

1. Einleitung

1.1. Zelluläre Signalübertragung durch Zytokine

1.1.1. Netzwerk der Zytokine

In einem mehrzelligen Organismus ist die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und verschiedenen Organen von zentraler Bedeutung. Hochentwickelte Lebewesen stehen ständig mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung und müssen schnell auf Veränderungen der Umgebung antworten. Ein bekanntes Beispiel ist das Immunsystem, das gezielt auf Störungen von außen reagiert und eine genau koordinierte Antwort auslöst. Zytokine gehören zu einer Gruppe von Mediatoren, die diese Koordination in den mehrzelligen Organismen vermitteln. Die Zytokine sind kleine Proteine oder Glykoproteine mit einer Länge von 100-200 Aminosäuren (Schooltink und Rose-John, 2002). Nahezu alle kernhaltigen Körperzellen setzen nach ihrer Aktivierung Zytokine frei. Als lösliche, extrazelluläre Botenstoffe übertragen Zytokine ihre Informationen über membranständige Rezeptoren in das Innere ihrer Zielzellen. Für die Zell-Zell-Kommunikation haben Zytokine eine zentrale Bedeutung. Gegenwärtig sind weit mehr als 100 verschiedene Zytokine beschrieben, es gibt aber keine einheitliche Nomenklatur. Die Einteilung der Zytokine erfolgte häufig nach der erstmaligen Beschreibung ihrer biologischen Aktivitäten. Zur Superfamilie der Zytokine gehören Interleukine, Wachstumsfaktoren, Interferone und Chemokine. Durch ihre strukturellen Merkmale können Zytokine in 5 verschiedene Familien eingeteilt werden, die in der Tabelle 1.1. beschrieben sind (Thomson, 1998; Nicola, 1994).

Die biologischen Funktionen der Zytokine sind sehr vielfältig. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, bei der Apoptose (programmierter Zelltod), bei Entzündungsreaktionen und bei der Kontrolle des Immunsystems (Arai et al., 1990). Interleukine (IL) und verschiedene Wachstumsfaktoren kontrollieren die Differenzierung und Vermehrung der hämatopoetischen Stammzellen, die sich im Knochenmark befinden. Die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen führt zu den verschiedenen Blutzellen der myeloiden und lymphoiden Entwicklungsreihe. Die verschiedenen Interleukine und Wachstumsfaktoren bestimmen in der Hämatopoese, ob sich die Stammzellen zu Erythrocyten, Thrombocyten, Monocyten, Gra-

nulozyten oder Mastzellen der myeloiden Reihe, oder zu B-Zellen, T-Helferzellen und cytotoxischen T-Zellen der lymphoiden Reihe entwickeln. Monocyten, Granulozyten und Mastzellen gehören zu dem angeborenen Immunsystem, wohingegen B-Zellen, T-Helferzellen und cytotoxische T-Zellen Zellen des erworbenen Immunsystems repräsentieren (Taga und Kishimoto, 1990). Eine weitere zentrale Rolle spielen die Interleukine bei der Koordination und Kontrolle des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Die Freisetzung der verschiedenen Interleukine, Interferone (IFN), des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) und der Kontakt mit Antigenen bestimmen die Antwort der Effektorzellen des Immunsystems. Ob es zur Abtötung virusbefallener Zellen durch cytotoxische T-Zellen, zur Freisetzung von Histamin durch Mastzellen oder zur Antikörperproduktion von B-Plasmazellen kommt, wird durch die verschiedenen Zytokine festgelegt (Brian, 1988; Arai et al., 1990). TNF α bildet eine eigene Strukturfamilie. IL1 und TNF α gehören zu den wichtigsten Mediatoren der Entzündungsreaktionen. Eine weitere Funktion, die von TNF α in die Zielzellen übertragen wird, ist die Auslösung der Apoptose (Grell et al., 1999). Interferone wurden erstmals als antivirale Zytokine beschrieben, sie haben jedoch noch weitere biologische Funktionen, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher beschrieben werden.

| Zytokinfamilie | Mitglieder | Biologische Funktion |
|--|--|---|
| Vier-Helikale-Zytokine | IL-1,-2,-4,-5,-6,-7,-9,-11,-15, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, CNTF, LIF, NNT-1, OSM, CT-1, EPO, GH, PRL Heterodimere Zytokine: IL-12,-23,-27 und CLC/CLF1 | Hämatopoese, Proliferation und Differenzierung von Zellen und Koordination des Immunsystems |
| IL-10-Familie | IL-10,-19,-20,-22,-24 und -26 | Immunregulation |
| IL-1-Familie | IL-1 α , IL-1 β , und IL-18 | Entzündungsreaktionen |
| Interferone | TypI: IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- τ und Limitin TypII: IFN- γ | antivirale Aktivität, immunregulatorische und antiproliferative Eigenschaften |
| TNF-α-Familie | TNF- α , Lymphotoxin, NGF und VEGF | Entzündungsreaktionen und Aktivator der Apoptose |

Tab. 1.1. Einteilung der Zytokine nach ihren strukturellen Merkmalen in Zytokinfamilien. G-CSF: Granuloocyte-Colony-Stimulating-Factor, M-CSF: Macrophage-Colony-Stimulating-Factor, CNTF: Ciliary-Neurotrophic Factor, NNT-1: New-Neurotrophin-1, OSM: Oncostatin-M, CT-1: Cardiotrophin-1, GH: Growth-Hormone, PRL: Prolactin, CLC/CLF: Cardiotrophin-Like-Cytokin/Cytokin-Like-Factor, NGF: Nerve-Growth-Factor und VEGF: Vascular-Endothelial-Growth-Factor: die anderen Faktoren werden im Text erwähnt und deren Abkürzungen beschrieben.

In der Embryonalentwicklung steuern Zytokine die Differenzierung der embryonalen Stammzellen (Nakashima et al., 1999). Zytokine kommen in der Regel nicht konstitutiv im Organismus vor. Sie werden erst nach der Aktivierung bestimmter Zelltypen produziert und entfalten nach ihrer Freisetzung ihre biologische Wirkung schon in sehr geringen Konzentrationen. Die Produk-

tion und Freisetzung von Zytokinen werden bereits auf der Ebene der Aktivierung der Zytokin-synthese reguliert. Die Regulation der Zytokinfreisetzung ist für die Koordination der vielfältigen biologischen Funktionen, die durch Zytokine ausgelöst werden, von großer Bedeutung.

1.1.2. Rezeptoren der Zytokine

Die Wirkung von Zytokinen erfolgt über spezielle membranständige Rezeptoren auf den Zielzellen, deren zelluläre Expression die Spezifität der Wirkung bestimmt. Alle Zytokinrezeptoren haben nur eine Transmembrandomäne. Die Rezeptoren der Zytokine werden analog zu den Liganden nach ihren strukturellen Merkmalen in Familien eingeteilt. In der Tabelle 1.2. werden die Rezeptorfamilien für Zytokine aufgeführt (Schooltink und Rose-John, 2002).

Die Rezeptoren der Vier-Helikalen-Zytokine gehören zu den Klasse-I-Zytokinrezeptoren, die der Interferone und IL-10-artigen Zytokine werden als Klasse-II-Zytokinrezeptoren bezeichnet. Rezeptoren für TNF α sowie IL-1 bilden jeweils eine eigenständige Rezeptorfamilie (Lang et al., 1998; Sims et al., 1988; Nicola, 1994). Den Zytokinrezeptoren ist eine extrazelluläre aminoterminal Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre carboxyterminale Domäne gemeinsam. Die Ligandenbindung findet am extrazellulären Teil der membranständigen Rezeptoren statt. Die spezifische Bindung der Liganden löst eine Dimerisierung bzw. Multimerisierung von einer oder mehreren Rezeptorkomponenten aus. Die Bildung dieses Liganden-Rezeptorkomplexes leitet die intrazelluläre Signalkaskade ein. Verschiedene Vier-Helikale-Zytokine binden spezifisch an einem Rezeptormolekül, welches als α -Untereinheit bezeichnet wird und assoziieren mit weiteren Rezeptorkomponenten, die als β -Untereinheiten bezeichnet werden. Die Funktion der β -Untereinheit besteht in der Übertragung des Signals auf intrazelluläre Komponenten der Signaltransduktion. Bei anderen Wachstumsfaktoren sind die Ligandenbindung und die intrazelluläre Signalübertragung nicht durch unterschiedliche Untereinheiten getrennt. Die Bindung von Erythropoetin auf den Zielzellen führt zum Beispiel zur Bildung eines homodimeren Rezeptorkomplexes, der das Signal über die intrazelluläre Domäne überträgt. Auch die Rezeptoren der anderen Zytokinfamilien bestehen aus mehreren verschiedenen Proteinen, wobei die Rezeptoren der TNF-Familie Ausnahmen bilden, da sie nur eine Proteinspezies enthalten (Grell et al., 1999; Miyajima et al., 1993; Bazan, 1990).

Die Zytokinrezeptoren treten erst nach der Stimulation der Zellen auf der Zelloberfläche auf. Die Kontrolle der Expression der Rezeptoren beschränkt Zytokineffekte auf bestimmte Zellpopula-

tionen. Ein Beispiel ist die Regulation der Expression des IL-6-Rezeptors (α -Untereinheit) auf der Oberfläche von nur wenigen Zellpopulationen (Hepatocyten, Makrophagen und B-Zellen), während die β -Untereinheit gp130 der IL-6-artigen Zytokinrezeptoren auf nahezu allen Körperzellen präsentiert wird (Taga und Kishimoto, 1997; Ehlers et. al., 1994). Zytokine besitzen die Eigenschaft, auf verschiedenen Zielzellen unterschiedliche Reaktionen auszulösen, was als Pleiotropie bezeichnet wird. Die Qualität der Antwort ist somit nicht alleine vom Zytokin abhängig, sondern auch von der Spezifität der Zielzelle. Andererseits lösen verschiedene Zytokine auf einer Zielzelle die gleichen Antworten aus, was als Redundanz bezeichnet wird. Zytokine, die nah miteinander verwandt sind, können wahrscheinlich den gleichen Rezeptor benutzen (Paul, 1989).

Die Bindung der Zytokine an ihre jeweiligen Rezeptoren und die Dimerisierung bzw. Multimerisierung der Rezeptoren führt zur Aktivierung von intrazellulären Kinasen, die nicht-kovalent an Zytokinrezeptoren gebunden sind. Diese Jak-Kinasen (**Januskinase**) phosphorylieren Tyrosinreste in der carboxyterminalen Domäne der Rezeptorproteine. Die Phosphorylierung der intrazellulären Zielproteine führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, die letztlich zur selektiven Genaktivierung und zu zytokin- und zellspezifischen Antworten führt (Darnell et al., 1994; Nicola, 1994).

| Rezeptorfamilie | Beispiel |
|------------------------------------|---|
| Klasse-I-Zytokinrezeptoren | IL-2-Familie: spezifische ligandenbindende Untereinheiten für IL-2,-4,-7,-9,-15,-21, (für IL-2:2 verschiedene bindende Untereinheiten: IL-2R α , IL-2R β); gemeinsame γ -Untereinheit IL-3-Familie: spezifische ligandenbindende β -Untereinheiten für: IL-2,-5 und CSF; gemeinsame γ -Untereinheit IL-6-Familie: spezifische α -Untereinheiten für IL-6,-11, CNTF, LIF, OSM, CT-1, NNT-1; gemeinsame β -Untereinheit (gp130) Homodimere Rezeptoren: EPO-R, GH-R, G-CSF-R und PRL-R |
| Klasse-II-Zytokinrezeptoren | IL-10-Familie: spezifische α -Untereinheiten für IL-10,-22 gemeinsame β -Untereinheit: IL-10-R β IL-19,-20,-24 benutzen entweder IL-20R α /IL-20R β oder IL22R α /IL22R β . Interferonrezeptoren TypI: IFNAR1/IFNRA2; Interferonrezeptor TypII: IFNGR1/IFNGR2 |
| Rezeptoren der TNF-Familie | TNF α : p55 oder p75 LT-R, NGF-R, VEGF-R |
| Rezeptoren der IL-1-Familie | IL-1-Rezeptorkomplex: IL-1RI oder IL-1RII/IL-1RacP IL-18-Rezeptorkomplex: IL1RI/IL-18RacP TLR |

Tab.1.2. Einteilung der Zytokinrezeptoren nach ihren strukturellen Merkmalen in Zytokinrezeptorfamilien.

R: Rezeptor, LT: Lymphotoxin, acP: accessory-Protein und TLR: Toll-like-Receptor; die anderen Faktoren werden im Text und in der Legende der Tabelle 1.1. aufgeführt.

1.1.3. Signalübertragung durch Interferone

Die Identifizierung des Interferons durch Isaacs und Lindemann im Jahre 1957 war ein Meilenstein in der Erforschung der Zytokine (Isaacs und Lindemann, 1987). Interferone spielen bei immunmodulatorischen und antiviralen Prozessen eine zentrale Rolle und haben antiproliferatorische Eigenschaften. Interferone werden in zwei Gruppen aufgeteilt (siehe Tab. 1.1.). Die Interferone vom Typ-I binden an die Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 (**I**nterferon-**A**lpha-**R**ezeptor) mit der gleichen Affinität. Der Rezeptor IFNAR1 ist mit der Tyrosinkinase Tyk2 assoziiert, während der Rezeptor IFNAR2 mit der Tyrosinkinase Jak1 nicht kovalent verbunden ist. Die Bindung von IFN α oder IFN β führt zur Dimerisierung von IFNAR1 und IFNAR2, wodurch die Tyrosinkinasen Tyk2 und Jak1 durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert werden. Der Rezeptor IFNAR2 bindet die cytosolischen Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 (**S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription). Nach der Aktivierung der Tyrosinkinasen werden die STAT1- und STAT2-Proteine phosphoryliert und leiten die IFN α - und IFN β -spezifische Antwort ein (Richter et al., 1998; Rani et al., 1996; Kotenko et al., 1999; Darnell et al., 1994; Ihle, 1995).

Die Bindung von IFN γ an dem Rezeptor IFNGR1 (**I**nterferon-**G**amma-**R**ezeptor) führt zur Bildung eines homodimeren Rezeptorkomplexes. Der Rezeptor IFNGR1 ist mit der Tyrosinkinase Jak1 nicht kovalent assoziiert und beinhaltet eine phosphorylierbare Bindungssequenz für STAT1 im carboxyterminalen Bereich. Der homodimere IFNGR1-Rezeptorkomplex bindet mit der ebenfalls homodimeren Rezeptorkomponente IFNGR2 zu einem tetrameren Rezeptorkomplex. IFNGR2 ist mit der Tyrosinkinase Jak2 assoziiert und aktiviert den Rezeptorkomplex. Dieser aktivierte Rezeptorkomplex bindet STAT1 und die Jak-Kinasen phosphorylieren STAT1-Proteine. Die Phosphorylierung des STAT1-Proteins führt zu IFN γ -spezifischen Antworten der Zielzellen (Rani et al., 1996; Darnell et al., 1994; Shuai et al., 1993a; Schindler und Darnell, 1995). Der Mechanismus der Aktivierung von STAT1 wird im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht.

1.1.4. Die STAT-Proteinfamilie

STAT-Proteine sind eine evolutionär hochkonservierte Proteinfamilie und kommen bereits beim Schleimpilz *Dictyostelium* vor (Darnell, 1997a; Kawata et al., 1997). Die STAT-Familie besteht bei Säugetieren aus sieben Mitgliedern, diese sind STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6. Allen STAT-Proteinen ist gemeinsam, daß sie eine Länge von ca. 700-800 Aminosäuren haben und aus einer aminoterminalen Domäne, DNA-Bindedomäne, SH2-Domäne und einer carboxyterminalen Transaktivierungs-Domäne aufgebaut sind. Im carboxyterminalen Bereich von STAT1, 2, 3, 5a, 5b und 6 befindet sich ein hochkonservierter Tyrosinrest, der von den Jak-Kinasen phosphoryliert wird. STAT1-, 3-, 5a- und 5b-Proteine besitzen im carboxyterminalen Bereich auch einen konservierten Serinrest, der von Serin- und Threonin-Kinasen phosphoryliert wird (Vinkemeier et al., 1998a; Shuai et al., 1993a).

Experimente mit STAT1- und STAT2-Gen-defizienten Mäusen zeigen die Bedeutung dieser Proteine bei der Regulation von antiviralen Prozessen, die durch Interferone vermittelt werden. STAT1-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen und mycobakteriellen Infektionen und ihnen fehlt die Auslösung einer Immunantwort. Wenn den Mäusen STAT2 fehlt, wird der IFN α/β -Signalweg unterdrückt, jedoch wird eine Immunantwort auf virale Infektionen ausgelöst (Park et al. 2000; Bluysen und Levy, 1997; Durbin et al., 1996).

Der Transkriptionsfaktor STAT3 wird durch IL-6, IL-11, LIF (**L**eukemia-**I**nhibitory-**F**actor), EGF (**E**pidermal-**G**rowth-**F**actor), PDGF (**P**latelet-**D**erived-**G**rowth-**F**actor) und CSF-1 (**C**olony-**S**timulating-**F**actor) aktiviert. Jak1 und Jak2 sind die spezifischen Tyrosin-Kinasen, die STAT3 am Tyrosinrest 705 phosphorylieren. Die Aktivierung von STAT3 führt zur Stimulation von proliferativen Prozessen und spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und der Regulation der Zellteilung. STAT3-Gendeletions-Experimente sind im Mausmodell während der Embryonalentwicklung letal und in adulten STAT3-negativen Zellen wird die Zellteilung und Zellproliferation unterdrückt (Schindler et al., 1992; Alonzi et al., 2001; Takeda et al., 1999).

STAT4 wird durch IL-12 in T-Zellen aktiviert und stimuliert die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen des Immunsystems. Mäuse, denen STAT4 fehlt, zeigen eine Störung der Differenzierung der T-Helfer-Zellen zu T_H1-Zellen (Wurster et al., 2000; Kaplan et al., 1996b; Lawless et al., 2000).

STAT5a und 5b sind in der Aminosäuresequenz zu 96% identisch und werden durch IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21, sowie GM-CSF (**G**ranulocyte-**M**acrophage-**C**olony-**S**timulating-**F**actor),

EGF, und Erythropoetin aktiviert. Diese Transkriptionsfaktoren kommen in einer Vielzahl von Zellen bei Säugetieren vor und unterdrücken die Apoptose. Die wichtigste Funktion von STAT5 liegt in der Regulation der Zellteilung und der Stimulation der Proliferation von Zielzellen. Mäuse, denen STAT5a/b fehlen, zeigen eine Unterdrückung der T-Zell-Proliferation nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (Yu et al., 1997; Schindler und Strehlow, 2000; Teglund et al., 1998; Liu et al., 1997; Udy et al., 1997; Ihle, 2001).

STAT6 wird ausschließlich durch IL-4 und IL-13 aktiviert und reguliert die T-Helfer-Zell-Entwicklung durch Induktion von T_H2-Zellen. Die Aktivierung von STAT6 führt zur Proliferation von B- und T-Zellen. STAT6-defiziente Mäuse haben einen Defekt der antikörpervermittelten Immunantwort. Den gleichen Phänotyp zeigen auch Mäuse, denen der IL-4 Rezeptor fehlt (Kaplan et al., 1996a; Takeda et al., 1997).

1.2. Der Transkriptionsfaktor STAT1

1.2.1. Struktur von STAT1

Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse führten zur Entschlüsselung der dreidimensionalen Struktur von STAT1-Protein (Abb. 1.1). Die Struktur von STAT1 offenbart eine typische Abfolge funktioneller Domänen, die für alle STAT-Proteine charakteristisch ist.

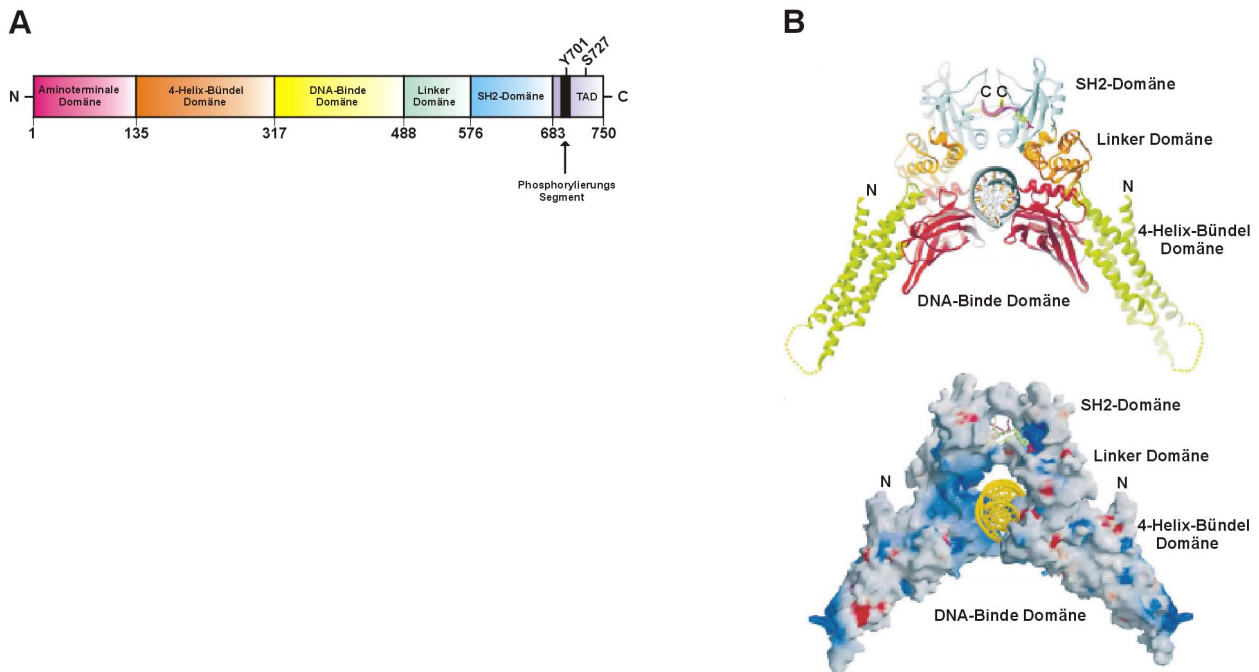


Abb. 1.1. Die Struktur von STAT1. Abbildung A: Die Struktur von STAT1 besteht aus der aminoterminalen Domäne, der 4-Helix-Bündel-Domäne, der DNA-Bindedomäne, der Linkerdomäne, der SH2-Domäne und der Transaktivierungsdomäne. Das Phosphorylierungssegment wurde schwarz hervorgehoben. Die Position von Aminosäuren wurde unter der Domänenstruktur am Ende der jeweiligen Domäne numeriert und Tyrosin 701 und Serin 727 wurden über der Domänenstruktur angezeigt. Abbildung B: Die dreidimensionale Struktur von STAT1 zeigt die Interaktion eines dimeren STAT1-Moleküls mit DNA (nach Vinkemeier et al., 1998a).

STAT1 besteht aus einer aminoterminalen Domäne, die *in-vitro* proteolytisch abspaltbar ist. Die aminoterminaler Domäne ist für die kooperative DNA-Bindung der einzelnen STAT-Dimere notwendig (Stark et al., 1998; Vinkemeier et al., 1998b). Dieser Domäne folgt eine 4-Helix-Bündel-Domäne. Das 4-Helix-Bündel beinhaltet ca. 185 Aminosäuren und beginnt mit der Aminosäure 136. Dem 4-Helix-Bündel schließt sich die DNA-Bindedomäne an. Die DNA-Bindedomäne besteht aus β -Faltblattstrukturen und Schleifen. In der DNA-Bindedomäne befindet sich eine Region, die für die Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz verantwortlich ist und über Protein-DNA-Wechselwirkungen mit DNA in Kontakt tritt. Mutationen in diesem Bereich führen zum Verlust der spezifischen DNA-Bindungen. (Darnell, 1997b; Decker et al., 1997; Stark et al., 1998; Williams, 2000).

Zwischen den Aminosäureresten 490-575 liegt die Linker-Domäne, die helikale Strukturen beinhaltet. Die Linker-Domäne ist noch relativ schlecht untersucht, weshalb die Funktion dieser Domäne noch weitgehend unbekannt ist. Der Linker-Domäne folgt die SH2-Domäne, die sowohl helikale als auch β -Faltblattstrukturen beinhaltet. Die SH2-Domäne wird für die Dimerisierung

von STAT-Proteinen benötigt. Dieser Domäne folgt von der Position 713 die Transaktivierungsdomäne, die ca. 67 Aminosäuren enthält. In der Transaktivierungsdomäne befindet sich der kritische Tyrosinrest 701, der von den Rezeptor-assoziierten Tyrosin-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 phosphoryliert wird und der Serinrest 727, der durch Serin- und Threonin-Kinasen phosphoryliert wird. (Vinkemeier et al., 1998a; Chatterjee-Kishore et al., 2000a; Hoey und Schindler, 1998).

Der Tyrosinrest 701, der in der Transaktivierungsdomäne in einem als Phosphorylierungs-Segment bezeichneten Bereich liegt, ist hochkonserviert und von essentieller Bedeutung für die STAT1-Aktivierung und Dimerisierung. Erst durch seine Tyrosin-Phosphorylierung wird die Dimerisierung der STAT-Proteine über Wechselwirkungen mit der SH2-Domäne möglich. Mutationen des Tyrosinrestes 701 führen ebenso wie Mutationen in der SH2-Domäne zum Verlust der Dimerisierung von STAT1 und somit zum Verlust der Zytokin-vermittelten Funktion von STAT1. Durch Phosphorylierung des Serinrestes 727 wird die transkriptionelle Aktivität von STAT1 gesteigert. In der natürlichen Spleißvariante von STAT-1 β fehlt dieser Serinrest (Darnell et al., 1994; Darnell, 1997b; Kuriyan und Darnell, 1999; Stark et al., 1998).

1.2.2. Die Funktion und Regulation von STAT1

Nach der Dimerisierung werden die homodimeren STAT1-Transkriptionskomplexe in den Zellkern transloziert. Im Zellkern binden die STAT1-Proteine an die Promotorregion von IFN γ -induzierbaren Genen und lösen deren Transkription aus. Die DNA-Sequenz, an der die STAT1-Homodimere binden, wird als GAS-Sequenz (**G**amma **A**ctivating **S**equence) bezeichnet. Die GAS-Sequenz ist durch das Palindrom TTNCNNNA gekennzeichnet, das charakteristisch für die spezifische Bindung von homodimeren STAT1-Komplexen ist (Decker et al., 1997; Frank, 1999; Park und Schindler, 1998; Stark et al., 1998).

Interferone vom Typ-I aktivieren die Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 durch die Rezeptor-assoziierten Tyrosin-Kinasen Jak1 und Tyk2. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste 690 von STAT2 und 701 von STAT1 führt zur Bildung von STAT1/STAT2-Heterodimere (Li et al., 1998). Das Heterodimer bindet mit einem cytosolischen Protein, das nach seiner molekularen Größe als p48 oder IRF-9 bezeichnet wird. IRF-9 gehört zur IRF-Familie (**I**nterferon **R**egulatory **F**actor). Der STAT1/STAT2-Heterodimer und IRF-9 bilden einen trimeren Komplex, der als ISGF3-Transkriptionskomplex (**I**nterferon **S**timulating **G**ene **F**actor) bezeichnet wird. ISGF3 wird in den Zellkern importiert und bindet in einer Region der DNA, die als ISRE-Sequenz (**I**n-

terferon Stimulated Response Element) bezeichnet wird. Die ISRE-Sequenz ist durch die Basenpaarabfolge AGTTTCNNTTTCNC gekennzeichnet. Die Bindung des ISGF3-Transkriptionskomplexes an die ISRE-Sequenz löst die Transkription von IFN α/β -induzierbaren Genen aus (Müller et al., 1993; Darnell et al., 1994; Park und Schindler, 1998).

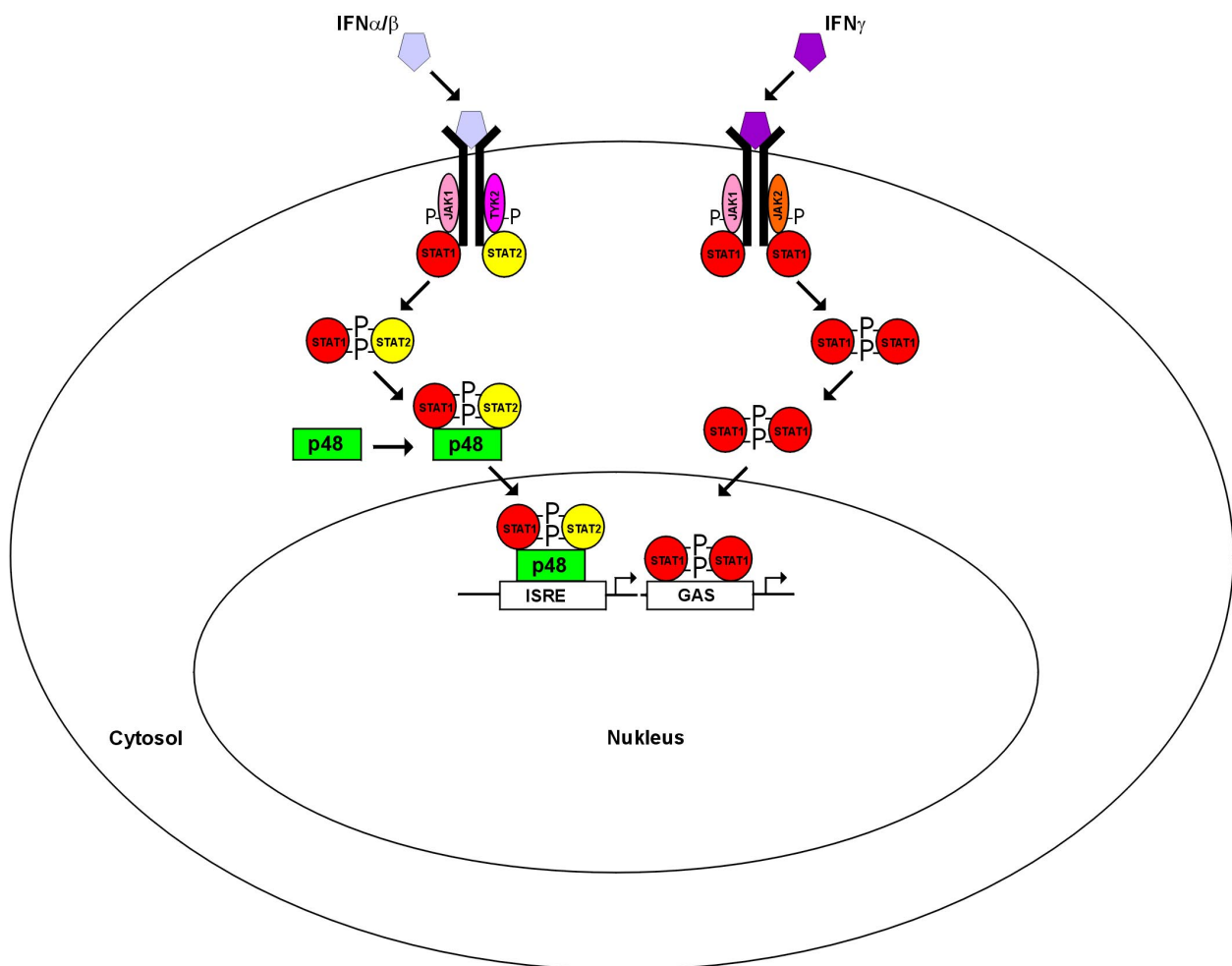


Abb. 1.2. Die Aktivierung von STAT1 und STAT2 durch die Zytokine IFN α/β und IFN γ . Nach der Bindung der Zytokine Interferon α/β und Interferon γ an ihrem Rezeptor kommt es zu einer Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 durch die Rezeptor-assoziierten Tyrosin-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2. Die Phosphorylierung aktiviert diese STAT-Proteine und führt nach IFN γ -Aktivierung zur Bildung von STAT1-Homodimeren und zur Bildung von STAT1/2-Heterodimeren nach IFN α/β -Aktivierung. Der STAT1-Homodimer oder der ISGF3-Transkriptionskomplex werden in den Zellkern transportiert und sie führen dort zur Genaktivierung an den spezifischen Sequenzen GAS für IFN γ -abhängige Gene und ISRE für IFN α/β -abhängige Gene.

Nach gängiger Meinung wird die DNA-Bindung von STAT1-Proteinen durch Ubiquitinierung der dimeren STAT1-Proteine aufgehoben. Der Proteasomen-vermittelte proteolytische Abbau von dimeren STAT1-Proteinen beendet die aktive Phase von STAT1 (Kim und Maniatis, 1996).

Nach einem anderen Modell könnte auch eine Tyrosindepshosphorylierung die aktive Phase von STAT1 beenden, da der dimere Komplex nach der Dephosphorylierung in die monomeren Proteinkomponenten dissoziiert (Darnell et al., 1994; Haspel und Darnell, 1999). In der Abbildung 1.2. ist der Signalweg der Interferone vom Typ-I und -II graphisch dargestellt.

Der Signalweg von STAT1 wird durch Inhibitoren im Cytosol und im Zellkern reguliert. SOCS-Proteine (**S**uppressor of **C**ytokine **S**ignaling) sind Inhibitoren, die eine STAT1-Aktivierung am Rezeptor unterdrücken. Diese Inhibitoren binden an die katalytische Region der Jak-Tyrosin-kinasen und unterbinden die STAT1-Phosphorylierung am Tyrosinrest 701 durch die Jak-Kinasen. Weitere negative Regulatoren der STAT1-Aktivierung sind CIS-Proteine (**C**ytokine **I**nducible **S**RC homology 2-domain containing protein), die mit STAT1 um die Bindestelle am Interferonrezeptor konkurrieren. (Starr et al., 1997; Endo et al., 1997; Kamizono et al., 2001; Krebs und Hilton, 2001).

Im Zellkern wird die Aktivierung der Genexpression der STAT1-Transkriptionskomplexe durch PIAS (**P**rotein **I**nhibitor of **A**ctivated **S**tat) unterdrückt. Der Inhibitor PIAS kommt ausschließlich im Zellkern vor und bindet an STAT1-Dimere. Die Interaktion von PIAS mit den STAT1-Transkriptionskomplexen soll die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen in interferonabhängigen Promotoren verhindern (Shuai, 2000; Liu et al., 1998; Liao et al., 2000; Naka et al., 1997).

Die Regulation des STAT1-Signalwegs ist in der Abbildung 1.3. dargestellt und zeigt die Vernetzung von Inhibitoren in den verschiedenen Kompartimenten mit dem STAT1-Signalweg.

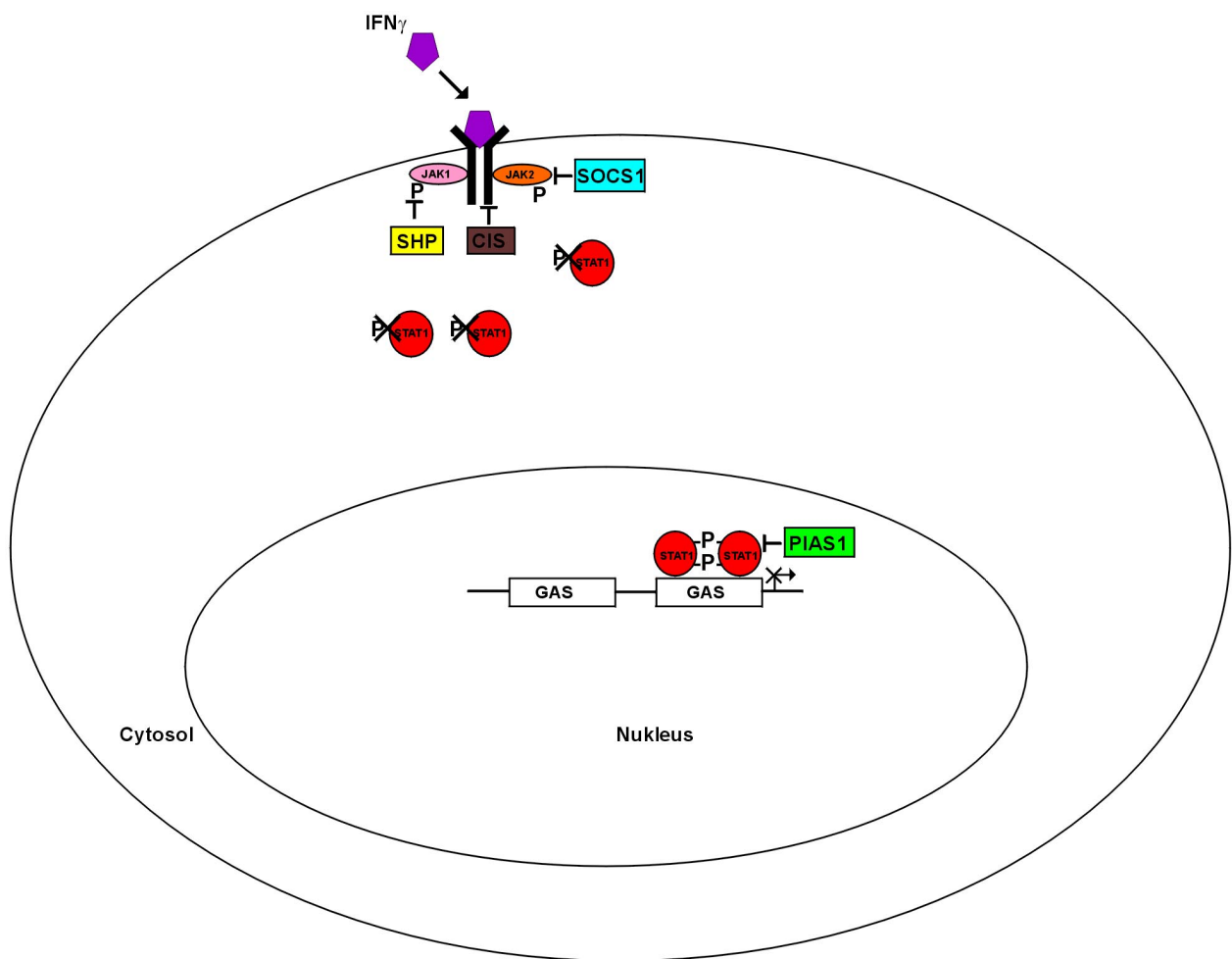


Abb. 1.3. Regulation des IFN γ -abhängigen Signalwegs von STAT1. Die Aktivierung von STAT1 wird durch Substrate inhibiert, die bereits auf der Rezeptorebene die Phosphorylierung von STAT1 durch die Jak-Kinasen verhindern. Die Inhibitoren SOCS1, CIS und SHP unterdrücken die Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 durch Jak1 und Jak2. PIAS unterdrückt die Transkription der Zielgene, indem es an STAT1 bindet und die Interaktion mit der GAS-Sequenz und der Transkriptionsmaschinerie verhindert.

1.2.3. Interferonabhängige Genaktivierung durch STAT1

Die Genaktivierung der STAT1-Zielgene erfolgt nach der Bindung der homodimeren STAT1-Transkriptionskomplexe an GAS-Sequenzen der DNA und nach der Bindung der ISGF3-Transkriptionskomplexe an ISRE-Sequenzen. Die ISRE-Sequenz befindet sich im Promotorbereich von IFN α/β -induzierbaren Genen. Untersuchungen an den Promotoren der Gene 6-16 und 9-27 haben gezeigt, daß der ISGF3-Transkriptionskomplex mit 35 bp der ISRE-Region interagiert. Der DNA-Kontakt wird nur durch STAT1 und IRF-9 hergestellt (Qureshi et al., 1996; Bluysen und Levy, 1997). Untersuchungen durch Röntgenstrukturanalyse zeigen, daß der ho-

modimere STAT1-Transkriptionskomplex mit 15 bp an der GAS-Sequenz bindet und mit diesen Basenpaaren eine relativ lockere Bindung eingeht (Vinkemeier et al. 1998a).

Die spezifische DNA-Bindung von STAT1 ist in der DNA-Bindedomäne lokalisiert. Die carboxyterminale Transaktivierungs-Domäne bindet Proteine des Transkriptionskomplexes. STAT1 bindet an das Koaktivator-Protein CBP/p300, das mit verschiedenen weiteren Proteinen einen STAT1-Koaktivator-Komplex bildet. Während STAT1 mit seiner aminoterminalen Domäne und seiner Transaktivierungs-Domäne mit dem CBP/p300 Koaktivator-Komplex in Verbindung steht, interagiert STAT2 nur mit der Transaktivierungs-Domäne mit diesem Komplex. Der CBP/p300 Koaktivator-Komplex verbindet die spezifischen Transkriptionsfaktoren mit der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie. Zur Transkriptionsmaschinerie gehören auch eine große Anzahl von Proteinen, die für die Regulation der Transkription wichtig sind (Stark et al., 1998; Zhang et al., 1995).

Die Interferone vom Typ I oder II aktivieren verschiedene Zielgene. Durch IFN γ werden mehr als 200 verschiedene Gene aktiviert. Dazu gehören Gene, die zu dem Antigen-präsentierenden Signalweg der MHC-Klasse-II-Proteine (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex) zählen, wie CIITA, TAP-1 (**T**ransporter **A**ssociated with **A**ntigene **P**rocessing) und LMP-2 (**L**ow molecular **M**ass **P**olypeptide) (Chatterjee-Kishore et al., 2000b; Horvath, 2000; Horvath et al., 1996). Diese Proteine regulieren den Transport und das Prozessieren der MHC-Klasse-II-Proteine in den verschiedenen Zellorganellen. Proteine wie IRF9 und IRF1 werden ebenfalls durch die Genaktivierung von GAS-enthaltenden Promotoren transkribiert. Diese Proteine regulieren den interferonabhängigen Signalweg (Boehm et al., 1997; Harton und Ting, 2002; Kumar et al., 1997b).

STAT1 aktiviert auch die Expression von MIG-1 (**M**onokine **I**nduced by **I**nterferon γ) und GBP-1 (**G**uanylate **B**inding **P**rotein). MIG-1 führt zur Aktivierung von Makrophagen, die eine direkte Rolle bei der Immunabwehr von Bakterien spielen und in die Koordination und Regulation des Immunsystems eingreifen. Das Protein GBP-1 unterdrückt die Proliferation von Epithelzellen (Boehm et al., 1997; Dupuis et al., 2001; Stark et al., 1998).

Die Abbildung 1.4. zeigt die Bindung des homodimeren STAT1-Transkriptionskomplexes und des ISGF3-Transkriptionskomplexes an die spezifischen DNA-Sequenzen. Die Genaktivierung wird für eine exemplarische Auswahl von Gene dargestellt.

Aktivierung von STAT1 durch IFN γ

Aktivierung von STAT1/2 durch IFN α/β

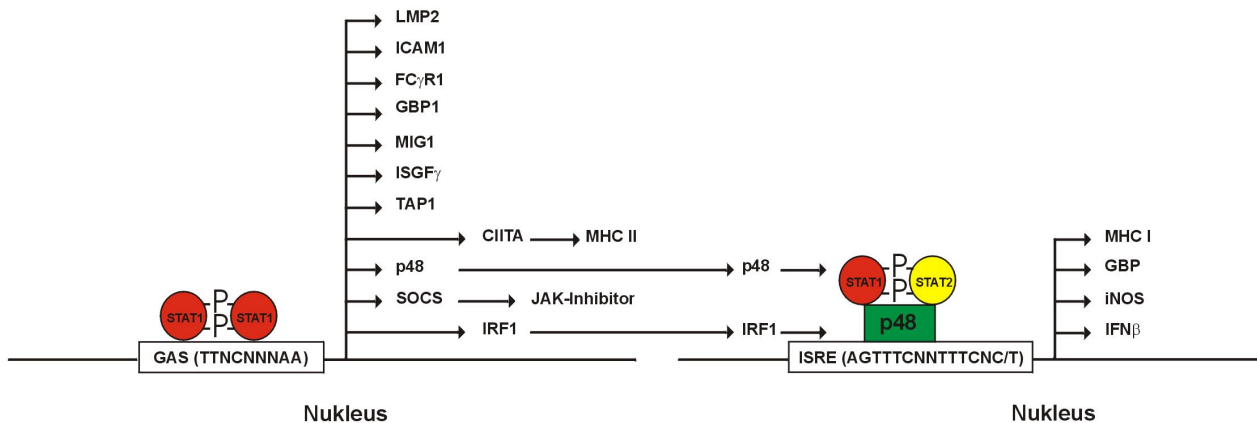


Abb. 1.4. Die IFN γ - IFN α/β -abhängige Genaktivierung durch STAT1 und STAT2. Die Bindung des STAT1-Homodimers an der GAS-Sequenz induziert die Aktivierung der IFN γ -abhängigen Gene LMP2, ICAM1 (**I**nter**C**ellular **A**dhesion **M**olecule), FC γ R1 (**FC** γ -**R**eceptor), GBP1, MIG1 ISGF γ , TAP1, CIITA (MHC II), p48, SOCS und IRF1. Die Bindung des ISGF3-Transkriptionskomplexes an der ISRE-Sequenz führt zur Aktivierung der IFN α/β -abhängigen Gene MHC I, GBP, iNOS (**N**itric **O**xide **S**ynthase) und IFN β . Die Aktivierung von IFN β , IRF1, p48 und SOCS führt zur Regulation des interferonabhängigen Signalwegs und macht eine Vernetzung des IFN α/β - und IFN γ -abhängigen Signalwegs deutlich.

Die Genaktivierung von STAT1 führt auch zur Expression von Genen, deren Produkte direkt in die negative Regulation der STAT1-Aktivierung eingreifen. Die Expression der SOCS-Proteine ist ein Beispiel für Inhibitoren des STAT-Signalwegs (Hoey und Schindler, 1998).

1.2.4. Interferonunabhängige Genaktivierung durch STAT1

STAT1-defiziente Zellen geben Hinweise darauf, daß es eine Beteiligung von STAT1 an der Aktivierung von Apoptosegenen geben könnte. Wenn STAT1 sich in diesen Zellen befindet, wird eine basale Expression der Caspasegene ausgelöst. Diese Genaktivierung unterbleibt in den Zellen, denen STAT1 fehlt. Es konnte deutlich gezeigt werden, daß STAT1 die Genexpression der Caspasen aktivierte, auch wenn keine Tyrosin-Phosphorylierung und Dimerbildung erfolgt (Kumar et al., 1997a; Na et al., 1996; Schindler, 1998; Hoey, 1997). Die Mechanismen der basalen Genaktivierung durch STAT1-Proteine ist noch vollkommen unbekannt.

1.3. Nukleocytoplasmatische Translokation von STAT1

1.3.1. Allgemeiner Mechanismus der nukleocytoplasmatischen Translokation

Viele Proteine, deren biologische Funktion in der Induktion von Zielgenen besteht, befinden sich im Cytosol der Zellen. Diese Proteine gelangen erst nach ihrer Aktivierung in den Zellkern und werden nach der Genaktivierung entweder durch eine Proteasomen-vermittelte Reaktion abgebaut oder werden wieder ins Cytosol zurücktransportiert (Kim und Maniatis, T., 1996; Mattaj und Engelmeier, 1998). Die Regulation der nukleocytoplasmatischen Transporte spielt eine zentrale Rolle für viele Prozesse. Dazu gehört der bereits gut beschriebene Prozeß der Translokation von RNA-Molekülen (mRNA), die im Cytosol durch die Ribosomen translatiert werden. Die RNA-Moleküle binden im Zellkern an Transportproteine und werden als Komplexe, die als snRNPs (**S**mall **N**uclear **R**ibonucleoprotein **P**articles) bezeichnet werden, in das Cytosol transportiert (Weis et al., 1995; Mattaj und Engelmeier, 1998).

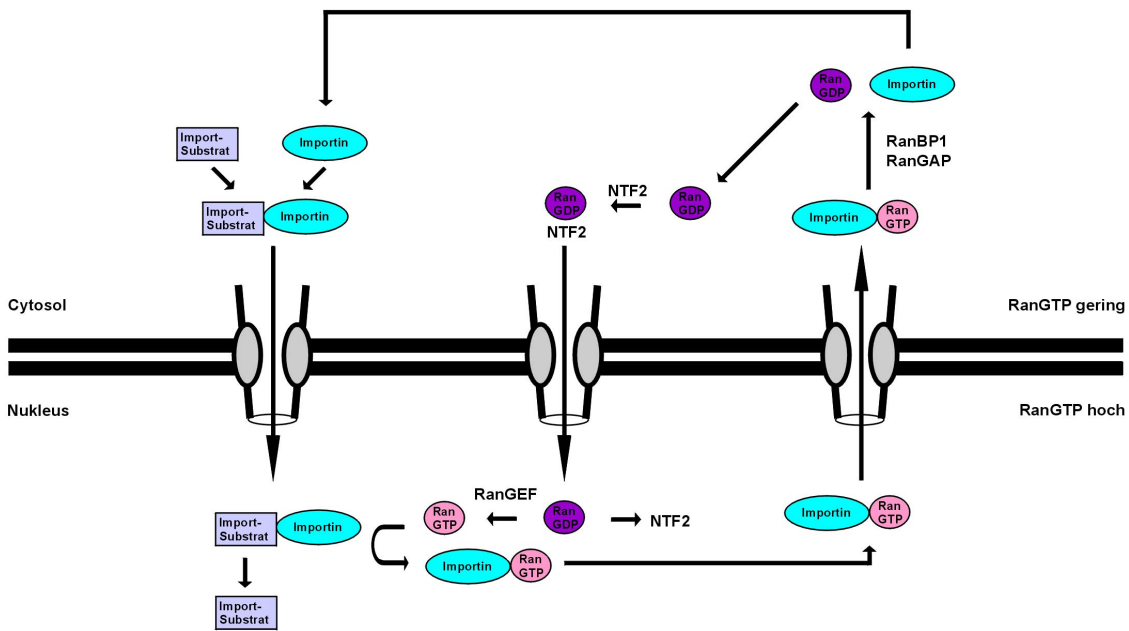
Allen nukleocytoplasmatischen Translokationen ist gemeinsam, daß die Kernmembran überwunden werden muß. In der Kernmembran befinden sich Poren. In diesen Poren werden Proteine gebunden, die zum nukleären Porenkomplex (NPC) gehören (Mattaj und Englmeier, 1998; Weis, 1998; Eguchi et al., 1997). Dieser nukleäre Porenkomplex reguliert den Import und Export von Proteinen und RNA-Protein-Komplexen zwischen Zellkern und Cytosol. Durch den wäßrigen Kanal des Kernporenkomplexes können Proteine, deren Größe nicht 30 kDa übersteigt, zwischen Kern und Cytosol diffundieren (Paine et al., 1975). Der Transport größerer Proteine und Protein-RNA-Komplexe ist ein hochregulierter Prozeß mit einem bidirektionalen Mechanismus (Azuma und Desso, 2000; Mattaj und Engelmeier, 1998).

Proteine, die aktiv durch den NPC transportiert werden, interagieren mit dem Porenkomplex über Rezeptorproteine. Diese Rezeptorproteine werden nach ihrer Funktion als Importine (Importrezeptor) oder Exportine (Exportrezeptor) bezeichnet und gehören zur Familie der Transportfaktoren. Die Bindung der Rezeptorproteine mit dem Zielprotein (Cargo-Protein) erfolgt über eine Signalsequenz in der Proteinstruktur der Cargo-Proteine. Diese Signalsequenzen bilden spezifische Motive, die für die Bindung von Importinen oder Exportinen unterschiedlich sind. Das "klassische" Importsignal NLS (**N**uclear **L**ocalisation **S**ignal) hat die Aminosäuresequenz PKKKRKV, die erstmals für das SV40-T-Antigen nachgewiesen werden konnte (Kalderon et al., 1984a). Das "klassische" Exportsignal NES (**N**uclear **E**xport **S**ignal) ist eine leuzinreiche Se-

quenz und hat die Konsensus-Sequenz LX₁₋₃LX₂₋₃LXL, wobei L der Aminosäure Leuzin entspricht und X eine beliebige andere Aminosäure ist. Leuzin kann in diesen Kernbereich auch durch die Aminosäuren Isoleuzin, Valin und Methionin ausgetauscht werden (Fornerod et al., 1997). Der aktive Transport durch die Kernporen wird von der GTPase Ran reguliert. Der Transport durch den Kernporenkomplex ist energieabhängig. Dabei bindet Ran an den Transportrezeptor, es bildet sich ein sogenannter Transportkomplex aus Transportrezeptor, Ran und Cargo-Protein. (Görlich und Kutay, 1999; Ullman et al., 1997; Jäckel et al., 1999; Jäckel und Görlich, 1998). Die GTPase Ran liefert die notwendige Energie für die Transportprozesse. Ran liegt im Cytosol in der Ran-GDP-Form vor, und im Zellkern dominiert die Ran-GTP-Form. Im Cytosol wird Ran-GTP durch RanBP-1 (Ran **B**inding **P**rotein) und RanGAP (Ran-GTPase **A**ctivating **P**rotein) hydrolysiert. Die Konzentration von Ran-GTP ist deshalb im Cytosol sehr gering. Ran-GDP bindet im Cytosol an NTF-2 (Nuclear **T**ransport **F**actor) und dieser dimere Komplex wird in den Kern transportiert. Im Kern bindet sich Ran-GDP an RanGEF (Guanine nucleotide **E**xchange **F**actor), der die Synthese des Ran-GTP katalysiert und zu der hohen Ran-GTP Konzentration im Zellkern führt. Der Konzentrationsunterschied von GDP und GTP-gebundenem Ran zwischen Cytosol und Zellkern treibt die Transportprozesse an (Görlich und Kutay, 1999; Weis et al., 1995).

Für den Export bindet sich das NES des Cargo-Proteins mit dem Exportin CRM-1 (Chromosome **R**egion **M**aintenance), das mit dem Kernporenkomplex in Verbindung tritt und den Export aus dem Zellkern einleitet. Der Export ist von der GTPase Ran abhängig, wie Experimente mit LMB (Leptomycin **B**), einen Inhibitor von CRM-1, zeigen. Der Exportrezeptor CRM-1 bindet Ran-GTP. (Fornerod et al., 1997; Kudo et al., 1999; Moroianu et al., 1996; Wolff et al., 1997). Ran-GTP bildet im Zellkern mit dem Cargo-Protein und CRM-1 einen trimeren Exportkomplex, der sehr schnell ins Cytosol transportiert wird. Im Cytosol führt die Hydrolyse von Ran-GTP zur Dissoziation des trimeren Exportkomplexes (Görlich und Kutay, 1999; Steggerda et al., 2000; Makkerh et al., 1996; Chi et al., 1997; Nigg, 1997). Es gibt Arbeiten, die einen "klassischen" Exportweg z.B. für den Transkriptionsfaktor NFκB (Nuclear **F**actor-**κ****B**) beschreiben. Im Cytosol ist IκB (Inhibitor of **κ****B**) mit NFκB assoziiert und unterdrückt dort die nukleäre Translokation von NFκB. IκB beinhaltet ein "klassisches" NES und reguliert demgegenüber im Zellkern den Export von NFκB (Johnson et al., 1999; Kaffman und O'Shea, 1999).

Import durch die GTPase Ran



Export durch die GTPase Ran

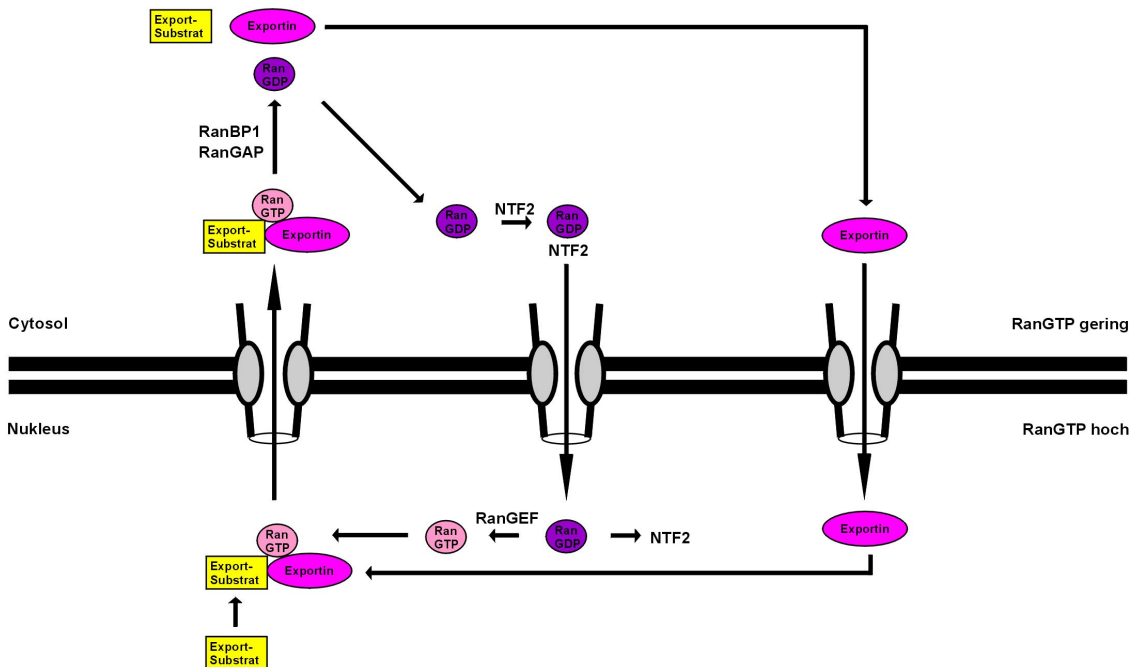


Abb. 1.5. Der nukleocytoplasmatische Transport durch die GTPase Ran. Das Importsubstrat bindet mit Importin, und der Importin-Substratkomplex wird durch den Gradienten von Ran-GTP zwischen Cytosol und Kernlumen und der Interaktion mit dem Kernporenkomplex in den Zellkern transportiert. Die Bindung des Importkomplexes an Ran-GTP im Kern führt zur Dissoziation des Importkomplexes. Importin bindet an Ran-GTP und wird als Importin-Ran-Komplex ins Cytosol zurück exportiert. Im Cytosol wird Ran-GTP durch RanBP1 und RanGAP hydrolysiert

und dies führt zur Dissoziation von Importin und Ran. Das Ran-GDP wird durch NTF-2 wieder in den Zellkern reimportiert, wo RanGEF die Reaktion von Ran-GDP zu Ran-GTP katalysiert. Der Export wird durch die Bindung von Exportin an Ran-GTP eingeleitet und die Bindung des Exportsubstrats an diesen Komplex führt zur Interaktion mit der Kernpore und zum Export des Export-Substratkomplexes ins Cytosol. Im Cytosol wird Ran-GTP durch RanBP1 und RanGAP hydrolysiert, und der Export-Substratkomplex dissoziiert.

Der Importrezeptor (Importin) bindet im Cytosol an das Cargo-Protein und wird als Importkomplex bezeichnet. Der Importkomplex wird über Wechselwirkungen mit Nucleoporinen in den Kern transportiert. Der Import ist vom Ran-GDP/GTP-Gradienten abhängig. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, daß der Kontakt von Importin und Nucleoporin die Löslichkeit im Kernporenmedium des Kernporenkomplexes erhöht und der Importkomplex die Kernpore daher passieren kann. Im Kern führt die Bindung an Ran-GTP zur Dissoziation des Importkomplexes (Görllich und Kutay, 1999; Moore und Blobel, 1993). Es sind andere Transkriptionsfaktoren in der Literatur beschrieben, die "klassische" Importsequenzen enthalten und mit dem Kernporenkomplex interagieren. Der GR (**G**lucocorticoid **R**eceptor) beinhaltet zwei NLS und tritt mit dem Kernporenkomplex über einen Importkomplex in Kontakt (Madan und DeFranco, 1993). Die Ran-abhängigen Import- und Exportprozesse sind schematisch in der Abbildung 1.6. dargestellt.

1.3.2. Nukleocytoplasmatischer Transport von STAT1

Der nukleocytoplasmatische Transport der STAT-Proteine ist noch immer weitgehend unbekannt. Viele Veröffentlichungen konnten eine Kernakkumulation nach einer IFN γ -Stimulation von STAT1 zeigen (Haspel et al., 1996; Darnell, 1997b; Köster und Hauser, 1999). Nach einer IFN γ -Stimulation kommt es bereits wenige Minuten nach der Stimulation zur Translokation und Akkumulation von STAT1 im Zellkern. Da STAT1 im unstimulierten Zustand als monomeres Molekül im Cytosol lokalisiert ist, führt die IFN γ -Stimulation zum Import von dimeren STAT1 in den Zellkern. Dort bindet das dimere STAT1 an der DNA (siehe 1.2.2.). Die Kernakkumulation von STAT1 nach IFN γ -Stimulation ist von dem Import, der DNA-Bindung und der Deaktivierung abhängig (Darnell, 1997b). Es ist bereits bekannt, daß STAT1 nach einer IFN γ -Aktivierung an NPI-1 bindet. NPI-1 ist ein Importin, das mit dem Kernporenkomplex interagiert (Sekimoto et al., 1997). Diese Ergebnisse deuten an, daß STAT1 als aktiviertes Molekül energieabhängig durch die GTPase Ran in den Zellkern importiert wird. STAT1 enthält kein "klassisches" NLS, das aus einer lysin- und argininreichen Aminosäuresequenz besteht (Sekimoto et al., 1996). Für die Familie der STAT-Proteine konnte bis heute kein Importsignal beschrieben werden, und der

Importmechanismus ist noch vollständig unbekannt (Kaffman und O`Shea, 1999; Sekimoto et al., 1997; Sekimoto et al., 1996).

Nach dem heutigen Erkenntnisstand konnte kein Exportmechanismus von STAT-Proteinen gezeigt werden. Die Kernakkumulation von STAT1 ist in 293T-Zellen zwei Stunden nach IFN γ -Stimulation nicht mehr nachweisbar (Kim und Maniatis, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die aktive Phase von STAT1 durch einen proteolytischen Abbau beendet wird. Die dimeren STAT1-Proteine werden ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut. Der Proteasomen-Inhibitor MG 132 stabilisiert die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 über einen längeren Zeitraum. Die aktive Form von STAT1 ist für die Ubiquitinilierung notwendig, und der Anteil von aktiven STAT1 im Kern wird durch den Proteasomen-vermittelten Abbau kontrolliert (Kim und Maniatis, 1996). Der proteolytische Abbau stellt einen Mechanismus zur Regulation der aktiven Phase von STAT1 dar. In der Literatur gibt es auch Hinweise, daß eine Dephosphorylierung die aktive Phase von STAT1 beendet (Haspel et al., 1996; Haspel und Darnell, 1999). Diese Ergebnisse legen einen sehr komplexen Mechanismus zum nukleocytoplasmatischen Transport und zur Deaktivierung der STAT-Proteine nahe, der bis heute nicht bekannt ist.

1.4. Fragestellung

Der Mechanismus der Translokation, der Kernakkumulation und der Regulation der aktiven Phase von STAT-Proteinen ist weitgehend noch nicht bekannt und enthält deshalb sehr viele offene Fragen. In dieser Arbeit soll der Mechanismus der nukleocytoplasmatischen Translokation von STAT1 näher untersucht werden. Im Vordergrund stehen die Fragen, nach welchem Mechanismus STAT1 nach einer IFN γ -Stimulation in den Zellkern gelangt und wie der Mechanismus der Deaktivierung von STAT1 im Zellkern abläuft. Es soll geklärt werden, ob es in der Aminosäuresequenz von STAT1 NLS-Motive gibt, die mit Importinen interagieren. In der Literatur gibt es bereits Hinweise (Sekimoto et al., 1997; Sekimoto et al., 1996), die zur Klärung des Importmechanismus herangezogen werden können. Die Deaktivierung von STAT1 führt zur Aufhebung der Kernakkumulation. Es gibt zwei Hinweise für die Deaktivierung von STAT1, wonach es zu einem proteolytischen Abbau oder zur Dephosphorylierung von aktiven STAT1-Molekülen kommt (Kim und Maniatis, 1996; Haspel und Darnell, 1999). In dieser Arbeit soll diesen Fragestellungen nachgegangen werden, und es soll untersucht werden, ob es noch weitere Mechanis-

men für die Inaktivierung von STAT1 gibt. Ein STAT1-GFP-Fusionsprotein wird für die Aufklärung der nukleocytoplasmatischen Lokalisation von STAT1 eingesetzt.

Die Untersuchung der Zielgenaktivierung durch STAT1 nach einer IFN γ -Stimulation soll ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sein. Die Zielgenaktivierung ist unmittelbar mit der Präsenz von STAT1 im Zellkern verbunden. Es soll untersucht werden, welchen Einfluß die Translokation und Kernakkumulation von STAT1 auf die Zielgenaktivierung nach einer IFN γ -Stimulation hat. Die Aufklärung dieser Fragen sollte das Verständnis der intrazellulären Verteilung von STAT1 erhellen. Da der Mechanismus der nukleocytoplasmatischen Verteilung von STAT1 noch völlig im Verborgenen liegt, könnte die Klärung eines Teils dieser Fragen weitere Bausteine liefern, um die Regulation des Jak-STAT-Signalweges besser zu verstehen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

2.1.1. Laborchemikalien

| | |
|------------------------------|---|
| Acrylamid-Lösung | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Actinomycin D | Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland |
| AG 490 | Biomol, Hamburg, Deutschland |
| Agar-Agar | Fisher Scientific, Loughborough, U.K. |
| Agarose | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Agarose (niedrig-schmelzend) | Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland |
| Albumin (Fraktion V) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland |
| Ammoniumacetat | Fisher Scientific, Loughborough, U.K. |
| Ammoniumchlorid | Fisher Scientific, Loughborough, U.K. |
| Ammoniumpersulfat | Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich |
| Ampicillin | Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich |
| Bisindolylmaleimid I | Calbiochem, San Diego, USA |