

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien

HeLaS3	Humane Epithelzelllinie des Zervixkarzinoms	DSMZ, Braunschweig
2fTGH	Humane Fibrosarkoma-Zelllinie	Dr. G. Stark, Lerner Research Institute
U3A	STAT1-defiziente Zelllinie entstanden aus 2fTGH	Dr. G. Stark, Lerner Research Institute
A431	Humane Karzinom-Zelllinie epidermalen Ursprungs	DSMZ
COS-7	Affennieren-Zelllinie	ATCC

Alle Zellkulturreagenzien wurden von den Firmen Gibco (Karlsruhe) und PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

### 2.2 Chemikalien

Alle Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fischer Scientific (Loughborough, UK), Eurobio (Les Ulis Cedex, Frankreich) und J.T.Baker (Deventer, Niederlande) bezogen.

Die Radiochemikalien  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP (10 mCi/ml),  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (10 mCi/ml),  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dGTP (10 mCi/ml),  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dTTP (10 mCi/ml) und  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (10 mCi/ml) stammten von Amersham Biosciences (Freiburg).

### 2.3 Enzyme und Reaktionskits

#### *Enzyme*

Alle Restriktionsendonukleasen, Vent DNA-Polymerase, DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), alkalische Phosphatase, Quick-Ligase und entsprechende Puffer stammten von New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main). Ribonuklease A wurde von Sigma, Lysozym von Eurobio und Complete<sup>TM</sup> Protease-Inhibitor-Tabletten von Roche Applied Science (Mannheim) bezogen.

### Reaktionskits

Die nachfolgend aufgelisteten Reaktionskits wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

QIAEXII Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotid Removal Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Purification Kit	Qiagen
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA
Half-Dye™ Mix	Bioline, Luckenwalde
ABI Prism BigDye™ Terminator Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA
Western Lightning™ Chemiluminescence	Perkin Elmer Life Science, Boston, MA
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs
Silver Stain Plus Kit	BioRad, München

### 2.4 Bakterienstämme und Medien

<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU196(π80 lacZ DM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, relA1, thi-1</i>	Gibco, Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> , <i>hsdS, r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>, gal, ompT</i>	Novagen, Schwalbach

#### LB-Medium:

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
ad 1 L H<sub>2</sub>O    pH 7,0

#### RB-Medium:

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
2 g Glucose  
ad 1 L H<sub>2</sub>O    pH 7,0

Zur Herstellung von LB-Agar wurde 15 g/L Agar zugegeben. Die Medien wurden 20 Min. bei 121 °C autoklaviert und gegebenenfalls vor Gebrauch mit Ampicillin (100 µg/ml; Eurobio), Kanamycin (50 µg/ml; Sigma) oder Tetracyclin (20 µg/ml; Eurobio) versetzt.

## 2.5 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Expressionsvektoren sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Quelle (Referenz)</b>
pEGFP-N1	Vektor zur Expression N-terminaler GFP-Fusionsproteine in Säugerzellen.	Clontech, Palo Alto, CA
pEGFP-C3	Vektor zur Expression C-terminaler GFP-Fusionsproteine in Säugerzellen.	Clontech
pSTAT1 $\alpha$ -GFP <sup>1</sup>	Humanes STAT1 $\alpha$ (AS 1-747) in pEGFP-N1.	(Begitt et al., 2000)
pSTAT1 $\beta$ -GFP	Humanes STAT1 $\beta$ (AS 1-712) in pEGFP-N1. PCR-Klonierung (Primerpaar 305/308) über EcoR1/BamH1.	Dr. U. Vinkemeier (Lödige et al., 2005)
pSTAT1(S <sup>727</sup> A)-GFP <sup>2</sup>	PCR-Amplifikation (Primerpaar 305/353) von <sup>5</sup> . In pEGFP-N1 über EcoR1/BamH1.	Dr. U. Vinkemeier
pSTAT1(S <sup>727</sup> D)-GFP	Derivat von <sup>1</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar 446/447.	Dr. U. Vinkemeier
pSTAT1(M <sup>726</sup> R/S <sup>727</sup> R)-GFP	Derivat von <sup>1</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar 462/463.	Dr. U. Vinkemeier
pSTAT1(M <sup>726</sup> E/S <sup>727</sup> D)-GFP	Derivat von <sup>1</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar 484/485.	Dr. U. Vinkemeier
pSTAT1(K <sup>410</sup> E/K <sup>413</sup> E)-GFP	Derivat von <sup>1</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit den Primerpaaren 596/597 und 598/599.	(Meyer et al., 2002b)
pSTAT1(T <sup>327</sup> R/V <sup>426</sup> H/T <sup>427</sup> H)-GFP	Derivat von <sup>1</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit den Primerpaaren 432/433 und 436/437.	(Meyer et al., 2003)
pSTAT1 $\Delta$ N-GFP <sup>3</sup>	N-terminal verkürztes STAT1 (AS 127-747) in pEGFP-N1. PCR-Klonierung (Primerpaar 306/353) über EcoR1/BamH1.	Dr. U. Vinkemeier (Lödige et al., 2005)
pSTAT1-tc-GFP	N- und C-terminal verkürztes STAT1 (AS 127-712) in pEGFP-N1. PCR-Klonierung (Primerpaar 306/308) über EcoR1/BamH1.	Dr. U. Vinkemeier (Lödige et al., 2005)
pSTAT1 $\Delta$ N(S <sup>727</sup> A)-GFP	PCR-Amplifikation (Primerpaar 306/353) von <sup>5</sup> . In pEGFP-N1 über EcoR1/BamH1.	Dr. U. Vinkemeier
pSTAT1(685-750)-GFP	C-Terminus von STAT1 (AS 685-750) in pEGFP-C3. PCR-Klonierung (Primerpaar 425/426) über HindIII/BamHI.	Dr. U. Vinkemeier (Lödige et al., 2005)

---

Material

---

pSTAT1 $\alpha$ -NES-GFP	Vektoren zur Expression eines Fusionsproteins aus	Dr. U. Vinkemeier
pSTAT1 $\Delta$ N-NES-GFP	STAT1, dem transferierbaren NES von STAT1 (AS	(Lödige et al., 2005)
pSTAT1 $\beta$ -NES-GFP	367-427) und GFP.	
pSTAT1tc-NES-GFP		
pcDNA3.1	Vektor zur Expression unmarkierter Proteine in Säugerzellen.	Invitrogen, Inchinnan
pcDNA3-STAT1 $\alpha$ <sup>4</sup>	Humanes STAT1 $\alpha$ in pcDNA3.1.	Dr. James E. Darnell
pcDNA3-STAT1 $\beta$	Humanes STAT1 $\beta$ in pcDNA3.1.	Dr. James E. Darnell.
pRcCMV-STAT1(S <sup>727</sup> A) <sup>5</sup>	Humanes STAT1 (Serin <sup>727</sup> Alanin) in pRcCMV.	Dr. James E. Darnell
pcDNA3-STAT1(F <sup>77</sup> A)	Derivat von <sup>4</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar 558/559.	(Meyer et al., 2004)
pRcCMV-STAT1(F <sup>77</sup> A/S <sup>727</sup> A)	Derivat von <sup>5</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar 558/559.	Dr. U. Vinkemeier
pcDNA3-STAT1(L <sup>407</sup> A/L <sup>409</sup> A)	Derivat von <sup>4</sup> , eingeführt durch Sequenz-spezifische Mutagenese mit dem Primerpaar 490/491.	(Meyer et al., 2002b)
pcDNA3-STAT1tc <sup>7</sup>	N- und C-terminal verkürztes STAT1 (AS 132-713) in pcDNA3.1.	Dr. James E. Darnell
pcDNA3-STAT1 $\Delta$ N	N-terminal verkürztes STAT1 (AS 132-750). Generiert durch Ligation des HindIII-Fragmentes aus <sup>7</sup> in <sup>4</sup> .	Diese Arbeit.
pcDNA3-STAT1 $\alpha$ -NES	Fusionsprotein aus STAT1 $\alpha$ und dem transferierbaren NES von STAT1 (AS 367-427) in pcDNA3.1.	Dr. U. Vinkemeier
pcDNA3-STAT1 $\beta$ -NES	Fusionsprotein aus STAT1 $\beta$ und dem transferierbaren NES von STAT1 (AS 367-427) in pcDNA3.1.	Dr. U. Vinkemeier
pFastBac	Baculo-Transfer-Vektor	Invitrogen
pFastBac-STAT1 $\alpha$	Humanes STAT1 $\alpha$ in pFastBac.	(Meyer et al., 2003)
pFastBac-STAT1 $\beta$	Humanes STAT1 $\beta$ in pFastBac.	Dr. U. Vinkemeier (Lödige et al., 2005)
pFastBac-STAT1 $\Delta$ N	N-terminal verkürztes STAT1 (127-750) in pFastBac.	Dr. U. Vinkemeier (Lödige et al., 2005)
pFastBac-STAT1tc-Strep	N- und C-terminal verkürztes STAT1 (127-712) mit C-terminalem Strep-Tag in pFastBac.	Dr. U. Vinkemeier (Lödige et al., 2005)
pGST-GFP	Vektor zur bakteriellen Expression eines GST-GFP-Fusionsproteins.	(Begitt et al., 2000)

pRcCMV-EgΔBglII	Vektor zur Expression eines Fusionsproteins aus der extrazellulären Domäne des murinen EPO-Rezeptors und der intrazellulären Domäne des humanen gp130-Rezeptors. Die Deletion eines internen BglII-Fragmentes (AS 709-796) führt zum Verlust der STAT3-Bindestelle, während die STAT1-Bindestelle erhalten bleibt.	Dr. F. Horn (Gerhartz et al., 1996)
pMex/neo cd8-c-eyk	Vektor zur Expression einer konstitutiv dimerisierten Form der Tyrosinkinase c-eyk in Säugerzellen.	Dr. D. Besser (Zong et al., 1996)
pGST-p38α	Vektor zur bakteriellen Expression der humanen Serinkinase p38α.	Dr. J. Han (Raingeaud et al., 1995)
pMal-MKK3(DD)	Vektor zur bakteriellen Expression einer konstitutiv aktiven Form der humanen Serinkinase MKK6/SKK3 als Maltosebindeprotein-Fusionsprotein.	Dr. A. Nebreda (Alonso et al., 2000)
pGST-Imp α5	Vektor zur bakteriellen Expression von humanem Importin α5 als GST-Fusionsprotein.	(Fagerlund et al., 2002)
pβGal	β-Galaktosidase-Expressionsvektor	Stratagene, La Jolla
pGAS3xLy6E	IFNγ-abhängiger Reportervektor	(Wen et al., 1995)
pDL(GAS2)HIV(-33/+88)	Vektor zur <i>in-vitro</i> -Transkription; enthält 2 STAT1-Bindestellen vor dem HIV-Kernpromotor.	Dr. T. Oelgeschläger (Lödige et al., 2005)
pTOG5HIV(-33/+68)	Vektor zur <i>in-vitro</i> -Transkription; enthält 5 GAL4-Bindestellen vor dem HIV-Kernpromotor.	(Castaño et al., 2000)

## 2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) oder Biotex (Berlin-Buch) bestellt. Zur Konzeption von Primern wurde das Softwareprogramm GeneTool (BioTools, Edmonton, Canada) verwendet.

### *Primer zur PCR-Amplifikation und nachfolgenden Klonierung verschiedener STAT1-Derivate*

Name	Sequenz	Beschreibung
305	5'-ATATATGAATTCATGTCTCAGTGGTACGAACTTCAG-3'	STAT1, 5'-3', EcoRI
306	5'-ATATATGAATTCATGTCTCGGGGAATATTCAGAGCACAG-3'	ΔN, 5'-3', EcoRI
308	5'ATATATGGATCCGCAACTTCAGACACAGAAATCAACTC-3'	ΔC, 3'-5', BamHI
353	5'-ATATATGGATCCATCATACTGTCTGAATTCTAC-3'	STAT1, 3'-5', BamHI
425	5'-ATATAAAGCTTAAGGAAGCACCAGAGCCAATGGAAC-3'	C-Terminus, 5'-3', HindIII
426	5'-ATATAGGATCCCTATACTGTGTTCATCATACTGTC-3'	C-Terminus, 3'-5', BamHI

*Primer für die Sequenz-spezifische Mutagenese*

Name	Sequenz	Beschreibung
432	5'-GAGGGTCCTCTCATCCATCACGAAGAGCTTCACTC-3'	V <sup>426</sup> H/T <sup>427</sup> H, 5'-3'
433	5'-GAGTGAAGCTCTTCGTGATGGATGAGAGGACCCTC-3'	V <sup>426</sup> H/T <sup>427</sup> H, 3'-5'
436	5'-GCCCTGCATTGCCAAGGCACCCTCAGAGGCC-3'	T <sup>327</sup> R, 5'-3'
437	5'-GGCCTCTGAGGGTGCCTTGGCATGCAGGGC-3'	T <sup>327</sup> R, 3'-5'
446	5'-CAACCTGCTCCCCATGGAACCTGAGGAGTTTGAC-3'	S <sup>727</sup> D, 5'-3'
447	5'-GTCAAACCTCCTCAGGTTCCATGGGGAGCAGGTTG-3'	S <sup>727</sup> D, 3'-5'
462	5'-GACAACTGCTCCCCAGGCGTCTGAGGAGTTTGACG-3'	M <sup>726</sup> R/S <sup>727</sup> R, 5'-3'
463	5'-CGTCAAACCTCCTCAGGACGCCTGGGGAGCAGGTTGTC-3'	M <sup>726</sup> R/S <sup>727</sup> R, 3'-5'
484	5'-GACAACTGCTCCCCGATGAACCTGAGGAGTTTG-3'	M <sup>726</sup> E, 5'-3'
485	5'-CAAACCTCCTCAGGTTTCATCGGGGAGCAGGTTGTC-3'	M <sup>726</sup> E, 3'-5'
490	5'-GGCTGAATTTCCGGCACGCGCAAGCGAAAGAACAGAAAAATGC-3'	L <sup>407</sup> A/L <sup>409</sup> A, 5'-3'
491	5'-GCATTTTTCTGTTCTTTTCGCTTGCGCGTGCCGAAATTCAGCC-3'	L <sup>407</sup> A/L <sup>409</sup> A, 3'-5'
558	5'-GTTATGCTGTAGCAAGGCGTTATTCTCCAAAG-3'	F <sup>77</sup> A, 5'-3'
559	5'-CTTTGGAGAATAACGCCTTGCTACAGCATAAC-3'	F <sup>77</sup> A, 3'-5'

*Sequenzierprimer*

Name	Sequenz	Beschreibung
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	CMV-Promotor, 5'-3'
Bgh	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	pcDNA3, 3'-5'
EGFPC (516)	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'	GFP, 5'-3'
EGFPN (517)	5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3'	GFP, 3'-5'
GFP3'	5'-CTTGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCCAG-3'	GFP, 3'-5'
324	5'-GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGG-3'	PEGFP-N1, 3'-5'
430	5'-GTGGGAGGTCTATATAAGCAG-3'	pEGFP-N1 (vor dem Polylinker) 5'-3'
408	5'-CCGTGGACGAGGTTTTGTAAAG-3'	STAT1 (AS 600), 5'-3'
464	5'-GAAGTTGAGACTGTTGGTG-3'	STAT1 (AS 350), 5'-3'
IL5	5'-CAGGCCAAAGGAAGCACCAGAG-3'	STAT1 (AS 680), 5'-3'

*Oligonukleotide als Sonde (M67) für Gelretardations-Experimente*

465	5'-ACGTCGACATTTCCCGTAAATCTG-3'
466	5'-CAGTCAGATTTACGGGAAATGTCG-3'

**2.7 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe**

*Erstantikörper*

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Antikörper	im Western-Blot eingesetzt:	bezogen bei:
α-STAT1 p84/p91 (E-23) sc-346, polyklonal	1: 1000 in 4% Milchpulver/TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
α-STAT1 p84/p91 (C-24) sc345, polyklonal	1: 1000 in 4% Milchpulver/TBS-T	Santa Cruz Biotechnology

$\alpha$ -STAT1 p84/p91 (C-136) sc-464, monoklonal	1: 1000 in 4% Milchpulver/TBS-T	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Phospho-Tyrosin <sup>701</sup> -STAT1, polyklonal	1: 1000 in 4% BSA/TBS-T	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
$\alpha$ -Phospho-Serin <sup>727</sup> -STAT1, polyklonal	1: 1000 in 4% Milchpulver/TBS-T	Upstate, Lake Placid, NY
$\alpha$ -JAK2, polyklonal	1: 1000 in 4% Milchpulver/TBS-T	Upstate
$\alpha$ -Phospho-Tyrosin <sup>1007/1008</sup> -JAK2, polyklonal	1: 1000 in 4% BSA/TBS-T	Biosource, Camarillo, CA
$\alpha$ - $\beta$ -Aktin (AC-15), monoklonal	1: 3000 in 4% Milchpulver/TBS-T	Sigma
$\alpha$ -GFP-GST, polyklonal	1: 10000 in 4% BSA/TBS-T	Dr. W. Rosenthal, FMP
$\alpha$ -GFP (2A3), monoklonal		Dr. M. Vigneron, Universität de Strasbourg
$\alpha$ -EGF-Rezeptor (M 108), monoklonal		Dr. A. Marg, FMP

### *Sekundäre Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe*

Alle zur Detektion im Western-Blot (3.3.6) verwendeten Peroxidase-gekoppelten (HRP) Sekundär-Antikörper (Ziege  $\alpha$ -Maus-IgG, Schwein  $\alpha$ -Kaninchen-IgG, Kaninchen  $\alpha$ -Ziege-IgG) wurden von DAKO Cytomation (Glostrup, Denmark) bezogen. Die in Immunfluoreszenz-Analysen (3.4.1) eingesetzten Cy3-konjugierten Sekundär-Antikörper (Ziege  $\alpha$ -Kaninchen-IgG, Esel  $\alpha$ -Maus-IgG, Esel  $\alpha$ -Ziege-IgG) stammten von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA). Das als Injektionsmarker (3.3.12) verwendete Tetramethylrhodamine-Isothiocyanat (TRITC)- oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppeltes BSA war von Sigma.

## **2.8 Peptide**

Ein Peptid, das dem C-Terminus (AS 713-750) von STAT1 entspricht, wurde in unphosphorylierter und Serin<sup>727</sup>-phosphorylierter Form von Dr. M. Beyermann synthetisiert.

## 2.9 Stammlösungen und Puffer

### PBS:

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

### TAE (50x):

242 g Tris-Base  
57 ml konz. Essigsäure  
37,2 g EDTA  
ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}$

### TBS:

100 mM Tris/HCl, pH 7,5  
0,9% NaCl

### TBS-T:

TBS  
0,05% Tween 20

### TE:

10 mM Tris/HCl, pH 8  
1 mM EDTA

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Kultur von Säugerzellen**

A431, U3A oder HeLa S3-Zellen wurden in Dulbecco's-modifiziertem Eagle Medium (DMEM; Biochrom, Berlin), das 10% fötales Kälberserum (FCS; Biochrom) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom) enthielt, bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten, CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

##### *Zellpassage*

Das Passagieren der Zellen erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag durch Ablösen der zuvor zweimal mit PBS gewaschenen, zu etwa 70% konfluenten Zellen mit Trypsin/EDTA (0,5% Trypsin, 0,5% EDTA in PBS; Viralex<sup>TM</sup>, PAA, Linz). Durch Zugabe von Serum-haltigem DMEM wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen 1:4 bis 1:8 verdünnt ausplattiert.

##### *Einfrieren von Zellen*

Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70% trypsiniert, in frischem Medium aufgenommen und durch Zentrifugation für 5 Min. bei 180 x g und 15 °C pelletiert. Das Zellpellet (einer 100 mm Schale) wurde in 0,5 ml DMEM mit 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Gefriergefäßen (Cryovials; Nalgene, Neerijse, Belgien) ü/N in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer (Nalgene) langsam auf –80 °C abgekühlt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

##### *Auftauen von Zellen*

Eingefrorene Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in ein Falcon-Röhrchen überführt und mit 7 ml DMEM (20% FCS) vorsichtig gemischt. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen für 10 Min. bei 15 °C mit 180 x g zentrifugiert, das Zellpellet erneut in 5 ml DMEM mit 20% FCS resuspendiert und die Zellen in Kultur genommen.

#### **3.1.2 Transfektion von Säugerzellen**

Transiente Transfektionen wurden mit Lipofectamine und Plus-Reagenz (Gibco) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Transfektion einer 100 mm Schale wurden typischerweise

5 µg Gesamt-DNA, 20 µl Plus-Reagenz und 20 µl Lipofectamine verwendet. Für die Transfektion von Zellen auf 60 mm Schalen oder in 6- und 12-Loch-Platten wurde entsprechend weniger DNA, Plus-Reagenz und Lipofectamine eingesetzt. 24 bis 48 h nach Transfektion wurden die Zellen analysiert.

### **3.1.3 Behandlung von Zellen mit Cytokinen und Inhibitoren**

Wenn nicht anders angegeben, wurden für eine IFN $\gamma$ -Stimulation 50 Einheiten/ml (5 ng/ml) humanes, rekombinantes IFN $\gamma$  (Calbiochem) eingesetzt. Humanes Erythropoietin (Roche) wurde in einer Konzentration von 7 Einheiten/ml verwendet. MG 132 (50 nM; Sigma), Cycloheximid (10 µg/ml; Sigma) und Ratjadon A (10 ng/ml; ein Geschenk von Dr. M. Kalesse, Universität Hannover) wurden 1 h vor einer IFN $\gamma$ -Stimulation ins Zellkulturmedium gegeben. Der Kinase-Inhibitor Staurosporin wurde in einer Konzentration von 500 nM benutzt. Zur Phosphatase-Inhibition wurden die Zellen mit 0,8 mM Vanadat und 0,2 mM H $_2$ O $_2$  behandelt. Die Herstellung einer wässrigen Na $_3$ VO $_4$ -Stammlösung (10 mM, pH 10) erfolgte wie von Kypta und Kollegen (1988) beschrieben. Hierfür wurde der pH-Wert der wässrigen Natriumorthovanadat-Lösung mit 1 N HCl auf pH = 10 eingestellt und die daraufhin gelbgefärbte Lösung solange erhitzt bis sie wieder farblos wurde und anschließend auf RT abgekühlt. Dieser Zyklus wurde wiederholt (drei bis viermal) bis der pH-Wert bei 10 stabil und die Lösung farblos blieb. Alle verwendeten Reagenzien wurden direkt mit Zellkulturmedium verdünnt.

## **3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für eine nachfolgende Klonierung erfolgte mit Vent-Polymerase (NEB). Eine Standardreaktion enthielt in 50 µl Volumen 1 Einheit Polymerase, 50 ng Matrizen-DNA, je 375 ng des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, je 6,25 dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 5 µl 10x Reaktions-Puffer (100 mM KCl, 100 mM (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ , 200 mM Tris/HCl, 20 mM MgSO $_4$ , 1% Triton X-100, pH 8,8). Die Reaktion wurde in einem programmierbaren Thermoblock (GeneAmp PCR Systems 9700 von Applied Bioscience oder Mastercycler Gradient von Eppendorf) durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung von 1 Min. bei 94 °C folgten 14 bis 18 Zyklen von jeweils 25 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Primer-Hybridisierung bei 45 bis 60 °C und einer Elongationsphase bei 72 °C für 2 Min./kBp. Die Hybridisierungstemperatur

wurde entsprechend der Schmelztemperaturen der Primer gewählt. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die PCR-Fragmente mit dem „QIAquick Nucleotid Removal Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

### **3.2.2 Restriktionsverdau**

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen und die entsprechenden Puffer wurden bei NEB erworben und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden 0,5 bis 1 µg DNA und entsprechende Mengen von einem oder zwei Restriktionsenzymen in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Im allgemeinen reichten 1 bis 2 Einheiten eines Enzyms aus, um 1 µg DNA vollständig zu schneiden. Die Inkubation erfolgte für 1 h bis ü/N bei 37 °C.

Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurde Plasmid-DNA mit stumpfen Enden für 30 Min. bei 37 °C mit 0,5 µl alkalischer Phosphatase (calf intestinal phosphatase, NEB) behandelt. Die verwendete Phosphatase konnte in allen Restriktions-Puffern eingesetzt werden und wurde im Anschluss an einen Restriktionsverdau dem Ansatz zugegeben.

### **3.2.3 DNA-Gelelektrophorese**

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten aus PCR- oder Restriktionsansätzen wurden 0,75 bis 1,5%ige Agarosegele in TAE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 10x Auftrags-Puffer (30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau in TAE-Puffer) versetzt und die Elektrophorese bei 80 bis 100 V in TAE-Puffer durchgeführt. Der „DNA Molecular Weight Marker X“ (Boehringer) diente zur Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente. Die DNA-Banden wurden mit UV-Licht (260 nm) detektiert.

Für präparative Agrose-Gele wurde niedrig-schmelzende Agarose (Invitrogen) eingesetzt und die Bande von Interesse mit einer sterilen Rasierklinge ausgeschnitten. Die Aufreinigung des isolierten DNA-Fragmentes erfolgte mit dem „QIAEX II Gel extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

### **3.2.4 Ligation**

Die Ligationsreaktion wurden in einem Volumen von 20 µl mit dem „Quick Ligation<sup>TM</sup> Kit“ von NEB für 5 bis 10 Min. bei RT durchgeführt. Eingesetzt wurden ca. 100 ng Vektor-DNA und ein drei- bis fünffacher molarer Überschuss an Insert-DNA. Für eine Transformation in *E. coli* DH5α wurden 10 µl eines Ligationsansatzes verwendet.

### **3.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode**

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 100 ml LB-Medium mit 200 µl einer Übernachtskultur des entsprechenden *E.coli* Stamms angeimpft und auf einem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 kultiviert. Die auf Eis abgekühlte Bakterienkultur wurde für 10 Min. bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert (5804R, Eppendorf) und das Pellet in 30 ml eiskaltem, sterilem 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1,3 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> mit 0,7 ml Glycerol aufgenommen. 100 µl-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.6 Transformation kompetenter Bakterien nach der Hitzeschock-Methode**

100 µl kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol (1 M) versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden 10 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes zugegeben und unter sporadischem Schütteln für weitere 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 45 s, nachdem die Bakterien sofort wieder auf Eis für 5 Min. abgekühlt wurden. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h in 600 ml Antibiotika-freiem LB-Medium kultiviert. 200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten, die die entsprechenden Antibiotika enthielten, ausplattiert und ü/N bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **3.2.7 Plasmidisolierung**

#### *Mini-Präparation nach der TELT-Methode*

3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum wurde mit einer Bakterienkolonie inokuliert und für mind. 6 h bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Aus 1,5 ml dieser Kultur wurden durch Zentrifugation für 1 Min. bei 16.000 x g (Tischzentrifuge 5415R, Eppendorf) die Bakterien pelletiert, in 150 µl TELT-Puffer (2,5 ml Tris/HCl (1 M), pH 7,5, 39,3 ml LiCl (3,2 M), 6,25 ml EDTA (0,5 M), 2 ml 10% Triton X-100, ad 100 ml H<sub>2</sub>O) mit 10 µl Lysozym (25 µg/µl; Eurobio) resuspendiert und für 5 Min. bei RT lysiert. Das Lysat wurde für 5 Min. bei 95 °C erhitzt, anschließend für 5 Min. auf Eis abgekühlt und bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und die Plasmid-DNA im Überstand durch Zugabe von 100 µl Isopropanol und einer fünfzehnminütigen Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C gefällt. Die gefällte DNA wurde mit 250 µl 70%igem Alkohol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend

in 20 µl TE-Puffer mit 0,5 µg RNase A (Sigma) aufgenommen. 1 µl dieser Präparation wurde in einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt.

#### *Maxi-Präparation von Plasmid-DNA*

Die Präparation von Plasmiden in größerer Menge wurde mit dem „QIAGEN Plasmid Purification Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 100 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit 10 µl einer Vorkultur angeimpft und ü/N bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Die DNA wurde über „tip500-Säulen“ gereinigt.

#### *DNA-Konzentrationsbestimmung*

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm im UV-Photometer (Ultrospec 2100 pro; Amersham). Der Absorbtionswert  $A_{260}$  von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Verunreinigungen lassen sich durch Bestimmung des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  nachweisen. Bei nicht kontaminierten DNA-Lösungen hat dieser Quotient einen Wert von 1,8.

### **3.2.8 DNA-Sequenzierung**

Die Bestätigung von DNA-Sequenzen erfolgte mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Hierfür wurde eine PCR-Reaktion mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden durchgeführt und die Sequenzier-Produkte anschließend in einem Kapillar-Sequenzierer aufgetrennt. Ein Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 20 µl 10 pmol Primer, 300 ng saubere Plasmid-DNA oder 1 µl Mini-Plasmid-Präparation, 2,5 µl „BigDye™ Terminator Mix“ (Applied Biosystems) und 5 µl „Half-Dye™ Mix“ (Bioline). 30 Zyklen von Denaturierung bei 94 °C für 16 s, Primer-Hybridisierung bei 52 °C für 16 s und Elongation bei 60 °C für 2 Min. wurden durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Zugabe von 80 µl 95%igen EtOH und 2 µl 1,5 M NaAc, 250 mM EDTA, pH 8,5 gefällt. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation bei RT mit 16.000 x g für 15 Min.. Das Pellet wurde mit 80%igen EtOH gewaschen und luftgetrocknet. Die Kapillar-Sequenzierung in einem „ABI™ Prism 310 Genetic Analyser“ wurde von der Service-Gruppe Sequenzierung des FMPs durchgeführt.

### 3.2.9 Mutagenese

Für die Einführung von Punktmutationen wurde das “QuickChange II Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) verwendet. Eine PCR-Reaktion enthielt 50 ng Plasmid-DNA, 125 ng von jedem Primer, 1,25 mM von jedem dNTP, 2,5 Einheiten Pfu-Turbo-Polymerase (Stratagene) und 5 µl 10x Pfu-Polymerase-Puffer (Stratagene) in einem Volumen von 50 µl. Es wurden 14 Zyklen einer Denaturierung bei 94 °C für 20 s, einer Hybridisierung bei 52 °C für 20 s und einer Elongation bei 68 °C für 2Min./kbp durchgeführt. Die amplifizierten Plasmide wurden für 1 h mit Dnpi inkubiert, um die methylierte Plasmid-DNA bakteriellen Ursprungs zu verdauen. Mit 1,5 µl dieses Ansatzes wurden superkompetente XL10-Gold *E.coli* Zellen (Stratagene) transformiert.

## 3.3 Proteinchemische Techniken

### 3.3.1 Zellextraktion

#### *Gesamtzellextraktion*

Gesamtzellextrakte wurden typischerweise für Immunpräzipitationen verwendet oder zur Analyse von Protein-Expression und Phosphorylierungsstatus in Western-Blot-Experimenten eingesetzt.

Adhärenente Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, trocken abgesaugt und in Gesamtzellextraktions-Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren (50 mM Tris/HCl, 280 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10% Glycerol, 50 mM NaF, 10 mM Glycerophosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pH 7,4) lysiert. Dem Puffer wurden unmittelbar vor der Extraktion Detergenz (0,5% Nonidet-P40 (NP-40)) und dithio-1,4-threitol (DTT; 5 mM), sowie Protease-Inhibitoren (Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitor-Tabletten und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 0,1 mM) frisch zugesetzt. Die Puffermenge richtete sich nach der Größe der Zellkulturschale. Typischerweise wurden 500 µl Extraktions-Puffer für eine 100 mm Schale und 100 µl für ein Loch einer 6-Loch-Platte verwendet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, mehrmals auf- und abpipettiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 5 Min. bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extrakte wurden, sollten sie nicht direkt weiter verwendet werden, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### *Fraktionierte Zellextraktion*

Die Herstellung von cytosolischen Extrakten erfolgte wie für Gesamtzellextrakte beschrieben, außer dass ein Extraktions-Puffer mit hypotonischem Salzgehalt (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 10% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,2% NP-40, 5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren, pH 7,4) verwendet wurde. Auch in diesem Fall wurden Protease-Inhibitoren und DTT erst unmittelbar vor der Extraktion dem Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation für 5 Min. auf Eis wurden die Lysate für 10 s bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Zellkerne zu pelletieren. Der Überstand wurde nun erneut für 15 Min. bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert und als cytosolischer Extrakt verwendet. Die pelletierten Zellkerne wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in gleichem Volumen Kern-Extraktions-Puffer (20 mM HEPES, 420 mM KCl, 20% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 Min. auf Eis wurden die Kernlysate für 20 Min. bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert und die Überstände als nukleäre Extrakte portioniert und gegebenenfalls eingefroren.

### **3.3.2 Konzentrationsbestimmung**

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (Bradford, 1976) wurde das Protein-Assay Farbkonzentrat von BioRad nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Absorption der gefärbten Lösung wurde bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichgrade eines Standardproteins (BSA) ermittelt.

Die Konzentration von rekombinantem STAT1 wurde spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  hat einen Wert von:  $\epsilon = 1,25$  für STAT1 $\alpha$ ,  $\epsilon = 1,31$  für STAT1 $\beta$ ,  $\epsilon = 1,19$  für STAT1 $\Delta$ N und  $\epsilon = 1,27$  für STAT1 tc (Vinkemeier et al., 1996).

### **3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen und Zellextrakten wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der Masse der zu untersuchenden Proteine wurden 7%, 10% oder 12% Gele verwendet. Hierfür wurde eine fertige Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung (Rotiphorese Gel 30; Roth) entsprechend mit 4x Trenngel-Puffer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS) verdünnt. Kurz vor dem Gießen wurden 0,01% Ammoniumperoxosulfat (APS; Roth) und 0,01% N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED;

Merck) zugegeben. Das Sammelgel (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 5% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,01% APS, 0,01% TEMED) wurde nach vollständiger Polymerisation des Trenngels über dieses gegossen. Die Proteinproben wurden mit 6x SDS-Proben-Puffer (350 mM Tris/HCl, 30% Glycerol, 10% SDS, 0,6 M DTT, 0,012% Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt, für 5 Min. bei 95 °C erhitzt und aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in SDS-Lauf-Puffer (25 mM Tris/HCl, 0,1% SDS, 192 mM Glycin, pH 8,3) bei max. 200 V in einer Mini-Protean II Apparatur (BioRad). Der vorgefärbte Molekulargewichtsstandart „SeaBlue Plus2“ (Invitrogen) wurde als Größenreferenz mitaufgetragen.

### **3.3.4 Coomassie-Färbung**

Die Detektion von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel erfolgte durch Anfärben des Gels mit „Coomassie Brilliant blue R 250“ (Merck). Das Gel wurde für 30 Min. in Färbelösung (40% MeOH, 10% HAc, 0,1% Coomassie Brilliant blue R 250) inkubiert und anschließend durch wiederholtes Aufkochen in Wasser entfärbt.

### **3.3.5 Silber-Färbung**

Eine Silberfärbung wurde mit dem „Silver Stain Plus Kit“ (BioRad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.3.6 Western-Blot-Analyse**

Für einen immunologischen Nachweis wurden die via SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membranen (Protran; Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Der Elektrotransfer wurde nach der „Semi-dry“-Methode (Towbin et al., 1979) für 45 Min. bei 18 V in einer Transfer-Apparatur (Transblot-SD Semidry Transfer Cell; BioRad) mit Transfer-Puffer (48 mM Tris/HCl, pH7,3, 39 mM Glycin, 0,13 mM SDS, 20% MeOH) durchgeführt.

Die Membran wurde gegebenenfalls reversibel mit Ponceau-Rot (150 ml HAc, 400 ml MeOH, 0,25 g Ponceau-Rot (Fischer Scientific), ad 1000 ml H<sub>2</sub>O) gefärbt und anschließend für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C mit Blockierlösung (4% BSA oder Milch in TBS-T, entsprechend dem verwendeten Erstantikörper (2.7)) abgesättigt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C in Blockierlösung. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Min. mit TBS-T wurde die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper

(DAKO) (1:2.000 in TBS-T) für 30 Min. bei RT inkubiert. Es folgten drei weitere Waschstschritte mit TBS-T, sowie ein letzter mit TBS, bevor die Membran mit Hilfe des „Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus-Kits“ (Perkin Elmer, Boston, MA) nach Angaben des Herstellers entwickelt wurde. Zur Detektion der Chemilumineszenz stand ein LumiImager-System (Boehringer Mannheim) zur Verfügung.

Um die Membran mit einem anderen Erstantikörper erneut analysieren zu können, wurden die gebundenen Antikörper durch Inkubation für 45 Min. bei 50 °C in einem SDS/ $\beta$ -Mercaptoethanol-Puffer (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) abgelöst. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 Min. mit TBS-T gewaschen und konnte danach erneut mit Blockierlösung und den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden.

#### *Quantitative Auswertung*

Die Quantifizierung von Signalintensitäten wurde mit dem Softwareprogramm LumiAnalyst 3 (Roche) durchgeführt. Antigenkonzentrationen und Belichtungszeiten wurden so gewählt, dass die resultierenden Signalstärken innerhalb des linearen Bereiches des LumiImager-Systems lagen. Um Signalintensitäten miteinander vergleichen zu können, wurden die Blot-Membranen Seite an Seite transferiert, inkubiert und entwickelt. Für die Bestimmung der spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin<sup>701</sup>-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] wurde, nach Entfernen des im ersten Schritt gebundenen und quantifizierten Phospho-Tyrosin<sup>701</sup>-spezifischen STAT1-Antikörpers (Cell Signaling), dieselbe Membran mit einem STAT1-spezifischen Antikörper (E-23; Santa Cruz) analysiert.

### **3.3.7 Aufreinigung rekombinanter Proteine über Affinitäts-Chromatographie**

#### *GST-Fusionsproteine*

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus dem *E.coli* Stamm BL21pLysS erfolgte über Affinitäts-Chromatographie mit Glutathion-Sepharose 4b (Amersham Biosciences) im wesentlichen nach Angaben des Herstellers. 1 L LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin wurde mit 10 ml einer entsprechenden  $\bar{u}$ /N-Kultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Die Bakterienkultur wurde auf Eis abgekühlt und die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 0,2 bis 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Roth) induziert. Die Proteinexpression erfolgte  $\bar{u}$ /N bei 18 °C im Schüttler. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien 20 Min. bei 4.000 x g und 4 °C pelletiert (Avanti J-25-Zentrifuge; Beckman Coulter,

Fullerton, CA) und das Zellpellet in 50 ml Lysis-Puffer (1x PBS mit 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT und Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Die Suspension wurde mit einem Ultraschallgerät (70% Leistung bei Zyklus 5; Sonoplus UW 2070; Bändelin, Berlin) sechsmal für jeweils 30 s auf Eis sonifiziert und das Lysat für 30 Min. bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. 1 ml gepackte Glutathion-Sepharose wurde mit Lysis-Puffer äquilibriert und zu dem Überstand gegeben. Die Bindung der Proteine an die Matrix erfolgte für 2 h bei 4 °C am Drehrad. Anschließend wurde die beladene Sepharose viermal mit Lysis-Puffer gewaschen und das gebundene Fusionsprotein in drei Schritten mit je 1,5 ml Elutions-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM Glutathion (GSH; Sigma), 2 mM DTT) eluiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C. Die gereinigten Proteine wurden durch Ultrafiltration in Centriprep-Röhrchen (Amicon; Bedford, MA) aufkonzentriert und anschließend ü/N gegen die entsprechenden Puffer dialysiert (GST-p38: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5% Glycerol; GST-Imp  $\alpha$ 5: 20 mM HEPES/KOH, pH 7,2, 250 mM Succrose, 2 mM DTT; GST-GFP: Alkylierungs-Puffer (3.3.8)). Anschließend wurden die Proteine aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

#### *Abspaltung des GST-Anteils*

Zur Herstellung von freiem GFP wurde das GST-GFP-Fusionsprotein nicht eluiert, sondern der GFP-Anteil des noch an die Sepharose-gebundenen Fusionsproteins enzymatisch abgespalten. Die Spaltung erfolgte mit Faktor Xa (Novagen) bei 4 °C ü/N. 1 ml gepackte, Protein-beladene Glutathion-Sepharose wurde zweimal mit je 10 ml Spaltungs-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen und mit 80 Einheiten Faktor Xa in 1 ml Spaltungs-Puffer auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 mM PMSF gestoppt, der Überstand abgenommen und das freie GFP im Überstand chromatographisch vom Faktor Xa getrennt. Hierfür wurde der Überstand zunächst für 3 h gegen 1 L Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8, 25 mM NaCl) dialysiert und anschließend auf eine 1 ml Hi-Trap-Mini-Q-Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Salzgradienten von 25 mM bis 500 mM NaCl. Das aufgereinigte GFP wurde in Alkylierungs-Puffer (3.3.8) umgepuffert.

#### *MBP-Fusionsproteine*

Die Induktion und Expression des MBP (Maltosebindprotein)-MKK6-DD-Fusionsproteins in *E.coli* BL21pLysS-Bakterien erfolgte wie für GST-Fusionsproteine beschrieben. Anstelle von

LB-Medium wurde jedoch RB-Medium (2.4) verwendet. Das Pellet einer 1 L Bakterienkultur wurde in 50 ml Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mg/ml Lysozym und Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren) resuspendiert und für 30 Min. auf Eis vorsichtig gerührt. Anschließend wurde, wie beschrieben, sonifiziert und das Lysat durch Zentrifugation für 30 Min. bei 4 °C und 15.000 x g geklärt. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte über Amylose-Affinitäts-Chromatographie (NEB) im wesentlichen wie von Palmer und Kollegen (1998) beschrieben. 2 ml gepackte und nach Angaben des Herstellers äquilibrierte Amylose wurde zu dem Lysat gegeben und für 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Es folgten vier Waschschritte mit jeweils 15 ml Wasch-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA und Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren), bevor das Protein durch dreimalige Inkubation mit je 1,5 ml Elutions-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, und 12 mM Maltose) für 15 Min. bei 4 °C auf dem Drehrad eluiert wurde. Die Dialyse erfolgte ü/N gegen 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT und 5% Glycerol.

### 3.3.8 Aufreinigung von rekombinantem STAT1

Die Protein-Aufreinigung von rekombinantem STAT1 aus Baculovirus-infizierten Zellen der Motte *Spodoptera frugiperda* (Sf9-Zellen) und die sich anschließende Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung wurden im wesentlichen wie von Vinkemeier (1996) beschrieben durchgeführt. Die Herstellung rekombinanter STAT1 $\alpha$ -, STAT1 $\beta$ -, STAT1tc- und STAT1 $\Delta$ N-exprimierender Baculoviren erfolgte mit pFastBac-Transfer-Vektoren (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Rekombinanter Virus zur Expression und Aufreinigung von STAT1 $\alpha$  und STAT1tc, sowie bereits aufgereinigtes Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertes oder unphosphoryliertes STAT1 $\beta$  und STAT1 $\Delta$ N, wurden freundlicherweise von Dr. Andreas Marg zur Verfügung gestellt.

Die Sf9-Zellen wurden bei 27 °C in Grace-Medium kultiviert, das 10% Hitze-inaktiviertes (45 Min., 58 °C), fötales Kälberserum (FCS), 4 g/L Yeastolate (Gibco), 0,1% Pluronic F-68 (Gibco), 0,1 mg/ml Penicillin (Biochrom), 0,1 mg/ml Streptomycin (Biochrom) und 0,5  $\mu$ g/ml Particin (Biochrom) enthält. 3 Tage nach Virusinfektion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2.000 x g für 15 Min. geerntet.

Das Pellet von etwa  $1 \times 10^9$  Zellen wurde in 100 ml eiskaltem Lysis-Puffer (20 mM 2-(n-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), 100 mM KCl, 10 mM NaF, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

pH 7, 10 mM NaPP<sub>i</sub>, 4 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM DTT und Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren) resuspendiert und in einem Homogenisator (Glas-Col; Terre Haute, IN) mit 20 Schlägen lysiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Min. bei 20.000 x g und 4 °C. Der pH-Wert des Überstandes wurde mit 0,5 M MES auf einen Wert von 6,2 eingestellt, anschließend wurden 0,5 Volumenanteile S-Sepharose-Puffer A ohne KCl (20 mM MES, 20 mM DTT, pH 6 mit Tris) zugegeben. Nach einer Zentrifugation von 20 Min. bei 25.000 x g und 4 °C (Beckmann) wurde der Überstand auf eine S-Sepharose-Säule (5 x 5,5 cm; Amersham Biosciences) aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten von 50 bis 300 mM KCl und einem pH-Wertgradienten von 6 bis 7 eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 5 ml aufgefangen und die Fraktionen, die Protein enthielten, vereinigt. Der pH-Wert des Eluats wurde mit 1 M Tris auf einen Wert von 8 eingestellt und 0,25 Volumenanteile Q-Sepharose-Puffer A ohne KCl (20 mM Tris, 10 mM β-Mercaptoethanol) wurden zugegeben. Anschließend wurde die Protein-Lösung auf eine MonoQ-Sepharose-Säule (9 x 2 cm; Amersham Biosciences) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 100 bis 500 mM KCl eluiert. Protein-enthaltende Fraktionen wurden im Coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert und vereinigt. Durch Ultrafiltration wurde das Protein aufkonzentriert und entweder in Mikroinjektions (3.3.12)- oder Alkylierungs-Puffer gebracht.

Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgte gegebenenfalls eine Alkylierungsreaktion mit N-Ethylmaleimid (NEM). Hierfür wurde das Protein in Alkylierungs-Puffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, Complete<sup>TM</sup>-Protein-Inhibitoren und 20 mM NEM) für 10 Min. bei RT und anschließend für 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM β-Mercaptoethanol gestoppt und das Protein, entsprechend des sich anschließenden Experimentes, entweder in Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierungs- oder in Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierungs-Puffer umgepuffert.

### **3.3.9 EGF-Rezeptor-Kinase-Präparation und *in-vitro*-Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung von rekombinantem STAT1**

Die Präparation der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase erfolgte aus A431-Zellen im wesentlichen nach dem von Vinkemeier (1996) beschriebenen Protokoll. Die Zellen einer zu etwa 90% konfluenten 150 mm Platte wurden nach Waschen mit kaltem PBS in 1 ml eiskaltem Lysis-Puffer (10 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 10% Glycerol, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren, pH 7,5) für 10 Min. auf Eis inkubiert, anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt und mit einem 15 ml-Pistill-Homogenisator lysiert. Das Lysat

wurde durch Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C für 20 Min. geklärt und 1: 3 mit Lysis-Puffer verdünnt. Zu 10 ml des verdünnten Lysates wurden 160 µg eines monoklonalen EGF-Rezeptor-spezifischen Antikörpers (M 108) gegeben und die Lösung für 2 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit 200 µl gepackter, äquilibrierter Protein-A-Agarose (Repligen, Cambridge, MA). Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C auf dem Drehrad wurden die Immunpräzipitate fünfmal in Lysis-Puffer, sowie einmal in Tyrosin-Phosphorylierungs-Puffer gewaschen. Sollten die Immunpräzipitate nicht unmittelbar weiter verwendet werden, so erfolgte, anstelle des Waschschrilles in Tyrosin-Phosphorylierungs-Puffer ein Waschschrill mit Lager-Puffer (20% Glycerol, 20 mM HEPES/HCl, 100 mM NaCl, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pH 7,5) und die Präzipitate (in gleichem Volumen Lager-Puffer) wurden auf Trockeneis eingefroren und bei –80 °C gelagert.

Die *in-vitro*-Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierungs-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 1 ml bei 4 °C ü/N. 4 mg rekombinantes, alkyliertes STAT1 und 60 µl Agarose-gebundener EGF-Rezeptor wurden in Tyrosin-Phosphorylierungs-Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,3 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, pH 8) mit 5 mM ATP (in Tris/HCl, pH 8,5) auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Überstand sichergestellt und das Tyrosin-phosphorylierte Protein chromatographisch mit einer Hi-Trap-Heparin-Säule (Amersham Biosciences) vom unphosphorylierten Protein getrennt. Die Elution erfolgte in HA-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 2 mM β-Mercaptoethanol) mit einem Salzgradienten von 0 bis 500 mM KCl. Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 wurde durch Ultrafiltration bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml aufkonzentriert und in Mikroinjektions (3.3.12)- oder in Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierungs-Puffer (3.3.10) gebracht. Im Falle einer Lagerung bei –20 °C wurde das Protein in gleichem Volumen Glycerol aufgenommen.

### **3.3.10 *In-vitro*-Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung von rekombinatem STAT1**

Die *in-vitro*-Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung von rekombinatem, alkyliertem STAT1α erfolgte für 3 h bei 30 °C in einem Volumen von bis zu 2 ml. Unphosphoryliertes oder bereits Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1α (3 µM) wurde mit jeweils 1,5 µM rekombinanter GST-markierter p38-Kinase und rekombinatem MBP-MKK6(DD)-Fusionsprotein in Serin-Phosphorylierungs-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM Glycerophosphate, 2 mM DTT und Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren) mit 1 mM ATP (in Tris/HCl, pH 8,5) inkubiert. Die Abtrennung der Kinasen erfolgte durch Affinitätschromatographie mit je 50 µl gepackter, äqui-

librierter Glutathion-Sepharose und 100  $\mu$ l gepackter, äquibrierter Amylose-Matrix. Eine erfolgreiche Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung wurde im Western-Blot-Experiment mit einem Phospho-Serin<sup>727</sup>-spezifischen Antikörper und durch Massenspektrometrie (durchgeführt von Dr. E. Krause, FMP) bestätigt. In Vorversuchen wurden zunächst kleinere Reaktionsansätze mit einem Volumen von 40  $\mu$ l und 0,25  $\mu$ M STAT1, je 0,15  $\mu$ M Kinase und 100  $\mu$ M ATP gewählt. Für die Autoradiographie wurden 2  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (Amersham Biosciences) zur Reaktion gegeben und das Signal, nach Auftrennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese, mit dem PhosphoImager-System (Storm820; Molecular Dynamics, Piscataway, NJ) detektiert.

### **3.3.11 Peptid-Synthese und Kopplung an freies oder GST-markiertes GFP**

Serin-phosphorylierte oder unphosphorylierte Peptide, die dem C-Terminus (AS 713-750) von humanem STAT1 $\alpha$  entsprechen, wurden von Dr. M. Beyermann synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Synthese erfolgte wie in einem Artikel von Beyermann und Kollegen beschrieben (Beyerman et al., 1996).

Die kovalente Konjugation von Protein und Peptid erfolgte mit dem heterobifunktionalen Quervernetzer Sulfo-MBS (m-maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimid) von Pierce nach Angaben des Herstellers.

Vor der Kopplungsreaktion wurde das GST-GFP-Fusionsprotein (80  $\mu$ M) mit 43 mM Iodoacetamid für 2 h bei RT in Alkylierungs-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT) alkyliert und die Reaktion durch Zugabe von 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol gestoppt. Die Alkylierung von freiem GFP erfolgte wie bereits beschrieben mit NEM (3.3.8). Die alkylierten Proteine wurden in PBS umgepuffert.

200  $\mu$ g GST-GFP oder 250  $\mu$ g GFP in 40  $\mu$ l PBS wurden mit 1 mM Sulfo-MBS für 30 Min. bei RT inkubiert. In diesem Schritt wurde eine Amidbindung zwischen dem NHS (N-Hydroxysuccinimid)-Ester des Quervernetzers und freien Aminogruppen des Proteins gebildet. Da die zugänglichen Cysteine des Proteins alkyliert vorlagen, fand die Maleimid-Gruppe des Quervernetzers keinen Reaktionspartner. Erst nach Zugabe des zu konjugierenden Peptides konnte die Maleimid-Gruppe des Quervernetzers mit einem (aus diesem Grund in das Peptid eingeführten) Cysteinrest zu einer Thioether-Bindung reagieren. Bevor jedoch das Peptid zugegeben wurde, wurde überschüssiger Quervernetzer entfernt. Dies geschah über eine mit PBS äquilibrierte Entsalzungs-Säule (MicroSpin<sup>TM</sup> G-25; Amersham Biosciences). Das aktivierte Protein wurde

nun für 1 h bei RT mit dem phosphorylierten oder unphosphorylierten Peptid (240  $\mu$  M) in 250  $\mu$ l PBS inkubiert. Nicht-konjugiertes Peptid wurde durch Dialyse (gegen Mikroinjektions-Puffer) abgetrennt. Es folgte eine Einengung durch Ultrafiltration mit Centricon-Röhrchen (Amicon). Die Peptidkonjugation wurde anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit nachfolgender Coomassie-Färbung überprüft.

### **3.3.12 Mikroinjektion**

Für die Mikroinjektion wurden auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen in 35 mm Schalen mit 1 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 10%FCS oder HEPES-gepuffertes RPMI-1640-Medium (Biochrom) mit 10% FCS) überführt und unter Verwendung eines Transjectors 5246 (Eppendorf) auf dem 37 °C-warmen Arbeitstisch eines Injektionsmikroskops (Axiovert 25; Zeiss, Oberkochen) injiziert.

#### *Mikroinjektion rekombinanter Proteine*

Aufgereinigte, rekombinante Proteine (0,5-1 mg/ml) in Mikroinjektions-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,5, 110 mM KAc, 0,5 mM EDTA, 5mM DTT) wurden in das Cytosol oder den Kern unstimulierter HeLa-Zellen injiziert. Während einer Injektionsperiode von 15 bis 20 Min. konnten bis zu 60 Zellen injiziert werden. Als Injektionsmarker diente FITC- oder TRITC-gekoppeltes BSA (0,2 mg/ml; Sigma). Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C weiterkultiviert oder gegebenenfalls mit INF $\gamma$  stimuliert und anschließend mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Die immunologische Detektion nicht-GFP-markierter Proteine (3.4.1) erfolgte mit den STAT1-spezifischen Antikörpern C-136 (1:1.000 in 25%FCS/PBS; Santa Cruz Biotechnologies) und C-24 (1:10.000 in 25%FCS/PBS; Santa Cruz Biotechnologies) oder einem Phospho-Tyrosin-spezifischen STAT1-Antikörper (1:1.000 in 25% FCS/PBS; Cell Signaling) sowie den entsprechenden Cy3-gekoppelten, Spezies-spezifischen Immunglobulinen (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Endogenes STAT1 war bei dieser Antikörper-Verdünnung nicht detektierbar. Für die Detektion von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 wurden die Zellen nicht mit 4% Formaldehyd, sondern für 10 Min. mit eiskaltem MeOH fixiert. Im Anschluss an die Immunfärbung wurden die Zellkerne mit Hoechstfarbstoff angefärbt und die Zellen in einem Tropfen „Mounting medium“ (DAKO) eingebettet.

### *Antikörper-Mikroinjektion*

Für die Antikörper-Mikroinjektion wurde der monoklonale, GFP-spezifische Antikörper 2A3 (2,5 mg/ml; ein Geschenk von Dr. M. Vigneron, Université de Strasbourg) verwendet, der in das Cytosol von transient transfizierten HeLa-Zellen injiziert wurde. GFP-STAT1-exprimierende Zellen konnten aufgrund ihrer Fluoreszenz identifiziert werden. Innerhalb einer Injektionsperiode von 15 bis 20 Min. wurden 20 bis 40 Zellen injiziert. Als Injektionsmarker diente TRITC-gekoppeltes BSA (0,2 mg/ml). Nach Ablauf der jeweils angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert, die Kerne mit Hoechstfärbstoff angefärbt und die Präparate eingebettet. Die Analyse der subzellulären Verteilung der GFP-markierten STAT1-Derivate erfolgte wie beschrieben (3.4.2).

### **3.3.13 Importin $\alpha$ 5-Bindungs-Assay**

Auf 100 mm Schalen kultivierte U3A-Zellen wurden nach der Lipofectamine-Methode (3.1.2) mit den entsprechenden pcDNA3- oder EGFPN1-STAT1-Konstrukten sowie der Tyrosinkinase c-Eyk transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 30 Min. mit IFN $\gamma$  stimuliert und wie beschrieben (3.3.1) in 200  $\mu$ l Gesamtzellextraktions-Puffer lysiert. Die Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung der STAT1-Derivate wurde im Western-Blot analysiert und die Lysate auf gleiche Konzentrationen von Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 normalisiert. Hierfür wurden die Lysate mit identisch hergestellten Gesamtzellextrakten untransfizierter U3A-Zellen aufgefüllt. Für den Importin  $\alpha$ 5-Bindungs-Assay wurden jeweils 500  $\mu$ l normalisierte Lysate für 1 h bei 4 °C mit 20  $\mu$ l gepackter, äquilibrierter Glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) oder Nickel-Agarose (NiNTA-Superflow; Qiagen) auf dem Drehrad inkubiert. Simultan wurden 10  $\mu$ g rekombinantes GST-markiertes Importin  $\alpha$ 5 (3.3.7) oder 5  $\mu$ g rekombinantes Histidin-gekoppeltes Importin  $\alpha$ 5 (ein Geschenk von Dr. M. Köhler, MDC-Berlin) für 1 h bei 4 °C an jeweils 20  $\mu$ l gepackte und äquilibrierte Glutathione-Sepharose bzw. Nickel-Agarose gebunden. Für die Bindungsreaktion mit Nickel-Agarose-immobilisiertem, Histidin-markiertem Importin  $\alpha$ 5 wurde ein Gesamtzellextraktions-Puffer ohne EDTA und EGTA verwendet, der 10 mM Imidazol enthielt. Die Importin  $\alpha$ 5-beladenen Matrices wurden anschließend dreimal mit je 0,5 ml Gesamtzellextraktions-Puffer gewaschen und mit den vorinkubierten, geklärten Zelllysaten vermischt. Die Bindungsreaktion erfolgte für 90 Min. bei 4 °C am Drehrad. Nach drei Waschschritten mit je 0,5 ml Gesamtzellextraktions-Puffer wurden die Matrices mit 40  $\mu$ l 1x SDS-Proben-

Puffer (3.3.3) versetzt und für 5 Min. bei 95 °C erhitzt. Der Überstand wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western-Blot-Experiment mit einem Phospho-Tyrosin<sup>701</sup>-spezifischen STAT1-Antikörper analysiert.

Der Importin  $\alpha 5$ -Bindungs-Assay mit endogenem STAT1 erfolgte in gleicher Weise, außer dass 150  $\mu$ l Gesamtzellextrakte von untransfizierten, unbehandelten oder für 30 Min. mit IFN $\gamma$  stimulierten HeLa-Zellen eingesetzt wurden.

### 3.3.14 Nachweis spezifischer DNA-Protein-Wechselwirkungen

Gelretardations-Experimente (electrophoretic mobility shift assays; EMSA), zum Nachweis der spezifischen STAT1-DNA-Bindung, wurden mit aufgereinigtem, *in-vitro*-Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 (3.3.9) oder mit Zellextrakten aus IFN $\gamma$ -stimulierten, transient mit den entsprechenden STAT1-Derivaten transfizierten U3A-Zellen durchgeführt. Die eingesetzten Gesamtzellextrakte entstanden durch Vereinigung cytosolischer und nukleärer Extrakte (3.3.1). Die Bindung von STAT1-Homodimeren erfolgte an eine doppelsträngige, radioaktiv-markierte DNA-Sonde mit einer einfachen STAT1-Bindestelle (M67).

#### *Hybridisierungsreaktion*

Die verwendete DNA-Sonde entstand durch Hybridisierung der beiden komplementären Oligonukleotide 465 und 466. Je 100 pmol Oligonuklotid wurden in 100  $\mu$ l Hybridisierungs-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM EDTA) für 5 Min. im Wasserbad auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden bei -20 °C gelagert.

#### *Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA*

Eine radioaktive Markierung erfolgte durch Auffüllen der nicht komplementären 5'-überhängenden Enden des hybridisierten Oligonukleotides mit radioaktiven Nukleotiden. Hierfür wurde das Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I verwendet, das über 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität, nicht aber über 5'-3'-Exonukleaseaktivität verfügt. Ein Reaktionsansatz von 50  $\mu$ l enthielt 1 pmol DNA, jeweils 8  $\mu$ l radioaktive Nukleotide ( $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dATP,  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP,  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dGTP,  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dTTP (10 mCi/ml; Amersham Biosciences), 5 Einheiten Klenow-Polymerase und 5  $\mu$ l 10x EcoPol-Puffer (NEB). Die Reaktion wurde 20 Min. bei RT durchgeführt. Anschließend wurde ein Überschuss nicht-markierter Nukleotide (je 6,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) für weitere 5 Min. zugegeben und die Reaktion durch Zuga-

be von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Freie Nukleotide wurden mit einer MicroSpin™ G-25-Säule (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

#### *Gelretardation*

Für die Bindungsreaktion wurden 0,2 µl radioaktiv-markierte DNA-Sonde, 1 µl Poly-Desoxyinosidphosphat-Desoxycytidinphosphat (Poly-dIdC; 2 mg/ml), 2,5 µl 5x Gelshift-Puffer (100 mM HEPES/KOH, pH, 7,9, 200 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 20% Ficoll), 1,3 µl DTT (100 mM), 3,5 µl H<sub>2</sub>O und entweder 4,5 µl Zellextrakt oder 10 nM rekombinantes, Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 für 15 Min. bei RT inkubiert. Um das resultierende Signal nachher als STAT1-DNA-Komplex identifizieren zu können, wurde in einen Reaktionsansatz nach 10 Min. 1 µl des polyklonalen STAT1-spezifischen Antikörpers C24 (Santa Cruz) in einer zehnfachen Verdünnung in PBS zugegeben.

Der gebildete Protein-DNA-Komplex wurde in einem nativen, äquilibrierten 4,8%igen Polyacrylamidgel bei 400 V und 4 °C mit 0,25x TBE als Lauf-Puffer für etwa 2 h aufgetrennt. Für das Gel wurden 12 ml einer fertigen Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)-Lösung (Rothiphorese Gel 40; Roth) mit 4,8 ml 5x TBE und 82 ml H<sub>2</sub>O gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 2 ml APS (10%; Roth) und 100 µl TEMED (Merck) gestartet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier (Schleicher & Schüll) vakuumgetrocknet und für mind. 2 h bei RT auf Phospho-Imager-Folie exponiert. Das Signal wurde mit einem PhosphoImager (Storm820; Molecular Dynamics, Piscataway, NJ) detektiert und mit dem Programm ImageQuant (Amersham Biosciences) analysiert.

Für das Kompetitions-Experiment mit unmarkierter DNA wurde zunächst ein fünffacher Reaktionsansatz hergestellt. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei RT wurden hieraus 13 µl auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Zeitpunkt: 0 Min.). Zu dem verbleibenden Ansatz wurden 10 pmol unmarkierte DNA-Sonde gegeben und bei RT inkubiert. Alle 10 Min. wurden hiervon nun weitere 13 µl auf das laufende Gel aufgetragen.

#### **3.3.15 Reporteragen-Assay**

Die Reporteragen-Analyse mit einem Interferon-γ-sensitiven Luciferase-Reporteragen (Wen et al., 1995) wurde wie beschrieben (Begitt et al., 2000) durchgeführt. Hierfür wurden in 24-Loch-Platten kultivierte U3A-Zellen mit je 0,15 µg des Luciferase-Reporteragen-Konstruktes, 0,1 µg

eines  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsplasmids (Stratagen) und 0,25  $\mu$ g der entsprechenden STAT1-Expressionsplasmide transfiziert. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit IFN $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt belassen, mit kaltem PBS gewaschen und in 150  $\mu$ l Glycyl-Glycine-Lysis-Puffer (25 mM Glycyl-Glycine, 1% Triton X-100, 15 mM MgSO $_4$ , 4 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,8) für 15 Min. bei RT lysiert. Die Lysate wurden anschließend für 15 Min. bei 4 °C und 16.000 x g geklärt und die Luciferaseaktivität mit dem „Luciferase Assay System“ (Promega) wie vom Hersteller empfohlen analysiert. Das emittierte Licht wurde in einem Mikroplatten Luminometer LB 96V (EG&G Berthold, Bad Wildbach) detektiert. Als interner Standard wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Hierfür wurden 20  $\mu$ l Lysat mit 280  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Substratlösung (211  $\mu$ l NaH $_2$ PO $_4$ /Na $_2$ HPO $_4$  (100 mM, pH 7,2), 66  $\mu$ l ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG)-Stammlösung (4 mg/ ml in PBS), 3  $\mu$ l 100x Mg-Stammlösung (100 mM MgCl $_2$ , 4,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol)) gemischt und die Reaktion nach 5 bis 20 Min. bei RT durch Zugabe von 500  $\mu$ l Stopp-Lösung (0,5 M Na $_2$ CO $_3$ ) gestoppt. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde nun durch die photometrische Messung des gelben Reaktionsproduktes o-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 420 nm mit einem Platten-Lesegerät (Tecan Safire Plate reader; Tecan, Crailsheim) bestimmt. Die relativen Lichteinheiten ergeben sich aus dem Quotienten der Luciferase- zur  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Dargestellt wurden der Mittelwert mit Standardabweichung aus 6 unabhängigen Experimenten. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2000.

### 3.3.16 Overlay-Assay

Die Bindung von STAT1 $\alpha$  oder STAT1 $\beta$  an die Kernporenproteine NUP153 und NUP214 wurde in einem *in-vitro*-Bindungs-Assay wie beschrieben (Marg et al., 2004) analysiert. Bakterienzelllysate, die etwa 6  $\mu$ g der entsprechen NUP-Fragmente enthielten (MBP-NUP153 (AS 333-618) und His-NUP214 (AS 1549-2090)) und freundlicherweise von Dr. A. Marg zur Verfügung gestellt wurden, wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt (3.3.3) und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (3.3.6). Anschließend wurden die Membranen mit Transport-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 110 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc) $_2$ , 0,5 mM EGTA, 2 mM DTT, 0,5% Tween-20 und Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitoren) gewaschen und für 1 h bei 4 °C in Blockier-Lösung (5% Milch in Transport-Puffer) inkubiert. 3  $\mu$ g/ml rekombinantes STAT1 $\alpha$  oder STAT1 $\beta$  wurden zugegeben und für weitere 16 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die

Membranen wurden anschließend dreimal mit Transportpuffer gewaschen und mit einem STAT1-spezifischen Antikörper (0,2 µg/ml; C-136; Santa Cruz) analysiert (3.3.6).

### **3.4 Fluoreszenzmikroskopische Analysen**

#### **3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie**

Für fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden Zellen auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichteten Deckgläsern kultiviert.

Zellen, die GFP-markierte Proteine exprimierten, wurden 24 h oder 48 h nach Transfektion, wie jeweils angegeben, stimuliert und anschließend für 10 Min. bei RT mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS, bevor die Kerne mit Hoechst 33258 (5 µg/ml in PBS; Sigma) gefärbt wurden. Nach erneutem Waschen mit PBS und H<sub>2</sub>O wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten in einem Tropfen „Fluorescence mounting medium“ (DakoCytomation) auf Objektträgern eingebettet.

Für die immunologische Detektion von unmarkiertem STAT1 wurden transfizierte Zellen, nach entsprechender Stimulation, für 15 Min. mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert und anschließend durch zehnmütige Behandlung mit 0,2% Triton X-100 (Promega) in PBS permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Zellen für 30 Min. mit 25% FCS in PBS inkubiert, bevor der STAT1-spezifische Erstantikörper (C-24; Santa Cruz Biotechnologies) in einer 5.000-fachen Verdünnung (25% FCS in PBS) für 1 h zugegeben wurde. Es folgten drei Waschschrte mit PBS und eine Inkubation für 30 Min. mit dem entsprechenden Cy3-gekoppelten Sekundäantikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories) in 2.000-facher Verdünnung (25% FCS in PBS). Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen einer Hoechst-Färbung unterzogen und eingebettet.

Für konventionelle Fluoreszenzmikroskopie wurde das Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss, Oberkochen) verwendet. GFP- und FITC-Signale wurde nach Anregung bei 480 nm, TRITC- und Cy3-Signale bei 580 nm detektiert. Aufnahmen wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (PCO, Kelheim) gemacht und mit der Axiovision Software von Zeiss bearbeitet.

### 3.4.2 Quantitative Auswertung von Fluoreszenzintensitäten

Eine quantitative Analyse der subzellulären Verteilung von GFP-markiertem STAT1 erfolgte unter Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (LSM 410; Zeiss, Jena). Das GFP-Signal wurde nach Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda=488$  nm detektiert.

Für die Auswertung fixierter Präparate wurden Zellen mit vergleichbarer Fluoreszenzintensität ausgewählt und eine Aufnahme der mittleren Schnittebene (Z-Ebene) gemacht. Mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms KS400 (Kontron Electronics, Redwood City, CA) wurden die Fluoreszenzdichten (Fluoreszenzintensität pro Fläche) in Cytoplasma und Zellkern bestimmt und der Quotient von nukleärer zu cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte errechnet. Dargestellt wurde der Prozentsatz von Zellen, deren Quotient oberhalb oder unterhalb eines festgelegten Wertes lag ([nukleäre Fluoreszenzdichte/cytoplasmatische Fluoreszenzdichte]  $> 4$  für nukleäre Akkumulation und  $\leq 0,5$  für cytoplasmatische Akkumulation). Die Anzahl der ausgewerteten Zellen lag zwischen 20 und 60 Zellen je STAT1-Derivat und Zeitpunkt und ist für jedes Experiment angegeben.

In ähnlicher Weise wurden die Fluoreszenzdichten in Cytoplasma und Zellkern lebender U3A-Zellen ermittelt, die GFP-markiertes STAT1 $\Delta$ N oder STAT1tc exprimierten. Hierfür wurden die transfizierten Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten 30 mm Deckgläschen kultiviert und 48 h nach Transfektion in die beheizbare Apparatur des Laser-Scanning-Mikroskops eingespannt. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 3 h in mit 20 mM HEPES gepuffertem RPMI-1640-Medium (Biochrom) mit 10% FCS. Zellen mit vergleichbarer Fluoreszenzintensität wurden ausgewählt und eine Aufnahme der mittleren Schnittebene (Z-Ebene) gemacht. Anschließend wurde vorsichtig Erythropoietin (7 Einheiten/ml) zugegeben und die Zellen alle 10 Min. erneut aufgenommen. Der Quotient aus nukleärer zu cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte wurde für jeden Zeitpunkt bestimmt und der Mittelwert mit Standardabweichungen für jeweils fünf Zellen pro STAT1-Derivat berechnet. Die Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm Microsoft Excel 2000.

### 3.4.3 FRAP-Analyse

Die intranukleäre Mobilität von GFP-markierten STAT1-Derivaten wurden in Photobleichungs-Experimenten (fluorescence recovery after photobleaching; FRAP) unter Verwendung eines, mit einem 30 mW Argon-Laser ausgestatteten Laser-Scanning-Mikroskops (LSM410; Zeiss, Jena) bestimmt. HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten 30 mm Deckgläsern kultiviert

und mit den entsprechenden pEGFN1-Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen wie angegeben für 30 Min. mit IFN $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt belassen und in die beheizbare Apparatur des Mikroskopes eingespannt. Die Messung, die maximal 30 Min. dauerte, erfolgte in DMEM mit 10% FCS. Es wurden Zellen mit vergleichbarer Fluoreszenz ausgewählt. Von einer Zelle wurden etwa 500 Aufnahmen der mittleren Schnittebene (Z-Ebene) mit hoher Frequenz (alle 0.016 s) über einen Zeitraum von 10 s gemacht. Auf die zehnte Aufnahme folgte der Bleichprozess. Hierfür wurde eine definierte, kreisförmige Region, in der Z-Ebene des Kerns (0,54% der Kernfläche) mit 30 Laserpulsen maximaler Intensität über einen Zeitraum von 0,55 s bestrahlt. Die Fluoreszenzintensitäten der definierten Region und einer gleich großen, ungebleichten Referenzregion wurden ermittelt und die differentielle Fluoreszenzintensität bestimmt. Die zehn Aufnahmen, die vor Beginn der Bestrahlung gemacht wurden, wurden gemittelt (Ausgangswert) und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden in % dieses Ausgangswertes angegeben. Graphisch dargestellt wurde der Mittelwert mit Standardabweichung der Fluoreszenzintensität (in % des Ausgangswertes) aus 5 bis 9 Messungen pro GFP-Derivat.

Die Kinetik der Fluoreszenzrückkehr wurde unter Verwendung des PRISM3-Programms (GraphPad Software) durch eine Exponentialfunktion mit zwei Exponenten ( $I(t) = A_{\max} + (A_{\min} - A_{\max}) \times \exp(-t/\tau_A) + B_{\max} + (B_{\min} - B_{\max}) \times \exp(-t/\tau_B)$ ) approximiert. Anhand dieser angepassten Messkurve wurde die Fluoreszenzintensität unmittelbar nach dem Bleichprozess (Minimum), das Maximum der Fluoreszenzintensität nach dem Bleichprozess (Endwert) und die Halbwertszeit bestimmt. Die statistische Analyse dieser Daten findet sich im Anhang.

Der Bleichprozess erfolgte analog zur Bildaufnahme. Dies bedeutet, dass die definierte Kernregion Pixel für Pixel bestrahlt wurde. Die sich hieraus ergebende reale Belichtungszeit lag für 30 Laser-Pulse bei 4.35 ms. Aufgrund der Bewegung der Aufnahmespiegel verlängerte sich jedoch die Zeit, die für diesen Prozess benötigt wurde, auf 0,55 s. Hierdurch wurde ein vollständiges Ausbleichen der bestrahlten Region verhindert. Die erreichte Bleichtiefe (Fluoreszenzintensität vor dem Bleichprozess - Fluoreszenzintensität nach dem Bleichprozess in % der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichprozess) wurde daher als Maß für die Mobilität der GFP-Fusionsproteine herangezogen.