

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

Borsäure	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
Bromphenol-Blau	Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Calciumchlorid-2-hydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calyculin A	Biomol, Hamburg, Deutschland
Camptothecin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Colchicine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie (Brillantblau R 250)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cycloheximid	Calbiochem, San Diego, USA
4-Cyano-3-methylisoquinolin	Calbiochem, San Diego, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
Diethylpyrocarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiotreitol (DTT)	Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Ethidiumbromid	Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Calbiochem, San Diego CA, USA
EGF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Arcos Organics, Geel, Belgien
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ficoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	Arcos Organics, Geel, Belgien
Genistein	Biomol, Hamburg, Deutschland
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycylglycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glycerolphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
G418-Sulfat	Calbiochem, San Diego, USA
H 7	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino-ethansulfonsäure (HEPES)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Hefeextrakt, granuliert	Merk, Darmstadt, Deutschland
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Interferon- α (IFN α)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Interferon- γ (IFN γ)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Immomount (Fluorescence Mounting Medium)	Dako, Glostrup, Dänemark
Iso-Amylalkohol	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
Immersionsöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxyd	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogen-orthophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Leptomycin B	M. Yoshida, University of Tokyo, Japan
Lipofectamin plus	Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland
Lithiumchlorid	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
β -Mercaptoethanol	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
Magnesiumchlorid-6-Hydrat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Magnesiumsulfat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Maleinsäure	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
MG 132	Calbiochem, San Diego, USA
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxyd	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
N-Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Nonidet P 40	Roche, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
PD 98059	Calbiochem, San Diego, USA
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Ponceau-Rot	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
Polyetylenamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Polydeoxyinosinic-Deoxycytidylic Acid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SB 203580, Hydrochlorid	Calbiochem, San Diego, USA
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Tumornekrosefaktor- α (TNF α)	Strathmann Biotech GmbH, Deutschland
Trichloressigsäure	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (TRIS)	Calbiochem, San Diego, USA
Triton X-100	Promega, Mannheim, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thiamin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Xylen-Blau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Zinksulfat	Fisher Scientific, Loughborough, U.K.

2.1.2. Radiochemikalien

(α - ³² P)dATP (370MBq/ml)	Amersham Biosciences, U. K.
(α - ³² P)dCTP (370MBq/ml)	Amersham Biosciences, U. K.
(α - ³² P)dGTP (370MBq/ml)	Amersham Biosciences, U. K.
(α - ³² P)dTTP (370MBq/ml)	Amersham Biosciences, U. K.
(α - ³² P)UTP (370MBq/ml)	Amersham Biosciences, U. K.

2.1.3. Antikörper

Anti-Phospho-STAT1-Tyrosin ⁷⁰¹	New England BioLabs, USA
Anti-Phospho-STAT1-Serin ⁷²⁷	New England BioLabs, USA
Cy3-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen- Immunglobulin	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-GFP polyklonal (IgG-Fraktion)	Clontech, Palo Alto, USA
FITC-gekoppeltes Kaninchen-anti-Maus- Immunglobulin	Zymed, San Francisco, USA
Anti-hEGFR(1005) polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-hESP15(C20) polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-hSTAT1 α p91(C24) polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-hSTAT1 α/β p91, p84(C136) polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-hSTAT1 α p84, p91(E23) polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-hSp1(1C6) monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
POD-Schwein-anti-Kaninchen Immunoglobulin	Dako, Glostrup, Dänemark
POD-Ziege-anti-Maus Immunoglobulin	Dako, Glostrup, Dänemark
TRITC-gekoppeltes anti-Ziege-Immunglobulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

2.1.4. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim, Deutschland
Complete-Mini Protease-Inhibitoren	Roche, Mannheim, Deutschland
DNA-Polymerase (Klenow)	New England BioLabs, USA
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase A	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>Bam</i> HI Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Bgl</i> II Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Eco</i> RI Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Hind</i> III Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Nhe</i> I Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Not</i> I Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Sma</i> I Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Spe</i> I Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
<i>Sph</i> I Restriktionsenzym	New England BioLabs, USA
Taq-DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs, USA
Trypsin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Vent-Polymerase	New England BioLabs, USA

2.1.5. Reaktions-Kits

ABM PRISM™ Dye Terminator- Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kit	NEN™ Life Science Products, USA
Annexin-V-FLUOS-Staining-Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Apoptotic-DNA-Ladder-Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
In-Situ-Cell-Death-Detection-Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Luciferase-Assay-System	Promega, Mannheim, Deutschland
Nukleotid-Mix	Stratagene, La Jolla, USA
QIAdex II-Gel-Extraction-Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

QIAquick PCR-Purifications-Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Quick-Change [®] Site-Directed Mutagenesis-Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Plasmid Purification Midi/Maxi	QIAGEN, Hilden, Deutschland
ProStar [™] HF Single-Tube RT-PCR-System	Stratagene, La Jolla, USA
RiboQuant [™] Multi-Probe	
RNase-Protection-Assay-System	Pharmingen, San Diego, USA
StrataPrep [®] Total-RNA-Miniprep-Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Western-Blot-Chemiluminescence-Reagent-Plus	NEN [™] Life Science Products, USA
Protein-Assay [®]	BioRad, Brüssel, Belgien

2.1.6. Primer und Oligonukleotide

RT-PCR-Primer	MWG; Ebersberg, Deutschland
PCR-Primer für Klonierung	MWG; Ebersberg, Deutschland
Primer für Mutagenese	MWG; Ebersberg, Deutschland
Oligonukleotide für Mobilshiftassay (M67)	MWG; Ebersberg, Deutschland
100 bp DNA-Marker	MBI Fermentas, Vilnius, Lettland
1 kb DNA-Marker	Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland

2.1.7. Plasmide

pBS2KS	Stratagene, La Jolla, USA
pcDNA3.1	Invitrogen, Inchinnan, U.K.
pEGFPN1	Clontech, Palo Alto, USA
pEGFPc2	Clontech, Palo Alto, USA
pET23a	Invitrogen, Inchinnan, U.K.
pCMV6M	Invitrogen, Inchinnan, U.K.
pGEX5X2	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
pGL3 Luciferase-Reporter	Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.8. Puffer und Stammlösungen

DNA Auftragspuffer (6X):

0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
30% (v/v) Glycerin

DNA-Fraktionierung Lysispuffer:

50 mM Tris/HCl; pH 7,5
20 mM EDTA
1% (v/v) NP-40 (frisch zugegeben)

Laemmli-Auftragspuffer (2X):

100 mM Tris/HCl; pH 6,8
4% (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerin
0,2% (w/v) Bromphenolblau
200 mM DTT

PBS:

1,4 mM KH_2PO_4
4,3 mM Na_2HPO_4
2,7 mM KCl
137 mM NaCl
pH 7,4

SDS-PAGE Laufpuffer (10X):

248 mM Tris/HCl; pH 8,0
1,92 M Glycin
35 mM SDS

SDS-PAGE Sammelgelpuffer:

30,3 g Tris-Base; pH 6,8
20 ml 10% SDS
in 500 ml dH_2O

SDS-PAGE Trenngelpuffer:

90,85 g Tris-Base; pH 8,8
20 ml 10% SDS
in 500ml dH_2O

SDS-Transblotpuffer:

48 mM Tris/HCl; pH 7,5
0,4% (v/v) SDS
39 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

Probenpuffer für EMSA:

100 mM HEPES
200 mM KCl
5 mM MgCl₂
2,5 mM EDTA
0,5 mM EGTA
20% (v/v) Ficoll

TAE (10X):

400 mM Tris/HCl; pH 7,3
200 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

TBST:

54 g Tris-Base
27,5 g Borsäure
2,9 g EDTA
0,05% (v/v) Tween 20
in 1000 ml dH₂O
pH 8,3

TE:

10 mM Tris/HCl; pH 8,0
1 mM EDTA

RNA-Laufpuffer:

MOPS 29,93 g
3 M Natriumacetat
500 mM EDTA
in 500 ml dH₂O

TBS (10X):

12,1 g Tris-Base; pH 7,8
80 g NaCl
in 1000 ml dH₂O

Lysispuffer für DNA-Fragmentierung:

50 mM Tris/HCl; pH 7,5
20 mM EDTA
1% (v/v) NP-40

Antikörper-Ablösepuffer:

62,5 mM Tris/HCl; pH 6,8
2% (w/v) SDS
0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol

Gesamtzellextraktionspuffer:

50 mM Tris/HCl; pH 7,4
289 mM NaCl
50 mM NaF
10 mM Glycerolphosphat
0,2% (w/v) EDTA
2 mM EGTA
1 mM Vanadat
10% (v/v) Glycerin
0,5% (v/v) NP 40

Zellextraktionspuffer (Cytosol)

20 mM HEPES
10 mM KCl
1 mM EDTA
0,1 mM Vanadat
10% (v/v) Glycerin
0,2% (v/v) NP 40
pH 7,4

Zellextraktionspuffer (Kern):

420 mM KCl
20 mM HEPES
1 mM EDTA
0,1 mM Vanadat
20% (v/v) Glycerin
pH 7,6

Zellextraktionspuffer (Membran I):

10 mM Tris/HCl; pH 7,5
25 mM NaF
5 mM MgCl₂
1 mM EDTA
0,5 mM Vanadat
1 mM DTT

Zellextraktionspuffer (Membran II):

42 mM KCl
10 mM HEPES
5 mM MgCl₂
250 mM Saccharose
pH 7,4

HEPES-Mikroinjektions-Puffer:

20 mM HEPES
110 mM Kaliumacetat
2 mM Magnesiumacetat
0,5 mM EDTA
0,5 mM DTT
pH 7,5

Den Zellextraktionspuffern wurden NP 40 (0,5% bzw. 0,2%) und DTT (1mM) frisch zugegeben. Für die Zellextraktion enthielten die Puffer auch 1% (v/v) PMSF und 1µM der Proteaseinhibi-

torlösung (Complete-Mini), die frisch zugegeben wurden. Alle Puffer wurden mit dH₂O hergestellt.

2.1.9. Zellen und Zellkulturmedien

Bakterienzelllinien:

<i>E. coli</i> -Stamm DH5 α	Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland
<i>E. coli</i> -Stamm DH5 α -E	Gibco/BRL, Eggenstein, Deutschland
<i>E. coli</i> -Stamm TKX1	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> -Stamm XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> -Stamm BL21	Stratagene, La Jolla, USA

Bakterienzellmedien:

LB-Medium:

1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
1% NaCl
pH 7,2

LB-Agar:

1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
1% NaCl
2% Agar Agar
pH 7,2

Bei Bedarf wurden Ampicillin (50 μ g/ml) oder Kanamycin (100 μ g/ml) zugegeben.

Humane Zelllinien:

293T-Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
2fTGH-Zellen	J. E. Darnell, Rockefeller University, USA
A431-Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
HeLa-S3-Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

HepG2-Zellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
U3A-Zellen	J. E. Darnell, Rockefeller University, USA

Zellkulturmedien:

DMEM:	RPMI 1640:
10% fötales Kälberserum	10% fötales Kälberserum
1% Streptomycin/Penicillin	1% Streptomycin/Penicillin

Dem Medium wurde 0,5% (w/v) G418-Sulfat (100µg/ml) für stabil-exprimierende Zellen als Selektionssubstanz zugegeben. Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Biochrom, Berlin, Deutschland bezogen.

2.1.10. Geräte und Utensilien

Autoradiographiekassetten	Eastmann Kodak, New York, USA
Bakterienschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Brutschrank	WTC Binder, Tuttlingen, Deutschland
Kamera Sensicam CCD	PCO, Kehlheim, Deutschland
Geldokumentationssystem	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Geltrockner Minidry	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektroporationsgerät Micro-Pulser	BioRad, Brüssel, Belgien
Elektrophoresesystem AV175	Savant, Holbrook, USA
Elektrophoresezelle Protean [®] II	BioRad, Brüssel, Belgien
Elektrophorese-Transferzelle Trans-Blot [®] SD	BioRad, Brüssel, Belgien
Horizontal Elektrophoresesystem EasyCast	OWI, Portsmouth, U.K.
Elektrophoresesystem XCELL II [™]	Invitrogen, Inchinnan, U.K.
Inkubator	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
Gefrierschrank MDF-U50V (-80°C)	Sanyo Electric Co., Ltd., Tokyo, Japan
Kühlschrank (4°C)	Liebermann, Berlin, Deutschland
Labortimer Jumbo	Merck, Darmstadt, Deutschland

Laborwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Mikroinjektionssystem Transjector 5246	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikromanipulator 5171	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroinjektionsmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur, inverse)	Hund, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen, Deutschland
Mikrowellenherd	Philips, Berlin, Deutschland
pH Meter 540 GLP	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer Ultrospec [®] 2100 pro	Amersham Biosciences, U. K.
Photo Imager Lumi-Imager F1 [™]	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Phospho-Imager Molecular Dynamics	Amersham Biosciences, U. K.
Phospho-Imager-Kassetten	Amersham Biosciences, U. K.
Pipette Pipetmann [®] P	Gilsen, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe Accu-Jet [®]	Brand Wertheim, Deutschland
Reagenzglas-Rotator 3025	GFL, Burgwedel, Deutschland
Spannungsquelle Consort	Consort, Turnhout, Belgien
Sterilbank 48/72	Antares, Köln, Deutschland
PCR-Maschine (Gradient)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge Avanti [™] J-25	Beckmann, München, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima [™] TLX	Beckmann, München, Deutschland
Vakuumsaugflasche 16309	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Mixgerät Genie 2 [®]	Scientific Industries, Inc., USA
Wasserbad 1002-1013	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Alle Laborglasgefäße, Messuren, Glaspipetten usw. wurden von der Firma Werkstätten, Chemikalien und Photo (WCP), Berlin, Deutschland bezogen.

2.1.11. Software

Adobe Photoshop 8,0	Adobe, Mountain View, USA
Axiovision 3,0	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CorelDraw 8,0	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Gene Tool 1,0	BioTool Incorp., Edmonton, Kanada
LumiAnalyst™ 3,0 für Windows™	Roche, Mannheim, Deutschland
Microsoft (Word, Excel, Power Point)	Microsoft, Washington, USA

2.1.12. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser Cellocate	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	WCP, Berlin, Deutschland
Dialyseschläuche ZellnTrans	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einmalkanülen Sterican®	B. Braun AG
(26 Gx 7/8", 2-G 21x 1 1/2)	Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen	B. Braun AG
(1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Melsungen, Deutschland
Einmalwischtücher (Kimberly-Clark®)	WCP, Berlin, Deutschland
Reaktions-Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Filterpapier	Schleicher & Schnull, Deutschland
Filzpapier (3 mm Watmann)	Schleicher & Schnull, Deutschland
Polyacrylamid-Harnstoff-Gele 4%	Invitrogen, Inchinnan, U.K.
Handschuhe	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Küvetten	BioRad, Brüssel, Belgien
Mikroinjektionsspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Minisäule MicroSpin™	Amersham Biosciences, U. K.
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schnull, Deutschland
Objekträger	WCP, Berlin, Deutschland
Parafilm	Greenwich, Chicago, USA
Pasteurpipetten	WCP, Berlin, Deutschland

PCR-Reaktionsgefäße (100 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plastikpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pipettenspitzen (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polystyrolröhrchen	Greiner, Finkenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	WCP, Berlin, Deutschland
Röntgenfilm X-Omat AR	Kodak, New York, USA
Röntgenfilm X-Omat Blue	Kodak, New York, USA
TBE-Acrylamidgele Gradient 4-20%	Invitrogen, Inchinnan, U.K.
Schraubdeckelröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Wägebapier MN 226	Schleicher & Schnull, Deutschland
Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturschalen	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zentrifugengefäße	Nalgene [®] , Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Quick-Seal [®]	Beckmann, Palo Alto, USA
Zentrifugationssäulen CentriPrep [®] 50	Millipore Corp., Bredford, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden der Zellkultur

2.2.1.1. Zellkultur

Die humanen Zelllinien HeLa-S3, U3A, 293T, HepG2, A431 und 2fTGH wurden bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ in Zellkulturschalen von 6 cm oder 10 cm Durchmesser sowie in Zellkulturplatten mit 6-, 12- oder 24-Loch-Schalen in den Kulturmedien DMEM und RPMI 1640 unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die stabil transfizierten Zelllinien wurden zusätzlich in 100 µg/ml G418 kultiviert.

2.2.1.2. Transfektion der Zellen

Für den Transfer von Plasmid-DNA in die humanen Zelllinien HeLa-S3, U3A, 293T, HepG2, A431 und 2fTGH wurde Lipofectamin der Firma GibcoBRL benutzt. Für alle Transfektionen wurden die Zellen zuvor auf Petri-Schalen von 6 cm oder 10 cm Durchmesser kultiviert. Zu 100 µl Serum-freiem Transfektionsmedium wurden 2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA, 2,5 µl Liposomen-Reagenz (Lipofectamin) und 5 µl Plus-Reagenz gegeben. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach 3 h Inkubation wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden dann für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für fluoreszenzmikroskopische Versuche wurden Zellpräparate hergestellt. Hierzu wurden die Zellen 24 h vor den Experimenten in 12-Loch-Platten, die Poly-L-Lysin-beschichtete (25 mM) Deckgläser enthielten, kultiviert. Nach den jeweiligen Experimenten wurden die Zellpräparate zweimal mit PBS gewaschen, mit 5 µg/ml Hoechst 33258 für 2 min bei RT inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde auf einem Objektträger ein Tropfen Einbettmedium (Immo-mount) aufgetragen und das Zellpräparat mit dem Zellrasen in dem Tropfen luftblasenfrei aufgelegt. Für Western-Blot-, Apoptose- und Reporter-gen-Assays sowie DNA-Bindungsstudien wurden die Zellen in verschiedene Zellkulturschalen überführt.

2.2.2. Nachweismethoden von Apoptose

2.2.2.1. Fluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen (TUNEL)

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte nach TUNEL-Methode durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide am 3'-Ende der genomischen DNA-Fragmente, katalysiert durch die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (Ando et al., 1994; Gougeon und Montagnier, 1993). Transient transfizierte sowie nicht transfizierte U3A-Zellen und 2fTGH-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (25 mM) beschichtete Deckgläser bis zu einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 20 ng/ml TNF α und 20 ng/ml Actinomycin D für 18 h in DMEM bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die bei sonst gleichen Bedingungen mit 10 µg/ml Camptothecin behandelt wurden (Kumar et al., 1997a). Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen 15 min bei

RT mit 4% (v/v) Paraformaldehyd fixiert und anschließend 2 min bei 4°C mit 0,1% (v/v) Triton X-100 in 0,1% (w/v) Natriumcitrat-Lösung permeabilisiert. Die TUNEL-Reaktion erfolgte mit dem TUNEL-Reagenz der Firma Roche. Für 1 h wurden die Zellpräparate in der Dunkelheit bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellpräparate wurden anschließend auf Objektträger eingebettet (siehe 2.2.1.2.). Am Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate bei einer Wellenlänge von 580 nm für den roten Fluoreszenzfarbstoff und 488 nm für den grünen Fluoreszenzfarbstoff mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

2.2.2.2. DNA-Fragmentation

Bei der Apoptose kommt es zu einer typischen DNA-Fragmentierung, die in einem Agarosegel in Form einer Leiter nachgewiesen werden kann (Herrmann et al., 1994; Paddenberg et al., 1996). Die Zellen wurden zur Apoptoseauslösung wie im Abschnitt 2.2.2.1. behandelt. Nach der TNF α /Actinomycin-D-Behandlung wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,05% (w/v) Trypsin-Lösung abgelöst. Für 10 min wurden die Zellen bei 1000 rpm sedimentiert und in 0,1 ml DNA-Fragmentations-Lysispuffer für 40 Sekunden lysiert. Nach der Lyse wurden die Zellen bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert, und der Überstand wurde abgenommen. Der Überstand wurde mit 6 μ l RNase A (100 mg/ml) und 13 μ l einer 10% (v/v) SDS-Lösung bei 56°C für 2 h inkubiert. Nach der RNase-A-Behandlung wurde der Überstand mit 35 μ l Proteinase K (20 mg/ml) bei 37°C für 18 h inkubiert. Aus der Reaktionslösung wurde die DNA mit 75 μ l Ammoniumacetat (10 M) und 450 μ l Ethanol gefällt, dazu mit 500 μ l Ethanol (75%) gewaschen und in 50 μ l TE (pH 8,0) aufgenommen (Vicent et al., 2000). Die DNA wurde auf einem 1,5% Agarosegel (siehe 2.2.6.2.) aufgetragen. DNA-Fragmente wurden durch Färbung mit 0,3 μ g/ml Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von 260 nm nachgewiesen.

2.2.2.3. Annexin-V-Färbung apoptotischer Zellen

Apoptotische Zellen wurden mit einem Annexin-V-gekoppelten FITC-Fluoreszenzfarbstoff markiert (Fadok et al., 1992; Creutz, 1992). Die Zellen wurden für 12 h mit TNF α /Actinomycin D behandelt (siehe 2.2.2.1.). Die Markierung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Roche. Die

Präparate wurden, wie im Abschnitt 2.2.2.1. beschrieben, eingebettet, aufgenommen und dokumentiert.

2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

Zellpräparate, die fluoreszenzmarkierte Proteine exprimierten, wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan von Zeiss (Oberkochen) analysiert. Das Mikroskop ist mit dem Fluoreszenzfiltersatz A, N 2.1 und 13 ausgestattet. Mit einer Sensicam-CCD-Kamera wurden von den Proben fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt und mittels der Axiovision-Software bearbeitet. Es wurden Aufnahmen von GFP-gekoppeltem Protein bei der Wellenlänge von 480 nm, von TRITC- und Cy3-gekoppelten Antikörpern bei einer Wellenlänge von 580 nm und für den Hoechstfarbstoff bei 280 nm gemacht. Die weitere Bearbeitung und Dokumentation der digitalen Daten erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop und dem Grafikprogramm CorelDraw.

2.2.4. Immunzytochemische Markierung

Humane Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern bis zu einer Zellzahl von ca. 1×10^6 Zellen kultiviert und für die einzelnen Untersuchungen unterschiedlich behandelt. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd gelöst in PBS für 10 min bei RT. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde 1 h bei RT mit 25% (v/v) FCS in PBS blockiert. Es wurde der jeweilige primäre antigenspezifische Antikörper in der Verdünnung 1:800 in der Blockierungslösung eingesetzt und für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Der ungebundene Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min entfernt. Als sekundärer Antikörper wurde Cy3-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin verwendet. Der zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in der Blockierungslösung für 1 h bei RT ebenfalls unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde ungebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die chromosomale DNA wurde mit $5 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 markiert und die Präparate fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

2.2.5. Mikroinjektion von Zellen

Die Zellen wurden 24 h vor der Mikroinjektion auf Deckgläsern (Cellocate) bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Danach wurden die Zellen in HEPES gepuffertes (20 mM) RPMI-Medium überführt. Der Ansatz des zu injizierenden Proteins bestand aus 5 µg Protein, das in 9 µl Mikroinjektionspuffer (siehe 2.2.8.) gelöst wurde. Für jede Mikroinjektion wurden 2 µl des Injektionsansatzes eingesetzt. Auf dem mit 37°C temperierten Arbeitstisch des Injektionsmikroskops wurden GST-STAT1-GFP-Fusionsproteine, die in Bakterien exprimiert wurden (siehe 2.2.9.4. und 2.2.9.5.), entweder ins Cytosol oder den Zellkern von HeLa-S3-Zellen injiziert. Eingesetzt wurde das Mikroinjektionssystem Transjector 5246 von Eppendorf/Hamburg. Als Injektionskontrolle wurde 0,2 mg/ml TRITC-gekoppeltes Anti-Ziege-Immunglobulin in das jeweilige Zellkompartiment koinjiziert. Während einer 20 minütigen Mikroinjektion konnten ca. 60 Zellen injiziert werden, und es wurde mit einem Arbeitsdruck von 40-80 hPa injiziert. Nach der Injektion wurden die Zellen für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellpräparate wurden nach dem im Abschnitt 2.2.1.2. beschriebenen Protokoll bearbeitet.

2.2.6. Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1. Restriktionsverdau von DNA

Der DNA wurden 1-2 Einheiten Restriktionsenzym pro Mikrogramm DNA in einem 50 µl Reaktionsvolumen zugesetzt und ca. 1-3 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur und den geeigneten Pufferlösungen inkubiert. Die Enden von Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert, um einer Selbstligation der linearisierten Vektoren entgegenzuwirken. Dem Reaktionsvolumen aus dem Restriktionsverdau der linearisierten Vektoren wurden 1,5 Einheiten alkalischer Phosphatase zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Erhitzen auf 65°C für 15 min wurde der Restriktionsverdau der DNA gestoppt. Die cDNA und die Vektor-DNA wurden weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.2.6.2. Gelelektrophorese von DNA

Horizontale Agarose-Gele wurden je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente zwischen 0,8-3,0% (w/v) mit niedrig-schmelzender Agarose für präparative Gele oder Agarose für analytische Gele in 1x TAE-Puffer, versetzt mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid im Gelansatz, hergestellt. Die aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden mit Probenpuffer (siehe 2.1.8.) versetzt, in die Taschen des Gels aufgetragen und die Elektrophorese bei 80-100 V in 0,5x TAE-Puffer durchgeführt. Die DNA wurde durch Anregung mit Licht der Wellenlänge von 260 nm sichtbar gemacht. Die DNA-Banden im analytischen Agarosegel wurden durch eine Kamera aufgenommen und dokumentiert. Die Fragment-Banden aus dem präparativen niedrig-schmelzenden Agarosegelen wurden ausgeschnitten (siehe 2.2.6.3.).

2.2.6.3. Präparation von DNA

PCR-Produkte, cDNAs und Plasmid-DNAs, die für Klonierungen eingesetzt werden sollten, wurden nach der enzymatischen Spaltung durch die jeweiligen Restriktionsenzyme (siehe 2.2.6.1.) elektroporetisch in einem präparativen niedrig-schmelzenden Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.6.2.). Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht der Wellenlänge von 260 nm mit einem Skalpell aus dem präparativen Gel ausgeschnitten. Nach dem Ausschneiden wurde die DNA mit dem QIADEX-II-Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben eluiert und in 20 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die DNAs wurden direkt in der Ligationsreaktion eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.2.6.4. Ligationsreaktion

Durch eine Ligationsreaktion wurde Vektor-DNA mit Insert-DNA zu einem zirkulären Produkt verbunden. Die Ligationen wurden in 10 µl Ansätzen mit 20 mM Tris/HCl, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA, 1 Einheit T4-DNA-Ligase (NEB), und 50 ng Vektor und cDNA durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 12 h bei 16°C. Die Produkte wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.2.6.5. Transformation kompetenter *E. coli*. Bakterien

Zwei Methoden der Transformation wurden angewendet, um Fremd-DNA in Bakterienzellen einzuschleusen: die Hitzeschock-Methode und die Elektroporation (Sambrook, 1989). Zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien des Stammes DH5 α wurden 100 μ l dieser Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut. Der Bakteriensuspension wurden 1-10 μ l Plasmid-DNA aus dem Ligationsansatz (siehe 2.2.6.4.) zugegeben und die Bakterien anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Für die Hitzeschock-Behandlung wurden die Bakterien dann schockartig auf 42°C für 45 sek erhitzt, wieder auf 4°C abgekühlt und für 2 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Bakterien nicht geschüttelt. Der Zellsuspension wurden anschließend 800 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und die Bakteriensuspension für 30 min auf einem Schüttler bei 37°C (225 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l des Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei der Elektroporation wurde 1 μ l Plasmid-DNA aus dem Ligationsansatz zu 100 μ l elektrokompetenten DH5 α -E-Bakterien gegeben, in einer Elektroporationsküvette (0,2 cm Küvette) bei 4°C zwischen die Elektroden überführt und in der Ec2-Schalterstellung (2,5 kV, 25 μ F und 400 ω^2) mit dem Elektroporator Micro Pulser für 1 sek gepulst. Die weitere Behandlung der Bakterien erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.6.6. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Es wurden 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie beimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 1,5 ml der Bakterienkultur wurden in Reaktionsgefäße (1,5 μ l) überführt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpräzipitat wurde resuspendiert und die Plasmid-DNA der Bakterien nach der Arbeitsanleitung des Plasmid-Mini-Kits der Firma Qiagen isoliert. Die Plasmid-DNA aus der Mini-Präparation wurde für analytische Untersuchungen eingesetzt. Für präparative Ansätze zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden 5 μ l der transformierten Bakterien-Suspension aus der analytischen Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium angeimpft. Die LB-Medien enthielten die entsprechenden Antibiotika. Die Bakterien wurden 16 h bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Die Bakterien wurden dann in Zentrifugengefäße überführt und für 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, um ein möglichst trockenes Bakterien-

präzipitat zu erhalten. Die Präparation von Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde über eine Anionenaustauschersäule (Midi-Kit) nach der Vorschrift der Herstellerfirma durchgeführt. Die eluierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.6.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden jeweils in Volumina von 50 µl durchgeführt. Als Reaktionsansatz wurden 50 ng Matrizen-DNA, 150 µM dATP, dTTP, dCTP und dGTP je Nukleotid, 25 pmol je DNA-Primer, 1 Einheit Pfu-DNA-Polymerase und 5 µl Puffer (10 x Pfu-Polymerase-Reaktions-Puffer) angesetzt und auf 50 µl mit dH₂O aufgefüllt. Der Thermocycler (Perkin Elmer oder Eppendorf) wurde wie folgt programmiert: Denaturierung für 3 min bei 94°C, danach 25-35 Zyklen mit Denaturierung für 1 min bei 94°C, Hybridisierung für 1 min bei 55°C und eine Verlängerungsphase von 1 min/kb bei 72°C. Die letzte Verlängerungsphase dauerte 10 min bei 72°C. Das Reaktionsvolumen wurde auf 4°C abgekühlt und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle wurden 5 µl den PCR-Ansätzen direkt entnommen und auf einem analytischen Agarosegel aufgetragen. Die PCR-Primerpaare wurden unter Verwendung des Softwareprogramms Gene Tool erstellt und von der Firma MWG bezogen.

2.2.6.8. Phenol-Chloroform Extraktion von DNA

Proteinhaltige Verunreinigungen von Nukleinsäurepräparationen werden durch Ausschütteln mit gepuffertem Phenol gereinigt. Dazu wurde 1 Volumenanteil Phenol (in 100 mM Tris/HCl, pH 7,9) zur wässrigen DNA-Probe gegeben, kurz gemischt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit gelöster DNA wurde abgenommen und mit 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:1) versetzt und geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde wieder die obere wässrige Phase mit DNA abgenommen. Nach der Extraktion schloß sich immer eine Ethanol-fällung (siehe 2.2.6.9.) an.

2.2.5.9. Ethanol-fällung von DNA

Zur DNA-Lösung wurden 0,1 Volumenanteile 3 M Natriumazetat und 2,5 Volumenanteile 98%igen Ethanols gegeben und durch kurzes Schütteln gemischt. Die DNA-Proben wurden danach 30 min bei 4°C inkubiert, um eine vollständige Fällung der DNA zu erreichen. Die DNA-Proben wurden für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das DNA-Präzipitat wurde zur Entfernung von Salzresten mit 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum für 5 min zentrifugiert. Die DNA-Präzipitate wurden 30 min luftgetrocknet und in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

2.2.6.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte in der Regel photometrisch mit Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine OD_{260} entsprach 50 µg/ml DNA, 40 µg/ml RNA oder 33 µg/ml Oligonukleotid. Die Nukleinsäure-haltigen Proben wurden am Photometer Ultrospec® 2100-Pro gemessen. Bei sehr kleinen Volumina wurde die Abschätzung der Konzentrationen gelelektrophoretisch mit Größenstandards bekannter Konzentrationen vorgenommen.

2.2.6.11. Klonierungstechnik

Die humane cDNA von STAT1 war ein Geschenk von James E. Darnell Jr., Rockefeller University, New York, USA. Durch PCR-Reaktion wurden die artifiziellen Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Bam*HI an das 5'-Ende und für *Eco*RI an das 3'-Ende der STAT1-cDNA-Sequenz eingeführt. Das erhaltene Produkt wurde als STAT1α Wildtyp (WT) bezeichnet und in den pcDNA3-Vektor ligiert (siehe 2.2.6.4.). Das STAT1α^{WT}-kodierende Plasmid wurde durch die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Sma*I geschnitten, wodurch der aminoternale Bereich von STAT1α erhalten wurde. Durch die Enzyme *Bam*HI und *Sma*I wurde der carboxyterminale Bereich von STAT1 aus der cDNA von STAT1α^{WT} ausgeschnitten. Die DNA dieser STAT1α-kodierenden Fragmente wurde in den Poly-Linker des entsprechend geschnittenen Vektors pEGFP-N1 kloniert (siehe 2.2.6.4.), der die DNA-Sequenz für das grünfluoreszierende Protein

(GFP) enthält. Das erhaltene Plasmid kodiert ein Hybridprotein von humanem STAT1 α^{WT} (1-746) mit einem am carboxyterminalen Ende fusioniertem GFP.

Für Untersuchungen zur intrazellulären STAT1-Lokalisation wurden verschiedene Fragmente von STAT1 präpariert. Aus der cDNA von STAT α^{WT} wurden durch PCR mit spezifischen Primern STAT1-Fragmente im Bereich der aminoterminalen Domäne (AS 1-129), der Helix 1 (AS 127-188), Helix 2 (AS 183-254), Helix 3 (AS 254-292) und Helix 4 (AS 289-314) aus dem 4-Helix-Bündel mit einer *EcoRI*-Schnittstelle hergestellt (siehe 2.2.6.7.). Die dafür benötigten speziellen Primerpaare und Restriktions-Schnittstellen wurden in der Tabelle 2.1. aufgeführt. Die cDNA-Fragmente von STAT1 α und des Vektors pEGFPC2 wurden mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *EcoRI* geschnitten (siehe 2.2.6.1.). Die STAT1 α -kodierenden Fragmente wurden in das Expressionsplasmid pEGFPC2 ligiert (siehe 2.2.6.4.). Dieser Expressionsvektor enthält die DNA für das GFP, das carboxyterminal mit der cDNA der STAT1-Fragmente gekoppelt wurde. Der Vektor wurde für die Untersuchung der Translokation von STAT1 in die Zellen transfiziert (siehe 2.2.1.2.).

Für die Mikroinjektionsexperimente wurde die cDNA von STAT1 α^{WT} mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *EcoRI* geschnitten (siehe 2.2.6.1.) und in den bakteriellen Expressionsvektor pGST-GFP kloniert (siehe 2.2.6.4.), der die DNA-Sequenzen für Glutathion-S-Transferase (GST) und GFP enthält. Die oben beschriebenen cDNA-Fragmente der aminoterminalen Domäne und den vier Helices aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 wurden ebenfalls für Mikroinjektionsexperimente in den bakteriellen Expressionsvektor pGST-GFP kloniert (siehe 2.2.6.4.). Der Expressionsvektor pGST-GFP wurde konstruiert, indem die für GFP-kodierende DNA aus dem Plasmidvektor pEGFPN1 durch eine PCR mit der Vent-Polymerase und einem speziellen Primerpaar (Tab. 2.1.) amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* geschnitten. Das gereinigte Fragment wurde in den Vektor pGEX5X-2 zum Produkt pGST-GFP ligiert (Eguchi et al., 1997). Die cDNA für STAT1 α , die Fragmente für die aminoterminalen Domäne und die vier isolierten Helices aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 wurden in den pGST-GFP-Vektor kloniert, wodurch GST aminoterminal und GFP carboxyterminal mit den jeweiligen STAT1-Fragmenten bzw. STAT1 α gekoppelt wurde. Dieser Vektor wurde in Bakterien transformiert und die exprimierten Proteine anschließend aus den Bakterien isoliert (siehe 2.2.9.5. und 2.2.9.6.).

STAT-1 Konstrukt	Länge	Primerpaare
Carboxyterminale Kopplung von GFP an STAT1α		
STAT1 α -GFP	AS 1-746	(V) 5'-ATATATGAATTCATGTCTCAGTGGTACGAACTTCAG-3' (R) 5'-ATATATGGATCCATCATACTGTGCAATTCTAC-3'
Aminoternale Kopplung von GST und carboxyterminale Kopplung von GFP an STAT1α		
GST-STAT1 α -GFP	AS 1-746	(V) 5'-ATATATAGAATTCAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3' (R) 5'-GATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGC-3'
Mutationen und Peptidfragmente aus dem aminoterminalen Bereich von STAT1α zur Untersuchung des NES		
aminoternale Domäne	AS 1-129	(V) 5'-ATATAAGGATCCCATGTCTCAGTGGTACGAACTTCAGC-3' (R) 5'-ATATAAGAATTCATTCCCGACTGAGCCTGATT-3'
4-Helix-Bündel-Domäne Helix 1	AS 127-188	(V) 5'-ATATAAGGATCCCTCGGGGAATTCAGAGCACAGTG-3' (R) 5'-ATATAAGAATTCCTGCCACACCATTGGTCTCTGTG-3'
4-Helix-Bündel-Domäne Helix 2	AS 183-254	(V) 5'-ATATAAGGATCCCGAGACCAATGGTGTGGCAAAG-3' (R) 5'-ATATAAGAATTCATAGCATTGGGGGCCCCCAATAC-3'
4-Helix-Bündel-Domäne Helix 3	AS 254-292	(V) 5'-ATATAAGGATCCCGCTTGCTTGGATCAGCTGCAGA-3' (R) 5'-ATATAAGAATTCATGCTGTTCTAGGTGTATTC-3'
4-Helix-Bündel-Domäne Helix 4	AS 289-314	(V) 5'-ATATAAGGATCCCCACCTACGAACATGACCCTATCAC-3' (R) 5'-ATATAAGAATTCCTGAATGAGCTGCTGGAAGGAC-3'
4-Helix-Bündel-Domäne N-Terminus Helix 4	AS 289-301	(V) 5'-GATCCCCACCTACGAACATGACCCTATCACAAAAACAAACAAGTGTAGG-3' (R) 5'-AATTCCTAACACTTGTGTTTTTGTGATAGGGTCATGTTCTAGGTGGG-3'
4-Helix-Bündel-Domäne C-Terminus Helix 4-L308A	AS 302-314	(V) 5'-GATCCCCCTGGGACCGCACCTTCAGTCTTTTCCAGCAGCTCATTGAGG-3' (R) 5'-AATTCCTGAATGAGCTGCTGGAAGGACTGAAGGTGCGGTCCAGGG-3'
4-Helix-Bündel-Domäne C-Terminus Helix 4-LL308/312AA	AS 302-314	(V) 5'-GATCCCCCTGGGACCGCACCTTCAGTCTTTTCCAGCAGCTCATTGAGG-3' (R) 5'-AATTCCTGAATGAGCTGCTGGAAGGACTGAAGGTGCGGTCCAGGG-3'
STAT1 α L308A	AS 1-746	(V) 5'-GGACCGCACCTTCAGTGCATCCAGCAGCTCATTCC-3' (R) 5'-GAATGAGCTGCTGGAATGCACTGAAGGTGCGGTCC-3'
STAT1 α LL308/312AA	AS 1-746	(V) 5'-CAGTGCATTCAGCAGGCCATTGAGCTCGTTTG-3' (R) 5'-CAAACGAGCTCTGAATGGCCTGCTGGAATGCACTG-3'
Mutationen und Peptidfragmente der DNA-Bindedomäne von STAT1α zur Untersuchung des NLS		
STAT1 α LL407/409AA	AS 1-746	(V) 5'-GGCTGAATTTGGGCACGCGCAAGCGAAAGAACAGAAAAATGC-3' (R) 5'-GCATTTTCTGTTCTTTGCTTTCGCTGCGCGTCCGAAATTCAGCC-3'
STAT1 α LL407/409TT	AS 1-746	(V) 5'-GGCTGAATTTGGGCACACGCAAGCGAAAGAACAGAAAAATGC-3' (R) 5'-GCATTTTCTGTTCTTTGCTTTCGCTGCGCGTCCGAAATTCAGCC-3'
STAT1 α LL407/409VV	AS 1-746	(V) 5'-GGCTGAATTTGGGCACGTGCAAGTGAAAGAACAGAAAAATGC-3' (R) 5'-GCATTTTCTGTTCTTTCACTTGCAGTGCAGTCCGAAATTCAGCC-3'
STAT1 α KK410/413EE	AS 1-746	(V) 5'-AATTGGAAAGAACAGGAAATGCTGGCACCAG-3' (R) 5'-CTGGTGCCAGCATTTTCTGTTCTTCCAATT-3'
STAT1 α F404Y	AS 1-746	(V) 5'-TCCACCAATGGCAGTGTGCGGCTGAATATCGGC-3' (R) 5'-GCCGATATTCAGCCGCACACTGCCATTGGTGA-3'
DNA-Bindedomäne Peptidfragment im NLS-Bereich	AS 367-427	(V) 5'-ATATATGGATCCAAGATAAAGATGTGAATGAG-3' (R) 5'-ATAATAGAATTCATGTAACGATGAGAGG-3'
Carboxyterminale Kopplung der Farnesylierungssequenz CAAX und der Mutante AAAX an STAT1α		
STAT1 α -CAAX	AS 1-746	(V) 5'-ATATTATGCTAGCTACTGTTCATCATACTGTGCAATTCC-3' (R) 5'-ATATATGGATCCTGGCAGGATGTCTCAGTGGTACGAAAC-3'
STAT1 α -AAAX	AS 1-746	(V) 5'-GAAGTCAAAGACAAAGGCTGTAATTATGTGAATTCC-3' (R) 5'-GGAATTCACATAATTACAGCCTTTGCTTTGACTTC-3'

Tab. 2.1. Mutagenese- und PCR-Primerpaare zur Generierung der in dieser Arbeit verwendeten STAT1 α -Mutationen und Derivate. In der Tabelle 2.1. wurden die verwendeten Primerpaare für die Einführung der Punktmutationen in STAT1 α , die Klonierung der STAT1 α -Peptidfragmente und die Einführung der Insertionen aufge-

führt. Die Restriktionsstellen der im Text aufgeführten Restriktionsenzyme wurden unterstrichen. Durch Fettdruck und Unterstreichungen wurden die mutierten Sequenzen für die Mutagenese hervorgehoben. Das Symbol (V) steht für Vorwärts-Primer und (R) für Rückwärts-Primer. Die Länge der einzelnen STAT1-Fragmente wurde in der Spalte 2 angegeben.

Punktmutationen im 4-Helix-Bündel in den Positionen 308 und 312 sowie in der DNA-Bindedomäne in den Positionen 404, 407, 409, 410 und 413 sowie in Position 727 wurden durch Mutagenese (siehe 2.2.6.12.) entweder als Einzelmutationen (L308A, L312A, F404Y und S727A) oder als Doppelmutationen (LL308/312AA, LL407/409AA, LL407/409TT, LL407/409VV und KK410/413EE) eingeführt. Die mutierten cDNAs, die das Volle-Länge-Molekül oder STAT1-Fragmente kodierten wurden, wie im oberen Teil beschrieben, in die Vektoren pEGFPC2, pEGFPN1 und GST-GFP kloniert (siehe 2.2.6.4.). Die Mutageneseprimer sind in der Tabelle 2.1. aufgeführt.

Die cDNA des STAT1 α -Gens und der Vektor pcDNA3 wurden für Reporterexperimente mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten (siehe 2.2.6.1.) und die cDNA von STAT1 α ^{WT} anschließend in den pcDNA3-Vektor kloniert (siehe 2.2.6.4.). Die für STAT1 α ^{LL308/312AA}-kodierende DNA wurde mit *Hind*III aus dem pEGFPN1-Vektor geschnitten und in den pcDNA3-Vektor kloniert, der zuvor mit *Hind*III geschnitten wurde.

Die Farnesylierungssequenz CAAX wurde aus dem Plasmidvektor pCMV6M durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nhe*I ausgeschnitten. Das erhaltene DNA-Fragment kodiert für die PAK1 (p21-Protein-Activated-Kinase1) mit den 17 carboxyterminalen Aminosäureresten der Farnesylierungssequenz CAAX (Daniels et al., 1998). Durch PCR mit der Vent-Polymerase (siehe 2.2.6.7.) wurde in die cDNA von STAT1 α ^{WT} die Restriktionsschnittstelle *Bam*HI am 5'-Ende und *Nhe*I am 3'-Ende eingeführt. Die Primer sind in der Tabelle 2.1. aufgeführt. An das carboxyterminale Ende der cDNA von STAT1 α ^{WT} wurde die CAAX-Sequenz gekoppelt. Das STAT1-CAAX-Konstrukt wurde dann über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nhe*I in den Vektor pCMV6M kloniert. In der CAAX-Sequenz wurde durch Mutagenese mit einem Primerpaar eine Mutation des zentralen Cysteinrestes zu Alanin eingeführt. Die Mutation wurde nach dem unten aufgeführten Mutageneseprotokoll durchgeführt (siehe 2.2.6.12.). Die Primerpaare sind in der Tabelle 2.1. angegeben.

2.2.6.12. Mutagenese

Für die Einführung von Punktmutationen wurde das QuickChange-Site-Directed-Mutagenese-Kit der Firma Stratagene verwendet. Es wurden einfache und mehrfache Punktmutationen in das Plasmid pSTAT1-GFP eingeführt. Von dem Plasmid wurden 50 ng eingesetzt und 125 ng der jeweiligen komplementären Mutagenese-Primer wurden dem Reaktionsansatz zugegeben. Durch eine PCR mit der Pfu-Turbo-DNA-Polymerase wurde die Plasmid-Matrize mit der Mutation vervielfältigt. Die Reaktionen wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die methylierten (unmutierten) DNA-Matrizen wurden in einer Inkubation von 1 h bei 37°C durch *DpnI*-Endonuclease (10 Einheiten) abgebaut. Die unmethylierte Doppelstrang-DNA mit den eingeführten Punktmutationen wurde anschließend zur Reparatur der Strangbrüche in superkompetente XL-1-Blue *E. coli*-Zellen transformiert. In der Tabelle 2.1. sind die eingeführten Mutationen beschrieben. Die Klonierungsstrategie wurde in dem Abschnitt 2.2.6.11. für die Mutationen in den STAT1-Fragmenten beschrieben. Die gereinigte Plasmid-DNA mit den eingeführten Mutationen wurde sequenziert (siehe 2.2.6.13.). Die für die Mutagenese benötigten Primerpaare wurden mit dem Softwareprogramm Gene Tool erstellt und von der Firma MWG bezogen.

2.2.6.13. Sequenzierung

Die Basenabfolge der zu untersuchenden DNA wurde nach dem Dideoxy-Verfahren (Kettenabbruch-Methode) bestimmt (Sanger et al., 1977). Für die Sequenzierungsreaktion wurde das Reaktions-Kit ABI PRISM™ Dyn-Terminator-Sequencing der Firma NEN verwendet. Sämtliche eingeführten Mutationen und Plasmid-DNAs wurden durch Sequenzierung bestätigt. Dazu wurde zu dem Reaktionsansatz 2 µl des jeweiligen Primer, 8 µl des Reaktionsmix und 0,5 µg/ml der Plasmid-DNA zugegeben und auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt. Der Reaktionsmix enthielt AmpliTaq®-Polymerase, fluoreszenzmarkierte Nukleotide und alle weiteren Reaktionskomponenten (siehe Reaktionsvorschrift der Firma NEN). Der Reaktionsansatz wurde mit dem Perkin Elmer Cycler 9600 nach folgendem Reaktionsablauf amplifiziert: Denaturierungsschritt für 2 min bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen mit Denaturierung 16 sek bei 96°C, Hybridisierung für 16 sek bei 52°C und Verlängerung für 1 min/kb bei 60°C. Nach 30 Zyklen wurde die letzte Verlängerungsreaktion für 8 min bei 60°C durchgeführt. Danach wurden die Sequenzierproben auf 100 µl mit TE-Puffer (pH 8,0) aufgefüllt und durch Ethanol-fällung (siehe 2.2.6.9.) gereinigt. Die gereinigte

Probe wurde getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte im Sequenzierungslabor des Forschungsinstituts für molekulare Pharmakologie (FMP) nach dem Protokoll der Firma NEN. Für die Auswertung der Sequenzierungsdaten wurde das Softwareprogramm Gene Tool und die Genbankdaten von NCBI verwendet.

2.2.6.14. Isolation von RNA

Die hier eingesetzte Methode zur Isolierung der RNA basierte auf der Bindung von RNA an eine siliziumhaltige Fasermatrix in Gegenwart von chaotropen Salzen und schloß eine DNase-Behandlung zur Reduktion von Verunreinigung durch genomische DNA ein. Die RNA wurde aus den humanen Zelllinien HeLa-S3, 2fTGH und U3A isoliert. Ferner wurde RNA aus stabilen bzw. transient transfizierten U3A-Zellen aufgereinigt (siehe 2.2.1.2.). Die Zellen wurden für 18 h in DMEM-Medium gehalten, dem 1% fetales Kälberserum zugesetzt war. Die Zellen wurden dann in DMEM-Medium mit 10% fetalem Kälberserum für 6 h bei 37°C mit 5 ng/ml IFN γ bzw. ohne IFN γ inkubiert. Durch Trypsin/EDTA-Behandlung wurden die Zellen abgelöst, 10 min mit 1000 rpm zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Präzipitat durch einen denaturierenden Lysispuffer gelöst. Die gesamte zelluläre RNA wurde mittels des StrataPrep-Total-RNA-Miniprep-Kits der Firma Stratagene aus den Zellen entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde mit 100 μl Elutionspuffer eluiert und die RNA-Konzentration anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (siehe 2.2.6.10).

2.2.6.15. Elektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA in Agarosegelen wurde unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Formaldehyd durchgeführt (Selden et al., 1987). Die Konzentration der Agarose in den RNA-Gelen betrug 1% (w/v). Ein horizontales RNA-Gel wurde mit 1,3 g Agarose, 3,9 g Paraformaldehyd, 113 ml DEPS- H_2O und 13 ml MOPS (10x) hergestellt. Es wurden 5 μg RNA mit 15 μl Probenpuffer in 25% Formaldehydlösung unter Ausschluß von RNAsen (siehe 2.1.8.) auf ein Volumen von 50 μl mit DEPS- H_2O aufgefüllt, 5 min auf 70°C erwärmt, für 2 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert. Die denaturierte RNA wurde mit

1 µl Ethidiumbromid versetzt und in den Probetaschen des RNA-Gels aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei einer angelegten Spannung von 80 V für etwa 1 h.

2.2.6.16. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Untersuchung der Genexpression in den verschiedenen Zellsystemen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Für die Transkription wurde das ProSTAR™ HF-Single-Tube-RT-PCR-System der Firma Stratagene verwendet. Dieses RT-PCR-System enthält die StrataScript™ reverse Transkriptase des Moloney-Murine-Leukemia-Virus und eine TaqPlus®-Precision-DNA-Polymerase. Die komplementären Primer für die RT-PCR wurden aus der jeweiligen DNA-Sequenz der Zielgene durch das Datenverarbeitungsprogramm Gene Tool erstellt, wobei die Zielgen-DNA-Sequenzen aus der Genbank von NCBI stammten. Die komplementären Primer wurden von der Firma MWG bezogen. Die RT-PCR wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Dieses enthielt 1 µl RNA (0,1 µg/ml) und 2 µl des jeweiligen Primergemisches (0,1 µg/ml je Primer). Die Reaktion wurde modifiziert nach dem Protokoll von Stratagene durchgeführt. Die Anzahl der Reaktionsschleifen wurde für jedes Genprodukt individuell ermittelt und die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach den jeweiligen physikalischen Bedingungen der Primerpaare und Genprodukte. Der initialen Denaturierung für 1 min bei 94°C folgten 25-40 Zyklen (30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Hybridisierung je nach Primern und Genprodukt bei 52-64°C und einer Verlängerung für 2 min bei 68°C), danach folgte eine Verlängerungsphase für 10 min bei 68°C. Auf einem TBE-Polyacrylamidgel 4-20% der Firma Invitac wurden 7 µl des Reaktionsgemisches aufgetragen, für 1 h bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt und am LumiImager mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Die Dokumentationen und Auswertungen der Daten erfolgte mit dem Software Programm Adobe Photoshop und CorelDraw.

2.2.7. Reporteragen-Analyse

Für die Bestimmung der Genaktivierung von STAT1^{WT} und STAT1-Mutanten wurde ein Luciferase-kodierendes Reporteragenkonstrukt eingesetzt, das in seinem Promotor drei IFN γ -sensitive Ly6E-STAT-Bindestellen enthielt (Wen et al., 1995). Zur Normalisierung wurde zusätzlich ein konstitutiv exprimierter β -Galactosidase-Reporter in die Zellen kotransfiziert und die β -Galactosidaseaktivität gemessen. Die U3A-Zellen wurden in 24 Zellkulturschalen kultiviert und

mit 250 ng des zu untersuchenden STAT1-Expressionsplasmids im Vektor pcDNA3, 50 ng des IFN- γ -sensitiven Luciferase-Reporters und 200 ng des β -Galactosidase-Reporters transient kotransfiziert. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen entweder nicht stimuliert oder für 6 h mit IFN γ behandelt. Die Zellen wurden 15 min mit Glycylglycerol-Puffer bei RT lysiert und die Luciferaseaktivität durch Zugabe von 50 μ l Substratlösung des Luciferase-Assay-Systems (siehe Protokoll, Promega) zu jeweils 10 μ l Lysat am Photometer LB9707 gemessen.

Für die β -Galactosidaseaktivität wurden 20 μ l des Lysats mit 66 μ l (4 mg/ml) o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid Stammlösung, 3 μ l Mg-Lösung (100x) und 211 μ l Natriumphosphatpuffer (100 mM) bei RT inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wurde nach 20 min mit 500 μ l einer Na₂CO₃-Lösung (0,5 M) gestoppt und die β -Galactosidaseaktivität anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Es wurden zu jedem Experiment jeweils sechs Messungen vorgenommen und zur Normierung für jede Messung der Quotient der Luziferaseaktivität durch die β -Galactosidaseaktivität berechnet.

2.2.8. Nachweis von Protein-DNA-Wechselwirkungen durch Gelshift-Assays

Für den mobilen Gelshift-Assay wurden [³²P]-markierte Oligonukleotide mit hochaffinen STAT1-Bindestellen benutzt. Dabei handelte es sich um die M67-Sonde mit einer GAS-Bindestelle, die eine sehr hohe Affinität zu dimeren STAT1-Proteinen aufweist (Fried und Crothers, 1981). Für die Herstellung der M67-Sonde wurden die komplementären Oligonukleotide durch 5-minütiges Aufkochen und anschließende langsame Abkühlung hybridisiert. Es wurden 0,1 ng des Oligonukleotids, jeweils 8 μ l von [α -³²P]-markiertem dATP, dCTP, dGTP und dTTP (3 mM, 370MBq/ml), 5 μ l Klenow-Pol-Puffer und 1 μ l Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Aktivität pro Reaktion 5 Einheiten) in einen 50 μ l Reaktionsansatz gegeben. Die Reaktion wurde 20 min bei RT durchgeführt und freie Bindestellen im Überhang der Oligonukleotid-Sequenz mit einem Überschuß von nicht-markiertem dATP, dCTP, dGTP und dTTP (1 μ l dNTP je Nukleotid 6,5 mM) für 5 min bei RT abgesättigt. Die Reaktion wurde mit 1 μ l EDTA (0,5 M) gestoppt. Die freien Nukleotide wurden von der markierten DNA-Sonde chromatographisch über Microspin-Sephadex-G-25 Säulen für 3 min bei 700 g durch Zentrifugation getrennt.

In der Gelshift-Reaktion wurden Gesamtzellextrakte sowie cytosolische oder nukleäre Extrakte der Zelllinien U3A (stabil oder transient transfiziert), HeLa-S3 oder 2fTGH eingesetzt (siehe

2.2.1.2.). Diese waren zuvor unstimuliert oder für verschiedene Zeitpunkte mit IFN γ stimuliert. Es wurden pro Reaktion 4,5 μ l Zellextrakt, 1 μ l der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonde (M67), 1 μ l Poly-dIdC (2 μ g/ml, 800 bp), 2,5 μ l 5x Shift-Puffer und 3,5 μ l H $_2$ O eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 15 min bei RT. Bei Verwendung von unmarkierten Oligonukleotiden als Kompetitoren wurde 1 μ l M67-Oligonukleotid zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Proben wurden unmittelbar nach der Reaktion auf ein natives, präaquilibriertes 4,8%iges TBE-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 400 V und 4°C für ca. 3 h bei aufgetrennt. Das Gel wurde auf Filzpapier (Watman) übertragen, getrocknet und für 18 h auf PhosphoImager-Folie exponiert. Die Folien wurden mit dem PhosphoImager aufgenommen und die Auswertung der Daten erfolgte mit den Softwareprogrammen Adobe Photoshop und CorelDraw.

2.2.9. Methoden zur Analyse von Proteinen

2.2.9.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine und zellulären Proteinextrakte wurden im ersten Schritt in Gegenwart von DTT als reduzierendem Agens mit SDS denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Zellextrakte wurden je nach Proteinkonzentration in 50-500 μ l 1x Probenpuffer (siehe 2.1.8.) aufgenommen. Die Proteinproben wurden 5 min bei 95°C inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden in einem 7, 10 oder 15% igen diskontinuierlichen Polyacrylamidgel mit 1x Laufpuffer (siehe 2.1.8.) nach ihrem Molekulargewicht in scharfe, distinkte Banden aufgetrennt. Das Gel lief ca. 45 min bei einer Spannung von 200 V. Es wurden 10 μ l eines Proteinmarkers (See-Blue) mit definierten Proteingrößen als Referenz aufgetragen.

2.2.9.2. Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel nach dem Semidry-Verfahren (Puffer siehe 2.1.8.) für 40 min bei einer Stromstärke von 2 mA/cm 2 auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Towbin et al., 1979). Die Membran wurde dann mit Ponceau-Rot reversibel gefärbt. Die freien Bindungsstellen wurden durch eine 1-stündige Inkubation bei RT mit Blockierungslösung (TBS-T-Puffer mit 4% BSA) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem jeweiligen primären Antikörper (1:1000) gelöst in Blockierungslö-

sung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS-T-Puffer erfolgte eine 1-stündige Inkubation bei RT mit Meerrettich-Peroxydase-gekoppelten Schweine-anti-Kaninchen- oder Ziege-anti-Maus-Immunglobulinen in Verdünnungen von 1:2000. Die Membranen wurden viermal in TBS-T gewaschen. Die gebundenen Protein-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit dem ECL-Detektionssystem der Firma NEN nachgewiesen. Die Membranen wurden am LumiImager mit einer CCD-Kamera aufgenommen und die Daten mit den Softwareprogrammen Adobe Photoshop und CorelDraw bearbeitet.

2.2.9.3. Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel in einer Farblösung, bestehend aus 0,15% Coomassie-Brilliant-Blue G250, 40% Methanol und 10% Essigsäure, für 2-12 h inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel nach einmaligem Waschen mit H₂O in einer Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 25% Methanol) für einige Stunden inkubiert, bis die Hintergrundfärbung annähernd farblos wurde.

2.2.9.4. Extraktion von Proteinen aus Zellen und Bakterien

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die aus den unterschiedlichen Experimenten stammenden Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und die Petri-Schalen zuletzt trocken abgesaugt. Es wurde je nach Oberflächengröße der Platten zwischen 50-400 µl Gesamtzell-Extraktionspuffer zu der jeweiligen Platte gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber gesammelt. Die Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lysate für 5 min mit 16000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

Cytosolische und nukleäre Extrakte wurden gewonnen, indem die Zellen zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann mit 50-400 µl cytosolischem Extraktionspuffer beschichtet wurden. Die zugegebene Menge richtete sich nach der Größe der Zellkulturschalen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C lysiert und danach 20 sek mit 16000 g und bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, erneut bei 16000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand als cytosolischer Extrakt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Das

Präzipitat aus der ersten Zentrifugation wurde in 50-400 µl Kern-Extraktionspuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Das nukleäre Lysat wurde 5 min mit 16000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde als nukleärer Extrakt eingesetzt.

Für Membran-Präparationen wurden die Zellen mit kaltem PBS zweimal gewaschen und mit 400 µl Membranen-Extraktionspuffer I (siehe 2.1.8.) überschichtet. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden homogenisiert, indem die Probe viermal durch Einwegkanülen pipettiert wurde. Der Homogenisation folgte eine 2-minütige Durchmischung mit dem Vortexgerät Genie2 und eine 5-minütige Zentrifugation mit 600 g bei 4°C. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und in Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal[®]) überführt. Es wurde eine Ultrazentrifugation für 1 h mit 100.000 g bei 4°C durchgeführt und der Überstand, der die lösliche cytosolische Fraktion enthielt, abgenommen. Das Präzipitat wurde zur Membran-Extraktion in 400 µl Membranen-Extraktionspuffer II (siehe 2.1.8.) aufgenommen. Durch eine anschließende Ultraschallbehandlung wurde das Präzipitat homogenisiert. Die Membranfraktion wurde gut gemischt, weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Der mit verschiedenen Insertionen versehene pGEX-Vektor wurde in *E. coli*-Bakterien des BL21 Stammes transformiert. Die Proteinexpression erfolgte für 18 h bei 37°C in 1 l LB-Medium, wobei die Bakterien mit 500 µM/l Isopropyl-β-thiogalactopyranosid induziert wurden. Danach wurden die Bakterien 10 min mit 6000 rpm bei 4°C zentrifugiert und das Bakterienpräzipitat in 50 ml kaltem PBS-Puffer resuspendiert. Der Puffer enthält 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,1 mM PMSF und Protease-Inhibitoren (Complete). Die Bakterien wurden 3 min bei 4°C durch Ultraschallbehandlung sonifiziert und 45 min mit 20.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe 2.2.9.5.) .

2.2.9.5. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung der Fusionsproteine für Mikroinjektionsversuche wurden die Zellysate aus dem *E. coli* Stamm BL21 mit 1 ml Glutathion-Sepharose-4B versetzt und für 3 h bei 4°C geschüttelt. Danach wurde die Matrix viermal mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Präparation der Proteine wurden die an die Affinitätsmatrix gebundenen Fusionsproteine mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 15 mM reduziertes Glutathion) eluiert und die eluierten Proteine anschließend durch eine Ultrazentrifugation mit CentriPrep-50 bei 1.500 g für 30 min und 4°C auf ca. 1mg/ml auf-

konzentriert. Die Proteine wurden durch Dialyse für 18 h gegen HEPES-Injektions-Puffer umgepuffert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.9.6. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgt mit dem Protein-Assay der Firma Biorad nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Die Proteinkonzentration wurde durch eine Eichreihe mit einer bekannten Konzentration eines Standardproteins (Rinder-Serumalbumin) bestimmt. Die Konzentrationen für die Eichkurve wurden von Rinder-Serumalbumin in einer Verdünnungsreihe von 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640 aus der Ausgangskonzentration von 1,12 mg/ml hergestellt. Zu 800 μl aus der jeweiligen Proteinverdünnung wurden 800 μl H_2O und 200 μl Farbstoffreagenz nach Herstellerangaben zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Für die Bestimmung der Proteine und Proteinextrakte wurden 5 μl der Proteinproben zu 795 μl H_2O gegeben und mit 200 μl Farbreagenz gemischt. Der Probenansatz wurde ebenfalls 5 min bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Aus der Verdünnungsreihe des Standardproteins wurde eine Eichgerade erstellt, und die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe wurde aus den Werten der Eichgeraden ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Kinetik der zytokinabhängigen Translokation von STAT1 α

3.1.1. Darstellung des STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsproteins

Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des molekularen Mechanismus der nukleocytoplasmatischen Translokation von STAT1. Die in dieser Arbeit verwendete cDNA von STAT1 α^{WT} , ein Geschenk von Dr. James Darnell Jr., The Rockefeller University, New York, kodierte die Aminosäuresequenz 1-746. Der cDNA-Sequenz von STAT1 α^{WT} fehlten damit die