

# **Untersuchungen zur Rolle des Kernexportes des Transkriptionsfaktors STAT1 in der Cytokin- abhängigen Geninduktion**

## **Dissertation**

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

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

vorgelegt von  
**Inga Lödige**  
aus Wuppertal

Berlin, im März 2006

Die vorliegende Arbeit habe ich von April 2001 bis März 2006 unter Anleitung von Dr. Uwe Vinkemeier in der Arbeitsgruppe für zelluläre Signalverarbeitung am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Meyer  
Prof. Dr. Petra Knaus

Datum der Abgabe: 6. März 2006

Datum der Disputation: 22. Juni 2006

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>2 Material.....</b>	<b>15</b>
2.1 Zelllinien.....	15
2.2 Chemikalien.....	15
2.3 Enzyme und Reaktionskits.....	15
2.4 Bakterienstämme und Medien.....	16
2.5 Plasmide.....	17
2.6 Oligonukleotide.....	19
2.7 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	20
2.8 Peptide.....	21
2.9 Stammlösungen und Puffer.....	22
<b>3 Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1 Zellkultur.....	23
3.1.1 Kultur von Säugerzellen.....	23
3.1.2 Transfektion von Säugerzellen.....	23
3.1.3 Behandlung von Zellen mit Cytokinen und Inhibitoren.....	24
3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	24
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	24
3.2.2 Restriktionsverdau.....	25
3.2.3 DNA-Gelelektrophorese.....	25
3.2.4 Ligation.....	25
3.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode..	26
3.2.6 Transformation kompetenter Bakterien nach der Hitzeschock-Methode.	26
3.2.7 Plasmidisolierung.....	26
3.2.8 DNA-Sequenzierung.....	27
3.2.9 Mutagenese.....	28
3.3 Proteinchemische Techniken.....	28
3.3.1 Zellextraktion.....	28
3.3.2 Konzentrationsbestimmung.....	29

3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	29
3.3.4	Coomassie-Färbung.....	30
3.3.5	Silber-Färbung.....	30
3.3.6	Western-Blot-Analyse .....	30
3.3.7	Aufreinigung rekombinanter Proteine über Affinitäts-Chromatographie	31
3.3.8	Aufreinigung von rekombinantem STAT1 .....	33
3.3.9	EGF-Rezeptor-Kinase-Präparation und <i>in-vitro</i> -Tyrosin <sup>701</sup> - Phosphorylierung von rekombinantem STAT1 .....	34
3.3.10	<i>In-vitro</i> -Serin <sup>727</sup> -Phosphorylierung von rekombinantem STAT1 .....	35
3.3.11	Peptid-Synthese und Kopplung an freies oder GST-markiertes GFP .....	36
3.3.12	Mikroinjektion.....	37
3.3.13	Importin $\alpha 5$ -Bindungs-Assay .....	38
3.3.14	Nachweis spezifischer DNA-Protein-Wechselwirkungen .....	39
3.3.15	Reportergen-Assay .....	40
3.3.16	Overlay-Assay .....	41
3.4	Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	42
3.4.1	Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie .....	42
3.4.2	Quantitative Auswertung von Fluoreszenzintensitäten .....	43
3.4.3	FRAP-Analyse.....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
4.1	Beschreibung einer neuen STAT1-Mutante .....	45
4.1.1	Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten STAT1-Derivate ....	48
4.1.2	N-terminal deletierte STAT1-Derivate sind nach Tyrosin <sup>701</sup> - Phosphorylierung vom Kernimport ausgeschlossen .....	52
4.1.3	Der N-Terminus von STAT1 ist für eine Bindung an Importin $\alpha 5$ erforderlich.....	54
4.2	Die Expression des C-Terminus erhöht die Rate der „Kern-frei-Bewegung“ .....	56
4.3	Untersuchungen zum Mechanismus der C-terminalen Exportaktivität .....	66
4.3.1	Der C-Terminus von STAT1 enthält kein übertragbares Exportsignal....	66
4.3.2	Die Regulation der Exportrate durch Expression des C-Terminus ist unabhängig vom Exportrezeptor CRM1 .....	70
4.3.3	Einfluss des C-Terminus auf die intranukleäre Mobilität von STAT1 ....	72

4.3.4	Untersuchungen zur Bindung von STAT1 an Phenylalanin-Glyzin-reiche Fragmente der Nukleoporeine NUP153 und NUP214 .....	76
4.4	Einfluss der Exportrate auf die Signalstärke.....	78
4.4.1	Die Steigerung der Exportrate ist mit einer erhöhten Tyrosin <sup>701</sup> -Phosphorylierung verbunden .....	78
4.4.2	Die Exportrate bestimmt die Cytokin-Sensitivität von STAT1 .....	85
4.4.3	Der Zusammenhang zwischen Exportrate und Tyrosin <sup>701</sup> -Phosphorylierung kann auch für die endogenen STAT1-Spleißvarianten demonstriert werden.....	86
4.5	Einfluss der Exportrate auf die Signaldauer .....	88
4.5.1	Die Mutation der Serin <sup>727</sup> -Phosphorylierungsstelle verlängert die Kernakkumulationsphase von STAT1 .....	88
4.5.2	Die Kernakkumulationsphase von STAT1 $\beta$ ist gegenüber der von STAT1 $\alpha$ verlängert.....	91
4.6	Einfluss der Exportrate auf die STAT1-vermittelte Geninduktion.....	98
4.6.1	<i>In-vitro</i> -Serin <sup>727</sup> -Phosphorylierung von STAT1 $\alpha$ .....	98
4.6.2	Der Export hat einen Anteil an der durch Serin <sup>727</sup> -Phosphorylierung gesteigerten Transkriptionsleistung von STAT1 .....	101
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>120</b>
	Summary.....	121
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>Anhang I .....</b>	<b>142</b>
	Statistische Auswertung der FRAP-Daten.....	142
	Massenspektrometrische Analyse der Serin <sup>727</sup> -Phosphorylierung .....	144
<b>10</b>	<b>Anhang II.....</b>	<b>146</b>
	Liste eigener Publikationen .....	146
	Lebenslauf.....	147
	Danksagung .....	148