

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

letzten 4 Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich. Im Vergleich zu dem endogenen STAT1 sollte untersucht werden, ob die deletierten 4 Aminosäuren am carboxyterminalen Ende von STAT1 α^{WT} die nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1 α beeinflusst. Für die Expressionsuntersuchungen wurde ein Fusionsprotein von STAT1 α^{WT} mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* hergestellt. Das Gen des GFP-Proteins (Tsien, 1998; Ormö et al., 1997; Li et al., 1997) wurde an den C-Terminus der Nukleinsäuresequenz von STAT1 α^{WT} gekoppelt. In der Abbildung 3.2. ist das STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsprotein dargestellt (Köstner und Hauser, 1999). Der Plasmidvektor pEGFPN1, der die DNA von STAT1 mit der C-terminal-gekoppelten cDNA des GFP-Proteins enthielt, wurde durch eine transiente Transfektion in 293T-Zellen eingebracht und von den Zellen über ca. 24 h exprimiert.

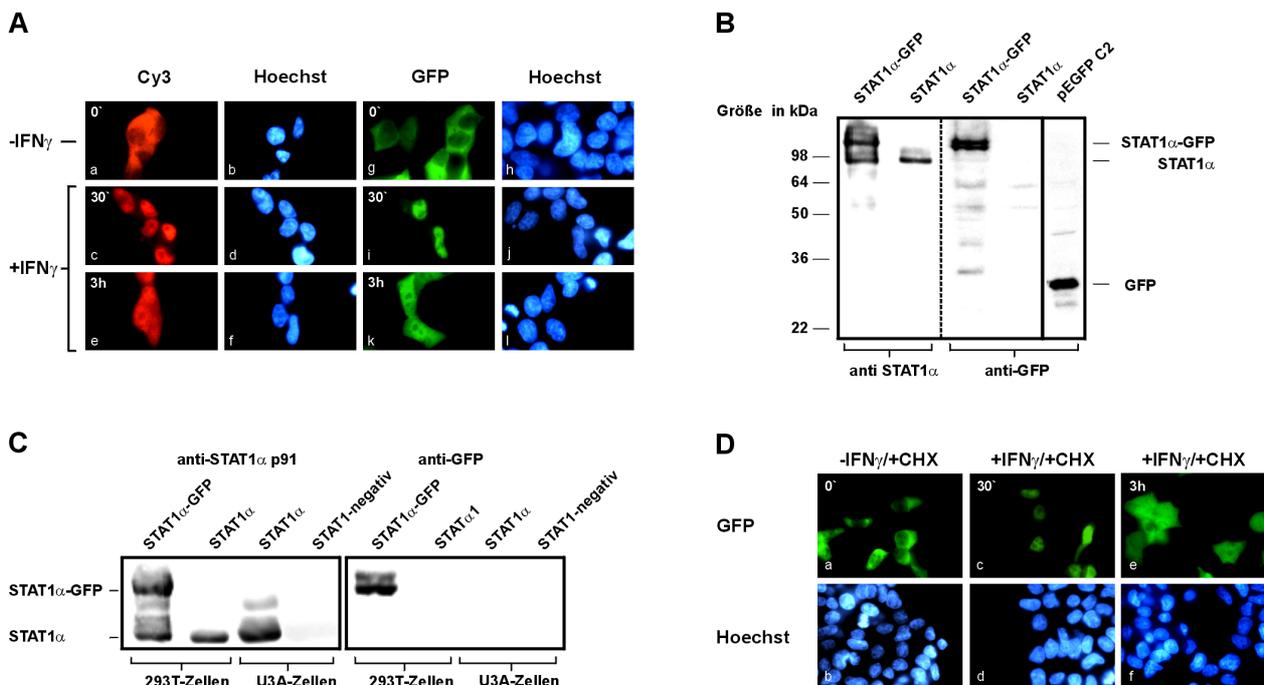


Abb. 3.1. Untersuchung des STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsproteins. In der Abbildung A wurde die nukleocytoplasmatische Verteilung von endogenem STAT1 und STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsproteinen nach einer IFN γ -Stimulation in 293T-Zellen untersucht. Die Zellen wurden entweder unbehandelt (-IFN γ) oder für 30 min bzw. 3 h mit IFN γ stimuliert. Die STAT-Verteilung in den zuvor fixierten Zellen wurde immunocytochemisch durch Färbung mit Anti-STAT1-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundär-Antikörper oder durch GFP-Autofluoreszenz detektiert. Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff markiert (Hoechst). In der Abbildung B wurden Gesamtzellextrakte von 293T-Zellen, die mit pSTAT1 α^{WT} -GFP oder dem leeren Expressionsvektor transfiziert oder aber untransfiziert waren, in einem Westernblot-Experiment untersucht. STAT1 α^{WT} -GFP, endogenes STAT1 und GFP wurden mit Anti-STAT1 α (links) bzw. Anti-GFP-Antikörper (rechts) nachgewiesen. Die Größe der Proteine wurde mit dem Proteinmarker SeeBlue für TRITC-Glycin ermittelt und auf der linken Seite dargestellt. Die Abbildung C zeigt die Extrakte der 293T-Zellen im Vergleich mit Extrakten aus U3A-Zellen mit oder ohne STAT1 α^{WT} -GFP in einem Western-Blot-Experiment. Es wurden Antikörper gegen STAT1 α (links) und GFP-Antikörper (rechts) eingesetzt. In der Abbildung

D wurden 293T-Zellen, die STAT1 α^{WT} -GFP exprimierten, mit 35 μ M Cycloheximid (CHX) vorbehandelt. Die obere Bildreihe zeigt STAT1 α^{WT} -GFP-kodierende Zellen unstimuliert (a) und nach einer IFN γ -Stimulation von 30 min (c) und 3 h (e). Die korrespondierenden Zellkerne wurden in der unteren Bildreihe durch Hoechstfärbung sichtbar gemacht (b, d und f).

Die nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1 α^{WT} wurde in einem kinetischen Experiment nach IFN γ -Stimulation der Zellen untersucht. Die Zellen wurden unstimuliert und für 30 min bzw. 3 h mit IFN γ behandelt und anschließend durch eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dargestellt. In einer parallelen Untersuchung wurden 293T-Zellen über gleiche Zeiträume mit IFN γ stimuliert und die intrazelluläre STAT1-Verteilung immunocytochemisch mit dem polyklonalen Antikörper Anti-STAT1 α (C24) und Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG analysiert.

Der Vergleich in der Abbildung 3.1. A zeigt deutlich, daß es zwischen der nukleocytoplasmatischen Verteilung von endogenem STAT1 und dem STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsprotein keinen Unterschied gab. Nach einer IFN γ -Stimulation befand sich nach 30 min der gesamte Pool von endogenem STAT1 und GFP-gekoppeltem STAT1 α^{WT} im Zellkern. Drei Stunden nach Beendigung der Stimulationsphase kam es zu einer panzellulären Verteilung von STAT1 und STAT1 α^{WT} -GFP. Die Ruheverteilung von STAT1 und STAT1 α^{WT} -GFP zeigte eine deutliche cytoplasmatische Lokalisation. Diese Ergebnisse geben keinen Hinweis auf einen Einfluß von fusioniertem GFP auf die nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1, wenn GFP an den C-Terminus von STAT1 α^{WT} gekoppelt wird. Die Ergebnisse zeigten zudem, daß die fehlenden 4 Aminosäuren am carboxyterminalen Ende des rekombinanten Proteins das Translokationsverhalten nicht beeinflussen. Das GFP-Protein wurde auch an den N-Terminus von STAT1 α^{WT} gekoppelt und untersucht. Ein GFP-STAT1-Fusionsprotein mit dem GFP in aminoterminaler Stellung zum STAT1-Molekül zeigte aber keine IFN γ -induzierbare Kernakkumulation mehr (nicht gezeigt).

Eine weitere Untersuchung sollte zeigen, ob in STAT1 α^{WT} -GFP-exprimierenden Zellen freies GFP vorhanden ist und gegebenenfalls die Verteilung mit der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von STAT1 interferiert. Dazu wurden Gesamtzellextrakte von 293T-Zellen in Western-Blot-Experimenten mit STAT1 α^{WT} -GFP und endogenem STAT1 untersucht. Es wurden Gesamtzellextrakte von 293T-Zellen gewonnen, die STAT1 α^{WT} -GFP und endogenes STAT1 oder zum anderen nur endogenes STAT1 exprimierten. Auf einem 12% Polyacrylamidgel wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die STAT1-Proteine wurden mit einem Antikörper gegen STAT1 α (C24) bzw. einem polyklonalen

Antikörper gegen GFP untersucht, die Sekundär-Antikörper bestanden aus Peroxidasegekoppeltem Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin. Als Kontrollexperiment wurde der Plasmidvektor pEGFPC2 in die Zellen eingebracht und im Western-Blot-Verfahren untersucht. Es wurde in den STAT1 α^{WT} -GFP-exprimierenden Zellen eine Bande für das STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsprotein mit ca. 116 kDa und endogenes STAT1 mit ca. 91 kDa nachgewiesen. Für die 293T-Zellen, denen das Fusionsprotein fehlte, konnte nur endogenes STAT1 mit einer Proteingröße von ca. 91 kDa nachgewiesen werden. Der GFP-Antikörper markierte nur das STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsprotein, endogenes STAT1-Proteine kann mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden. Deutlich wird, daß kein freies GFP in STAT1 α^{WT} -exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte. Das GFP-Protein hat eine Größe von ca. 25 kDa (Tsien, 1998; Ormö et al., 1996). In Kontrollversuchen mit Zellen, die nur mit dem Plasmidvektor pEGFPC2 transfiziert wurden, konnte nur das freie GFP mit einer Größe von ca. 25 kDa nachgewiesen werden (Abb.3.1. B). Demgegenüber wurde in Extrakten von U3A-Zellen, die mit pSTAT1 α^{WT} -GFP transfiziert wurden, nur das STAT1 α^{WT} -GFP-Fusionsprotein nachgewiesen, aber kein freies GFP (Abb. 3.1. C).

Eine Neusynthese von STAT1 α^{WT} -GFP im Cytoplasma während der reversiblen Akkumulationsphase würde die Beurteilung der nukleocytoplasmatischen Verteilung von STAT1 stören und zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen. Um eine De-novo-Synthese von STAT1 auszuschließen, wurden 293T-Zellen mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteintranslation hemmt, behandelt (Chow et al., 1995; Fucile et al., 1984). STAT1 α^{WT} -GFP-exprimierende Zellen, die zuvor mit 35 μM Cycloheximid behandelt worden waren, wurden durch Zugabe von IFN γ einer Kernakkumulation unterworfen (Abb. 3.1. D) und mit zytokinstimulierten Zellen, die nicht mit Cycloheximid vorbehandelt wurden (Abb. 3.1. A), verglichen. Dabei zeigte sich eine identische nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1 α^{WT} -GFP. Cycloheximid hatte also keinen Einfluß auf die nukleocytoplasmatische Verteilung vor und nach einer IFN γ -Stimulation. Damit konnte ausgeschlossen werden, das eine nennenswerte De-novo-Synthese über einen Untersuchungszeitraum von 3 h die intrazelluläre Verteilung von STAT1 stört. Möglicherweise unterliegt das neugebildete STAT1-Protein ebenfalls einer zytokinabhängigen Phosphorylierung und wird wie das präexistente STAT1 auch einer reversiblen Kernakkumulation unterworfen.

Die cDNA der dimerisierungs-inkompetenten Mutante STAT1 α^{Y701F} war ein Geschenk von Dr. Curt M. Horvath, Mount Sinai, New York und enthielt in der Position 701 der kodierenden Se-

quenz einen Austausch von Tyrosin nach Phenylalanin. Diese Mutante kann nicht mehr durch Jak-Kinasen phosphoryliert werden (Darnell et al., 1994, Darnell, 1997b; Leonard, 2001). Wie oben beschrieben (siehe 2.2.6.11.), wurde STAT1 α^{Y701F} in den Vektor pEGFPN1 integriert und in der Abbildung 3.2. graphisch dargestellt.

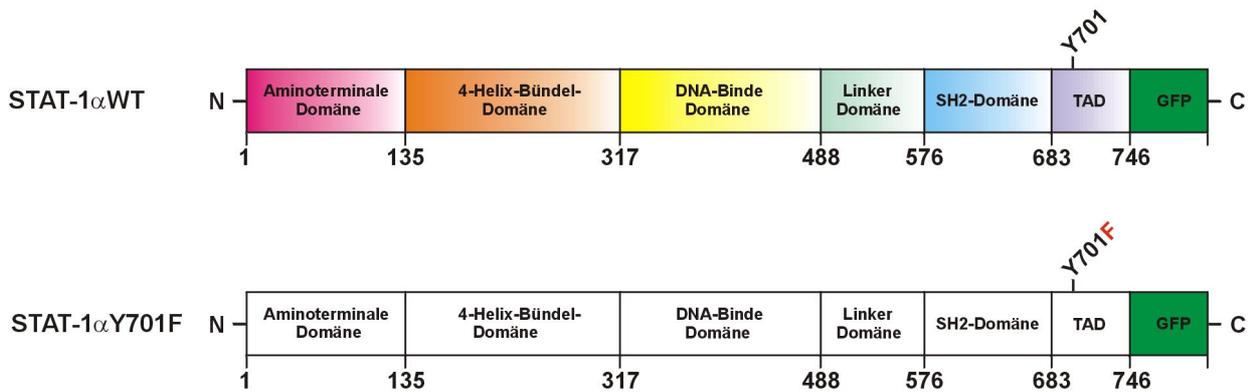


Abb. 3.2. Darstellung von STAT1 α^{WT} und STAT1 α^{Y701F} mit C-terminal fusioniertem GFP. In STAT1 α^{Y701F} wurde die Aminosäure Tyrosin 701 gegen Phenylalanin ausgetauscht. Die Mutation wurde rot hervorgehoben und das GFP-Fusionsprotein am carboxyterminalen Ende grün dargestellt.

Die cDNA von STAT1 α^{WT} und STAT1 α^{Y701F} wurde transient in 293T-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen entweder unstimuliert oder für 30 min bzw. 3 h mit IFN γ stimuliert. Die Deckgläser mit den Zellen wurden danach fixiert.

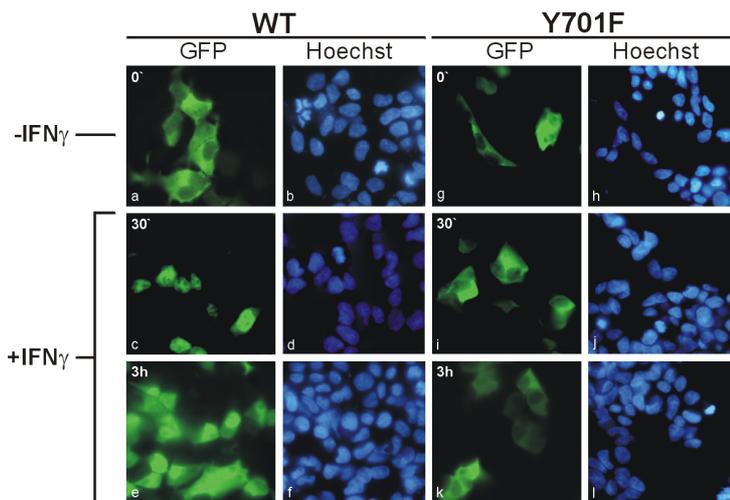


Abb. 3.3. Analyse der IFN γ -abhängigen nukleocytoplasmatischen Verteilung von STAT1 α ^{Y701F}. Die intrazelluläre Translokation von STAT1 α ^{WT}-GFP und STAT1 α ^{Y701F}-GFP wurde im zeitlichen Verlauf nach IFN γ -Stimulation in 293T-Zellen untersucht. Die obere Bildreihe zeigt unstimulierte STAT1 α ^{WT}-GFP und STAT1 α ^{Y701F}-GFP Zellen (-IFN γ). Die Zellen wurden in der mittleren Bildreihe nach einer 30-minütigen bzw. in der unteren Bildreihe nach einer 3-stündigen IFN γ -Stimulation für STAT1 α ^{WT}-GFP und STAT1 α ^{Y701F}-GFP gezeigt (+IFN γ). Die Zellkerne wurden mit Hoechst markiert und zu den korrespondierenden GFP-markierten Zellen dargestellt.

In der Abbildung 3.3. konnte gezeigt werden, daß sich STAT1 α ^{Y701F} in unstimulierten Zellen überwiegend im Cytosol befindet. STAT1 α ^{Y701F} akkumulierte zu keinem Zeitpunkt nach IFN γ -Stimulation im Zellkern. STAT1 α ^{WT} wurde im unstimulierten Zustand präferentiell im Cytosol detektiert, doch im deutlichen Gegensatz zu STAT1 α ^{Y701F} akkumulierte STAT1 α ^{WT} bereits nach einer 30-minütigen IFN γ -Stimulation fast vollständig im Zellkern. Drei Stunden nach der IFN γ -Stimulation befand sich der Großteil von STAT1 α ^{WT} wieder im Cytosol. Während STAT1 α ^{WT} stimulationsabhängig in den Zellkern importiert wurde, konnte für STAT1 α ^{Y701F} keine Veränderung in der nukleocytoplasmatischen Verteilung nachgewiesen werden.

3.1.2. Einfluß von Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren auf die nukleocytoplasmatische Lokalisation von STAT1 α ^{WT}

Im weiteren wurde untersucht, ob verschiedene Inhibitoren für Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen bzw. Phosphatasen die IFN γ -abhängige Verteilung und Kernakkumulation von STAT1 α ^{WT} beeinflussen. AG 490 ist ein spezieller Inhibitor für Jak2 und unterdrückt besonders potent die Interleukin-7-vermittelte Aktivierung der Src-Kinase. Es war bekannt, daß STAT1 mit der Tyrosin-Kinase Src interagieren kann. Da es sich bei AG 490 um einen Tyrosin-Kinase-Inhibitor handelt, sollte untersucht werden, ob die Inhibierung von Jak2 speziell den Import von aktiviertem STAT1 α ^{WT} unterdrücken kann (Meydan et al., 1996; Ulloa et al., 1999). Staurosporin ist ebenfalls ein bekannter Inhibitor für Tyrosin-Kinasen, der jedoch auch sehr effektiv die Serin- und Threonin-Kinasen PKA, PKC, PKG und MLCK inhibiert. Der Kinase-Inhibitor Staurosporin

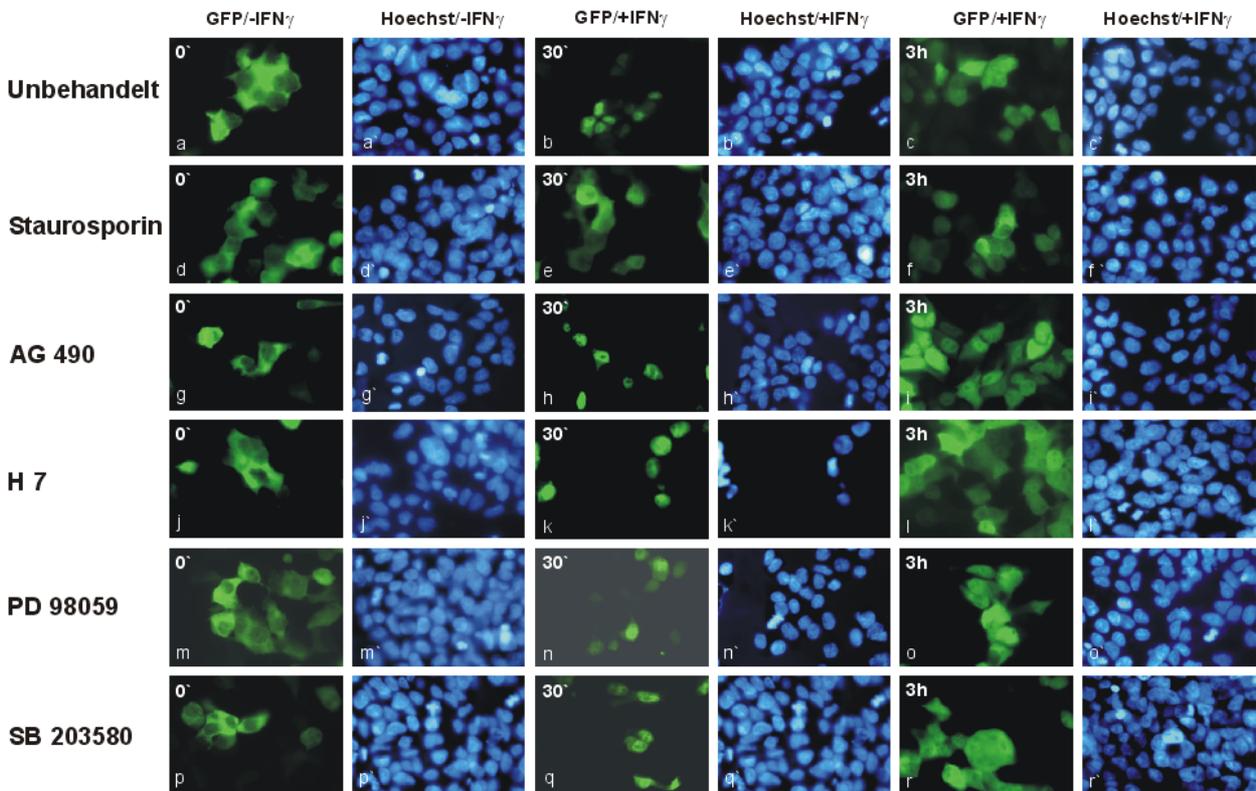
wurde ebenfalls eingesetzt, um die zytokinabhängige Translokation von STAT1 α^{WT} zu charakterisieren (Haspel et al., 1996; Callus und Mathey-Prevot, 1998; Meggio et al., 1995). H-7 inhibiert PKA, PKC, PKG und MLCK, blockiert jedoch nicht Tyrosin-Kinasen. Dieser Inhibitor wurde eingesetzt, um die Rolle einer Serin- und Threonin-Phosphorylierung für den Import und die nukleäre Akkumulation von STAT1 α^{WT} zu untersuchen (Hidaka et al., 1984; Irons et al., 1992). Wechselwirkungen mit dem MAP-Kinase-Signalweg wurden ebenfalls analysiert, dazu wurden die Einflüsse des Inhibitors PD 98059 für MAP-Kinasen (MEK) und SB 203580 für p38 untersucht (Goh et al.; 1999; Dudley et al., 1995; Alessi et al., 1995; Cuenda et al., 1995; Young et al., 1997; Kops et al., 1999). Der Einfluß einer Inhibition von Phosphatasen auf das nukleäre Akkumulationsverhalten von STAT1 α^{WT} sollte ebenfalls untersucht werden. Eingesetzt wurde Calyculin-A, ein sehr effektiver Inhibitor für die Serin- und Threonin-Phosphatase PP-2A und Genistein, das die Aktivität von cytosolischen Tyrosin-Phosphatasen supprimiert (Favre et al., 1997; Mustelin et al., 1990; Lane et al., 1991). Es war bereits bekannt, daß Vanadat, ein effektiver Inhibitor von Tyrosin-Phosphatasen die Dephosphorylierung und Inaktivierung von STAT1 inhibiert (Haspel et al.; 1999; Bardgette et al., 1999; ten Hoeven et al., 2002; Posner et al., 1994). Tabelle 3.1. faßt die eingesetzten Inhibitoren und deren Konzentrationen zusammen.

Inhibitoren	Konzentration	Vorinkubationszeit in min
Ag 490	10 μ M	0
Calyculin A	80nM	0
Genistein	90 μ M	0
H 7	50 μ M	0
Leptomycin B	10ng/ml	60
MG 132	50 μ M	60
PD 98059	30 μ M	0
SB 203580	30 μ M	0
Staurosporin	100nM	30
Vanadat	1 μ M	0

Tab. 3.1. Konzentration und Vorbehandlung der in dieser Studie eingesetzten Inhibitoren von Kinasen, Phosphatasen und dem Protasomen-Inhibitor MG 132.

293T-Zellen, die transient STAT1 α^{WT} -GFP exprimierten, wurden, wie in der Tabelle 3.1. beschrieben, behandelt, mit Paraformaldehyd fixiert und fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Kinetik der IFN γ -induzierten reversiblen Kernakkumulation analysiert. Es konnten nur für den Kinase-Inhibitor Staurosporin und den Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Vanadat Effekte auf die nukleocytoplasmatische Verteilung und nukleäre Akkumulation von STAT1 α^{WT} nachgewiesen werden. Die Anreicherung im Kernkompartiment wurde durch eine Vorbehandlung mit Staurosporin vollständig unterdrückt. Nach einer 30-minütigen IFN γ -Stimulation in Anwesenheit von Staurosporin konnte keine Akkumulation von STAT1 α^{WT} im Zellkern mehr nachgewiesen werden. Staurosporin führte auch nach einer 3-stündigen IFN γ -Stimulation zu keiner nukleären Akkumulation von STAT1 α^{WT} . Es konnten keine Einflüsse auf das Akkumulationsverhalten von STAT1 α^{WT} mit den anderen hier eingesetzten Kinase-Inhibitoren nachgewiesen werden. Mit den anderen Kinase-Inhibitoren wurde nach 30-minütiger IFN γ -Stimulation eine deutliche Kernakkumulation detektiert, und nach 3-stündiger Stimulation wurde eine panzelluläre Verteilung zwischen Kern und Cytosol beobachtet. Dieses Ergebnis bestätigt, daß die Tyrosin-Phosphorylierung der wichtigste Schritt für die nukleäre Akkumulation von STAT1-Proteinen ist.

A Inhibitoren von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen



B Inhibitoren von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen

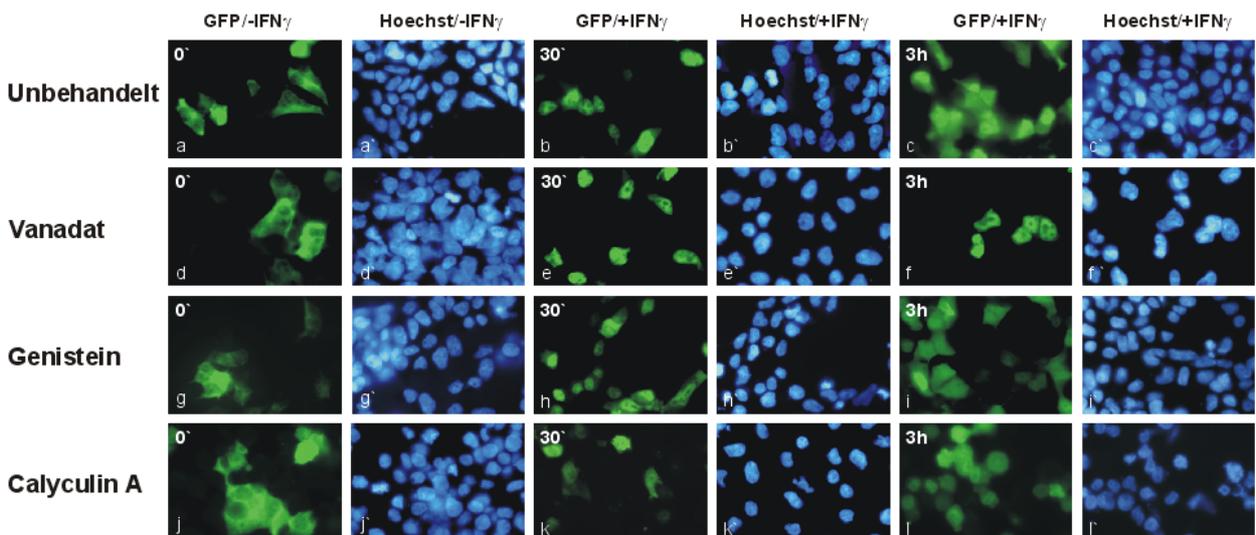


Abb. 3.4. Einfluß von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen und Phosphatasen auf die nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1 α^{WT} . In der Abbildung A wurde die intrazelluläre Verteilung von STAT1 α^{WT} -GFP nach Präinkubation mit den Kinase-Inhibitoren Staurosporin (d, e und f), AG 490 (g, h und i), H 7 (j, k und l), PD

98059 (m, n und o) und SB 203580 (p, q und r) in 293T-Zellen untersucht. Die Zellen wurden entweder ohne IFN γ (-IFN γ) oder für 30 min bzw. 3 h in IFN γ (+IFN γ) vorbehandelt. Die Bilder für die Hoechst-Kernfärbungen der korrespondierenden Zellen werden ebenfalls gezeigt. In der Abbildung B wurde die nukleocytoplasmatische Lokalisation von STAT1 α^{WT} -GFP nach Präinkubation mit den Phosphatase-Inhibitoren Vanadat (d, e und f), Genistein (g, h und i) und Calyculin-A (j, k und l) in 293T-Zellen dargestellt. Die STAT1 α^{WT} -Verteilung wurde für unstimulierte Zellen (a, d, g und j), und für 30 min (b, e, h und k) und 3 h (c, f, i und l) mit IFN γ behandelten Zellen gezeigt.

Vanadat unterdrückte die Dephosphorylierung von STAT1 α^{WT} und führte zu einer Verlängerung der nukleären Akkumulationsdauer von STAT1 α^{WT} . Die Ergebnisse für 293T-Zellen sind in Abbildung 3.4. B dargestellt. STAT1 α^{WT} wurde durch IFN γ -Behandlung in Gegenwart des Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Vanadat in den Zellkern importiert und akkumulierte im nukleären Kompartiment. Eine nukleäre Präsenz von STAT1 α^{WT} wurde in Anwesenheit von Vanadat auch noch nach einer 3-stündigen IFN γ -Stimulation beobachtet. Dem gegenüber hatten die Phosphatase-Inhibitoren Calyculin-A und Genistein keinen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung von STAT1 α^{WT} in 293T-Zellen. Calyculin-A stellte für die Zellen ein starkes Toxin dar, morphologisch erkennbar an der starken Abrundung der Zellen nach 3-stündiger Inkubation.

3.2. Mechanismen des IFN γ -abhängigen nukleären Exports von STAT1 α

3.2.1. Untersuchung des nukleären Exportverhaltens von STAT1 α^{WT}

Weiterhin wurde untersucht, ob STAT1 nach IFN γ -Stimulation proteolytisch durch Proteasomen abgebaut wird (Kim und Maniatis, 1996). MG 132 ist ein spezifischer Inhibitor, der den Abbau durch Proteasomen unterdrückt (Wiertz et al., 1996; Meriin et al., 1998). Wenn STAT1 zu einem signifikanten Anteil durch proteolytischen Abbau von Proteasomen degradiert wird, sollte die Anwesenheit des Inhibitors MG 132 zu einer längeren Kernpräsenz von STAT1 α^{WT} in 293T-Zellen führen. Eine kinetische Untersuchung der IFN γ -vermittelten STAT1-Translokation sollte zudem Aufschluß geben, ob STAT1 α^{WT} durch Ubiquitinierung abgebaut wird oder CRM1-abhängig exportiert wird. Das Exportin CRM1 bindet die GTPase Ran im Zellkern und könnte nach der Bindung an STAT1 einen effektiven Export dieses Transkriptionsfaktors aus dem Zellkern bewirken. Viele Proteine und RNA-Proteinkomplexe werden über das Exportin CMR1 in das Cytosol exportiert. LMB ist ein spezieller Inhibitor für CRM1 und unterdrückt die Bildung des Exportkomplexes (Kudo et al. 1999; Fukuda et al., 1997).

293T-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit pSTAT1 α^{WT} -GFP transfiziert. Nach ca. 24 h wurden die Zellen mit dem Inhibitor MG 132 (50 μ M) oder dem CRM1-Inhibitor LMB (10 ng/ml) 1 h vorinkubiert. Die Zellen wurden dann unstimuliert oder für 30 min, 3 h, und 5 h mit IFN γ stimuliert, bevor sie fixiert wurden. In parallelen Experimenten wurden die Zellen ohne Vorbehandlung mit den Inhibitoren durch IFN γ stimuliert. Abbildung 3.5. dokumentiert die gefundenen Ergebnisse an repräsentativen Zellen.

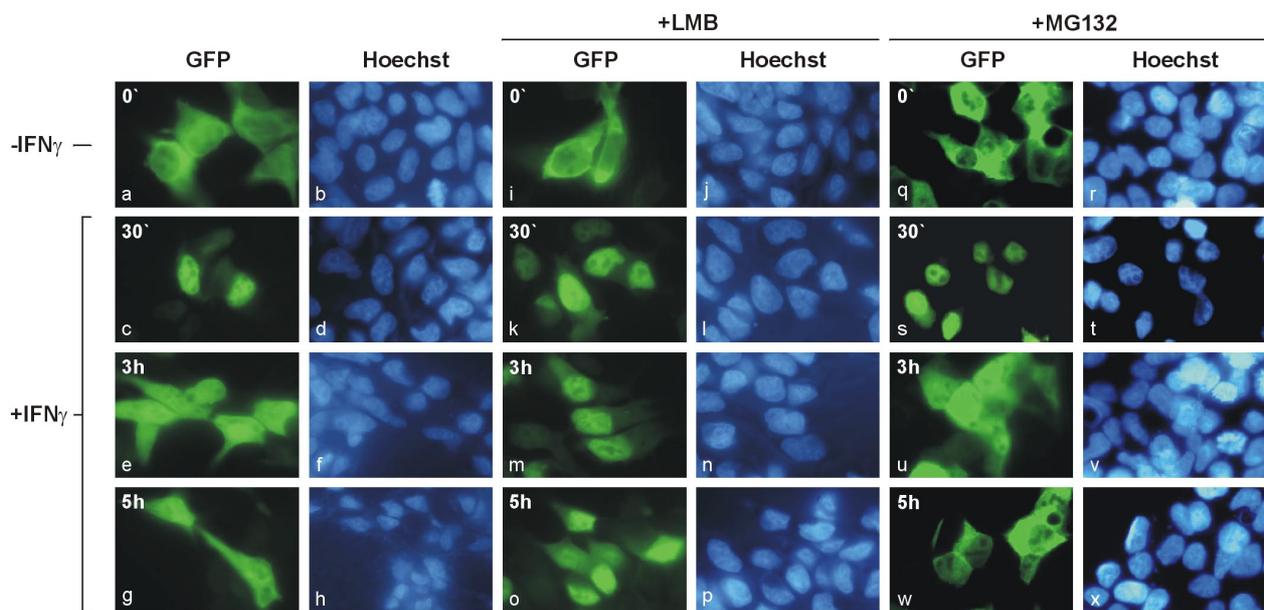


Abb. 3.5. Untersuchung der nukleocytoplasmatischen Verteilung von STAT1 α^{WT} vor und nach Prästimulation mit dem CRM1-Inhibitor LMB und dem Proteasomen-Inhibitor MG 132. 293T-Zellen, die STAT1 α^{WT} -GFP exprimierten, wurden mit 10 ng/ml LMB oder 50 μ M MG 132 vorbehandelt, bevor die Zellen dann unstimuliert (-IFN γ) oder für weitere 30 min, 3 h oder 5 h mit IFN γ (+IFN γ) behandelt wurden. Die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins wurde in Ab- und Anwesenheit von LMB (+LMB) oder MG 132 (+MG 132) dargestellt. Korrespondierende Zellkerne wurden mit Hoechstfarbstoff markiert.

Der Export von STAT1 α^{WT} ist von dem Exportin CRM1 abhängig, was in der Abbildung 3.5. deutlich gezeigt werden konnte. Nach 3-stündiger IFN γ -Stimulation befand sich STAT1 α^{WT} noch überwiegend im Zellkern, wenn der Export durch LMB blockiert wurde. Der Anteil von STAT1 α^{WT} im Zellkern war auch 5 h nach der Stimulation mit IFN γ in den LMB-behandelten Zellen noch sehr hoch. Ein proteolytischer Abbau von STAT1 α^{WT} durch Proteasomen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. STAT1 α^{WT} zeigte bereits 3 h nach IFN γ -Zugabe eine panzelluläre Verteilung, wenn die Zellen mit MG 132 behandelt wurden, unterschied sich also

nicht von den unbehandelten Zellen. Nach 5-stündiger IFN γ -Stimulation konnte wieder eine präferentiell cytosolische Verteilung von STAT1 α^{WT} beobachtet werden, wie sie für den unstimulierten Zustand typisch ist. Auf den Beginn der Akkumulationsphase hatte weder LMB noch MG 132 einen nachweisbaren Einfluß, denn nach 30-minütiger IFN γ -Stimulation befand sich STAT1 α^{WT} im Zellkern. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, daß der Export von STAT1 α^{WT} partiell von CRM1 abhängig ist. Es konnte deshalb vermutet werden, daß CRM1 an STAT1 bindet und mit der GTPase Ran einen Exportkomplex bildet, durch den STAT1 aktiv in das Cytosol exportiert wird. Bemerkenswert ist aber auch, daß LMB den nukleären Export nicht vollständig supprimiert, sondern nur die Dauer der reversiblen Kerntranslokation verlängert.

3.2.2. Identifizierung eines IFN γ -abhängigen nukleären Exportsignals im 4-Helix-Bündel von STAT1 α

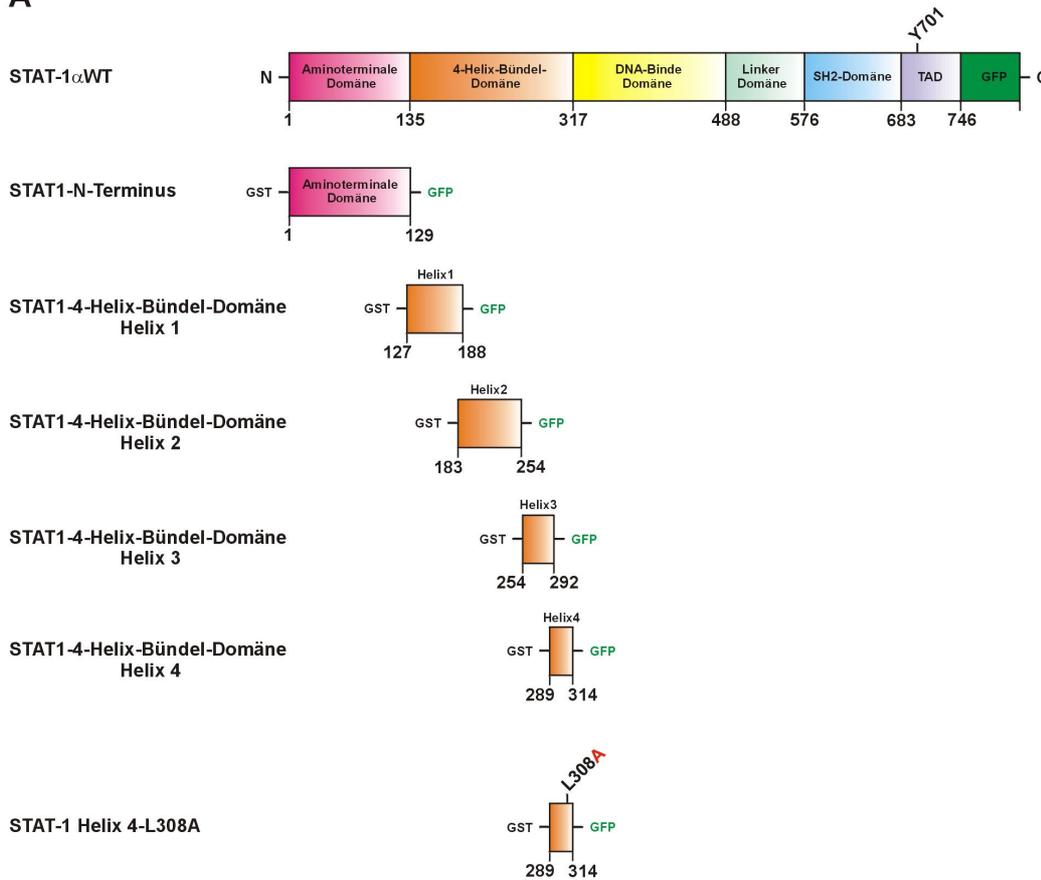
Die Konsensus-Sequenz, an die das Exportin CRM1 bindet, ist eine leuzinreiche Sequenz mit der konservierten Kern-Struktur Lx₁₋₃Lx₂₋₃LxL, wobei L für Leuzin und x für jede andere Aminosäure steht (Elfgang et al., 1999). Eine Inspektion der Genstruktur von STAT1 ergab, daß sich eine leuzinreiche Sequenz im aminoterminalen Bereich von STAT1 befindet, die diesem Konsensus entspricht. Die Leuzinreste sind hoch konserviert unter den einzelnen Mitgliedern der STAT-Familie und befinden sich im 4-Helix-Bündel von STAT1. Diese Domäne besteht aus vier α -Helices, die sich zu einer verdrillten Struktur zusammenlagern und eine hydrophobe Oberfläche haben (Vinkemeier et al.; 1998). Die leuzinreiche Struktur in der 4-Helix-Domäne könnte auf ein dort lokalisiertes Exportsignal hindeuten, das für eine Interaktion mit CRM1 benötigt wird und zum nukleären Export von STAT1 beiträgt. Die LMB-Sensitivität des Kernexports von STAT1 α^{WT} legte eine solche Vermutung nahe, weshalb dieser Bereich näher untersucht wurde.

Es wurde ein GST-STAT1-GFP-Fusionsprotein hergestellt. Der aminoternale Bereich von STAT1 α^{WT} wurde in isolierte Fragmente getrennt, die mit GFP am carboxyterminalen Ende und mit GST am aminoterminalen Ende gekoppelt wurden. Die Kopplung der Fragmente mit GST und GFP erfolgte durch eine Klonierung der cDNA der STAT1-Fragmente in den pGST-GFP-Expressionsvektor (siehe 2.2.5.11.). Die Fragmente bestanden aus der aminoterminalen Domäne (AS 1-129), Helix 1 (AS 127-188), Helix 2 (AS 183-254), Helix 3 (AS 254-292) und Helix 4 (AS 289-314) des 4-Helix-Bündels. Die Helix 4 wurde in ein aminoternales (AS 289-301) und ein

carboxyterminales (AS 302-314) Peptidfragment unterteilt, und die cDNA dieser STAT1-Fragmente wurde ebenfalls in den pGST-GFP-Expressionsvektor kloniert. In der Helix 4 wurde durch Mutagenese der Leuzinrest 308 durch Alanin ersetzt. Der pGST-GFP-Expressionsvektor mit der cDNA der einzelnen Fragmente aus STAT1 wurde in Bakterien exprimiert, und die Fusionsproteine wurden unter Ausnutzung der GST-Markierung chromatographisch gereinigt (siehe 2.2.9.5.). Die erhaltenen Fusionsproteine wurden in das jeweilige Kompartiment mikroinjiziert und hinsichtlich ihres nukleocytoplasmatischen Translokationsverhaltens untersucht. Abbildung 3.6. listet die für die Mikroinjektionsexperimente verwendeten GST-GFP-Fusionsproteine auf.

In den Mikroinjektionsexperimenten wurden die GST-STAT1-GFP-Fusionsproteine entweder in den Zellkern oder das Cytosol von HeLa-S3-Zellen injiziert. Als Injektionsmarker wurde TRITC-gekoppeltes BSA koinjiziert, welches die Kernpore nicht passieren kann. Die subzelluläre Verteilung nach der Injektion wurde in einem zeitabhängigen Experiment in An- und Abwesenheit des CRM1-Inhibitors LMB untersucht. Die Zellen wurden mit LMB 1 h vor der Mikroinjektion vorinkubiert. Nach der Injektion wurden die HeLa-S3-Zellen für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und nachfolgend fixiert. In der Abbildung 3.7. sind Kerninjektionen der GST-STAT1-GFP-Fusionsproteine aus der Helix 1, der Helix 4 und der carboxyterminalen Hälfte der Helix 4 nach 3-stündiger Inkubation dargestellt. Es wurden auch nukleäre Injektionen der GST-STAT1-GFP-Fusionsproteine der Helix 2 und 3 sowie der aminoterminalen und carboxyterminalen Hälfte der Helix 4 durchgeführt.

A



B

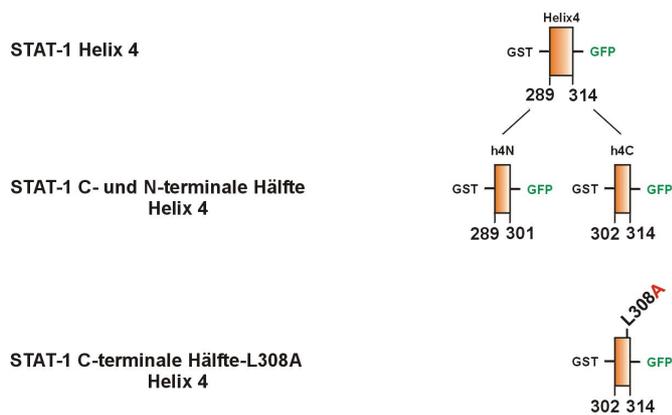


Abb. 3.6. Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten GST-STAT1-GFP-Fragmente zur Untersuchung des STAT1-Exports. Abbildung A: Schematische Darstellung der für Mikroinjektionen verwendeten STAT1 α -Fragmente einschließlich eines Schemas für die Domänenstruktur von STAT1 α ^{WT}. Der GFP-Anteil wurde grün und die GST gelb hervorgehoben. Die eingeführte Punktmutation von Leuzin 308 nach Alanin wurde rot gekennzeichnet. In der Abbildung B wurden die Peptid-Fragmente aus der Helix 4 der 4-Helix-Bündel-Domäne dargestellt.

Das Fusionsprotein mit der Helix 1 zeigte 3 h nach seiner nukleären Injektion keine Exportaktivität. Auch die Fusionsproteine der Helices 2 und 3 waren nach der Injektion im Zellkern noch 3 h später ausschließlich im Zellkern lokalisiert (nicht gezeigt). Das Fusionsprotein der Helix 4 zeigte demgegenüber eine deutliche Exportaktivität, denn nach 3 h war der größte Teil des GST-STAT1-GFP-Fusionspeptids der Helix 4 bereits im Cytosol lokalisiert. Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß in der Helix 4 des 4-Helix-Bündels von STAT1 ein Exportsignal lokalisiert ist.

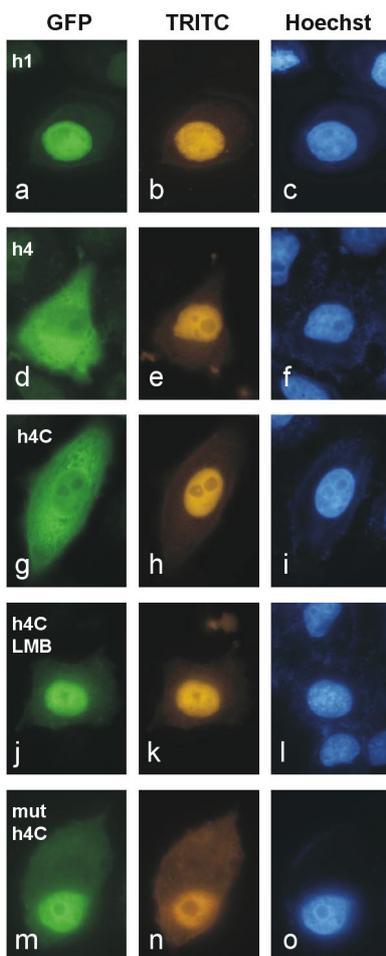


Abb. 3.7. Mikroinjektion von GST-STAT1-GFP-Fragmenten in den Zellkern von HeLa-S3-Zellen. Verschiedene GST-STAT1-GFP-Fusionsproteine wurden in den Zellkern von HeLa-S3-Zellen zusammen mit TRITC-markierten Immunglobulinen als Injektionskontrolle koinjiziert, und der nukleäre Export 3 h nach der Mikroinjektion untersucht. Die intrazelluläre Lokalisation nach der Injektion wurde für die Helix 1 (h1), die Helix 4 (h4), die carboxyterminale Hälfte der Helix 4 (h4C) und die Punktmutation von Leuzin 308 nach Alanin in der Helix 4 des 4-Helix-Bündels von STAT1 α (mut h4C) dargestellt. Die Zellen, die mit der carboxyterminalen Hälfte der Helix 4 injiziert wurden, waren über 1 h mit LMB vorbehandelt (h4C LMB), bevor die Mikroinjektion erfolgte. Die GST-STAT1-GFP Fusionsproteine (a, d, g, j und m), die TRITC-markierten Immunglobuline (b, e, h, k und n) und die Hoechst-markierten Zellkerne (c, f, i, l und o) sind gezeigt.

Um das nukleäre Exportsignal näher einzugrenzen, wurden die Fusionsproteine der isolierten aminoterminalen und carboxyterminalen Hälfte der Helix 4 untersucht. Nach einer Injektion in den Zellkern konnte nur für das Fusionsprotein der carboxyterminale Hälfte der Helix 4 eine Exportaktivität nach 3 h aufgedeckt werden. Das Fusionsprotein der aminoterminalen Hälfte von der Helix 4 zeigte keine Exportaktivität (nicht gezeigt). In der Abbildung 3.7. ist die cytosolische Lokalisation 3 h nach der Injektion dieses Fragments deutlich zu erkennen. Der CRM1-Inhibitor LMB unterdrückte den Export des Fusionsproteins mit der carboxyterminalen Hälfte (AS 302-

314) von Helix 4. Drei Stunden nach der nukleären Injektion wurde das Fusionsprotein der carboxyterminalen Hälfte von der Helix 4 in Gegenwart von LMB nicht mehr in das Cytosol der Zellen exportiert. Eine Mutation des Aminosäurerestes Leuzin 308 zu Alanin führte ebenfalls zum vollständigen Verlust der Exportaktivität. Nach nukleärer Mikroinjektion befand sich das mutierte Fusionsprotein auch nach 3 h noch im injizierten Kompartiment. Eine Stimulation der Zellen mit IFN γ hatte keinen Einfluß auf die Verteilung der mikroinjizierten GST-STAT1-GFP-Fusionsproteine (nicht gezeigt). Die Abbildung 3.7. zeigt deutlich, daß sich in der Helix 4 des 4-Helix-Bündels von STAT1 ein LMB-sensitives Exportsignal befindet. Die Ergebnisse der Mikroinjektion belegen die Existenz eines transferierbaren Exportsignals in der Aminosäuresequenz 302-314 von STAT1. Weiterhin wurde die intrazelluläre Lokalisation von transient exprimierten GFP-Fusionsproteinen untersucht, die schon zuvor als rekombinante Proteine mikroinjiziert wurden. Eindrucksvoll bestätigt wurde die Präsenz eines Exportsignals durch den Nachweis einer relativen Kernexklusion der isolierten Helix 4.

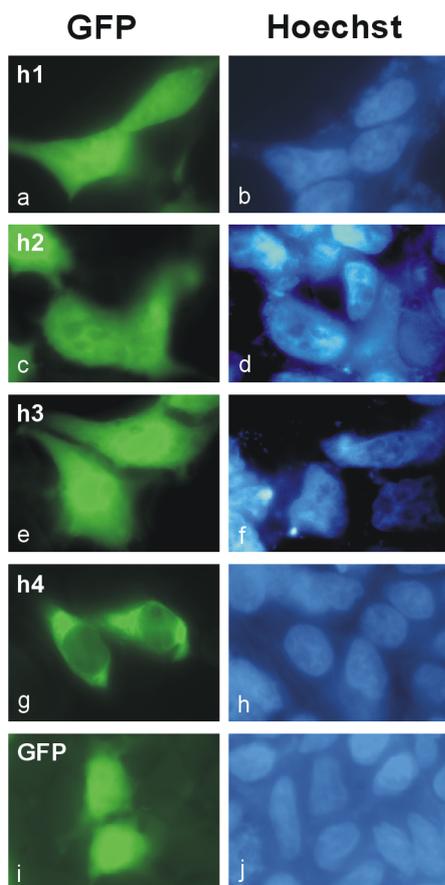


Abb. 3.8. Untersuchung der nucleocytoplasmatischen Verteilung von STAT1 α -GFP-Fragmenten der Helix 1-4 aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 α . Die STAT1-GFP-Fragmente der Helix 1-4 aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 α und GFP wurden in 293T-Zellen exprimiert und hinsichtlich der nucleocytoplasmatischen Verteilung untersucht. Die subzelluläre Lokalisation wurde für die Fusionsproteine der Helix 1 (a, b), Helix 2 (c, d), Helix 3 (e, f) und Helix 4 (g, h) des 4-Helix-Bündels von STAT1 α sowie für GFP (i, j) als Kontrolle gezeigt. Die Lokalisation der STAT1 α -GFP-Fragmente (a, c, e, g und i) und die korrespondierenden Zellkerne (b, d, f, h und j) sind dargestellt.

Während STAT1-GFP-Fusionsproteine der Fragmente von Helix 1-3 ebenso wie das isolierte GFP jeweils panzelluläre Verteilungen im Ruhezustand der transfizierten Zellen aufwiesen, war das Fusionsprotein der Helix 4 im Gegensatz dazu in unstimulierten Zellen präferentiell im Cytosol lokalisiert. Die Ruheverteilung bestätigte, daß in der Helix 4 ein nukleäres Exportsignal existiert. Dieses läßt sich aus dem aktiven Export des Peptidfragments der Helix 4 aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 schließen. In dieser Helix befinden sich die hochkonservierten Leuzinreste 308 und 312. Die nukleocytoplasmatische Lokalisation der transient exprimierten GFP-Fusionsproteine mit den isolierten Helices aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 veränderte sich nicht, wenn die Zellen mit IFN γ stimuliert wurden (nicht gezeigt).

3.2.3. Untersuchung des nukleären Exportsignals von STAT1 α

Die Aminosäuresequenz im Bereich des Exportsignals von STAT1 ist bei allen Mitgliedern der STAT-Familie konserviert. Die Sequenzen von *Caenorhaditis elegans*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* und den einzelnen Mitgliedern von humanem STAT weichen nur geringfügig voneinander ab (Abbildung 3.9.). In diesem Bereich befinden sich viele hydrophobe Aminosäuren, die stark konserviert sind. Das NES von STAT1 weicht vom Konsensus der bereits identifizierten Exportsignale anderer Proteine wie PKI (human cAMP-dependent **P**rotein **K**inase **I**nhibitor α), MAPKK1 (human **M**itogenactivated **P**rotein **K**inase **K**inase1) und von I κ B (**I**nhibitor of nuclear factor **\kappa****B**) ab (Johnson et al. 1999; Elfgang et al., 1999). In der Abbildung 3.9. sind bekannte Exportsignale von nicht mit STAT verwandten Proteinen aufgelistet. In dem NES-Bereich der STAT-Proteine befinden sich weitere hydrophobe Aminosäuren. Diese Aminosäuren sind zwischen den STAT-Proteinen konserviert und könnten für den Export von Bedeutung sein.

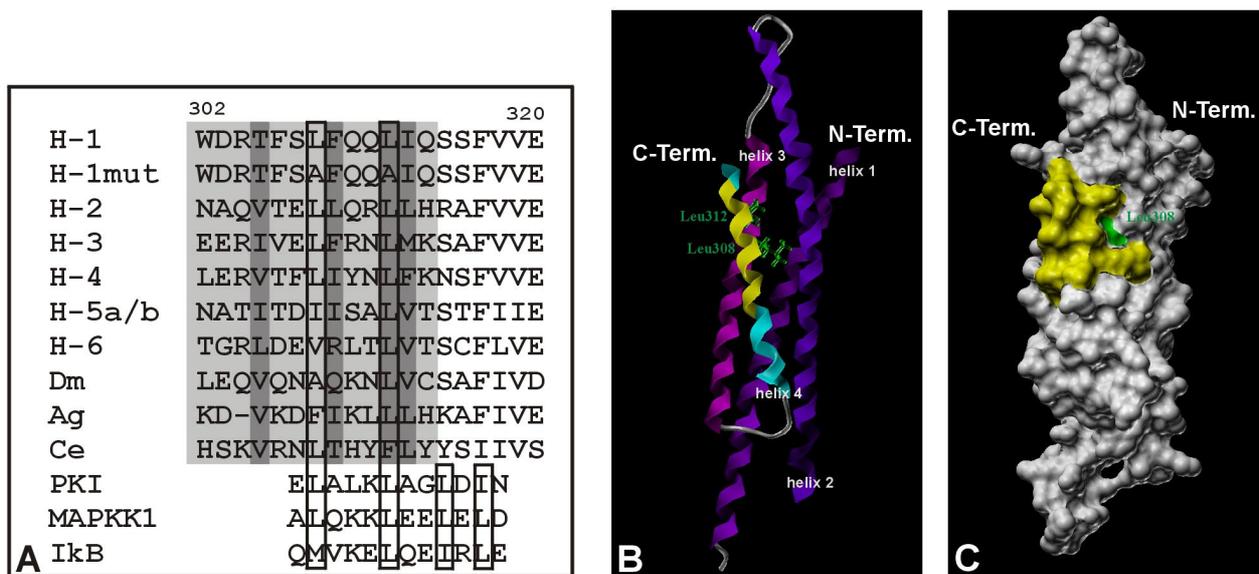


Abb. 3.9. Darstellung der NES-Sequenz von STAT und den homologen Bereichen anderer STAT-Proteine und der dreidimensionalen Struktur des 4-Helix-Bündels von STAT1. In der Abbildung A wird ein Sequenzvergleich zwischen dem Aminosäurebereich 302-320 des 4-Helix-Bündels von STAT1 sowie den homologen Regionen der anderen Mitglieder der STAT-Familie zusammen mit den bekannten leuzinreichen Exportsequenzen anderer Proteine dargestellt. Die NES-Sequenz im Aminosäurebereich 302-314 von STAT1 wurde hellgrau unterlegt. Aminosäurereste, die für das vermutete nukleäre Exportsignal wichtig sind, wurden dunkelgrau unterlegt, und die hochkonservierten hydrophoben Aminosäurereste in der Position 308 und 312 des Exportsignals von STAT1 durch Einrahmung hervorgehoben. Die Aminosäurereste der bekannten NES-Sequenzen der anderen Proteine wurden ebenfalls durch Einrahmung hervorgehoben. Abbildung B zeigt eine Ribbon-Darstellung des 4-Helix-Bündels von STAT1 α , wobei die Helix 4 mit der aminoterminalen Hälfte blau und der carboxyterminalen Hälfte gelb hervorgehoben wurde. Die essentiellen Aminosäuren Leuzin 308 und 312 wurden in der Molekülform hervorgehoben. In der Abbildung C wurde die Oberfläche des 4-Helix-Bündels von STAT1 gezeigt. Die NES-Sequenz mit den Seitenketten wurde in Gelb hervorgehoben, und die Aminosäure Leuzin 308 wurde in grüner Farbe dargestellt (nach Vinkemeier et al, 1998).

Aus Daten der Röntgenstrukturanalyse von STAT1 ist bekannt, daß sich die Aminosäure Leuzin 308 auf der Oberfläche der Helix befindet (Abb. 3.9.). Durch Mikroinjektionsexperimente mit rekombinanten GFP-Fusionsproteinen (Abb. 3.7.) wurde gezeigt, daß der Austausch des Aminosäurerests Leuzin 308 gegen Alanin ausreichte, um die Exportaktivitäten zu unterdrücken. Dieser Aminosäurerest ist sehr gut zugänglich und könnte mit CRM1 interagieren. Der Aminosäurerest Leuzin 312 ist nicht auf der Oberfläche der Helix 4 angeordnet und wohl nicht direkt für eine Interaktion mit Proteinen der Exportmaschinerie zugänglich.

Die Aminosäurereste Leuzin 308 und Leuzin 312 wurden durch eine Mutagenese gegen Alanin im Volle-Länge-Molekül von STAT1 α^{WT} ausgetauscht. Für die Mutagenese wurden die in der Tabelle 2.1. aufgeführten Primerpaare verwendet. Die mutierten STAT1 α -Derivate waren am

carboxyterminalen Ende mit GFP gekoppelt. In der Abbildung 3.10. sind die verwendeten STAT1 α -Mutanten dargestellt.

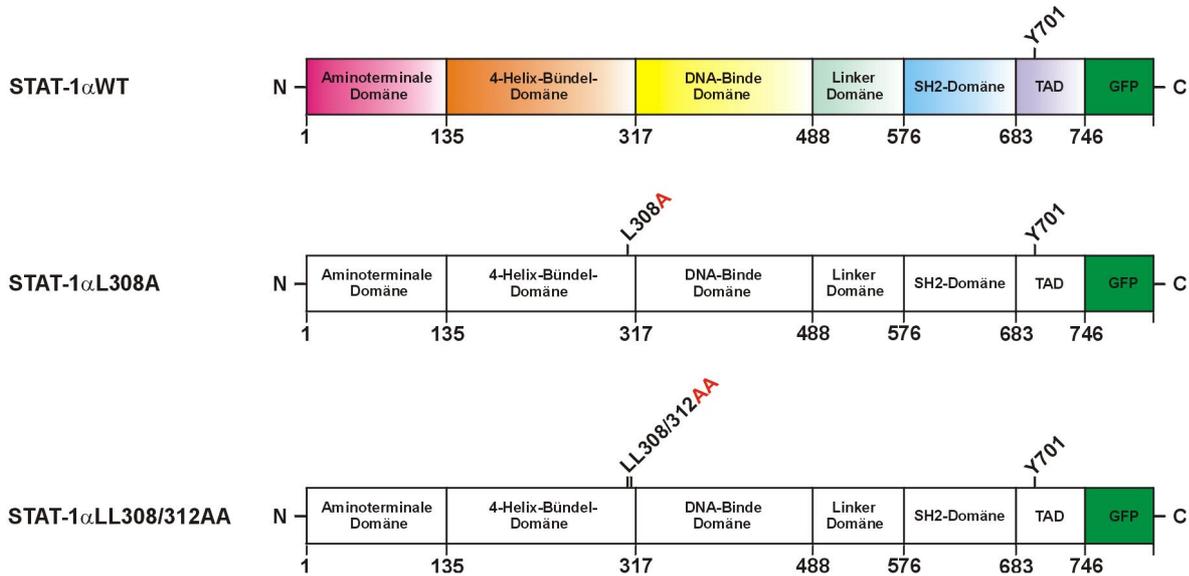


Abb. 3.10. Darstellung der Mutationen STAT1 α ^{L308A} und STAT1 α ^{LL308/312AA} im 4-Helix-Bündel von STAT1 α . Die eingeführten Punktmutationen der Aminosäurereste Leuzin 308 nach Alanin sowie Leuzin 308 und 312 nach Alanin wurden rot hervorgehoben und über der Domänenstruktur von STAT1 α dargestellt. Der GFP-Anteil wurde grün am carboxyterminalen Ende von STAT1 α gezeigt.

Die cDNA von STAT1 α ^{L308A} und STAT1 α ^{LL308/312AA} wurde in 293T-Zellen transient transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen ca. 24 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden 30 min, 3 h und 5 h bzw. 10 h mit IFN γ stimuliert. STAT1 α ^{LL308/312AA}-exprimierende Zellen wurden 1 h vor und 10 h nach einer 45-minütigen IFN γ -Stimulation mit 10 ng/ml LMB behandelt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3. 11. dargestellt.

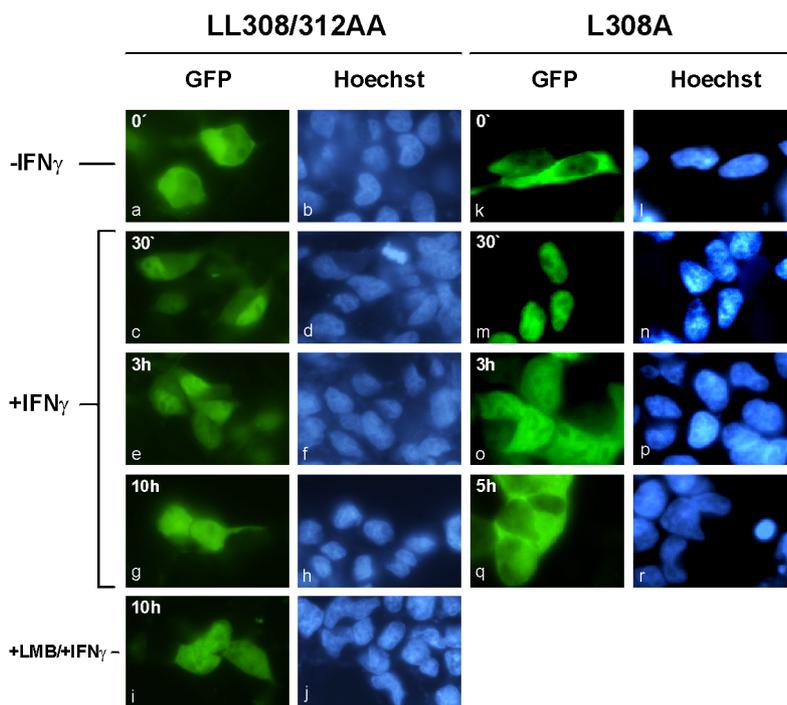


Abb. 3.11. Untersuchung des nukleären Exports von STAT1 α^{L308A} und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$. Der nukleäre Export von STAT1 α^{L308A} -GFP und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP wurde unstimuliert und 30 min, 3 h und 5 h bzw. 10 h nach IFN γ -Stimulation in 293T-Zellen untersucht. Die subzelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ und STAT1 α^{L308A} wurde in den Bildern (a, c, e, g und i) bzw. (k, m, o und q) dargestellt. Die Ansichten (a und b) bzw. (k und l) zeigen die unstimulierten Zellen von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP und STAT1 α^{L308A} -GFP. Die subzellulären Verteilungen von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP und STAT1 α^{L308A} -GFP nach einer IFN γ -Stimulation wurden in den Bildern für 30 min (c und d) bzw. (m und n), 3 h (e und f) bzw. (o und p), 5 h (q und r) für STAT1 α^{L308A} -GFP und 10 h (g und h) für STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP gezeigt. Die

293T-Zellen mit STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP wurden 1 h mit LMB vorinkubiert, 45 min mit IFN γ stimuliert, gewaschen und weitere 10 h mit LMB behandelt. Die subzelluläre Verteilung wurde in der Ansicht (i) dokumentiert und die korrespondierenden Zellkerne in der Ansicht (j) gezeigt.

Die Ruheverteilung von STAT1 α^{L308A} , STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ und STAT1 α^{WT} unterschied sich nicht. Nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation wurden STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{L308A} und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ in den Zellkern importiert. Der Import von STAT1 wurde durch die Mutationen nicht nachweisbar beeinflusst. Interessanterweise konnte nur für STAT1 α^{WT} und STAT1 α^{L308A} nach 3 h eine Exportaktivität nachgewiesen werden, während sich für STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ zum gleichen Zeitpunkt noch eine Kernakkumulation beobachten ließ. Der gesamte Pool von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ war nach 3 h im Zellkern lokalisiert, und erst nach 10 h kam es zu einer Gleichverteilung zwischen Cytosol und Zellkern. Die Doppelmutation führte zu einer Verlangsamung des Kernexports. Wenn der CRM1-Inhibitor LMB zugegen war, konnte der langsame nukleäre Export von STAT1 α^{WT} nicht unterdrückt werden, was darauf hindeutete, daß es neben dem LMB-sensitiven nukleären Export noch einen zweiten LMB-unabhängigen Exportmechanismus geben muß. Abbildung 3. 11. verdeutlicht den langsamen nukleären Export von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ nach 10 h. Der zweite Exportweg ist von CRM1 unabhängig und läuft parallel zu dem CRM1-abhängigen Exportmechanismus. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Aminosäurereste Leuzin 308 und 312 für den Export von STAT1 aus dem Zellkern notwendig sind.

Die einzelne Punktmutation von Leuzin 308 reichte im Kontext des Volle-Länge-STAT1-Proteins nicht für eine effektive Unterdrückung des nukleären Exports von STAT1 aus.

3.2.4. Charakterisierung der nukleären Exportmutante STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum nukleären Export hatten ergeben, daß sich ein NES in dem 4-Helix-Bündel von STAT1 befindet. Das nukleäre Exportsignal von STAT1 wurde in der Helix 4 in dem Bereich zwischen den Aminosäureresten 302-314 lokalisiert. Dabei zeigte sich, daß die Aminosäurereste 308 und 312 für den nukleären Export von STAT1 eine zentrale Bedeutung haben. Eine Mutation dieser beiden Leuzinreste zu Alanin führte zu einem vollständigen Verlust der CRM1-abhängigen Exportaktivität von STAT1. Die Exportmutante STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ wurde deshalb in weiteren biochemischen Untersuchungen näher charakterisiert. Zunächst wurde gefragt, ob sich die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ von der von STAT1 α^{WT} unterscheidet. Dazu wurde die Phosphorylierungskinetik von STAT1 α^{WT} bzw. STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ zu den angegebenen Zeitpunkten nach IFN γ -Zugabe (Abb. 3.12. A) in nukleären Extrakten von 293T-Zellen im Western-Blot untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß es keinen Unterschied in der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung zwischen STAT1 α^{WT} und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ gab. Nach einer 30-minütigen IFN γ -Stimulation wurden der Wildtyp und die Mutante gleichermaßen phosphoryliert. Die oberen Banden in der Abbildung 3.12. A des Western-Blot-Experiments repräsentierten STAT1-GFP-Homodimere und die unteren Banden zeigten die Homodimere des endogenen STAT1. Der nukleäre Import und die Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ wurden durch die Mutation des NES nicht beeinflusst. Hinsichtlich des Ausmaßes der Tyrosin-Phosphorylierung gab es keinen Unterschied zwischen STAT1 α^{WT} und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ nach 90- und 150-minütiger IFN γ -Stimulation. Nach 150 min wurden STAT1 α^{WT} und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ fast vollständig dephosphoryliert (Abb. 3.12. A). In der Abbildung 3.11. wird gezeigt, daß der nukleäre Export von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ nach IFN γ -Stimulation sehr stark supprimiert ist.

In einer Gelshift-Untersuchung sollte zudem geklärt werden, ob STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ eine veränderte Kinetik in der DNA-Bindung gegenüber STAT1 α^{WT} aufweist. Für diese Untersuchung wurden die gleichen nukleären Extrakte wie für Western-Blot-Untersuchungen verwendet. Die

GFP-gekoppelten Proteine von STAT1 α ^{WT} und STAT1 α ^{LL308/312AA} wurden mit [³²P]-markierter M67-Sonde (GAS-Sequenz) inkubiert. Als Kontrolle wurden Extrakte von untransfizierten 293T-Zellen ebenfalls mit der M67-Sonde inkubiert (siehe 2.2.8.). Der polyklonale GFP-Antikörper (IgG-Fraktion), der mit GFP einen Antikörperkomplex bildet und zum geänderten elektrophoretischen Laufverhalten beiträgt, wurde zum Nachweis von dimerisiertem STAT1-GFP eingesetzt. Die Resultate aus dem Gelshiftexperiment werden in der Abbildung 3.12. B gezeigt. Die DNA-Bindung an der [³²P]-markierten M67-Sonde (GAS-Sequenz) zeigte keinen Unterschied zwischen STAT1 α ^{WT}- und STAT1 α ^{LL308/312AA}-exprimierenden IFN γ -stimulierten Zellen. STAT1 α ^{WT} und STAT1 α ^{LL308/312AA} binden als unphosphorylierte Moleküle nicht an die GAS-Sequenz, erkennbar an den fehlenden Signalen in unstimulierten Zellen (Abb. 3.12. B). Nach einer 30-minütigen IFN γ -Stimulation führte die Aktivierung von STAT1 α ^{WT} und STAT1 α ^{LL308/312AA} zu einer deutlichen Bindung der STAT1 α -Derivate an die GAS-Sequenz. Nach 90-minütiger Stimulation mit IFN γ gingen die DNA-Bindungsaktivitäten der STAT1 α -Derivate zurück, und nach 150 min konnte keine Bindung an die GAS-Sequenz mehr nachgewiesen werden. In der Kinetik der DNA-Bindung zeigte sich kein Unterschied zwischen STAT1 α ^{WT} und STAT1 α ^{LL308/312AA} (Abb. 3.12. B). Autoradiographisch wurden drei Banden in den Gelshiftreaktionen nach zellulärer Aktivierung mit IFN γ detektiert. Die Identität der Banden wurde über das retradierte Laufverhalten in Gegenwart eines Anti-GFP-Antikörpers ermittelt. Die untere Bande entsprach dem Homodimer aus endogenem STAT1. Die obere Bande repräsentierte das STAT1-GFP-Homodimer und die mittlere Bande das Heterodimer aus dem STAT1-GFP-Fusionsprotein und dem endogenem STAT1-Protein.

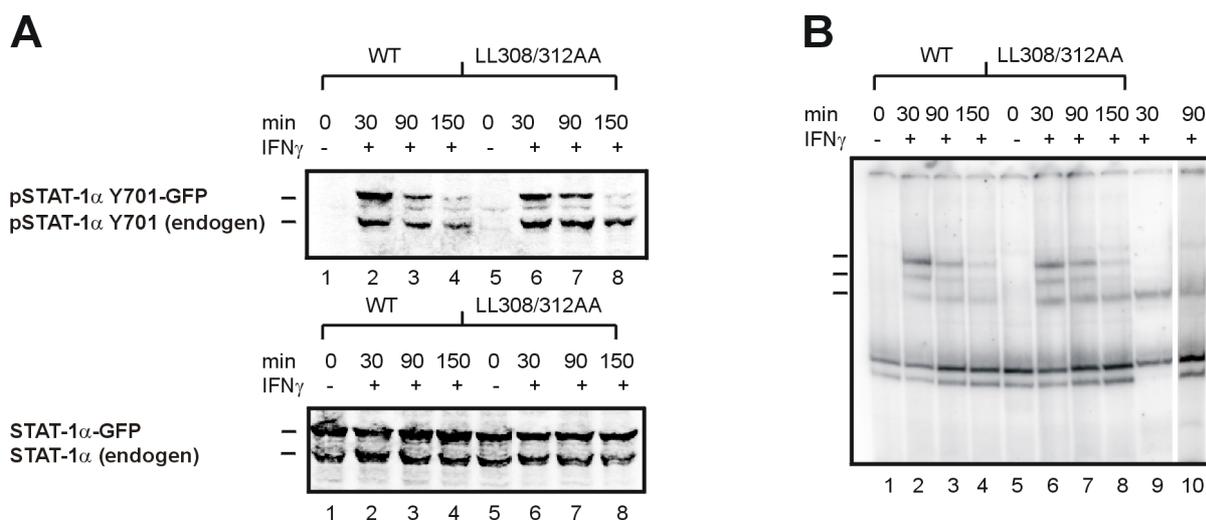


Abb. 3.12. Zytokinabhängige Tyrosin-Phosphorylierung, DNA-Bindung und Reportergenaktivität von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$. In der Abbildung A wurde die Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung in nukleären Extrakten von STAT1 α^{WT} -GFP- und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP-exprimierenden 293T-Zellen durch Western-Blot untersucht. Die Zellen wurden unstimuliert bzw. mit IFN γ 30 min, 90 min oder 150 min stimuliert. Die Tyrosin-Phosphorylierung wurde mit dem Antikörper Anti-Phospho-STAT1-Tyrosin⁷⁰¹ im oberen Blot untersucht. Die unteren Banden repräsentieren das endogene STAT1 α und die oberen Banden STAT1 α^{WT} -GFP bzw. STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP. Der gleiche Blot wurde nach Entfernung der gebundenen Antikörper-Komplexe mit Anti-STAT1 α p91 reinkubiert. In der Abbildung B wurden die nukleären Extrakte aus der Abbildung A auf DNA-Bindeaktivität mit einer [³²P]-markierten M67-Sonde untersucht. In der Spur 1-4

wurde STAT1 α^{WT} -GFP und in der Spur 5-8 STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP aufgetragen. Das endogene STAT1 α wurde nach einer 30-minütigen IFN γ -Stimulation in untransfizierten Zellen nachgewiesen (Spur 9). In der Spur 10 wurde der Extrakt von STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ -GFP-exprimierenden, IFN γ -stimulierten Zellen (90 min) mit dem Anti-GFP-Antikörper vorbehandelt. Der obere Balken auf der linken Seite der radiographischen Aufnahme des Gels repräsentiert das STAT1 α -GFP-Homodimer, der mittlere Balken repräsentiert das Heterodimer aus STAT1 α -GFP und endogenem STAT1 α und der untere Balken zeigt das endogene STAT1 α -Dimer. In der Abbildung C wurde die Luciferase-Reportergenaktivität gezeigt. U3A-Zellen, die STAT1 α^{WT} bzw. STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ exprimieren, wurden unstimuliert (grauer Balken) oder für 6 h (schwarzer Balken) mit IFN γ stimuliert, zusätzlich wurden die Reportergenaktivitäten für STAT1 α^{WT} in Gegenwart von LMB gezeigt.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Experimente und der Gelshiftexperimente zeigten, daß die Exportmutante mit der gleichen Kinetik wie STAT1 α^{WT} dephosphoryliert wird. Nicht bekannt war, welche Auswirkung eine längere Kernpräsenz von STAT1 nach der Aktivierung durch IFN γ auf die Genaktivierung hatte. In Reportergenexperimenten sollten STAT1 α^{WT} und STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ auf ihre Fähigkeit zur IFN γ -spezifischen Genaktivierung untersucht werden. Dazu wurden die cDNAs von STAT1 α^{WT} bzw. STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ zusammen mit dem Luciferase-

se-Reportergen und dem Gen für β -Galactosidase transient in U3A-Zellen kotransfiziert. Am Folgetag wurden die unstimulierten bzw. die für 6 h mit IFN γ stimulierten Zellen lysiert und die Reportergenaktivität bestimmt (siehe 2.2.6.). Der Einfluß von LMB auf die Reportergenaktivierung wurde für STAT1 α^{WT} ebenfalls untersucht. LMB wurde 1 h vor IFN γ -Stimulation auf die Zellen gegeben, und die LMB-Behandlung wurde während der gesamten Stimulationszeit aufrecht erhalten. In der Abbildung 3.12. C sind die Ergebnisse der Reportergenexperimente gezeigt. Die Daten der Genaktivierung demonstrierten, daß die längere Kernpräsenz Konsequenzen für die Reportergenaktivierung hat. Die Aktivierung von STAT1 α^{WT} durch IFN γ führte zu einer starken Erhöhung der Transaktivierung des IFN γ -responsiven Reportergens mit der dreifachen STAT1-Bindestelle im Promotor. Die Aktivierung durch IFN γ zeigte für die Exportmutante STAT1 $\alpha^{\text{LL308/312AA}}$ ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Reportergenaktivität, gegenüber den unstimulierten Zellen fiel diese jedoch geringer aus als bei STAT1 α^{WT} -exprimierenden Zellen. Gegenüber STAT1 α^{WT} wurde für STAT1 $\alpha^{\text{LL308/312AA}}$ eine ca. 30% ige Verringerung der Aktivierung des Reportergens beobachtet. Die Reportergenaktivierung von STAT1 α^{WT} wurde ebenfalls um ca. 20% verringert, wenn der CRM1-Inhibitor LMB zu den Zellen gegeben wurde. Eine Vorbehandlung der Zellen mit LMB hatte keinen Einfluß auf die basale Genaktivierung von STAT1 α^{WT} .

Die Verringerung der Genaktivierung könnte mit einer verringerten Phosphorylierung des Aminosäurerestes Serin 727 zusammenhängen. So ist bekannt, daß die Phosphorylierung von Serin 727 zu einer Erhöhung der Genaktivierung von aktiviertem STAT1 führt (Wen, Z. et al., 1995).

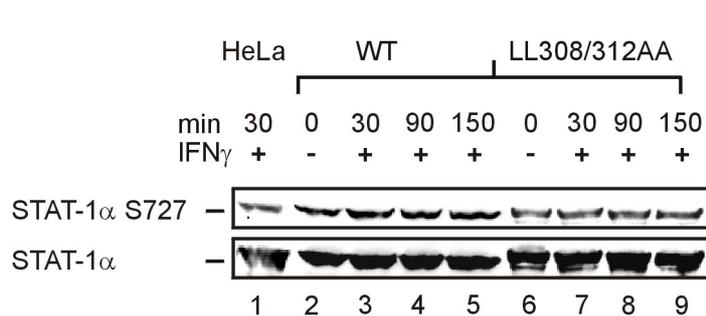


Abb. 3.13. Analyse der Phosphorylierung des Serinrestes 727 von STAT1 α ^{LL308/312AA}. Gesamtzellextrakte von STAT1 α ^{WT}- und STAT1 α ^{LL308/312AA}-exprimierenden U3A-Zellen wurden in einem Western-Blot-Experiment untersucht. In der Spur 2-5 und der Spur 6-9 wurden Proben von unstimulierten bzw. für 30 min, 90 min oder 150 min mit IFN γ stimulierten STAT1 α ^{WT}- bzw. STAT1 α ^{LL308/312AA}-exprimierenden Zellen aufgetragen und mit dem

Anti-Phospho-STAT1-Serin⁷²⁷-Antikörper untersucht. In der Spur 1 wurde HeLa-S3-Extrakt von Zellen nach einer 30-minütigen IFN γ -Stimulation aufgetragen. Der gleiche Blot wurde im unteren Teil der Abbildung nach Entfernung der gebundenen Antikörper-Komplexe mit dem Antikörper STAT1 α p91 reinkubiert.

In der Abbildung 3. 13. wird das Ergebnis eines Western-Blot-Experimentes mit Extrakten von STAT1 α ^{WT}- und STAT1 α ^{LL308/312AA}-exprimierenden U3A-Zellen gezeigt. In beiden STAT1-Proteinen ist Serin 727 konstitutiv phosphoryliert. Es konnte keine zytokinabhängige Änderung in der Serin-Phosphorylierung festgestellt werden.

3.3. Zytokinabhängiger nukleärer Import von STAT1 α

Nach heutigem Erkenntnisstand benötigt der nukleäre Import von STAT1 eine Aktivierung durch Zytokine. Nach Phosphorylierung an einem kritischen Tyrosinrest in Position 701 durch cytoplasmatische Jak-Kinasen und konsekutiver Dimerisierung unter Beteiligung der SH2-Domäne erfolgt der Transport aktivierter STAT1-Moleküle in den Kern, wo diese an spezifischen GAS-Sequenzen der DNA binden (Darnell, 1997b; Leonard, 2001). Der nukleäre Import von STAT1 ist ein essentieller Schritt für die Aktivierung von IFN γ -abhängigen Zielgenen (Schindler et al., 1995; Darnell et al., 1994). In der DNA-Bindedomäne von STAT1 wurde eine leuzinreiche Sequenz beschrieben, der eine Exportfunktion zugeschrieben wurde (McBride et al., 2000). Von den Autoren wurde postuliert, daß eine Bindung an den Exportrezeptor CRM1 nur dann erfolgen kann, wenn STAT1 von der DNA dissoziiert ist. Das vermutete Exportsignal wurde in der DNA-Bindedomäne von STAT1 α lokalisiert und umfaßt eine leuzinreiche Sequenz zwischen den Aminosäuren 400-410. Die Aminosäuren in der Position Leu⁴⁰⁰, Leu⁴⁰⁷ und Leu⁴⁰⁹ sind zwischen den einzelnen Mitgliedern der STAT-Familie stark konserviert und könnten auf eine Exportaktivität schließen lassen. In dem Bereich der DNA-Bindedomäne von STAT1 α befinden sich auch die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, die ebenfalls zwischen den Mitgliedern der STAT-Familie hoch konserviert sind und auf ein Importsignal hinweisen könnten. Aus zeitgleich in un-

serem Labor durchgeführten Vorarbeiten war bekannt, daß ein GST-STAT1-GFP-Fusionsprotein, welches zwischen den kodierenden Sequenzen von GST und GFP ein isoliertes Peptidfragment aus der DNA-Bindedomäne von STAT1 enthielt (Aminosäuresequenz 367-427), eine nukleäre Exportaktivität aufwies (Abb. 3.14).

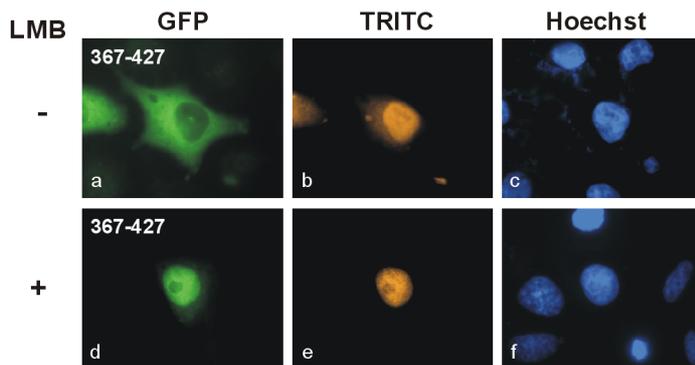


Abb. 3.14. Exportaktivität eines isolierten Peptidfragmentes der Aminosäuresequenz 367-427 aus der DNA-Bindedomäne von STAT1 α . Mikroinjektion eines aufgereinigten GST-STAT-GFP-Peptidfragmentes der Aminosäuren 367-427 aus der DNA-Bindedomäne von STAT1 α in den Zellkern von HeLa-S3-Zellen (a, d). Die Koinjektion von TRITC-gekoppeltem BSA diente als Injektionskontrolle (b, e). Die Position der korrespondierenden Zellkerne wurde durch eine Färbung mit Hoechst 33258 markiert (c, f). Die Zellen wurden ohne

LMB-Behandlung (a-c) bzw. mit LMB (d-f) für 1 h vor der Mikroinjektion behandelt und nach einer 3-stündigen Inkubation fixiert.

Nach Mikroinjektion in den Zellkern wurde ein nukleärer, Leptomycin-sensitiver Export dieses rekombinanten STAT1-Derivates beobachtet, während das zu Kontrollzwecken injizierte Markerprotein TRITC-BSA im injizierten Kompartiment verblieb (Meyer et al., 2002a). Im Kontext des Volle-Länge-Moleküls von STAT1 α aber ergab sich kein Hinweis auf eine detektierbare Exportaktivität in diesem Bereich (Abb. 3.15.). Unerwarteterweise wurde gefunden, daß Mutationen zweier kritischer Leuzine in den Positionen 407 und 409 für die zytokinvermittelte nukleäre Akkumulation von essentieller Bedeutung sind. Die beiden Doppelmutanten Leuzin 407 und 409 nach Alanin bzw. Threonin zeigten einen schwerwiegenden Akkumulationsdefekt nach Stimulation mit IFN γ (Meyer et al., 2002a). Ebenso war die Doppelmutante Lysin 410 und 413 nach Glutaminsäure nicht zu einer IFN γ -abhängigen Kernakkumulation befähigt (Melen, K. et al., 2001). Die Einzelmutante Phenylalanin 404 nach Tyrosin wies ebenso wie die Doppelmutante Arginin 405 nach Alanin und Histidin 406 nach Asparagin keinen Akkumulationsdefekt auf und zeigte eine dem Wildtyp vergleichbare Dauer der Kernlokalisation nach IFN γ -Stimulation (Meyer et al., 2002a).

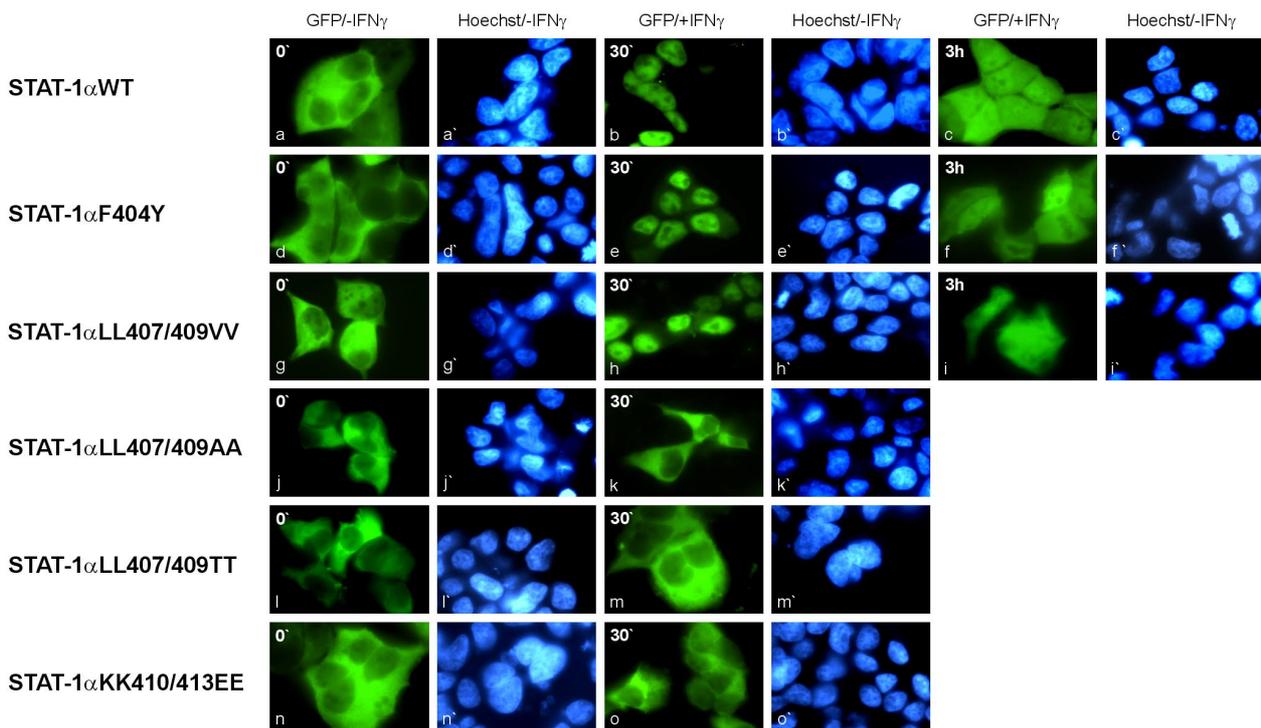
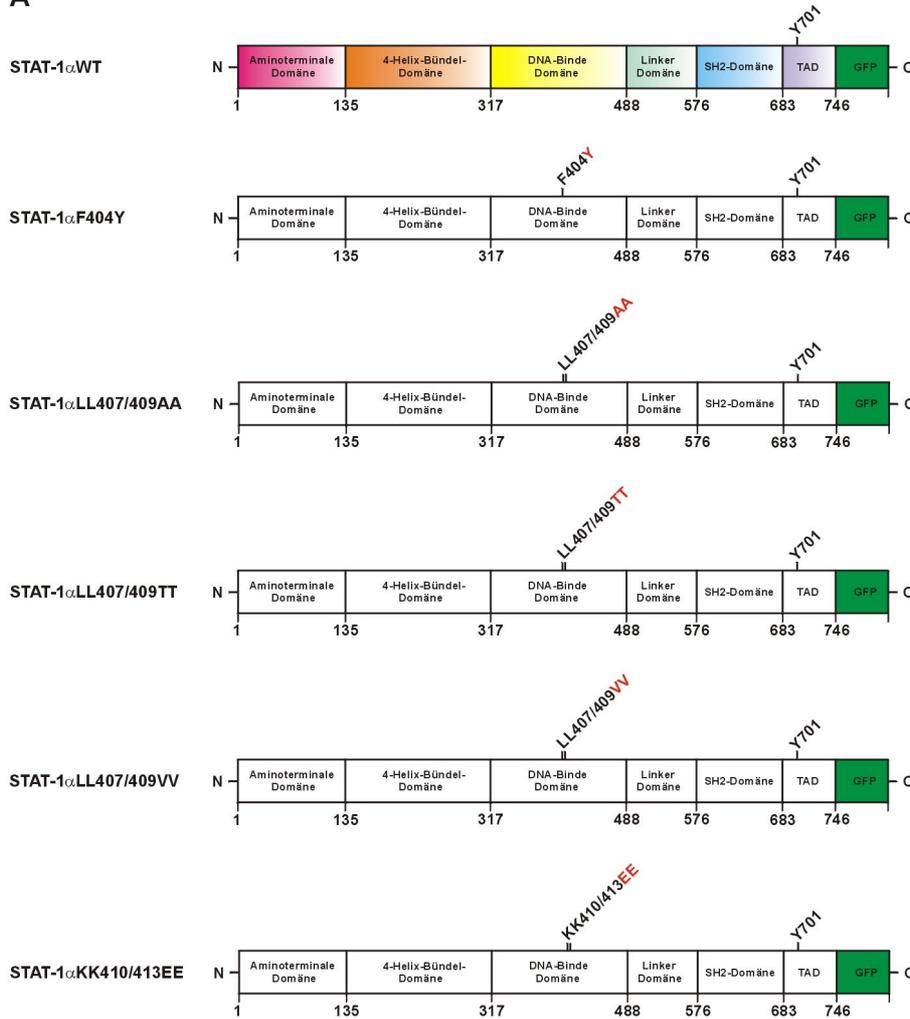


Abb. 3.15. Untersuchung des nukleären Imports von STAT1 α ^{F404Y}, STAT1 α ^{LL407/409AA}, STAT1 α ^{LL407/409TT}, STAT1 α ^{LL407/409VV} und STAT1 α ^{KK410/413EE}. Die induzierbare Kernakkumulation von STAT1 α ^{F404Y}-GFP, STAT1 α ^{LL407/409AA}-GFP, STAT1 α ^{LL407/409TT}-GFP, STAT1 α ^{LL407/409VV}-GFP und STAT1 α ^{KK410/413EE}-GFP wurde nach IFN γ -Stimulation in 293T-Zellen untersucht. Die STAT1-GFP-Fusionsproteine wurden unstimuliert oder 30 min mit IFN γ stimuliert (b, e, h, k, m und o) bzw. wie angegeben für einige der Mutanten auch für 3 h mit IFN γ behandelt (c, f und i). Korrespondierende Kernfärbungen mit Hoechst-Farbstoff sind angegeben (a' - o').

Als molekulare Ursache der fehlenden Kernakkumulation der Leuzin-Doppelmutanten wurde ein defekter Import von aktivierten STAT1 α -Dimeren identifiziert. Dieses ergab sich aus Gelshift- und Western-Blot-Experimenten, bei denen phosphoryliertes STAT1 α anders als unphosphoryliertes STAT1 α nur in cytosolischen, nicht aber in nukleären Extrakten von STAT1 α ^{LL407/409AA} exprimierenden Zellen nachgewiesen wurde. Demgegenüber konnte Phospho-STAT1 α ^{WT} auch in nukleären Extrakten sowohl in Gelshift- wie auch in Western-Blot-Experimenten detektiert werden (Meyer et al., 2002a). Dieses Ergebnis wurde als ein ausschließlich die phosphorylierte Molekülform betreffender Importdefekt von STAT1 α ^{LL407/409AA} gedeutet.

Alle im Abschnitt 2.2.6.11. beschriebenen Mutationen wurden durch Primer-spezifische Mutagenese eingeführt. Die dabei verwendeten Primerpaare wurden in der Tabelle 2.1. und die entsprechenden Konstrukte in Abbildung 3.16. aufgeführt.

A



B

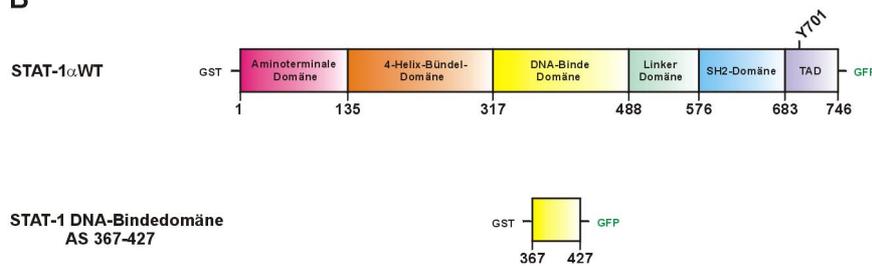


Abb. 3.16. Schema der in dieser Arbeit verwendeten Punktmutanten für die Untersuchung des Importsignals in der DNA-Bindedomäne von STAT1 α . Die Mutationen sind in der Domänenstruktur von STAT1 α rot hervorgehoben. In der Abbildung A sind die Mutationen von Phenylalanin 404 nach Alanin, Leuzin 407/409 nach Alanin, Threonin und Valin sowie Lysin 410/413 nach Glutaminsäure dargestellt. GFP ist grün am carboxyterminalen Ende von STAT1 α hervorgehoben. Die Abbildung B zeigt eine Darstellung des GST-STAT-GFP-Peptidfragments. Dieses Peptidfragment der Aminosäuresequenz 367-427 aus der DNA-Bindedomäne von STAT1 α wurde für die Mikroinjektion eingesetzt.

Das für STAT1 α nachgewiesene Dimer-spezifische Importsignal und die homologen Bereiche bei anderen Mitgliedern der STAT-Familie sind in Abbildung 3.17. wiedergegeben.

DdStat (541-572)	RNVI F I L L H E L T I Q S I Q L E T Y H E E L Q L L V R P Q
DStat (421-445)	Y Q Q N N H V F S A S F R - - N M Q L K K I K - - - - - R A E
hStat6 (349-373)	N S I P G N C C S A L F K - - N L L K K I K - - - - - R C E
hStat5a (406-429)	H Q A T G T L - S A H F R - - N M S L K R I K - - - - - R A D
hStat4 (389-416)	E S S N G S L - S V E F R - - H I Q P K E M K S S A G G K G N
hStat3 (398-426)	E S N N G S L - S A E F K - - H L T L R E Q R C G N G G R A N
hStat2 (390-418)	K G Q S Q G L - I W D F - - G Y L T L V E Q R S G G S G K G S
hStat1 (394-420)	E S T N G S L - A A E F R - - H L Q L K E Q K N A - G T R T N
F404Y	L - A A E Y R - - H L Q L K E Q K
LL407/409VV	L - A A E F R - - H V Q V K E Q K
LL407/409TT	L - A A E F R - - H T Q T K E Q K
LL407/409AA	L - A A E F R - - H A Q A K E Q K
KK410/413EE	L - A A E F R - - H L Q L E E Q E

Abb. 3.17. Beschreibung der NLS-Sequenz in der DNA-Bindedomäne von STAT1 α . Es wurden Vergleiche der Aminosäuresequenz 394-420 in der DNA-Bindedomäne von STAT-1 α mit den anderen Mitgliedern der STAT-Familie vorgenommen. Die für diese Sequenz kritischen basischen Aminosäuren wurden hellgrau und hydrophobe Reste dunkelgrau unterlegt. Im unteren Bereich der Abbildung sind die eingeführten Mutationen aufgeführt und durch fette Buchstaben hervorgehoben.

In kinetischen Untersuchungen mittel Western-Blot-Analyse ergab sich eine verlängerte Phosphorylierungsphase von STAT1 α ^{LL407/409AA} gegenüber der von STAT1 α ^{WT}. Demgegenüber zeigten sich keine Unterschiede im Phosphorylierungsausmaß von Serin 727 zwischen Mutante und Wildtyp (Abb. 3.18.).

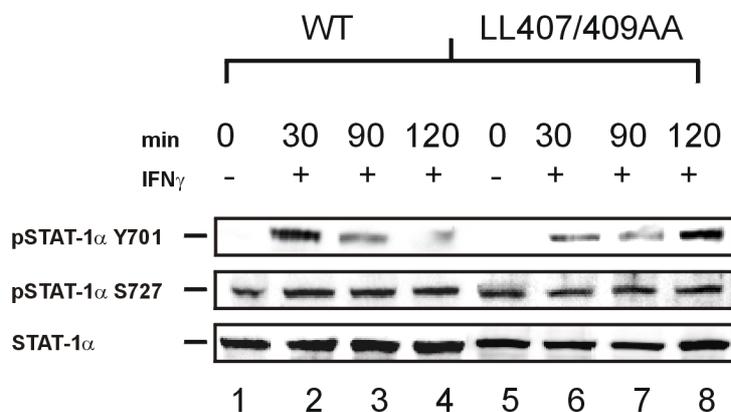


Abb. 3.18. Kinetik der Phosphorylierung von Tyrosin 701 und Serin 727 bei STAT1 α ^{WT} und STAT1 α ^{LL407/409AA}. U3A-Zellen, die STAT1 α ^{WT} und STAT1 α ^{LL407/409AA} exprimierten, wurden unbehandelt (Spur 1 und 5) oder 30 min (Spur 2 und 6), 90 min (Spur 3 und 7) bzw. 120 min (Spur 4 und 8) mit IFN γ behandelt, bevor Gesamtzell-extrakte von diesen Zellen hergestellt wurden. Die Tyrosin-Phosphorylierung wurde im oberen Blot mit dem Anti-Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-Antikörper, die Serin-Phosphorylierung im mittleren Blot mit dem Anti-Phospho-Serin⁷²⁷-Antikörper und die aufgetragene Mengen von STAT1 α mit dem Anti-STAT1 α -Antikörper p91 im unteren Blot untersucht. In der Spur 1-4 wurde STAT1 α ^{WT} und in der Spur 5-8 STAT1 α ^{LL407/409AA} aufgetragen.

phosphorylierung im mittleren Blot mit dem Anti-Phospho-Serin⁷²⁷-Antikörper und die aufgetragene Mengen von STAT1 α mit dem Anti-STAT1 α -Antikörper p91 im unteren Blot untersucht. In der Spur 1-4 wurde STAT1 α ^{WT} und in der Spur 5-8 STAT1 α ^{LL407/409AA} aufgetragen.

Die NLS-Mutante zeigte eine inhibierte Dephosphorylierung von Tyrosin 701. Dieses Ergebnis unterstreicht den nukleären Importdefekt von phosphoryliertem STAT1 α ^{LL407/409AA}, da die Dephosphorylierung nach heutigem Kenntnisstand durch die im Zellkern befindliche Tyrosin-Phosphatase TC 45 bewirkt wird (ten Hoeve et al., 2002). Die Phosphorylierung von Serin 727 wird durch die Mutation nicht beeinträchtigt.

3.4. Effekte von membranassoziertem STAT1 α

3.4.1. Immobilisierung durch carboxyterminale Kopplung von STAT1 an eine Farnesylierungssequenz

Die Transkription Interferon- γ -abhängiger Gene ist von der Bindung des aktivierten STAT1 an seine Zielsequenzen auf DNA abhängig (Darnell, 1997b; Shuai et al., 1993a). Diskrete Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne verhindern, daß STAT1 in den Zellkern gelangt (siehe 3.3.). Eine weitere Möglichkeit, den Import von STAT1-Proteinen artifiziell zu inhibieren, stellt die Addition einer Farnesylierungssequenz zur Verankerung an der Cytoplasmamembran dar. Die Farnesylierungssequenz CAAX, ein Tetrapeptid aus den Aminosäuren Cystein (C), hydrophober Aminosäuren wie Isoleuzin und Valin (A) und Serin oder Methionin (X), bindet über eine Thio-Gruppe, in einer durch das Enzym Farnesyltransferase katalysierten Reaktion, an Farnesylmoleküle in der Lipidschicht der Plasmamembran. Die Mutation des kritischen Cysteins führt zum Verlust der kovalenten Verankerung an Lipide der Plasmamembran (Leevers et al., 1994; Lerner et al., 1995).

Diese Mutante wird hier als STAT1 α^{AAAX} bezeichnet. Die für die Farnesylierungssequenz CAAX kodierende cDNA, ein Geschenk von Gary M. Bokoch, The Scripps Research Institut, La Jolla, wurde an das carboxyterminale Ende von STAT1 α^{WT} gekoppelt (siehe 2.2.5.11.). In die cDNA-Sequenz von CAAX wurde durch Mutagenese das Kodon für die Aminosäure Cystein gegen das für Alanin ausgetauscht (siehe 2.2.5.12.). Das für AAAX kodierende Fragment wurde an den C-Terminus der cDNA von STAT1 α^{WT} gekoppelt und ebenfalls in dem Vektor pCMV6M kloniert (Daniels et al., 1998). Die verwendeten Primer und die Klonierung wurden im Abschnitt 2.2.5.11. sowie in Tabelle 2.1. näher erläutert. Die STAT1 α^{CAAX} - und STAT1 α^{AAAX} -Mutanten und die Farnesylierungssequenz CAAX sind in der Abbildung 3.19. dargestellt.

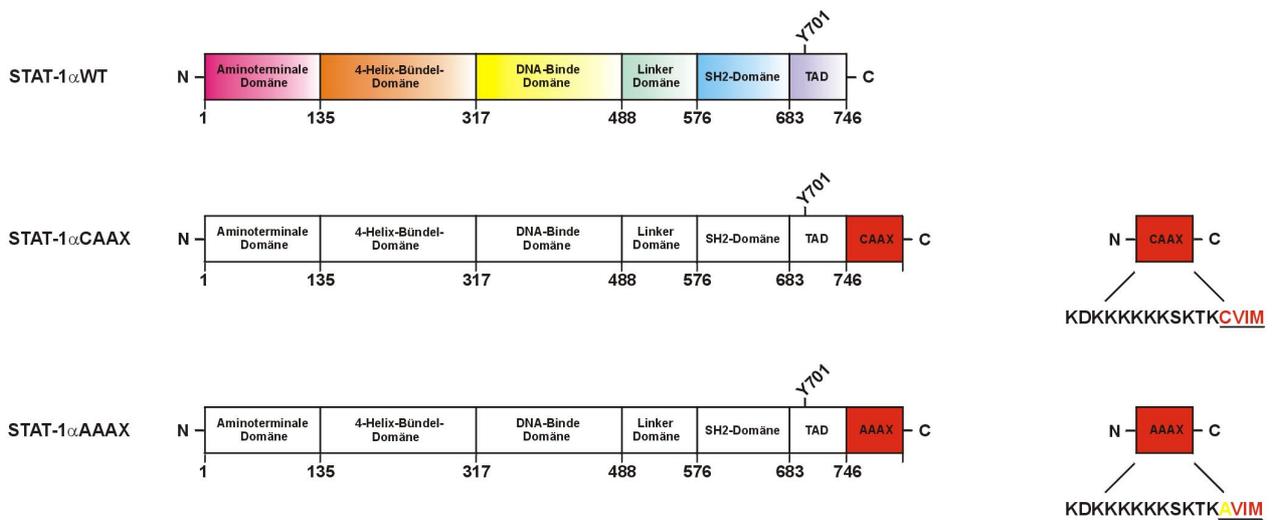


Abb. 3.19. Darstellung von STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAAX}. Die Farnesylierungssequenz CAAX sowie die Mutation der Aminosäure Cystein nach Alanin in dieser Sequenz (AAAX) wurden an den C-Terminus von STAT1 α gekoppelt. Die Mutation der Farnesylierungssequenz wurde in der rechten Abbildung gezeigt, die unterstrichenen Aminosäuren gehören zu der Farnesylierungssequenz CAAX. Die Mutation des Cysteins gegen Alanin wurde gelb hervorgehoben und die Aminosäuren der Farnesylierungssequenzen rot dargestellt.

3.4.2. Charakterisierung von STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAAX}

In STAT1-defizienten U3A-Zellen wurde untersucht, ob STAT1 α ^{CAAX} tatsächlich an der Plasmamembran der Zellen verankert wurde und welchen Einfluß eine IFN γ -Stimulation auf die Translokation dieser Mutante hatte. Fernerhin wurde bestimmt, ob mit der Mutation von Cystein zu Alanin in der CAAX-Bindesequenz ein Verlust der Membranverankerung einhergeht. Dazu wurden U3A-Zellen mit der cDNA von STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{AAAX} und STAT1 α ^{CAAX} transient transfiziert und nachfolgend für unterschiedliche Zeiträume mit IFN γ stimuliert. Die fixierten Zellen wurden dann mit dem Antikörper hSTAT1 α p91 (C24) und mit Cy3-gekoppeltem Ziegenanti-Kaninchen-Immunglobulin inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Kontrolle dienten 2fTGH-Zellen, die endogenes STAT1 exprimieren.

Es wurde ein normaler, dem Wildtyp vergleichbarer Kernimport von STAT1 α ^{AAAX} nach 30-minütiger IFN γ -Behandlung registriert. Demgegenüber war STAT1 α ^{CAAX} nach einer 30-minütigen IFN γ -Stimulation weiterhin an der Plasmamembran der Zellen lokalisiert. Drei Stunden nach IFN γ -Zugabe befanden sich STAT1 α ^{WT} und STAT1 α ^{AAAX} zu einem großen Teil wieder im Cytosol. STAT1 α ^{CAAX} mit der intakten Farnesylierungssequenz befand sich auch nach 3 h an

der Plasmamembran. Der Import von STAT1 α^{CAAX} in den Zellkern wurde nach einer IFN γ -Stimulation vollständig unterdrückt. Nach einer IFN γ -Stimulation über 30 min wurde das endogene STAT1 im Zellkern der 2fTGH-Zellen akkumuliert, und nach 3 h befand sich ein großer Teil wieder im Cytosol. Die reversible Kernakkumulation von STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{AAAX} und dem endogenen STAT1 verlief damit gleichartig, während STAT1 α^{CAAX} in der Plasmamembran retiniert wird (Abb. 3.20.).

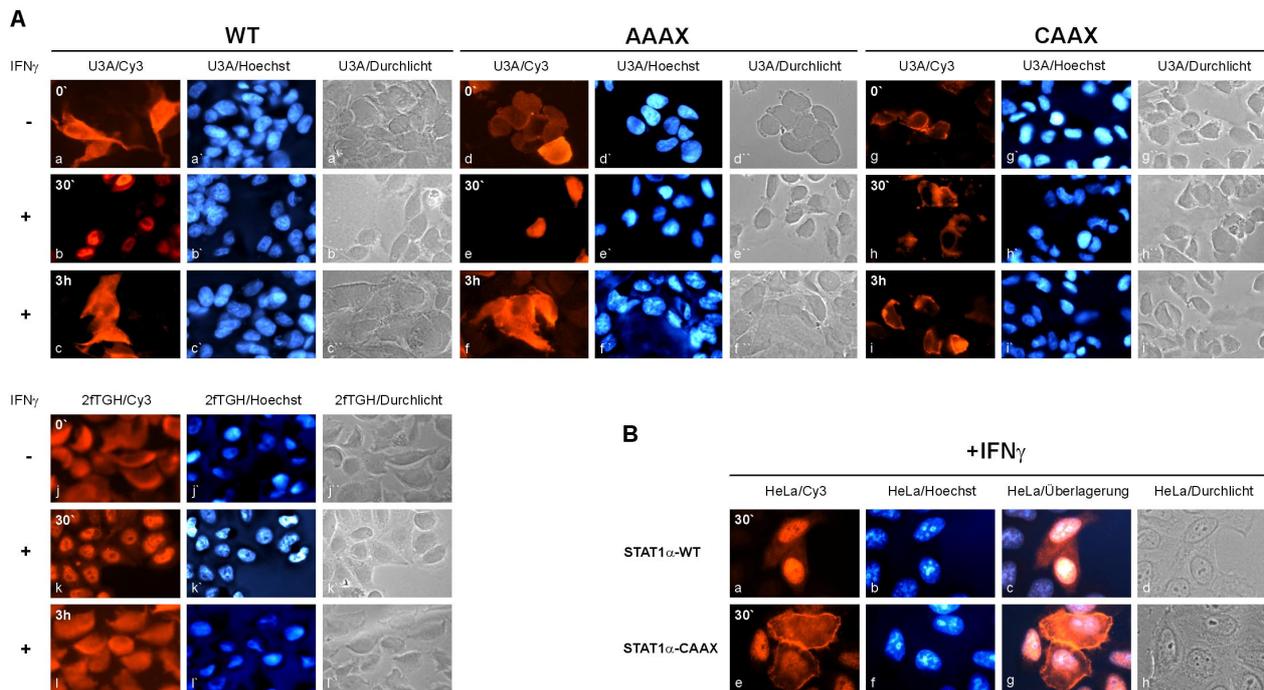


Abb. 3.20. Untersuchung der IFN γ -abhängigen nukleocytoplasmatischen Verteilung von STAT1 α^{CAAX} und STAT1 α^{AAAX} . In Abbildung A wurde die subzelluläre Lokalisation von STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{CAAX} und STAT1 α^{AAAX} vor und nach IFN γ -Stimulation in U3A-Zellen und für endogenes STAT1 α in 2fTGH-Zellen untersucht. Die Aufnahmen zeigen die Fluoreszenzsignale von Immunfärbungen für STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} in unstimulierten Zellen (a, d, g, und j) und in für 30 min (b, e, h und k) bzw. 3 h (c, f, i und l) mit IFN γ behandelten Zellen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 (a''-l'') gefärbt, und Phasenkontrastaufnahmen wurden angefertigt (a''-l''). In der Abbildung B sind STAT1 α^{WT} - und STAT1 α^{CAAX} -exprimierende, IFN γ -stimulierte (30 min) HeLa-S3-Zellen mit den entsprechenden Kernfärbungen und Durchlichtaufnahmen gezeigt.

In der Abbildung 3.20. B ist die STAT1-Lokalisation in STAT1 α^{WT} - und STAT1 α^{CAAX} -überexprimierenden HeLa-S3-Zellen nach 30-minütiger IFN γ -Stimulation gezeigt. Die Überexpression von STAT1 α^{WT} und STAT1 α^{CAAX} in HeLa-S3-Zellen bestätigte die fehlende Kernakkumulation der membranverankerten STAT1-Mutante. Trotz 30-minütiger IFN γ -Behandlung befand sich ein Großteil der zellulären STAT-Immunreaktivität an der Plasmamembran immobi-

liert. Hierbei handelte es sich vermutlich um die CAAX-Mutante und nur ein sehr geringer Anteil war im Kernkompartiment lokalisiert. In STAT1 α^{WT} -exprimierenden HeLa-S3-Zellen war sämtliche zelluläre STAT1-Positivität im Zellkern detektierbar. Das bedeutet, daß STAT1 α^{CAAX} hauptsächlich an der Plasmamembran fixiert vorliegt und durch IFN γ -Stimulation nicht in detektierbaren Mengen in den Kern transloziert wird.

Durch Fraktionierungsexperimente sollten die Anteile von STAT1 α^{CAAX} , STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{WT} ermittelt werden, die in der löslichen Phase oder in Membran-gebundener Form vorliegen. Von U3A-Zellen, die STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} exprimierten, wurde eine Membranextraktion angefertigt (siehe 2.2.9.4.). Die lösliche Fraktion und die mit dem Detergenz Triton-X100 gelöste Membranfraktion wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine anschließend auf eine Blot-Membran übertragen. In Western-Blot-Experimenten wurden die lösliche Fraktion und die Membranfraktion mit dem Antikörper hSTAT1 α p91 (C24) und dem polyklonalen Antikörper hEGFR (1005) gegen den Rezeptor von EGF (EGFR) untersucht. Dieser Rezeptor wird ausschließlich in der Plasmamembran der Zellen exprimiert und diente als Kontrolle für die Reinheit der Extraktionsbedingungen. Abbildung 3.21. A demonstriert, daß in der löslichen Fraktion kein STAT1 α^{CAAX} nachgewiesen werden konnte. Die gesamte Menge von STAT1 α^{CAAX} wurde in der Membranfraktion sedimentiert. Der überwiegende Anteil von STAT1 α^{WT} befand sich demgegenüber in der löslichen Fraktion, jedoch konnte auch in der membranassoziierten Fraktion STAT1 α^{WT} nachgewiesen werden. Auch das endogene STAT1 in HeLa-S3-Zellen wurde in der löslichen und membranassoziierten Fraktion detektiert. STAT1 α^{AAAX} wurde sowohl in der löslichen wie auch in der Membranfraktion nachgewiesen, dabei fanden sich große Mengen in der Membranfraktion. Dieses Ergebnis zeigt, daß STAT1 α^{CAAX} ausschließlich an der Plasmamembran gebunden vorliegt und unterstreicht damit die Resultate aus den immuncytochemischen Versuchen zur zellulären Verteilung von STAT1 α^{CAAX} . Durch die Mutation von Cystein nach Alanin in der Farnesylierungssequenz CAAX konnte die kovalente Bindung mit der Plasmamembran aufgehoben werden. Jedoch führt wahrscheinlich der Rest der Farnesylierungssequenz in Membrannähe zu einer stärkeren Lokalisation von STAT1 α^{AAAX} an der Plasmamembran.

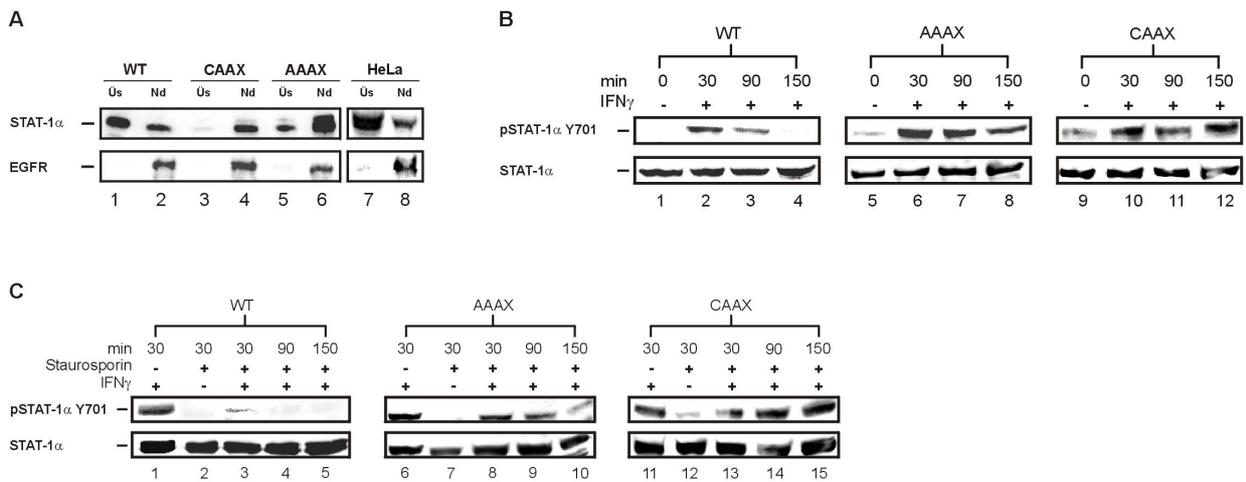


Abb. 3.21. Membranlokalisierung und Hyperphosphorylierung von STAT1 α ^{CAAX}. In der Abbildung A wurden Membranextrakte von STAT1 α ^{WT}-, STAT1 α ^{AAXX}- und STAT1 α ^{CAAX}-exprimierenden U3A-Zellen in einem Western-Blot-Experiment untersucht. In der Spur 1, 3 und 5 wurden lösliche Fraktionen (Üs) und in der Spur 2, 4 und 6 die Membranfraktionen (Nd) von STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{CAAX} bzw. STAT1 α ^{AAXX} aufgetrennt. Zusätzlich wurden die lösliche Fraktion (Spur 7) und die Membranfraktion (Spur 8) von untransfizierten HaLa-S3-Zellen auf STAT1-Präsenz untersucht. Die Membranen wurden mit dem Antikörper hSTAT1 α p91 im oberen Blot und dem Antikörper hEGFR (1005) im unteren Blot inkubiert. In der Abbildung B wurden die Phosphorylierungskinetiken von Tyrosin 701 in einem Western-Blot-Experiment für STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{AAXX} und STAT1 α ^{CAAX} in transient transfizierte U3A-Zellen untersucht. Es wurden STAT1 α ^{WT}-enthaltende Extrakte in der Spur 1-4, Extrakte mit STAT1 α ^{AAXX} in der Spur 5-8 und solche mit STAT1 α ^{CAAX} in der Spur 9-12 vor und nach IFN γ -Stimulation für 30 min, 90 min und 150 min aufgetragen. Die Phosphorylierung wurde mit dem Anti-Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-Antikörper im oberen Blot gezeigt und mit dem hSTAT1 α p91-Antikörper im unteren Blot untersucht. In der Abbildung C wurde die Dephosphorylierung von Tyrosin 701 in einem Western-Blot-Experiment untersucht. Die mit den angegebenen STAT1-Konstrukten transfizierten U3A-Zellen wurden für 30 min mit IFN γ stimuliert (Spur 1, 6 und 11). Nach 30 min wurden die Zellen gewaschen und für 30 min, 90 min und 150 min mit 500 nM Staurosporin behandelt (Spur 3-5, 8-10 und 13-15). Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit Staurosporin behandelt (Spur 2, 7 und 12). Das Western-Blot-Experiment wurde wie in der Abbildung B mit den Antikörpern Anti-Phospho-STAT1-Tyrosin⁷⁰¹ (oben) und Anti-hSTAT1 α p91 (unten) untersucht.

Im weiteren sollte untersucht werden, ob STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAXX} in der gleichen Weise wie STAT1 α ^{WT} durch die Jak-Kinasen am Tyrosinrest 701 phosphoryliert werden. Zur Untersuchung der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung wurden U3A-Zellen mit cDNAs, die für STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{AAXX} und STAT1 α ^{CAAX} kodierten, transfiziert. Die Zellen wurden unstimuliert bzw. für 30, 90 oder 150 min mit IFN γ stimuliert. In der Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten wurde der spezifische Anti-Phospho-STAT1-Tyrosin⁷⁰¹-Antikörper verwendet. Für die Überprüfung der aufgetragenen Menge von STAT1 wurde der polyklonale Antikörper hSTAT1 α p91 benutzt (Abb. 3.21. B). Nach 30 min wurde der überwiegende Anteil von STAT1 α ^{WT} phosphoryliert, und das Phosphorylierungsniveau ging danach rasch wieder zurück. Nach 150 min IFN γ -Stimulation konnte keine Tyrosin-Phosphorylierung für STAT1 α ^{WT} mehr

festgestellt werden. Die Insertion der Farnesylierungssequenz an das carboxyterminale Ende von STAT1 α führte zu einer Erhöhung des Phosphorylierungssignals in IFN γ -stimulierten Zellen und persistierte für STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} über mindestens 150 min. STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} waren im Gegensatz zu STAT1 α^{WT} auch im unstimulierten Zustand schwach tyrosin-phosphoryliert, jedoch wurde das Ausmaß der Phosphorylierung durch IFN γ -Stimulation deutlich erhöht. Das prolongierte Phosphorylierungssignal von STAT1 α^{CAAX} resultierte wahrscheinlich aus der Unfähigkeit dieser membranständigen Mutante, in den Zellkern zu gelangen und dort von der nukleären Phosphatase dephosphoryliert zu werden.

In der Abbildung 3.21. C wurde die Dephosphorylierung der STAT1-Mutanten unter Staurosporin untersucht. U3A-Zellen wurden nach 30-minütiger Prästimulation mit IFN γ gewaschen und für verschiedene Zeiträume (Abb. 3.21. C) mit Staurosporin behandelt. Für alle drei STAT1 α -Derivate konnte eine starke Tyrosin-Phosphorylierung beobachtet werden, wenn kein Staurosporin zugegen war. Die basale Phosphorylierung von Tyrosin 701 wurde durch Staurosporin für STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} nahezu vollständig reduziert. Doch persistierte in IFN γ -prästimulierten Zellen nach 30 min trotz Staurosporinbehandlung eine deutliche Tyrosin-Phosphorylierung bei den Mutanten STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} . Für STAT1 α^{WT} konnte nach einer 30-minütigen Staurosporinbehandlung nur noch ein geringes Phosphorylierungssignal beobachtet werden. Eine Phosphorylierung von Tyrosin 701 wurde bei STAT1 α^{WT} nach 90 min Inkubation mit Staurosporin im Western-Blot nicht mehr nachgewiesen. Die Phosphorylierungsbande war für STAT1 α^{AAAX} nach 150 min Staurosporinbehandlung nur noch schwach detektierbar. STAT1 α^{CAAX} zeigte eine deutlich verlängerte Phosphorylierungsrate, über 150 min war diese Mutante resistent gegenüber den inhibitorischen Effekten von Staurosporin. Dieses Ergebnis bestätigte, daß die STAT1-spezifische Phosphataseaktivität präferentiell im Zellkern lokalisiert ist (Shuai et al., 1996; ten Hoeve et al., 2002).

Zur weiteren Charakterisierung der Funktionalität von STAT1 α^{CAAX} und STAT1 α^{AAAX} wurde die Phosphorylierung von Serin 727 untersucht. Die gleichen Zellextrakte, die zuvor für die Untersuchung der Phosphorylierung von Tyrosin 701 von STAT1 α verwendet wurden (Abb. 3.22. B), wurden in einem weiteren Western-Blot-Experiment mit Phospho-Serin⁷²⁷-spezifischem Antikörper und als Kontrolle mit dem hSTAT1 α p91-Antikörper untersucht.

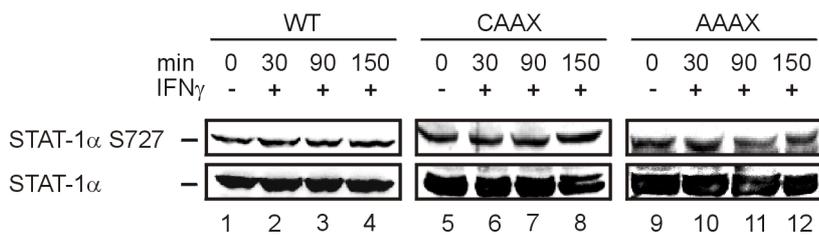


Abb. 3. 22. Serin-Phosphorylierung von STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAAX}. Gesamtzellextrakte aus U3A-Zellen, die STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{AAAX} und STAT1 α ^{CAAX} exprimierten, wurden in einem Western-Blot-Experiment untersucht. Extrakte von unstimulierten sowie mit IFN γ für 30 min, 90 min oder

150 min stimulierten Zellen wurden aufgetragen. Die Membranen wurden mit dem Anti-Phospho-Serin⁷²⁷- (oben) und dem hSTAT1 α p91-Antikörper (unten) inkubiert. In der Spur 1-4 wurden Extrakte von STAT1 α ^{WT}-, in der Spur 5-8 von STAT1 α ^{CAAX}- und in der Spur 9-12 von STAT1 α ^{AAAX}-exprimierenden Zellen aufgetragen.

In der Abbildung 3.22. ist zu erkennen, daß es keinen Unterschied in der Phosphorylierung von Serin 727 zwischen STAT1 α ^{WT} und den Lokalisierungsmutanten STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAAX} gab. Die drei STAT1-Derivate lagen bereits konstitutiv am Serin 727 phosphoryliert vor und änderten sich nicht in ihren Ausmaß in Abhängigkeit von der Zytokinstimulation. Die Phosphorylierung von Serin 727 von STAT1 α wurde nicht durch eine Verankerung an der Plasmamembran gestört, STAT1 α ^{CAAX} zeigte das gleiche Niveau der Phosphorylierung von Serin 727 wie der Wildtyp.

3.5. IFN γ -abhängige Genaktivierung und Translokation von STAT1

3.5.1. Untersuchung der Genaktivierung von STAT1 α ^{LL407/409TT}, STAT1 α ^{AAAX} und STAT1 α ^{CAAX}

Von den Mutanten STAT1 α ^{LL407/409TT} und STAT1 α ^{LL407/409AA} ist bereits gezeigt worden, daß der Import in den Zellkern komplett unterdrückt wird (Abb. 3.15.). STAT1 α ^{LL407/409TT} wurde in einem Reporterexperiment mit einem IFN γ -abhängigen Luziferase-Reporter in U3A-Zellen kotransfiziert. 24 Stunden später wurden unstimulierte Zellen und 6 h lang mit IFN γ stimulierte Zellen lysiert und in den Extrakten die Luziferaseaktivität bestimmt (siehe 2.2.6.). Für eine statistische Auswertung wurden jeweils 6 identische Experimente durchgeführt.

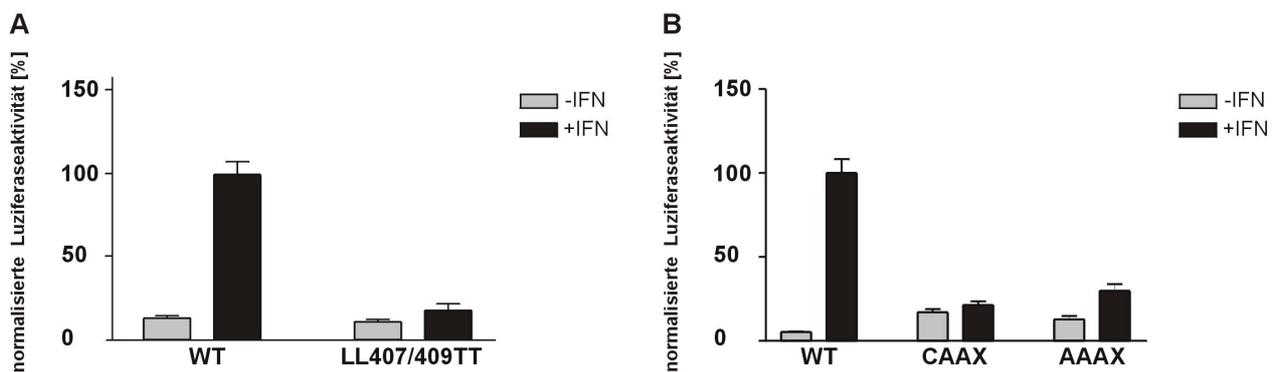


Abb. 3.23. IFN γ -abhängige Reporteraktivität von STAT1 α^{CAAX} , STAT1 α^{AAAX} und STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$. U3A-Zellen wurden mit dem IFN γ -abhängigen Luziferase-Reporter, einem konstitutiv exprimiertem β -Galaktosidase-reporter und den STAT1-kodierenden Plasmiden STAT1 α^{WT} , STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$, STAT1 α^{CAAX} oder STAT1 α^{AAAX} kotransfiziert. In Abbildung A ist die IFN γ -abhängige Aktivierung des Luziferase-Reporters für STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$ und STAT1 α^{WT} gezeigt. In der Abbildung B wurden die IFN γ -abhängigen Luziferase-Reporteraktivitäten für STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{CAAX} und STAT1 α^{AAAX} dargestellt. Die grauen Säulen zeigen die auf das Niveau der β -Galaktosidaseexpression normierten Reporteraktivitäten für unstimulierte Zellen und die schwarzen Säulen die normierten Reporteraktivitäten nach einer IFN γ -Stimulation von 6 h.

Die Abbildung 3.23. A zeigt deutlich, daß es nach einer IFN γ -Stimulation von STAT1 α^{WT} zu einer starken Aktivierung des IFN γ -abhängigen Reporters kommt (vergleiche auch Abb. 3.10.). Eine Aktivierung des IFN γ -abhängigen Reporters wurde durch STAT1 $\alpha^{LL407/409TT}$ nicht erreicht. Das Ergebnis ließ die Vermutung zu, daß die Suppression des nukleären Imports von aktiviertem STAT1 zu einer vollständigen Unterdrückung der IFN γ -abhängigen Zielgenaktivierung führt.

In weiteren Reporterexperimenten wurden U3A-Zellen mit den kodierenden Plasmiden von STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} und dem IFN γ -abhängigen Luziferase-Reporter kotransfiziert. Die Bestimmung der auf die β -Galaktosidaseexpression normierten Luziferaseaktivitäten in der Abbildung 3.23. B zeigt nach einer IFN γ -Stimulation für den Wildtyp von STAT1 α erneut eine starke Aktivierung des Reporters durch STAT1 α^{WT} . Für STAT1 α^{CAAX} konnte eine leicht erhöhte basale Aktivität beobachtet werden. Die Aktivierung des IFN γ -abhängigen Reporters wurde durch STAT1 α^{CAAX} vollständig unterdrückt. STAT1 α^{AAAX} zeigte ebenfalls eine Erhöhung der basalen Aktivität und eine stark verminderte Aktivierung der Reporteraktivität nach IFN γ -Stimulation. Die Ergebnisse machten deutlich, daß ein nukleärer Import von STAT1 notwendig ist, damit es zu einer IFN γ -abhängigen Genaktivierung durch STAT1 kommt.

3.5.2. Nukleärer Import und IFN γ -abhängige Zielgenaktivierung von STAT1 α

Die Homodimerisierung und Aktivierung von STAT1 führt zu einer Induktion IFN γ -abhängiger Zielgene, die in der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen (Darnell, 1997b; Levy und Darnell, 2002). Mehr als 200 Gene werden nach der Stimulation mit IFN γ aktiviert (Ramana et al, 2000a; Ramana et al., 2000b). In dieser Arbeit wurde eine Auswahl von diesen Genen mittels RT-PCR in stabil transfizierten U3A-Zellen analysiert, dazu zählten TAP-1, GBP-1, IP-10, IRF-9 und MIG-1. Das Haushaltsgen GAPDH wurde als Kontrolle mitbestimmt, und das STAT1-Gen diente der Bestimmung der Transfektionseffizienz. Die für die RT-PCR verwendeten Primerpaare, die Hybridisierungstemperaturen, Zyklenzahlen und Längen der erwarteten Genprodukte sind in Tabelle 3.2. aufgelistet.

Gene Gen-Bank-Nummer	Primerpaar	Hybridisierungstemperatur in °C	Zyklusanzahl	Länge des Genprodukts in bp
MIG-1 XM_011141	(V) 5'-TGGTGTCTTTTCCTCTTGGGCATCATC-3' (R) 5'-CTCGCAGGAAGGGCTTGGGGCA-3'	64	32	166
IRF-9 BC035716	(V) 5'-AGGGGGCCAGTGGGGGAGCAGT-3' (R) 5'-GGCCCTGAAAGTACCTGACCAAGT-3'	58	40	519
GBP-1 M55542	(V) 5'-TCGCCCTGGCCGTCCTCCTGAG-3' (R) 5'-CGGGGTCCAGCTCTTCATCTTGTAGT-3'	58	32	435
TAP-1 X57522	(V) 5'-GCCCTTCCCAATATGAGCACC-3' (R) 5'-ACCGCTCAGGGCTTTCGTACAG-3'	54	32	374
IP-10 X02530	(V) 5'-TGCATTCTGATTTGCTGCCTTATCTTT-3' (R) 5'-ATTCTTGATGGCCTTCGATTCTGGATTTC-3'	60	32	241
STAT-1 NM_007315	(V) 5'-CAGTCTCAACTTCACAGTG-3' (R) 5'-GTTCCACCAGCTTTATGATGACAG-3'	52	25	1000
GAPDH BC026907	(V) 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' (R) 5'-TGAATTTGCCATGGGTG-3'	60	25	189

Tab. 3.2. Reaktionsbedingungen, Primerpaare und Genprodukte der IFN γ -abhängigen Genaktivierung durch STAT1 α . In der Tabelle wurden die Primerpaare in der Spalte 2 für die (V) Vorwärts-Primer und (R) Rückwärts-Primer angegeben, die zur Untersuchung der IFN γ -abhängigen Gene von STAT1 α verwendet wurden. Für die einzelnen Gene (mit Genbank-Nummer) wurden die Hybridisierungstemperaturen, Anzahl der Zyklen und die Länge der gewonnenen Genprodukte aufgelistet.

Ziel dieser Experimente war es, den Einfluß der nukleocytoplasmatischen Translokation auf die IFN γ -abhängige Zielgenaktivierung von STAT1 zu untersuchen. Es wurden U3A-Zellen eingesetzt, in denen STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{LL308/312AA} oder STAT1 α ^{LL407/409AA} durch Transfektion stabil exprimiert wurde. Aus den Zellen wurde die gesamte RNA isoliert (siehe 2.2.5.14.) und durch reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben (siehe 2.2.5.16.). Nach der RT-PCR wurden die Reaktionsprodukte auf einem Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen und analysiert. Eine Ak-

tivierung der Gene MIG-1, IRF-9, GBP-1, TAP-1 und IP-10 durch STAT1 α ^{WT} infolge der IFN γ -Stimulation konnte deutlich beobachtet werden (Abb. 3.24.).

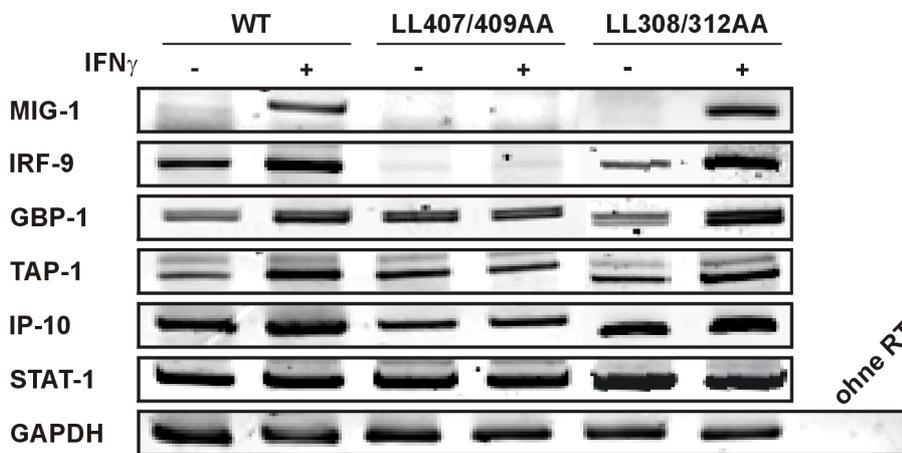


Abb. 3.24. IFN γ -abhängige Genaktivierung von STAT1 α ^{LL308/312AA} und STAT1 α ^{LL407/409AA}. Die isolierte RNA aus U3A-Zellen mit stabil integrierten STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{LL407/409AA} oder STAT1 α ^{LL308/312AA} wurde in einer RT-PCR untersucht. In einem 4-20% Polyacrylamid-Gradientengel wurden die IFN γ -abhängigen Reaktionsprodukte für MIG-1, IRF-9, GBP-1, TAP-1 und IP-10 aus Extrakten von unstimulierten und für 4 h

mit IFN γ stimulierten Zellen aufgetragen. Als Kontrolle für die RT-PCR wurden Sequenzen des GAPDH- und STAT1-Gens amplifiziert. Als Kontrolle für die RNA-Isolation wurde die RNA von STAT1 α ^{WT} ohne den Zusatz von reverser Transkriptase für das Gen STAT1 gezeigt (ohne RT).

Ein dem Wildtyp vergleichbares Aktivierungsmuster konnte für die IFN γ -abhängige Genaktivierung durch die Mutante STAT1 α ^{LL308/312AA} beobachtet werden, bei der das Exportsignal im 4-Helix-Bündel mutiert wurde. Dagegen führte die Mutation des Dimer-spezifischen Importsignals bei STAT1 α ^{LL407/409AA} zu einer kompletten Unterdrückung der Zielgenaktivierung nach IFN γ -Stimulation. Für die Gene GBP-1, TAP-1 und IP-10 konnte noch eine basale Aktivität registriert werden, jedoch fand keine Aktivierung dieser Gene durch die Importmutante statt. In allen Zellen wurde STAT1 α und GAPDH in einer vergleichbaren Menge exprimiert, und es konnte keine Verunreinigung durch die genomische DNA festgestellt werden. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Reportergenexperimenten und machten deutlich, daß ein inhibierter Kernimport von STAT1 zu einem Verlust der Genaktivierung IFN γ -abhängiger Zielgene führt.

In einer weiteren RT-PCR wurde untersucht, ob STAT1 α ^{CAAX} zu einer IFN γ -abhängigen Genantwort in der Lage ist. Für dieses Experiment wurden U3A-Zellen transient mit STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAAX} transfiziert, und nach 24 h wurden von gleichen Zellzahlen RNA-Transkripte durch RT-PCR untersucht.

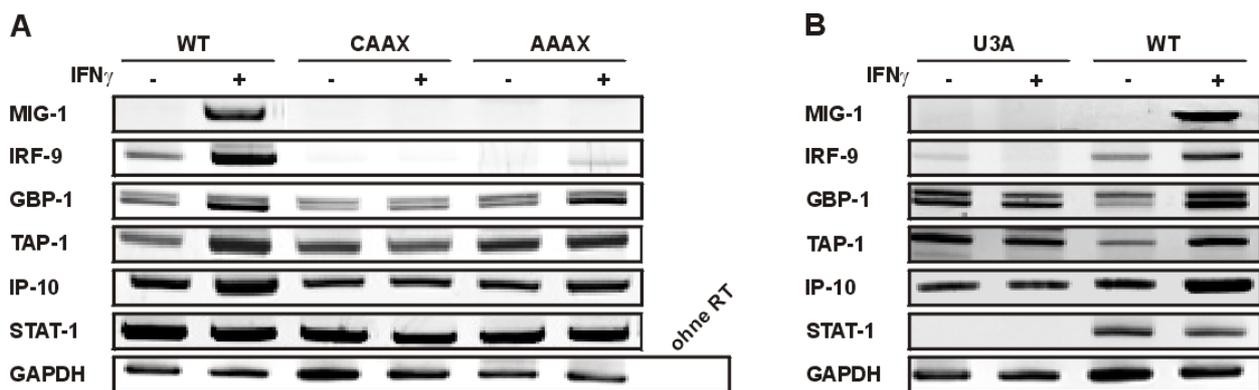


Abb. 3.25. Zytokininduzierte Genaktivierung von STAT1 α^{CAAX} und STAT1 α^{AAAX} . In Abbildung A wurde RNA aus U3A-Zellen mit transient exprimiertem STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{CAAX} und STAT1 α^{AAAX} in einer RT-PCR untersucht. In einem 4-20% Polyacrylamid-Gradientengel wurden die IFN γ -abhängigen Reaktionsprodukte von MIG-1, IRF-9, GBP-1, TAP-1 und IP-10 aus Extrakten von unstimulierten und IFN γ stimulierten (4 h) aufgetragen. Als Kontrolle für die RT-PCR wurden die Gene GAPDH und STAT1 im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Als Kontrolle wurde die RNA von STAT1 α^{WT} ohne den Zusatz von reverser Transkriptase für das Gen STAT1 gezeigt (ohne RT). In Abbildung B wurde RNA aus STAT1-negativen U3A-Zellen und transient STAT1 α^{WT} -exprimierenden U3A-Zellen für die identischen Gene wie in der Abbildung A untersucht.

Eine zytokininduzierbare Zielgenaktivierung von STAT1 α^{CAAX} unterblieb vollständig (Abb. 3.25. A). Da STAT1 α^{CAAX} an der Plasmamembran verankert ist, konnte dieses STAT1 α -Derivat nach einer IFN γ -Stimulation nicht mehr in den Zellkern importiert werden. Die basale Expressionsrate für die Gene GBP-1, TAP-1 und IP-10 konnte durch STAT1 α^{CAAX} nicht mehr gesteigert werden. Auch STAT1 α^{AAAX} zeigte eine stark verringerte Zielgenaktivierung nach Stimulation mit IFN γ für die Gene IRF-9, GBP-1, TAP-1 und IP-10. Die Aktivierung des MIG-1-Gens unterblieb, wenn STAT1 α^{AAAX} mit IFN γ stimuliert wurde. Die exprimierte Menge der mRNA von STAT1 und GAPDH war in allen Zellen identisch. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß STAT1 in den Zellkern gelangen muß, damit eine IFN γ -abhängige Zielgenaktivierung eingeleitet wird. STAT1 α^{AAAX} hatte in dieser Hinsicht einen partiellen Defekt und glich im Expressionsverhalten mehr STAT1-defizienten U3A-Zellen als STAT1 α^{WT} -exprimierenden Zellen. Auffällig war auch, daß der supprimierende Effekt unphosphorylierter STAT1 α^{WT} -Moleküle auf die TAP-1-Expression für STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{CAAX} in gleicher Weise nicht beobachtet wurde.

Stabil STAT1 α^{WT} -, STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ - oder STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$ -exprimierende sowie transient STAT1 α^{AAAX} - und STAT1 α^{CAAX} -exprimierende U3A-Zellen wurden weiterhin auf ihre Tyrosin-Phosphorylierung untersucht. Gesamtzellextrakte von unbehandelten und 45 min mit IFN γ sti-

mulierten U3A-Zellen wurden im Western-Blot-Experiment analysiert. Es wurde mit Anti-Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-Antikörper und nachfolgend mit POD-Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperkomplexe wurde die Membran mit polyklonalem hSTAT1 α p91-Antikörper zur Kontrolle des STAT1-Expressionsniveaus reinkubiert.

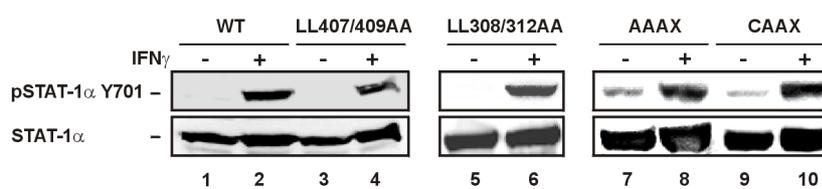


Abb. 3.26. Ausmaß der Tyrosin-Phosphorylierung von diversen STAT1-Lokalisationsmutanten. In einem Western-Blot-Experiment wurden die Extrakte der U3A-Zellen, die auch in der RT-PCR eingesetzt wurden, hinsichtlich der

Tyrosin-Phosphorylierung und Expressionsrate analysiert. In der oberen Reihe wurde der Anti-Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-Antikörper eingesetzt und im unteren Blot mit den hSTAT1 α p91-Antikörper inkubiert.

Das Western-Blot-Experiment in der Abbildung 3.26. zeigte deutlich, daß die stabil bzw. transient transfizierten U3A-Zellen aus den Proben für die RT-PCR-Versuche vergleichbar STAT1 α exprimiert hatten, und daß die Tyrosin-Phosphorylierung nach IFN γ -Stimulation in allen STAT1 α -Derivaten gewährleistet war.

3.6. Basale Translokation von STAT1 und IFN γ -unabhängige Genaktivierung

3.6.1. Analyse der IFN γ -unabhängigen Genaktivierung durch STAT1 α

Die Apoptose ist eine Signalkette, bei der eine Kaskade von Caspasen aktiviert werden, die ihrerseits Proteine aktivieren, die eine programmierte Lyse des Zellkerns mit Fragmentierung der genomischen DNA einleiten, an deren Ende der biologische Tod der Zelle steht (Gougeon und Montagnier, 1993). Die Untersuchung von STAT1-exprimierenden U3A-Zellen ergab, daß STAT1 die Aktivierung von apoptoseexekutierenden Genen in diesen Zellen induziert. Die Aktivierung der Apoptosegene in diesen Zellen wird durch Streß ausgelöst und benötigt keine IFN γ -abhängige Aktivierung von STAT1 (Schindler, 1998; Brunet et al., 1999). In U3A-Zellen führen auch Mutationen in der SH2-Domäne von STAT1 und die Substitution des essentiellen Tyrosinrests 701 zur Auslösung der Apoptose, wogegen die Abwesenheit von STAT1 und eine Mutation von Serin 727 zur Inhibition der Apoptoseinduktion führt (Kumar et al., 1997a). Die Aktivierung

von Apoptosegenen durch STAT1 war unabhängig von der IFN γ -Stimulation und benötigte keine Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1.

Für die Untersuchung der konstitutiven Zielgenaktivierung durch STAT1 α wurden in dieser Arbeit die Apoptosegene FAS, CPP-32, ICH-1 und ICE untersucht (Kumar et al., 1997a; Xu et al., 1998; Na et al., 1996). Es wurden stabil transfizierte U3A-Zellen, die STAT1 α^{WT} , STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ und STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$ exprimierten, und transient transfizierte STAT1 α^{AAAX} - und STAT1 α^{CAAX} -enthaltende U3A-Zellen für die RT-PCR verwendet. Die Primerpaare für die Gene FAS, CPP-32, ICH-1 und ICE sowie die PCR-Bedingungen und die erwarteten Genfragmentgrößen wurden in der Tabelle 3.3. zusammengefasst.

Gene Gen-Bank-Nummer	Primerpaar	Temperatur der Amplifikation in °C	Cyclenzahl	Länge des Genprodukts in bp
ICE BC041689	(V) 5'-TTGCTCCCTAGAAGAAGCTCAAAG-3' (R) 5'-GCCCTCCCGAATACCATGAGAC-3'	57	32	321
ICH-1 NM_032982	(V) 5'-TCCAGCTCCAAGAGGTTTTTCAG-3' (R) 5'-GTCCCTTTGAGGCAGGCATAG-3'	58	32	250
CPP-32 BC016926	(V) 5'-TGGAACAAATGGACCTGTTGACC-3' (R) 5'-AGGACTCAAATTCTGTTGCCACC-3'	58	28	365
FAS X82286	(V) 5'-CCCAAATAGGAGTGTATGCAGAGG-3' (R) 5'-GCCATTAAGATGAGCACCAAGG-3'	60	32	547
STAT-1 NM_007315	(V) 5'-CAGTCTCAACTTCACAGTG-3' (R) 5'-GTTCCACCAGCTTTATGATGACAG-3'	52	25	1000
GAPDH BC026907	(V) 5'-GTGAAGTCTGGAGTCAAC-3' (R) 5'-TGGAATTTGCCATGGGTG-3'	60	25	189

Tab. 3.3. Primerpaare, Reaktionsbedingungen und Genprodukte zur Untersuchung der IFN γ -unabhängigen und STAT1 α -vermittelten Genaktivierung. In der Tabelle wurden die Primerpaare in der Spalte 2 angegeben für die (V) Vorwärts- und (R) Rückwärts-Primer, die zur Untersuchung der IFN γ -unabhängigen, konstitutiven Genaktivierung verwendet wurden. Es handelt sich um Caspasegene, die durch eine TNF α -vermittelte Induktion zur Apoptose führen. Für die einzelnen Gene (mit Genbank-Nummer) wurden die Hybridisierungstemperaturen, Anzahl der Zyklen und die Länge der gewonnenen Reaktionsprodukte aufgelistet.

Die Analyse der RT-PCR-Produkte erfolgte in einem 4-20% Polyacrylamid-Gradientengel. Die Genprodukte für STAT1 und GAPDH wurden zu Kontrollzwecken detektiert. Die Apoptosegene wurden in allen untersuchten Zellen gleich exprimiert, unabhängig davon welche STAT1-Mutante von den U3A-Zellen exprimiert wurde (Abb. 3.27.). Es konnte kein Unterschied in der Transkriptionsrate dieser Gene beobachtet werden, wenn STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$, STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$, STAT1 α^{AAAX} , STAT1 α^{CAAX} oder STAT1 α^{WT} in den Zellen präsent war. In STAT1 α -negativen U3A-Zellen wurde die Transkription der mRNA von Caspase ICE vollständig supprimiert und von Caspase ICH-1 stark reduziert.

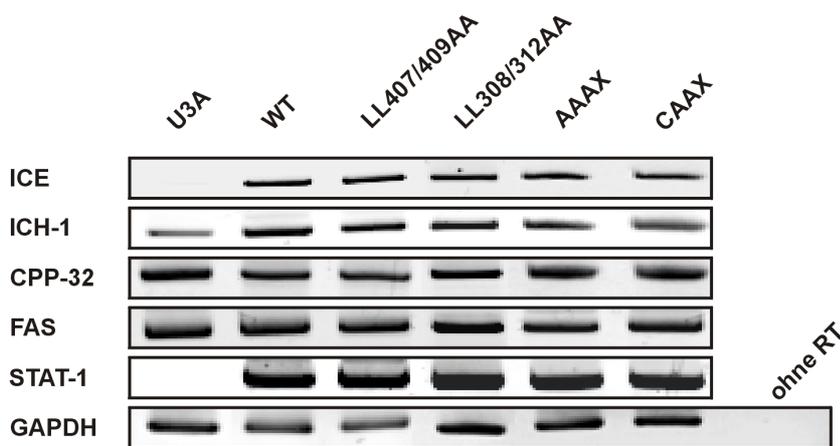


Abb. 3.27. IFN γ -unabhängige Genaktivierung von STAT1 α ^{LL308/312AA}, STAT1 α ^{LL407/409AA}, STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAAX}. Die jeweiligen RNA-Präparationen aus STAT1-negativen U3A-Zellen und U3A-Zellen mit diversen transient integrierten STAT1 α -Lokalisationsmutanten wurden durch RT-PCR untersucht. In einem 4-20% Polyacrylamid-Gradientengel wurden die Genprodukte für die Caspasen ICE, ICH-1, CPP-32 und für den Apoptosemediator FAS aufgetragen und dokumentiert. Als Kontrolle für

die RT-PCR wurden die Reaktionsprodukte für GAPDH und STAT1 im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Als Kontrolle für die RNA-Isolation wurde die PCR ohne Zusatz von reverser Transkriptase durchgeführt (ohne RT).

In der Abbildung 3.26. wurde in einem Western-Blot-Experiment bereits gezeigt, daß die verschiedenen STAT1 α -Mutanten enthaltenden U3A-Zellen die gleichen Mengen von STAT1 α exprimierten. Es wurden identische Mengen an RNA in jeder Probe eingesetzt, erkennbar an dem Expressionsniveau von GAPDH. In den STAT1-negativen U3A-Zellen konnte keine mRNA von STAT1 α nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigte deutlich, daß die konstitutive Aktivierung der Caspasegene ICE und ICH-1 von STAT1 abhängig ist, wobei die Anwesenheit von STAT1 α ausreicht, um diese Gene zu aktivieren.

3.6.2. Untersuchung der TNF α -vermittelten Apoptose in U3A-Zellen

Durch Stimulation mit TNF α /Actinomycin D wird in STAT1-komplementierten U3A-Zellen apoptotischer Zelltod ausgelöst. Die Exekutierung der Apoptose ist von der IFN γ -abhängigen STAT1 α -Aktivierung unabhängig. Die Präsenz von STAT1 α führte zur konstitutiven Aktivierung der Caspasen ICH-1, CPP 32, ICE und des Apoptosemediators FAS in U3A-Zellen. TNF α ist ein bekanntes Zytokin, das Apoptose induziert und in sehr vielen Zellen die Kaskade des programmierten Zelltods initiiert (Hoey, 1997; Kumar et al., 1997a). Es wird eine Reihe zellulärer, apoptotischer Ereignisse ausgelöst, die in einer zeitlichen Abfolge beobachtet werden können und so einen experimentellen Zugang ermöglichen. Der Fettsäureester Phosphatidylserin ist im physiologischen Zustand asymmetrisch auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran verankert. In einem frühen Stadium der Apoptose wird Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite

der Plasmamembran durch eine Translokation exponiert und ist dort für den Farbstoffmarker Annexin V zugänglich (Fadok et al., 1992). Im weiteren Verlauf der Apoptose findet eine Fragmentierung der genomischen DNA statt. Die Einzelstrangbrüche können durch terminale Transferase in TUNEL-Tests sichtbar gemacht werden. Zusätzlich können die kurzen Fragmente der genomischen DNA in einem Agarosegel aufgetrennt werden (Herrmann et al., 1994).

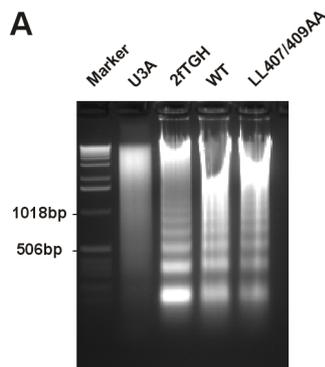
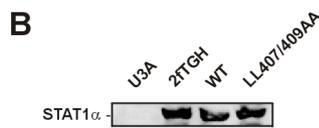


Abb. 3.28. Untersuchung der TNF α -vermittelten Apoptoseinduktion durch endogenes STAT1 α , STAT1 α^{WT} und STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$. STAT1-negative U3A-Zellen und U3A-Zellen mit stabil integriertem STAT1 α^{WT} oder STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$ sowie 2fTGH-Zellen wurden im Hinblick auf Marker für genomische DNA-Fragmentierung 18 h nach TNF α /Actinomycin-D-Zugabe untersucht. In einem Agarosegel (15%) wurden 40 μ l der DNA-Proben von einer 10 cm Petrischale aufgetragen und dokumentiert (Abb. A.). In der Abbildung B wurden die Gesamtzellextrakte aus dem Fragmentierungsexperiment durch Western-Blot untersucht. Die Expressionsprofile von STAT1 α wurden mit dem Antikörper hSTAT α p91 untersucht und dargestellt.



Zur Untersuchung der durch STAT1 α vermittelten konstitutiven Aktivierung von apoptotischen Genen wurden U3A-Zellen transient mit STAT1 α^{WT} oder STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$ kodierenden Plasmiden transfiziert und mit 2fTGH-Zellen und untransfizierten U3A-Zellen bezüglich der TNF α -induzierten Apoptose verglichen. Die Zellen wurden bei einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen für 18 h mit TNF α und Actinomycin D behandelt und einem DNA-Fragmentierungsexperiment unterzogen. Die Abbildung 3.28. A zeigt, daß nur U3A-Zellen, die kein STAT1 α exprimierten, nicht das typische Leitmuster fragmentierter genomischer DNA aufwiesen. In STAT1 α^{WT} - oder STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$ -exprimierenden Zellen kam es zu einer durch TNF α -induzierten Apoptose der U3A-Zellen. TNF α und Actinomycin D lösten auch in 2fTGH-Zellen Apoptose aus. In der Abbildung 3.28. B wurde in einem Western-Blot-Experiment mit dem spezifischen Antikörper hSTAT1 α p91 gezeigt, daß die untersuchten STAT1 exprimierenden Zellen ein gleiches Expressionsniveau aufwiesen. Die Untersuchung der Apoptose wurde mit der TUNEL-Methode in weiteren Experimenten ergänzt. Es war aus vorausgegangenen Arbeiten in unserem Labor bekannt, daß sich die nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1 zwischen verschiedenen Zelllinien

im unstimulierten Zustand unterscheidet (Meyer et al., 2002b). STAT1 α ist im basalen Zustand in der Lage, als unphosphoryliertes Molekül in den Kern zu gelangen und pendelt zwischen nukleärem und cytosolischem Kompartiment ständig hin und her (Meyer et al., 2002a). In eigenen Experimenten wurden U3A-Zellen mit STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{LL308/312AA}, STAT1 α ^{LL407/409AA}, STAT1 α ^{AAAX} oder STAT1 α ^{CAAX} kodierenden Plasmiden transient transfiziert und nach 24-stündiger Inkubation entweder unbehandelt oder mit 20 μ g/ml TNF α und 20 μ g/ml Actinomycin D für weitere 18 h inkubiert (siehe 2.2.1.1.). Als Kontrollen wurden 2fTGH-Zellen und STAT1-negative U3A-Zellen in TUNEL-Experimenten mit gleichen Konzentrationen von TNF α und Actinomycin D behandelt.

Die Daten der TUNEL-Versuche in Abbildung 3.29. A bestätigten die Ergebnisse aus den DNA-Fragmentierungsexperimenten für 2fTGH-Zellen, STAT1 α ^{WT}, STAT1 α ^{LL407/409AA} und STAT1-negative U3A-Zellen (Abb. 3.28.). STAT1-defiziente U3A-Zellen zeigten keine Apoptoseauslösung durch TNF α und Actinomycin D. 2fTGH-Zellen und STAT1-exprimierende U3A-Zellen zeigten 18 h nach TNF α -Behandlung deutliche Zeichen der Apoptoseinduktion. Das Ausmaß der Apoptoseinduktion unterschied sich nicht zwischen STAT1 α ^{WT}-, STAT1 α ^{LL308/312AA}-, STAT1 α ^{LL407/409AA}-, und STAT1 α ^{AAAX}-exprimierenden U3A-Zellen sowie 2fTGH-Zellen. Nach einer TNF α und Actinomycin D-Behandlung konnte für STAT1 α ^{CAAX} eine im Vergleich zu STAT1 α ^{WT} reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen beobachtet werden. Wenn die Zellen nicht mit TNF α und Actinomycin D behandelt wurden, konnte keine Apoptose induziert werden. Als Kontrolle wurde die TUNEL-Reaktion in STAT1 α ^{WT}-exprimierenden U3A-Zellen ohne terminale Transferase durchgeführt, und es wurde erwartungsgemäß kein TUNEL-positives Signal detektiert.

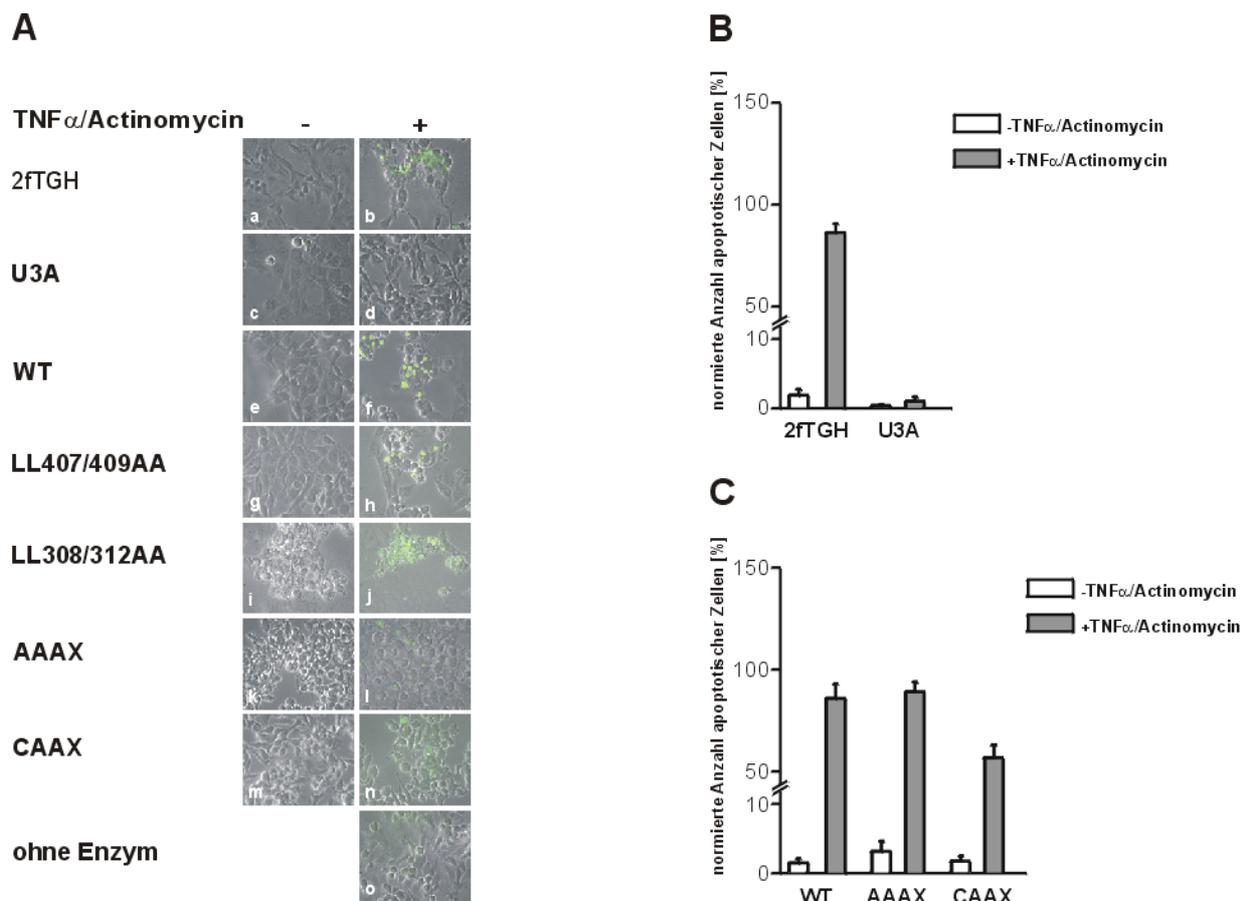


Abb. 3.30. TNF α -vermittelte und STAT1-abhängige Apoptoseinduktion in U3A- und 2fTGH-Zellen. In der Abbildung A wurden 2fTGH-Zellen (a und b), STAT1-negative U3A-Zellen (c und d) sowie transient STAT1 α^{WT} - (e und f), STAT1 $\alpha^{LL307/409AA}$ - (g und h), STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$ - (i und j), STAT1 α^{AAAX} - (k und l) und STAT1 α^{CAAX} - exprimierende U3A-Zellen (m und n) in einem TUNEL-Experiment auf Zeichen der TNF α -vermittelten Apoptoseinduktion untersucht. Als Kontrolle fungierten STAT1 α^{WT} -exprimierende U3A-Zellen (o), bei denen in der TUNEL-Reaktion keine terminale Transferase anwesend war (ohne Enzym). Die in der rechten Spalte abgebildeten Zellen wurden 18 h mit 20 μ g/ml TNF α und 20 μ g/ml Actinomycin D behandelt. In der Abbildung B wurde der Anteil Annexin-V-positiver Zellen bei STAT1-negativen U3A-Zellen und 2fTGH-Zellen dargestellt. Die Apoptose rate dieser Zellen wurde durch Annexin-V-Markierung normiert auf die Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Die weißen Balken repräsentieren den Anteil apoptotischer Zellen vor und die grauen Balken nach 12 h TNF α - und Actinomycin-Behandlung. In der Abbildung C wurden U3A-Zellen mit transient integrierten STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{AAAX} , und STAT1 α^{CAAX} durch eine Annexin-V-Markierung untersucht. Der prozentuale Anteil der apoptosepositiven Zellen wurde auf die Anzahl STAT1-positiver Zellen bezogen und in einem Balkendiagramm wie in der Abbildung B graphisch dargestellt.

Für eine Quantifizierung der Apoptoseinduktion wurden U3A-Zellen mit Plasmiden, die für STAT1 α^{WT} , STAT1 α^{CAAX} oder STAT1 α^{AAAX} kodieren, transient transfiziert und für 12 h mit TNF α und Actinomycin D behandelt. STAT1-negative U3A-Zellen und 2fTGH-Zellen dienten als Kontrolle und wurden ebenfalls auf Apoptosezeichen untersucht. Die TNF α -Behandlung wurde gegenüber den obigen Experimenten verkürzt, da die Translokation von Phosphatidylserin

auf der Außenseite der Zellmembran zeitlich vor der Fragmentierung der genomischen DNA erfolgt. Die Annexin-V-Färbung ist ein weiteres, sehr sensitives Verfahren zur Detektion von Apoptose (siehe 2.2.1.3.). Die Zellen wurden auf Cellocate-Deckgläsern mit einem vorgegebenen Raster kultiviert und unbehandelt oder für 12 h mit TNF α und Actinomycin D behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 15 min mit fluoreszenzmarkiertem Annexin-V inkubiert und die apoptotischen Zellen anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt. Das Verhältnis von Annexin-V-positiven zu STAT1-exprimierenden Zellen wurde bestimmt. Die Apoptoseraten für STAT1-negative U3A-Zellen und den endogenen STAT1-exprimierenden 2fTGH-Zellen wurden über die Gesamtzahl der Zellen ermittelt. Für eine statistische Auswertung wurden vier unabhängige Experimente für jedes Einzelexperiment durchgeführt.

Die Quantifizierung der Apoptoserate ergab, daß in Abwesenheit von TNF α und Actinomycin D keine signifikante Apoptose ausgelöst wurde. Ebenfalls wurde in Abwesenheit von STAT1 α durch TNF α und Actinomycin D kein programmierter Zelltod ausgelöst. Die 2fTGH-Zellen zeigten eine sehr starke Erhöhung der Apoptoseinduktion nach TNF α /Actinomycin-D-Behandlung (Abb. 3.29. B). STAT1 α^{WT} - und STAT1 α^{AAAX} -exprimierende U3A-Zellen zeigten ebenfalls eine starke Aktivierung des apoptotischen Zelluntergangs nach Behandlung mit TNF α und Actinomycin D (Abb. 3.29. C). Gegenüber STAT1-negativen U3A-Zellen war die Apoptoserate für 2fTGH-Zellen um 91 %, für STAT1 α^{WT} um 86 % und für STAT1 α^{AAAX} um 89 % durch TNF α -Stimulation erhöht. Die U3A-Zellen, die mit STAT1 α^{CAAX} -kodierendem Plasmid transfiziert wurden, zeigten eine meßbare Verringerung der Apoptoserate gegenüber STAT1 α^{WT} -exprimierenden Zellen. Die Apoptoserate wurde für STAT1 α^{CAAX} -exprimierende Zellen um 31 % gegenüber STAT1 α^{WT} -exprimierenden Zellen verringert (Abb. 3.29. C).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate weisen darauf hin, daß die durch TNF α /Actinomycin D induzierte Apoptose in U3A-Zellen der Präsenz von rekombinantem STAT1 bedarf. Die Ergebnisse aus den eigenen Experimenten bzw. aus anderen Veröffentlichungen deuten darauf hin, daß auch cytoplasmatisch fixiertes STAT1 die Caspasegene ICH-1 und ICE aktivieren kann (Kumar et al., 1997a). Die Beobachtung daß auch cytoplasmatisch lokalisiertes STAT1 α , wie das in der Plasmamembran verankerte STAT1 α^{CAAX} , zur Induktion des programmierten Zelltods befähigt ist, könnte darauf hindeuten, daß eine cytoplasmatische Präsenz von STAT1 für die Auslösung der Apoptose ausreicht.