). Structure of sickled erythrocytes and of sickle-cell hemoglobin fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 718-722.
- Frahm, T., Hauser, H., and Koster, M. (2006). IFN-type-I-mediated signaling is regulated by modulation of STAT2 nuclear export. *J Cell Sci* 119, 1092-1104.
- Gariglio, M., Martinotti, M. G., Cavallo, G., and Landolfo, S. (1990). Regulation of gene expression by interferons. *G Bacteriol Virol Immunol* 83, 143-149.
- Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1996). Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* 271, 12991-12998.
- Gollob, J. A., Sciambi, C. J., Huang, Z., and Dressman, H. K. (2005). Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN-gamma. *Cancer Res* 65, 8869-8877.

- Gong, L., Millas, S., Maul, G. G., and Yeh, E. T. (2000). Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* 275, 3355-3359.
- Goodson, M. L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 276, 18513-18518.
- Gottschalg, E., Moore, N. E., Ryan, A. K., Travis, L. C., Waller, R. C., Pratt, S., Atmaca, M., Kind, C. N., and Fry, J. R. (2006). Phenotypic anchoring of arsenic and cadmium toxicity in three hepatic-related cell systems reveals compound- and cell-specific selective up-regulation of stress protein expression: implications for fingerprint profiling of cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 161, 251-261.
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Malczewska-Malec, M., and Szczudlik, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 274, 177-188.
- Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J., and Schindler, C. (1996). The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- $\alpha$  signals. *Embo J* 15, 1075-1084.
- Haspel, R. L., and Darnell, J. E., Jr. (1999). A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10188-10193.
- Haspel, R. L., Salditt-Georgieff, M., and Darnell, J. E., Jr. (1996). The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *Embo J* 15, 6262-6268.
- Hay, R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.

- Herrington, J., Rui, L., Luo, G., Yu-Lee, L. Y., and Carter-Su, C. (1999). A functional DNA binding domain is required for growth hormone-induced nuclear accumulation of Stat5B. *J Biol Chem* 274, 5138-5145.
- Herrmann, A., Sommer, U., Pranada, A. L., Giese, B., Kuster, A., Haan, S., Becker, W., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (2004). STAT3 is enriched in nuclear bodies. *J Cell Sci* 117, 339-349.
- Heyman, R. A., Borrelli, E., Lesley, J., Anderson, D., Richman, D. D., Baird, S. M., Hyman, R., and Evans, R. M. (1989). Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2698-2702.
- Horvath, C. M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 25, 496-502.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.
- Jakobs, A., Koehnke, J., Himstedt, F., Funk, M., Korn, B., Gaestel, M., and Niedenthal, R. (2007). Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation. *Nat Methods* 4, 245-250.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A., and Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8972-8976.
- John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J. E., Jr., and Leonard, W. J. (1999). The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol Cell Biol* 19, 1910-1918.
- Johnson, E. S., and Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-744.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A., and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.
- Kaminsky, R., Denison, C., Bening-Abu-Shach, U., Chisholm, A. D., Gygi, S. P., and Broday, L. (2009). SUMO regulates the assembly and function of a cytoplasmic intermediate filament protein in *C. elegans*. *Dev Cell* 17, 724-735.



- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-7561.
- Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., and Grusby, M. J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177.
- Keller, R., Geiges, M., and Keist, R. (1990). L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages. *Cancer Res* 50, 1421-1425.
- Kielian, T. L., and Blecha, F. (1995). CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. *Immunopharmacology* 29, 187-205.
- Kim, K. I., Baek, S. H., Jeon, Y. J., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, N., Saitoh, H., Tanaka, K., and Chung, C. H. (2000). A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J Biol Chem* 275, 14102-14106.
- Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T. W., Horvath, C. M., and Stark, G. R. (1997). Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278, 1630-1632.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19, 4293.
- LeRoy, E. C., Trojanowska, M. I., and Smith, E. A. (1990). Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw* 1, 215-219.
- Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.
- Levy, D. E., Kessler, D. S., Pine, R., Reich, N., and Darnell, J. E., Jr. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev* 2, 383-393.

- Li, S. J., and Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-251.
- Liao, J., Fu, Y., and Shuai, K. (2000). Distinct roles of the NH<sub>2</sub>- 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 U S A* 97, 5267-5272.
- Lillemeier, B. F., Koster, M., and Kerr, I. M. (2001). STAT1 from the cell membrane to the DNA. *Embo J* 20, 2508-2517.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-10631.
- Liu, B., Mink, S., Wong, K. A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P. W., Wu, H., and Shuai, K. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* 5, 891-898.
- Liu, X., Robinson, G. W., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11, 179-186.
- Lodige, I., Marg, A., Wiesner, B., Malecova, B., Oelgeschlager, T., and Vinkemeier, U. (2005). Nuclear export determines the cytokine sensitivity of STAT transcription factors. *J Biol Chem* 280, 43087-43099.
- Lorenz, D., Krylov, A., Hahm, D., Hagen, V., Rosenthal, W., Pohl, P., and Maric, K. (2003). Cyclic AMP is sufficient for triggering the exocytic recruitment of aquaporin-2 in renal epithelial cells. *EMBO Rep* 4, 88-93.
- Ma, J., and Cao, X. (2006). Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. *Cell Signal* 18, 1117-1126.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15, 323-350.

- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Mao, X., Ren, Z., Parker, G. N., Sondermann, H., Pastorello, M. A., Wang, W., McMurray, J. S., Demeler, B., Darnell, J. E., Jr., and Chen, X. (2005). Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* 17, 761-771.
- Mao, Y., Desai, S. D., and Liu, L. F. (2000). SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* 275, 26066-26073.
- Marg, A., Meyer, T., Vigneron, M., and Vinkemeier, U. (2008). Microinjected antibodies interfere with protein nucleocytoplasmic shuttling by distinct molecular mechanisms. *Cytometry A* 73A, 1128-1140.
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., and 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.
- Matsui, T., Kinoshita, T., Hirano, T., Yokota, T., and Miyajima, A. (2002). STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J Biol Chem* 277, 36167-36173.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-1470.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.
- Meng, T. C., Fukada, T., and Tonks, N. K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9, 387-399.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., et al. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442.

- Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., and 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.
- Meyer, T., Begitt, A., Lodige, I., van Rossum, M., and Vinkemeier, U. (2002). Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *Embo J* 21, 344-354.
- Meyer, T., Hendry, L., Begitt, A., John, S., and Vinkemeier, U. (2004). A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J Biol Chem* 279, 18998-19007.
- Meyer, T., Marg, A., Lemke, P., Wiesner, B., and Vinkemeier, U. (2003). DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev* 17, 1992-2005.
- Meyer, T., and Vinkemeier, U. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem* 271, 4606-4612.
- Misteli, T. (2001). The concept of self-organization in cellular architecture. *J Cell Biol* 155, 181-185.
- Mogensen, K. E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G., and Uze, G. (1999). The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 19, 1069-1098.
- Morgenstern, J. P., and 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.
- Muller, M., Laxton, C., Briscoe, J., Schindler, C., Improta, T., Darnell, J. E., Jr., Stark, G. R., and Kerr, I. M. (1993). Complementation of a mutant cell line: central role of the 91 kDa polypeptide of ISGF3 in the interferon-alpha and -gamma signal transduction pathways. *Embo J* 12, 4221-4228.
- Murphy, T. L., Geissal, E. D., Farrar, J. D., and Murphy, K. M. (2000). Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 20, 7121-7131.

- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., et al. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924-929.
- Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M. T., and Lafarga, M. (2008). SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 163, 137-146.
- Nayak, A., Glockner-Pagel, J., Vaeth, M., Schumann, J. E., Buttmann, M., Bopp, T., Schmitt, E., Serfling, E., and Berberich-Siebelt, F. (2009). Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem* 284, 10935-10946.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12, 2048-2060.
- Ota, N., Brett, T. J., Murphy, T. L., Fremont, D. H., and Murphy, K. M. (2004). N-domain-dependent nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation. *Nat Immunol* 5, 208-215.
- Ouyang, J., and Gill, G. (2009). SUMO engages multiple corepressors to regulate chromatin structure and transcription. *Epigenetics* 4, 440-444.
- Park, C., Li, S., Cha, E., and Schindler, C. (2000). Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13, 795-804.
- Pestka, S., Krause, C. D., and Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-120.
- Raven, J. F., Williams, V., Wang, S., Tremblay, M. L., Muller, W. J., Durbin, J. E., and Koromilas, A. E. (2011). Stat1 is a suppressor of ErbB2/Neu-mediated cellular transformation and mouse mammary gland tumor formation. *Cell Cycle* 10, 794-804.
- Ray, S., Boldogh, I., and 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.

- Ribet, D., Hamon, M., Gouin, E., Nahori, M. A., Impens, F., Neyret-Kahn, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Dejean, A., and Cossart, P. (2010). *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature* 464, 1192-1195.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., and et al. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* 8, 217-225.
- Rodriguez, C. I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A. F., and Dymecki, S. M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25, 139-140.
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C., and Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276, 12654-12659.
- Rogers, R. S., Horvath, C. M., and Matunis, M. J. (2003). SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem* 278, 30091-30097.
- Roingard, P. (2008). Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biol Cell* 100, 491-501.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-3103.
- Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275, 6252-6258.
- Samuel, C. E. (1991). Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* 183, 1-11.
- Sarih, M., Souvannavong, V., and Adam, A. (1993). Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 191, 503-508.

- Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V. R., and Darnell, J. E., Jr. (1992). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 257, 809-813.
- Schooltink, H., and Rose-John, S. (2002). Cytokines as therapeutic drugs. *J Interferon Cytokine Res* 22, 505-516.
- Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U., and Berg, T. (2006). Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol* 13, 1235-1242.
- Seeler, J. S., and Dejean, A. (2001). SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7243-7249.
- Seidel, H. M., Milocco, L. H., Lamb, P., Darnell, J. E., Jr., Stein, R. B., and 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 U S A* 92, 3041-3045.
- Sekimoto, T., Nakajima, K., Tachibana, T., Hirano, T., and Yoneda, Y. (1996). Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem* 271, 31017-31020.
- Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D., and Darnell, J. E., Jr. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821-828.
- Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M., and Darnell, J. E., Jr. (1993). A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 261, 1744-1746.
- Song, L., Bhattacharya, S., Yunus, A. A., Lima, C. D., and Schindler, C. (2006). Stat1 and SUMO modification. *Blood* 108, 3237-3244.
- Song, M. M., and Shuai, K. (1998). The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 273, 35056-35062.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and 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., and Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.
- Taga, T., and Kishimoto, T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Faseb J* 6, 3387-3396.
- Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T. W., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2003). Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170, 4886-4890.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3801-3804.
- Takeuchi, T., Nomura, T., Tsujita, M., Suzuki, M., Fuse, T., Mori, H., and Mishina, M. (2002). Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 953-957.
- Taylor, D. L., Ho, J. C., Oliver, A., and Watts, F. Z. (2002). Cell-cycle-dependent localisation of Ulp1, a *Schizosaccharomyces pombe* Pmt3 (SUMO)-specific protease. *J Cell Sci* 115, 1113-1122.
- ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M., and Shuai, K. (2002). Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22, 5662-5668.
- Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Bao, Y. C., Moon, Y., Tsubono, Y., Hatori, T., Nakajima, H., Nosaka, T., Kawashima, T., and Kitamura, T. (2004). A GTPase-activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemic cell line. *Blood* 104, 3550-3557.
- Townsend, P. A., Cragg, M. S., Davidson, S. M., McCormick, J., Barry, S., Lawrence, K. M., Knight, R. A., Hubank, M., Chen, P. L., Latchman, D. S., and Stephanou, A. (2005). STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci* 118, 1629-1639.



- Truchet, S., Chebrou, M., Djediat, C., Wietzerbin, J., and Debey, P. (2004). Presence of permanently activated signal transducers and activators of transcription in nuclear interchromatin granules of unstimulated mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 71, 1330-1339.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Gronholm, J., Palvimo, J. J., and Silvennoinen, O. (2005). SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood* 106, 224-226.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomaki, S., Janne, O. A., Palvimo, J. J., and Silvennoinen, O. (2003). PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* 102, 3311-3313.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4, 137-142.
- Vinkemeier, U., Cohen, S. L., Moarefi, I., Chait, B. T., Kuriyan, J., and Darnell, J. E., Jr. (1996). DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *Embo J* 15, 5616-5626.
- Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J. E., Jr., and Kuriyan, J. (1998). Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 279, 1048-1052.
- Virelizier, J. L., and Arenzana-Seisdedos, F. (1985). Immunological functions of macrophages and their regulation by interferons. *Med Biol* 63, 149-159.
- Weber, S., Maass, F., Schuemann, M., Krause, E., Suske, G., and Bauer, U. M. (2009). PRMT1-mediated arginine methylation of PIAS1 regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* 23, 118-132.
- Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-250.
- Wenta, N., Strauss, H., Meyer, S., and Vinkemeier, U. (2008). Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9238-9243.

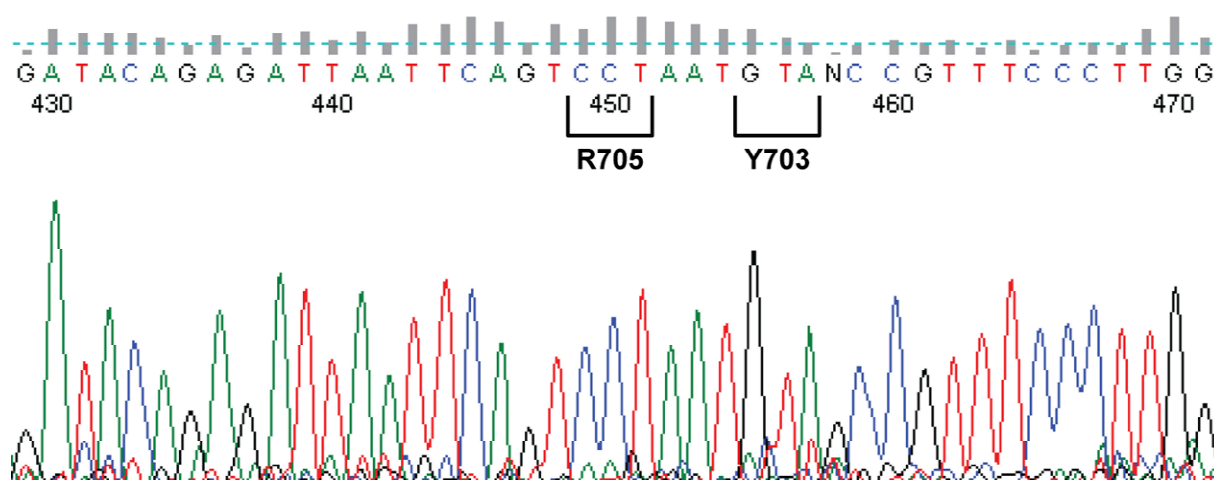
- Wu, Y., Wang, Y., and Zhan, J. (2009). Effects of remifentanyl and fentanyl on LPS-induced cytokine release in human whole blood in vitro. *Mol Biol Rep* 36, 1113-1117.
- Xue, Y., Zhou, F., Fu, C., Xu, Y., and Yao, X. (2006). SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res* 34, W254-257.
- Yang, E., Wen, Z., Haspel, R. L., Zhang, J. J., and Darnell, J. E., Jr. (1999). The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol* 19, 5106-5112.
- Yeh, E. T. (2009). SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem* 284, 8223-8227.
- Yoshimura, A. (2005). Negative regulation of cytokine signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* 28, 205-220.
- Zhang, H., Saitoh, H., and Matunis, M. J. (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 22, 6498-6508.
- Zhang, J. J., Vinkemeier, U., Gu, W., Chakravarti, D., Horvath, C. M., and Darnell, J. E., Jr. (1996). Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15092-15096.
- Zhang, T., Kee, W. H., Seow, K. T., Fung, W., and 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, X., Blenis, J., Li, H. C., Schindler, C., and Chen-Kiang, S. (1995). Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 267, 1990-1994.
- Zhong, M., Henriksen, M. A., Takeuchi, K., Schaefer, O., Liu, B., ten Hoeve, J., Ren, Z., Mao, X., Chen, X., Shuai, K., and Darnell, J. E., Jr. (2005). Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3966-3971.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., and Pandolfi, P. P. (2000a). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.

- Zhong, S., Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2000b). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2, E85-90.
- Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95-98.
- Zhou, W., Ryan, J. J., and Zhou, H. (2004). Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem* 279, 32262-32268.
- Zhuang, J. C., and Wogan, G. N. (1997). Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11875-11880.
- Zimmerer, J. M., Lesinski, G. B., Kondadasula, S. V., Karpa, V. I., Lehman, A., Raychaudhury, A., Becknell, B., and Carson, W. E., 3rd (2007). IFN-alpha-induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins. *J Immunol* 178, 4832-4845.
- Zimnik, S., Gaestel, M., and Niedenthal, R. (2009). Mutually exclusive STAT1 modifications identified by Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation. *Nucleic Acids Res* 37, e30.

## 8. Anhang

### 8.1 Die Sequenzierung der genomischen STAT1-DNS des Haushuhns

Die genomische DNS des Haushuhns (*gallus gallus*) wurde aus einer Hautbiopsie, analog der in 2.1.11 beschriebenen Methode, isoliert. Die *in vitro* Amplifikation eines 1378 bp langen DNS-Fragments (3.1.6) erfolgte mit den PCR-Primern B636 (GGCAAATACTACTCCAG) und B638 (TGAAGAGTTTGATGAGG). Anschließend wurde die Sequenzierung des PCR-Produktes auf dem Komplementärstrang mit dem Primer B637 (CACAGGTTTCATACAATT) durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung Abb. 8.1 dargestellt sind.



**Abb. 8.1. Der SUMO-Konsensus von STAT1 ist im Haushuhn (*gallus gallus*) evolutionär nicht konserviert.** Genomische DNS-Sequenz von STAT1 in 3'-5'-Richtung einer Hautbiopsie des Haushuhns (*gallus gallus*). Die konservierte Tyrosinphosphorylierungsstelle von STAT1 (Y<sup>703</sup>) ist hervorgehoben. Das in der Evolution konservierte SUMO-Akzeptorlysine ist in dieser Sequenz mutiert (R<sup>705</sup>). Dieses Ergebnis deckt sich mit der zuvor veröffentlichten Genbank-Sequenz NC\_006094.

## **8.2 Veröffentlichungsnachweise**

Teilergebnisse aus der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht.

**Droescher, M.**, Begitt, A., Marg, A., Zacharias, M., and Vinkemeier, U. (2011). Cytokine-induced Paracrystals Prolong the Activity of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) and Provide a Model for the Regulation of Protein Solubility by Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO). *J Biol Chem* 286, 18731-18746.

Begitt, A., **Droescher, M.**, Knobloch, K. P., and Vinkemeier, U. (2011). SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyper-responsiveness to interferon-gamma. *Blood*. DOI 10.1182/blood-2011-04-347930.

### **8.3 Lebenslauf**

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

### **8.4 Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Uwe Vinkemeier für die Bereitstellung dieses hochinteressanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Vor allem seine ständige Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Ratschläge haben sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Herrn Prof. Dr. Volker Haucke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Klaus-Peter Knobeloch danke ich herzlich für die angenehme Zusammenarbeit, für die Unterstützung bei der Generierung transgener Mäuse und die vielen akademischen und nicht-akademischen Gespräche. Bei Dr. Andreas Marg, Dr. Andreas Begitt und Dr. Martin Zacharias möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die zur Verfügung gestellten Daten bedanken. Zudem danke ich Susan Anderson, Marie Smith, Emma King, Jeremy Skepper, Elke Gottschlag, Ronald Naumann, Susan Diebold und Dorothea Lorenz für Ihre Unterstützung.

Darüber hinaus gilt mein Dank den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Vinkemeier. Bei Stefanie Meyer, Melanie Lange, Dr. Andreas Marg und Dr. Andreas Begitt möchte ich mich für die freundliche Eingliederung und die detaillierte Einarbeitung in das Labor bedanken, bei Dr. Nikola Wenta und Filipa Antunes für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Laboralltag. Bei Christin Pelzel, Dr. Andreas Begitt, und Dr. Nikola Wenta möchte ich mich zudem für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Familie und Freunde, die mich all die Jahre unterstützt und motiviert haben. Vor allem danke ich Christin, die nicht nur meine Launen mit Geduld ertragen musste, sondern mir auch in allen Lebenslagen tatkräftig zur Seite stand.

**8.5 Eidesstattliche Erklärung**

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

Nottingham, den 11.07.2011