

Intrazelluläre Dynamik des Transkriptionsfaktors STAT1

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jasmin Speil

aus

Reutte

Bonn 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Vinkemeier

Tag der Promotion: 22.07.2010

Erscheinungsjahr: 2010

Für meine Mutter und meinen Freund Albert

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
2.1. Motivation und Zielsetzung	10
2.2. Die Signalübertragung und Transkriptionsaktivierung durch STAT1	14
2.2.1. Die STAT-Familie	14
2.2.2. Die Domänen von STAT1	15
2.2.3. Die STAT1-Signaltransduktion	17
2.2.3.1. Die STAT1-Aktivierung	17
2.2.3.2. Der Rezeptor-vermittelte STAT1 Import	19
2.2.3.3. Die Aktivierung der Transkription durch STAT1	20
2.2.4. Der Export von STAT1	21
2.2.5. Die kontinuierliche Translokation von STAT1	22
2.3. Die Strukturen des Zellkerns	24
3. Material und Methoden	30
3.1. Material	30
3.1.1. Chemikalien	30
3.1.2. Medien, Puffer und Lösungen	31
3.1.3. Plasmide	34
3.1.4. Bakterienstämme	34
3.1.5. Proteine und Peptide	35
3.1.6. Farbstoffe	36
3.1.7. Zellen	37
3.2. Methoden	38
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1.1. Mikrobiologische Methoden	38
3.2.1.2. Biochemische Methoden	39
3.2.2. Zellbiologische Methoden	44
3.2.2.1. Zellkultur	44
3.2.2.2. Immunhistochemische Methoden	45
3.2.2.3. Mikroskopische Methoden	45
4. Ergebnisse	56
4.1. Herstellung von fluoreszenzmarkierten Proteinen	56
4.1.1. Expression und Reinigung der Proteine	56
4.1.1.1. Präparation von GST-Fusionsproteinen	56
4.1.1.2. Präparation eines STREP-Fusionsproteins	58
4.1.2. Farbstoffmarkierung der Proteine	59

4.2. Die Mobilität von Ovalbumin im Zellkern	63
4.2.1. Die Verteilung von Ovalbumin in Zellen	63
4.2.2. Die Analyse einzelner Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und im Nukleolus	65
4.2.3. Einzelpartikeltracking von Ovalbumin im Zellkern	67
4.2.4. Sprungweitenanalyse von Ovalbumin	69
4.2.5. Bindungsdauer der Ovalbuminmoleküle in den nukleären Regionen.	72
4.2.6. Zusammenhang zwischen der Chromatindichte und der Ovalbuminverteilung im Zellkern	72
4.3. Die Mobilität der STAT1-Proteine in humanen Zellen	75
4.3.1. Die intrazelluläre Verteilung der STAT1-Proteine.	75
4.3.2. Die intrazelluläre Verteilung einzelner STAT1-Moleküle	79
4.3.3. Sprungweitenanalyse der STAT1-Proteine	82
4.3.4. Bindungsdauer der STAT1-Proteine	86
5. Diskussion	91
5.1. Die Mobilität von Ovalbumin im Zellkern	91
5.1.1. Intrazelluläre und intranukleäre Verteilung von Ovalbumin	91
5.1.2. Sprungweitenanalyse von Ovalbumin	92
5.1.3. Bindungsdauer von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus	93
5.2. Die intrazelluläre Dynamik der STAT1-Proteine	95
4.3.1. Intrazelluläre Verteilung der STAT1-Proteine.	96
4.3.2. Intrazelluläre Verteilung einzelner STAT1-Moleküle	96
4.3.3. Sprungweitenanalyse von STAT1	97
4.3.4. Bindungsdauer der STAT1-Proteine	101
5.3. Ausblick	103
6. Literaturverzeichnis	104
7. Abkürzungsverzeichnis	108
8. Abbildungsverzeichnis	111
9. Tabellenverzeichnis	113
10. Danksagung	114
11. Lebenslauf	115
12. Publikationen und Konferenzbeiträge	116
13. Eidesstattliche Erklärung	117

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Dynamik des Transkriptionsfaktors Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) in humanen Zellen unter physiologischen Bedingungen analysiert. Diese regulatorischen Proteine agieren als direkte Signaltransduktoren von hormonabhängigen Signalketten und können ein Signal direkt vom Rezeptor in der Zellmembran zu den Zielgenen im Nukleus übermitteln. STAT1 befindet sich im unphosphorylierten Zustand präferentiell im Zytoplasma, erst nach einer Stimulation mit extrazellulären Zytokinen, wie z.B. $\text{IFN}\gamma$, werden die STAT1-Proteine phosphoryliert und bilden aktive Homodimere. In aktivierter Form werden die STAT1-Proteine über einen Transportfaktor-vermittelten Mechanismus in den Nukleus importiert, um dort an spezifische Promotersequenzen zu binden und die Genexpression zu initiieren. Jedoch findet auch in unstimulierten Zellen ein konstitutiver Austausch von unphosphorylierten STAT1 zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus statt. Die STAT1-Proteine sind in verschiedenen essentiellen zellulären Prozessen involviert, wie z.B. in der Immunabwehr, der Wachstumskontrolle, der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung. Durch die Visualisierung einzelner STAT1-Moleküle kann die Mobilität von STAT1 in der Rolle als Signalüberträger und Transkriptionsfaktor in lebenden Zellen beobachtet und charakterisiert werden.

Dazu wurden zuerst die dafür benötigten Mess- und Analysemethoden mit einem inerten Protein entwickelt. Die Mobilitätsanalysen mit dem inerten Protein Ovalbumin wurden herangezogen um die strukturelle Beschaffenheit des Nukleoplasmas und des Nukleolus zu untersuchen. Im Nukleus sind die Kerndomänen nicht wie die zytoplasmatischen Organellen durch Membranen abgegrenzt. Trotzdem ist der Nukleus in funktionell und morphologisch unterschiedliche Kompartimente organisiert. Dabei stellt sich die Frage wodurch sich diese intranukleären Strukturen voneinander abgrenzen. Da Ovalbumin frei in den und aus dem Nukleus diffundieren kann und in humanen Zellen keine Interaktionen eingeht kann man ein unterschiedliches Verhalten von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus direkt mit einer unterschiedlichen Beschaffenheit der beiden nukleären Kernregionen assoziieren. Fluoreszenzmarkiertes Ovalbumin wurde in HeLa-Zellen injiziert und mittels konfokaler Mikroskopie beobachtet. Ovalbumin verteilte sich gleichmäßig in der gesamten Zelle, nur in den Nukleoli befand sich deutlich weniger Ovalbumin. Die Analyse der Ovalbumindynamiken auf Einzelmolekülebene hingegen wies auf keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Nukleoplasma und dem Nukleolus hin. Die identifizierten Mobilitäten sowie die Anzahl der Moleküle waren in beiden Regionen fast gleich, nur die Bindungsdauer von Ovalbumin in den beiden Regionen war unterschiedlich. Somit wurde die unterschiedliche Verteilung von Ovalbumin im Nukleus von HeLa-Zellen voraussichtlich durch die längeren unspezifischen Interaktionen der Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und durch weniger frei zugänglichen Raum in den Nukleoli hervorgerufen.

Für die Untersuchung der Dynamik von STAT1 vor und nach Aktivierung wurden zuerst drei verschiedene ATTO647N-fluoreszenzmarkierte STAT1-Varianten in das Zytoplasma von HeLa-Zellen injiziert und am konfokalen Mikroskop beobachtet. Der STAT1-Wildtyp und eine N- und C-terminal verkürzte Deletionsmutante, die inaktive Form von STAT1, verteilten sich in den Zellen annähernd homogen. Im Vergleich dazu zeigten die konfokalen Aufnahmen der intrazellulären Verteilung des phosphorylierten Wildtyps STAT1-P, die aktive Form von STAT1, und der STAT1-wt in IFN γ -stimulierten Zellen eine nukleare Akkumulation. Anschließend wurden die Mobilität und die Interaktionen der STAT1-Proteine am Einzelmolekülmikroskop mit einer Zeitauflösung von circa 5 ms und einer Lokalisierungsgenauigkeit von ungefähr 10 nm beobachtet. Die Aktivierung der STAT1-Proteine in lebenden Zellen führte zu einer drastischen Änderung der Mobilität. Im Nukleus kam es zu einer Immobilisierung und zu einer längeren Bindungsdauer von STAT1-P und von IFN γ -stimulierten STAT1-wt, da die aktiven STAT1-Proteine voraussichtlich an die DNA banden um die Transkription zu aktivieren. Die inaktiven Varianten hingegen wiesen eine heterogene Mobilitätsverteilung auf und waren vorwiegend im Zytoplasma zu sehen.

2. Einleitung

2.1 Motivation und Zielsetzung

Zu den elementaren Fähigkeiten einer Zelle gehört es, auf die Umwelt zu reagieren. Dies wird durch die intrazelluläre Übertragung von Signalen ermöglicht (Karp, 2005). Zuerst bindet ein extrazellulärer Botenstoff oder ein Signalmolekül (Ligand) an ein Rezeptorprotein an der Zelloberfläche oder im Zellinneren der Zielzelle. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins und löst damit eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade aus, die zu einer Änderung der zellulären Aktivitäten führt (Abb. 2.1).

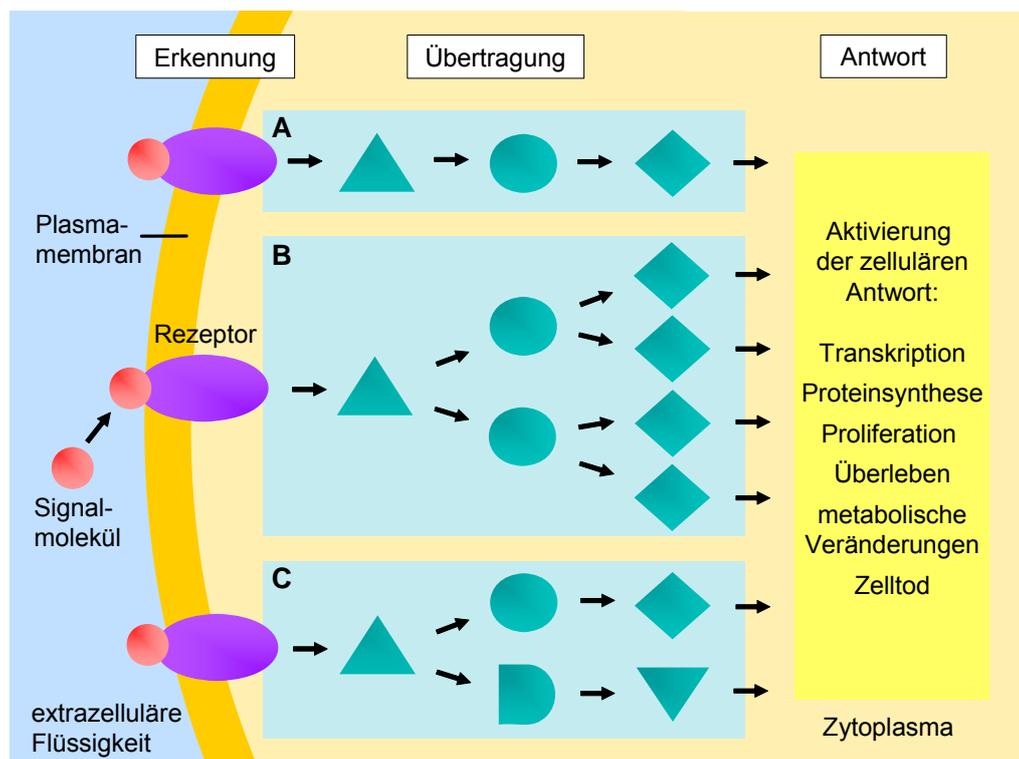


Abbildung 2.1: Signalübertragung in Zellen. Zur zellulären Signalübertragung gehört die Erkennung eines extrazellulären Stimulus auf der Zelloberfläche, die Übertragung des Signals in das Zellinnere, wo es dann letztendlich eine Antwort hervorruft. (A) Die Signalübertragung erfolgt meistens über unterschiedliche Mediatoren, (B) Signalamplifikation, (C) der Stimulus aktiviert mehrere Signalwege. Abbildung modifiziert aus (Campbell *et al.*, 2009).

Nur durch die Signaltransduktion können Zellen auf äußere Reize reagieren. Innerhalb der Zelle werden die Signale in den meisten Fällen entlang verschiedener Signalwege durch unterschiedliche Mediatoren übertragen (Campbell *et al.*, 2009; Pollard, 2007).

Durch Wechselwirkungen von Proteinen, wie Proteinkinasen und Proteinphosphatasen mit ihren Substraten, werden die Substrate aktiviert oder inhibiert und so das Signal weitergeleitet. Auf manchen Signalwegen geschieht die Signalübertragung auch durch Wechselwirkungen von Proteinen mit Lipiden oder Nukleinsäuren, wie z.B. zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Durch die Weiterleitung des Signals kommt es in vielen Fällen zu einer Signalamplifikation, in dem ein aktiviertes Proteinmolekül mehrere Effektormoleküle aktiviert. Somit wird bei jedem Schritt der Signalübertragung das Signal verstärkt (Abb. 2.1 B). Manche der Signalmoleküle können verschiedene Substrate, die in unterschiedliche Signalwege eingebunden sind, aktivieren. Somit kann ein aktiviertes Signalmolekül verschiedene Signaltransduktionen aktivieren, die unterschiedliche Antworten hervorrufen (Abb. 2.1 C). In seltenen Fällen wird das Signal innerhalb der Zelle von einem einzigen Molekül übertragen, wie zum Beispiel von den Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Proteinen. Am Ende erreichen die Signale über den jeweiligen Signalübertragungsweg ihr Zielmolekül, was zu einer Regulation einer oder mehrerer Aktivitäten der Zelle führt.

Zum Schluss wird die Signalübertragung beendet, indem der Botenstoff meist durch Abbau oder Inhibierung aus dem Verkehr gezogen wird. Da die Bindung eines Liganden an den Rezeptor reversibel ist, nimmt das Rezeptormolekül, nachdem sich der Botenstoff vom Rezeptor gelöst hat, wieder seine inaktive Form ein. Folglich müssen auch alle beteiligten Signalmoleküle wieder in ihre inaktive Form zurückkehren. Diese Aufgabe wird von Enzymen übernommen, in manchen Fällen jedoch werden die aktivierten Signalmoleküle zum Abbau freigegeben und neu synthetisiert. Erst nachdem der Prozess der Signaltransduktion vollständig beendet wurde, kann die Zelle erneut auf Signale reagieren.

In den letzten Jahren gab es rasante Fortschritte in der Entwicklung von optischen Techniken, die eine Detektion und Analyse einzelner Moleküle ermöglichen. In der Zellbiologie findet die Einzelmolekülmikroskopie (Kues et al., 2001, Grünwald et al., 2006, Siebrasse et al., 2007) Anwendung zur biophysikalischen Analyse von biologischen Zellsystemen, wie der Untersuchung von kinetischen Prozessen, Moleküldynamiken und Brownscher Molekularbewegung. Mit dieser Methode erhält man vollständig neue Einblicke in die Zellen, da man einzelne Proteinmoleküle beim Ablauf biochemischer Reaktionen beobachten kann.

In dieser Arbeit soll die Einzelmolekülmikroskopie herangezogen werden, um zum ersten Mal eine Signaltransduktion in lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen zu beobachten. Für diese Zwecke wurde das STAT1-Protein verwendet, es eignet sich optimal, da es ohne weitere Mediatoren das Signal von der Zellmembran bis zu den Zielgenen überträgt. Dort löst es eine spezifische Antwort auf das Signal aus, indem es als Transkriptionsfaktor an die Promotoren der Zielgene bindet und die Genexpression induziert. Aufgrund dessen kann durch die Visualisierung von fluoreszenzmarkierten einzelnen STAT1-Molekülen nicht nur die intrazelluläre Dynamik während der Signalübertragung analysiert werden, sondern auch die Dynamik des Transkriptionsfaktors im Zellkern im Detail aufgeklärt werden. In dieser Weise sollen grundlegende Fragen geklärt werden, z.B. wie schnell sich die signalübermittelnden

Proteine bewegen und ob sie dabei Interaktionen eingehen. Ebenso sollen die Beobachtungen des STAT1-Transkriptionsfaktors klären, wie sich Transkriptionsfaktoren im Nukleus verhalten und wichtige Informationen darüber liefern, wie schnell die Transkriptionsfaktoren ihre Bindungsstellen im Nukleus finden und vor allem wie lange sie daran binden.

Um alle diese Fragen zu beantworten, sollen zuerst die dafür benötigten experimentellen und theoretischen Methoden unter der Verwendung eines inerten Proteins entwickelt werden. Hierfür soll Ovalbumin verwendet werden, da es keinerlei Interaktionspartner in humanen Zellen besitzt und es zu erwarten ist, dass es frei in den und aus dem Zellkern diffundieren kann, das heißt das es sich gleichmäßig in der gesamten Zelle ausbreiten kann. Somit ist Ovalbumin für diese Aufgabe ideal. Zusätzlich soll Ovalbumin auch in allen STAT1-Messungen als Referenzprotein eingesetzt werden, um das Verhalten von STAT1 mit einem inerten Protein zu vergleichen.

Für die Entwicklung der Mess- und Analysemethoden, um die Dynamik von STAT1 zu untersuchen, soll zuerst die Dynamik von Ovalbumin in lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen analysiert werden. Diese Analysen sollen dazu verwendet werden, um die molekulare Struktur der zwei bekanntesten Kernregionen, des Nukleoplasmas und des Nukleolus, aufzuklären. Im Zellkern sind die Kerndomänen zwar funktionell organisiert, aber im Unterschied zu den zytoplasmatischen Organellen nicht von Membranen umgeben. Da bis heute nicht bekannt ist, wodurch sich die nukleären Regionen vom restlichen Nukleoplasma abgrenzen, sollen die intranukleären Verteilungen und Mobilitäten von einzelnen Ovalbuminmolekülen Aufschluss über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Nukleoplasmas und des Nukleolus geben. Unterschiede im Verhalten von Ovalbumin würden direkt auf eine unterschiedliche Beschaffenheit der beiden Kernregionen hindeuten. In dieser Studie soll das Ovalbumin fluoreszenzmarkiert werden und in Mikroinjektionsexperimenten in humanen Zellen unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden. Anschließend soll die Verteilung, sowie die Mobilität und die Aufenthaltsdauer von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus bestimmt werden.

Bei der Untersuchung der intrazellulären Mobilität von STAT1 in humanen Zellen, soll das Verhalten von einzelnen STAT1-Molekülen in stimulierten und unstimulierten Zellen verglichen werden. Erst durch eine Stimulierung der Zellen mit einem extrazellulären Botenstoff werden die STAT1-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und nur in diesen aktivierten Zustand können sie Signale übermitteln. Deswegen werden als zusätzliche Kontrollen ein bereits phosphoryliertes STAT1, das die aktive Form von STAT1 darstellt, und eine N- und C-terminal verkürzte Deletionsmutante (STAT1-tc), das die inaktive Form von STAT1 darstellt, analysiert. Der Aufbau des Wildtyps mit den Phosphorylierungsstellen und die Deletionsmutante sind in Abbildung 2.2 gezeigt. Die genauen Funktionen der einzelnen Proteindomänen werden im Abschnitt 2.2.2 detailliert beschrieben.

Durch die Deletion der aminoterminalen Domäne kann die Mutante keinerlei Dimere ausbilden, um an die DNA zu binden. Des Weiteren führt der Verlust des größten Teils der Transaktivierungsdomäne einschließlich der Phosphorylierungsstelle am Serinrest an der Position 727 zu einem gänzlichen Verlust der transkriptionellen Aktivität.

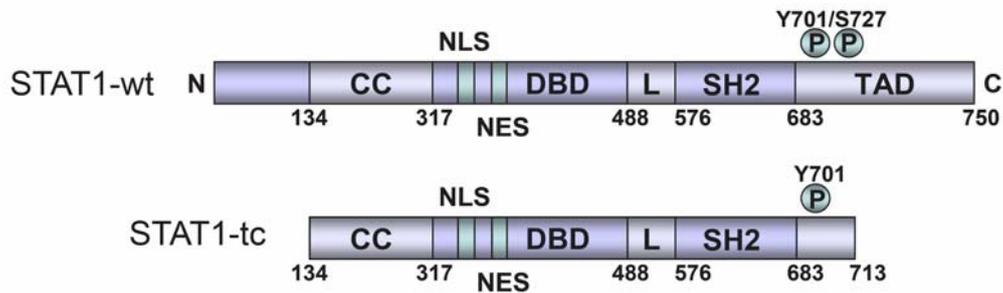


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der STAT1-Varianten STAT1-wt und STAT1-tc. N: N-terminale Domäne, CC: Vier-Helix-Bündeldomäne, NLS: nukleäres Lokalisierungssignal, NES: nukleäres Exportsignal, DBD: DNA-Bindedomäne, L : Linkerdomäne, SH2: Src-Homologie-2-Domäne, TAD: carboxyterminale Transaktivierungsdomäne, Y701: konservierter Tyrosinrest, S727: konservierter Serinrest, P: Phosphorylierungsstelle. Erläuterungen siehe Abschnitt 2.2.2.

Alle drei Varianten, der Wildtyp, der aktivierte Wildtyp und die Mutante sowie das Kontrollprotein Ovalbumin sollen in Zellen beobachtet und detektiert werden. Wie bei der Analyse von Ovalbumin sollen bei den STAT1-Varianten Verteilungs- und Mobilitätsstudien durchgeführt werden, um den Einfluss der STAT1-Aktivierung auf die Dynamik von STAT1 zu veranschaulichen. Abschließend sollen im Nukleus die Bindungsdauern der STAT1-Transkriptionsfaktoren ermittelt werden.

2.2 Die Signalübertragung und Transkriptionsaktivierung durch STAT 1

2.2.1 Die STAT-Familie

Die STAT-Proteine zählen zu einer evolutionär hoch konservierten Gruppe von Transkriptionsfaktoren in eukaryotischen Zellen. Die STAT-Proteine treten ab dem Stadium der Mehrzelligkeit auf und konnten in Schleimpilzen, Nematoden, Insekten und Vertebraten, jedoch nicht in Pflanzen und Pilzen, nachgewiesen werden (Begitt, 2004; Levy *et al.*, 2002; Lodige, 2006; Meyer *et al.*, 2004; Reich, 2007; Reich *et al.*, 2006; Wenta, 2008). Zu der Familie der STAT-Proteine zählen sieben Mitglieder: das STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6. Die Gene für STAT1 und STAT4 befinden sich beim Menschen auf dem Chromosom 2, für STAT2 und STAT6 auf dem Chromosom 12 und für STAT3, STAT5A und STAT5B auf dem Chromosom 17 (Copeland *et al.*, 1995; Wenta, 2008). Alle sieben STAT-Proteine bestehen aus 750 bis 850 Aminosäuren und verfügen über einen ähnlichen Aufbau aus sechs strukturell und funktionell konservierten Domänen: einer N-terminalen Domäne, einer Vier-Helix-Bündeldomäne, einer DNA-Bindedomäne, einer Linkerdomäne, einer Src-Homologie-2-Domäne und einer carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne (Levy *et al.*, 2002; Reich *et al.*, 2006). Die Funktionen der einzelnen Domänen werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

Die besondere Eigenschaft der STAT-Signalübertragung ist, dass die STAT-Proteine die Signale von extrazellulären Botenstoffen direkt von der Zellmembran zu den Zielgenen im Zellkern übermitteln. Dort binden sie an spezifische Erkennungssequenzen in den Promotoren dieser Gene um deren Transkription zu aktivieren. Während der Signalübertragung befinden sich die STAT-Proteine im phosphorylierten Zustand und liegen als Dimere vor, die Proteine STAT1, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6 bilden Homodimere, während STAT1 mit STAT2 oder STAT3 und STAT5A mit STAT5B auch Heterodimere bilden können.

Die biologischen Funktionen der STAT-Signalübertragung sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst. Der Verlust oder die Fehlregulation der STAT-Aktivitäten hat schwere Folgen für den Organismus und führt zu Störungen von entwicklungsphysiologischen Prozessen und zu Defekten in der Immunantwort.

Wie in Tabelle 2.1 ersichtlich ist, spielen die STAT-Proteine eine besonders große Rolle in der Immunabwehr. Zellen des Immunsystems, wie z.B. die Lymphozyten werden durch virale Infektionen aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer Produktion und Sekretion von Zytokinen. Zytokine sind kleine Proteine, die in sehr geringen Konzentrationen wirken. Zum Beispiel bindet das Zytokin Interleukin 4 (IL-4) an Klasse I Zytokinrezeptoren, die sich auf den B-Zellen befinden. Dadurch wird die STAT6-Signaltransduktion aktiviert, die zu einem Klassenwechsel bei den synthetisierten Immunglobulinen führt. Die Typ I Interferone werden von virusinfizierten Zellen produziert und sezerniert. Diese Zytokine

binden an die Klasse II Zytokinrezeptoren von umliegenden nicht infizierten Zellen, um diese gegen Virusinfektionen resistent zu machen. In diesem Fall erfolgt die Übertragung des Signals durch STAT1-STAT2-Heterodimere.

STAT-Protein	Biologische Bedeutung
STAT1	Regulation der Zellentwicklung und der Wachstumskontrolle, Apoptose, Inhibierung des Zellwachstums, Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen
STAT2	Inhibierung des Zellwachstums, Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen
STAT3	Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Überleben, Apoptose, Regulation der Wachstumskontrolle, Zelluläre Transformation
STAT4	Entwicklung von T-Zellen, Entwicklung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen
STAT5A und 5B	Regulation der Wachstumskontrolle, Hämatopoese, Anämie, T-Zellproliferation, Zelldifferenzierung der Erythrozyten
STAT6	Proliferation von B- und T-Zellen

Tabelle 2.1: Die biologische Bedeutung der STAT-Proteine. (Begitt, 2004; Kramer *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2002; Lodige, 2006; Reich *et al.*, 2006; Schindler *et al.*, 2007; Wenta, 2008)

Die Aktivierung der STAT-Proteine erfolgt aber auch durch Wachstumsfaktoren, die die Zellen z. B. durch den Zellzyklus lenken. Die STAT-Proteine werden durch eine Vielzahl von Zytokinen aktiviert, die oben angeführten Beispiele sollen die Komplexität der STAT1-Proteine deutlich machen und vor allem die Bedeutung der STAT-Signalübertragung unterstreichen.

Da im Hauptinteresse dieser Arbeit die STAT1-Signaltransduktion steht, werden in den folgenden Abschnitten der Aufbau von STAT1 und die Signalübertragung durch das STAT1-Protein im Detail erläutert.

2.2.2 Die Domänen von STAT1

Das humane STAT1-Protein besteht aus 750 Aminosäuren und hoch konservierten funktionell und strukturell unterschiedlichen Domänen (Abb. 2.3). Die aminotermine Domäne besteht aus 134 Aminosäuren (Reich *et al.*, 2006) und ermöglicht eine Dimerisierung von unphosphorylierten STAT1-Monomeren (Vinkemeier *et al.*, 1996). Sie ist nach der SH2-Domäne die am besten konservierte Domäne innerhalb der STAT-Familie (Wenta, 2008). Der N-Terminus kann von dem restlichen Protein proteolytisch

abgespaltet werden und bildet auch isoliert in Lösung Homodimere. Durch die direkte Interaktion von zwei N-terminalen Domänen werden Dimere in einer antiparallelen Konfiguration gebildet. Bei den phosphorylierten Dimeren, die an benachbarten Promotoren gebunden sind, kann eine weitere Dimerisierung durch die N-Domänen zur Bildung von Tetrameren führen (Lodige, 2006; Vinkemeier *et al.*, 1996; Wenta, 2008). Ansonsten ist über die Funktion und Struktur der aminoterminalen Domäne wenig bekannt (Levy *et al.*, 2002).



Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der STAT1-Domänen. N: N-terminale Domäne, CC: Vier-Helix-Bündeldomäne, NLS: nukleäres Lokalisierungssignal, NES: nukleäres Exportsignal, DBD: DNA-Bindedomäne, L : Linkerdomäne, SH2: Src-Homologie-2-Domäne, TAD: carboxyterminale Transaktivierungsdomäne, Y701: konservierter Tyrosinrest, S727: konservierter Serinrest, P: Phosphorylierungsstelle.

Als nächstes folgt eine Vier-Helix-Bündel-Domäne, sie enthält vier α -Helices und ist für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich (Reich *et al.*, 2006).

Am Anfang der DNA-Bindedomäne befinden sich die Transportsignale für den Import in den und Export aus dem Nukleus. Das dimerspezifische nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) liegt in den STAT1-Monomeren und in den unphosphorylierten STAT1-Dimeren maskiert vor und kann von den Transportfaktoren nicht erkannt werden (Meyer *et al.*, 2002; Reich *et al.*, 2006; Sekimoto *et al.*, 1997). Erst durch die Dimerisierung von Tyrosin 701-phosphorylierten STAT1-Monomeren kommt es zu einer Konformationsänderung und somit zu einer Demaskierung der NLS. Das nukleäre Exportsignal (NES) befindet sich hinter der NLS in der DNA-Bindedomäne und besteht aus einer leuzinreichen Sequenz. Die DNA-Bindedomäne ist für die Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz verantwortlich und tritt mit der DNA in Kontakt. Diese Domäne ist in einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren ähnlich aufgebaut (Levy *et al.*, 2002). Sie besteht aus mehreren β -Faltblättern und bindet an die große Furche der DNA-Helix. Die Linkerdomäne beinhaltet helikale Strukturen, aber die Funktion dieser Domäne ist noch weitgehend unbekannt. Mutationen in diesem Bereich der STAT1-Proteine führen zu einer instabilen DNA-Bindung.

Die Src-Homologie-Region 2 (SH2) wurde im Src-Protein (Src, Sarcoma) entdeckt und erkennt spezifisch phosphorylierte Tyrosine. Die SH2-Domäne ermöglicht den STAT1-Proteinen an die Phosphotyrosine zu binden und ist für die Dimerisierung der phosphorylierten STAT1-Monomere verantwortlich. Am C-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne, in der sich ein hochkonservierter Tyrosinrest befindet, der von Tyrosinkinasen phosphoryliert wird. Dieser Tyrosinrest an der Stelle 701 ist für die STAT1-Aktivierung und Dimerisierung von essentieller Bedeutung. Erst durch die

Phosphorylierung des Tyrosins 701 können die STAT1-Monomere durch ihre SH2-Domäne an das Phosphotyrosin eines anderen Monomers binden. Die Phosphatgruppe am Tyrosin wird durch einen Argininrest in der SH2-Domäne an der Position 602 erkannt (Wenta, 2008). Die Wechselwirkung wird durch die Aminosäuren an den Positionen zwischen 701 und 708 in der Nähe des Phosphotyrosins und einem Lysinrest in der SH2-Domäne an der Position 584 vermittelt. Durch die wechselseitige Interaktion des Tyrosinphosphats und den SH2-Domänen von zwei Monomeren werden sehr stabile Homodimere in paralleler Konfiguration gebildet. Diese Konformationsänderung führt zu einer Demaskierung der dimerspezifischen NLS. Innerhalb der STAT-Familie ist die Transaktivierungsdomäne die am wenigsten konservierte Domäne, deren Struktur bis heute noch nicht aufgeklärt wurde. Diese Domäne ist verantwortlich für die transkriptionelle Aktivität und interagiert mit einer Reihe von transkriptionellen Koaktivatoren, wie z.B. mit den Histonacetyltransferasen (Lodige *et al.*, 2005). Es existiert auch eine C-terminal verkürzte Variante von STAT1, die durch alternatives Spleißen entsteht (Lodige *et al.*, 2005). Durch das Fehlen der Transaktivierungsdomäne ist diese verkürzte STAT1-Variante transkriptionell nicht aktiv und wirkt als negativer Regulator (Lödige, 2006). Des Weiteren befindet sich in der C-terminalen Domäne auch ein konservierter Serinrest an der Position 727, der von Serin- und Threoninkinasen phosphoryliert wird. Durch die Phosphorylierung des Serinrests wird die transkriptionelle Aktivität von STAT1 erhöht (Lodige *et al.*, 2005). Mutationen des Serinrests führen zu einer verminderten Transaktivierungsleistung und zu einer reduzierten Interaktion mit den transkriptionellen Kofaktoren (Lödige, 2006).

2.2.3 Die STAT1-Signaltransduktion

2.2.3.1 Die STAT1-Aktivierung

Die STAT1-Proteine agieren als direkte Signaltransduktoren. Sie übermitteln die Signale von extrazellulären Botenstoffen direkt vom Rezeptor in der Zellmembran zu den Zielgenen. Dort lösen sie eine spezifische Antwort auf das Signal aus, indem sie die Transkription ihrer Zielgene aktivieren. Zuerst bindet ein von außen ankommendes Signal an den Transmembranrezeptor der Zellen (Tab. 2.2). Bei diesen Signalen handelt es sich um Zytokine: kleine Botenstoffe, die für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen sowie für die Immunabwehr maßgeblich sind.

Zu den Zytokinen, die das STAT1-Protein aktivieren, zählen die Typ I Interferone IFN α und IFN β , das Typ II Interferon IFN γ sowie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Plättchenwachstumsfaktor (PDGF) und der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) (Pau, 2004). Der bekannteste Mediator der STAT1-Aktivierung ist IFN γ , dieses Zytokin ist an der Regulation von antiviralen Prozessen der Immunabwehr beteiligt. (Abbas *et al.*, 2000). Die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren sind Transmembranproteine mit Tyrosin-spezifischer Proteinkinaseaktivität und bestehen meistens aus zwei Untereinheiten. Die Bindung eines

Liganden an den Rezeptor bewirkt eine Dimerisierung der Untereinheiten und dadurch können sich die intrazellulären Domänen gegenseitig an den Tyrosinresten phosphorylieren.

Zytokine	Rezeptor-assoziierte Januskinasen	Signalmolekül	Reaktion
Typ I Interferone α/β	TYK2 und JAK2	STAT1, STAT2	Erhöhte Resistenz gegen Virusinfektionen
Typ II Interferon γ	JAK1 und JAK2	STAT1	Makrophagenaktivierung
Wachstumshormone	ev. JAK2	STAT1, STAT5	Stimulierung und Inhibierung von Wachstum

Tabelle 2.2: Zusammenstellung der Zytokine, Januskinasen, Signalmoleküle und deren Reaktionen. Die Tabelle wurde modifiziert aus (Alberts *et al.*, 2007).

Die Klasse II Zytokinrezeptoren, an denen die Interferone binden, sind Tyrosinkinase-assoziierte Rezeptoren. Da sie selbst keine Tyrosinkinaseaktivität besitzen, sind Proteine mit einer Kinaseaktivität an sie gekoppelt. Des Weiteren bestehen diese Rezeptoren aus zwei identischen Untereinheiten und ähnlich wie bei den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) führt die Bindung eines Zytokins an die extrazellulären Teile der Untereinheiten zu einer Dimerisierung der beiden Rezeptorketten (Abb. 2.4). Dadurch kommen sich die an den intrazellulären Teil der Transmembranuntereinheiten assoziierten Tyrosinkinasen, die Januskinasen (JAK), näher und phosphorylieren sich gegenseitig.

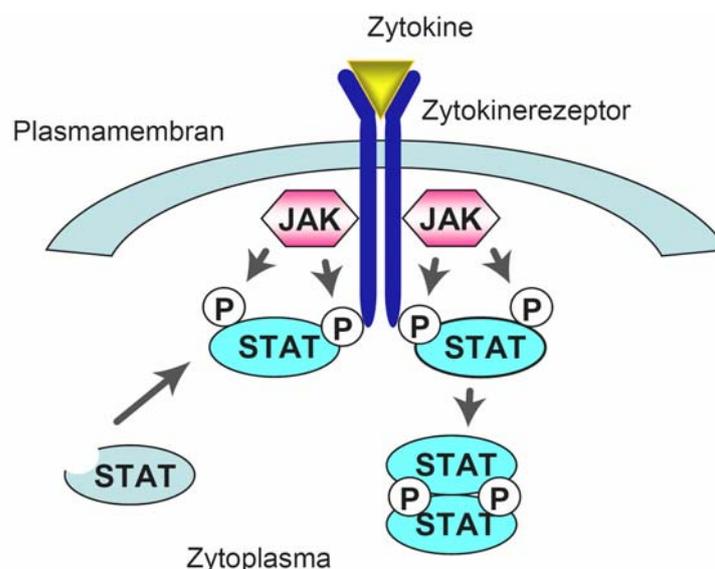


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der STAT1-Aktivierung. Die Bindung eines Zytokins führt zur Dimerisierung der Rezeptorketten und zu einer gegenseitigen Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Januskinasen. Die aktivierten Januskinasen phosphorylieren daraufhin die Tyrosinreste an den Rezeptoren, an die die STAT1-Monomere mittels SH2-Domäne binden. Die STAT1-Monomere werden dann von den Januskinasen phosphoryliert, dissoziieren von den Rezeptoruntereinheiten und dimerisieren über Wechselwirkungen der SH2-Domäne mit den Phosphatgruppen an den Tyrosinen. Die Abbildung wurde modifiziert aus (Meyer *et al.*, 2004).

Die Januskinasen gehören ebenfalls zu einer evolutionär hoch konservierten Proteinfamilie (Meyer *et al.*, 2004; Reich, 2007) bestehend aus vier verschiedenen Varianten JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosinkinase 2 (TYK2). Die Proteine JAK1 und JAK2 sind an den Zytokinrezeptor der Typ II Interferone und JAK1 und TYK2 an den Zytokinrezeptor der Typ I Interferone gekoppelt. Nachdem sich die Januskinasen gegenseitig phosphoryliert haben, was ihre Kinaseaktivität erhöht, phosphorylieren sie die Tyrosinreste innerhalb der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren. Diese phosphorylierten Tyrosine stellen Bindungsstellen für die unphosphorylierten STAT1-Monomere dar. Die STAT1-Monomere binden mit der SH2-Domäne an das Phosphotyrosin des Rezeptors und werden von den Januskinasen an dem Tyrosinrest 701 in der Transaktivierungsdomäne phosphoryliert.

Die aktivierten STAT1-Monomere dissoziieren von den Rezeptoruntereinheiten und dimerisieren durch reziproke Interaktionen zwischen der SH2-Domäne eines Monomers und dem phosphorylierten Tyrosin des anderen STAT1-Proteins. Die Aktivierung durch JAK1 und JAK2 an dem Typ II IFN Zytokinrezeptor führt zu STAT1-Homodimeren und die Aktivierung durch JAK1 und TYK2 an dem Typ I IFN Rezeptor zu STAT1-STAT2-Heterodimeren (Reich, 2007).

2.2.3.2 Der Rezeptor-vermittelte STAT1 Import

Der Transkriptionsfaktor STAT1 befindet sich präferentiell im Zytoplasma und liegt dort als Monomer oder als antiparalleles Dimer vor. Erst nach der Aktivierung durch ein extrazelluläres Zytokin werden die STAT1-Proteine über einen Transportfaktor-vermittelten Import in den Zellkern transportiert, um dort eine Antwort auf das Signal hervorzurufen.

Die Dimerisierung der phosphorylierten STAT1-Monomere führt zu einer Konformationsänderung und zu einer Demaskierung der dimerspezifischen NLS (Reich *et al.*, 2006). Erst nach diesem Prozess kann die NLS von den Transportfaktoren, den Importinen, erkannt werden. Der Importinkomplex besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit. Von diesen Importinuntereinheiten existieren verschiedene Isoformen, die an verschiedene Transportproteine binden (Pemberton *et al.*, 2005). Das Importin $\alpha 5$ erkennt die NLS des aktiven STAT1-Dimers, bindet daran und dient als Adapterprotein zwischen dem Transportsubstrat und dem Importin β (Abb. 2.5). Das Importin β bindet an das Importin α und vermittelt den Transport des STAT1-Importin α/β -Komplexes über direkte Interaktion mit der Kernpore. Die Kernporen in der Zellkernmembran fungieren als Barriere und bewirken einen kontrollierten Austausch von Makromolekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus (Fahrenkrog *et al.*, 2003). Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa können frei durch die Poren diffundieren. Alle Moleküle, die größer sind, benötigen eine NLS um mittels Transportfaktor-vermittelten Transport in den Nukleus zu gelangen (Macara, 2001).

Der NPC besteht aus mehr als 30 verschiedenen Proteinen, die als Nucleoporine (Nups) bezeichnet werden (Paulillo *et al.*, 2005). Ungefähr ein Drittel der Nups enthalten

Phenylalanin-Glycin-Wiederholungsmotive, diese „FG-Motive“ befinden sich an der Oberfläche der NPCs und stellen Interaktionsstellen für Transportfaktoren dar. Der hydrophobe Teil des Importin β bindet an die FG-Motive der Nucleoporine, der genaue Ablauf des Transports durch die Kernporen ist jedoch noch nicht bekannt. Nach der Translokation in den Zellkern bindet die GTPase Ran-GTP an das Importin β und führt zur Dissoziation des Transportkomplexes, wobei das STAT1 freigesetzt wird. STAT1 kann auch in unphosphorylierter Form ohne Transportfaktoren die Kernpore passieren, dieser Translokationsmechanismus wird in Abschnitt 2.2.5 erläutert.

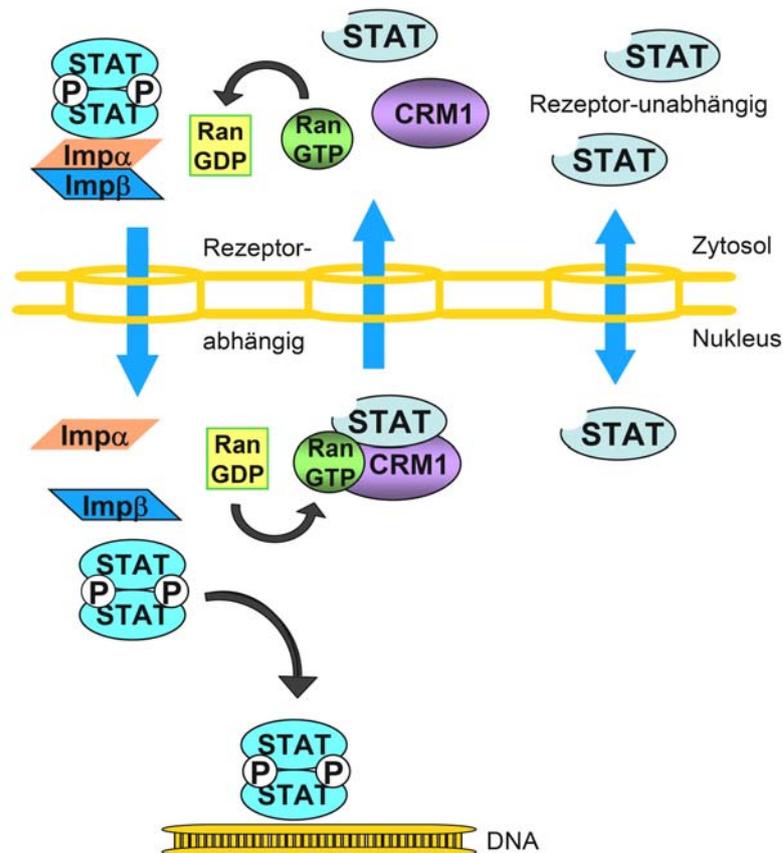


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Rezeptor-vermittelten STAT1-Transports und der STAT1 Translokation in den und aus dem Zellkern. Auf der linken Seite ist der Importin-abhängige Import von phosphorylierten STAT1-Dimeren zu sehen. Nach der Auflösung des Importkomplexes binden die aktivierten STAT1-Dimere an die DNA um die Transkription ihrer Zielgene zu aktivieren. In der Mitte ist der Rezeptor-vermittelte Export von STAT1 gezeigt. Auf der rechten Seite ist die nukleäre Translokation von unphosphoryliertem STAT1 dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert aus (Meyer *et al.*, 2004).

2.2.3.3 Die Aktivierung der Transkription durch STAT1

Im Nukleus erkennen die aktiven STAT1-Dimere durch die DNA-Bindedomäne spezifische Promotorsequenzen (Abb. 2.5). Die mit IFN γ -stimulierten STAT1-Homodimere binden an ein 8 bis 10 Basenpaar langes DNA-Element, an die IFN γ -aktivierte Stelle (GAS) (Decker *et al.*, 1997). Die GAS-Region ist ein Palindrom und besteht aus einer

Wiederholungssequenz von 5`-TTC(N₂₋₄)GAA-3` (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin und N: beliebige Base). Die STAT1-STAT2-Heterodimere bilden mit Hilfe des Interferonregulationsfaktors 9 (IRF9) den Interferon-stimulierten Genfaktor 3 (ISGF3)-Komplex und binden an die Interferon-stimulierten Antwortelemente (ISRE) (Kovarik *et al.*, 2001; Reich, 2007; Schindler *et al.*, 2007). Nach der Bindung an die DNA-Regionen rekrutiert die Transaktivierungsdomäne von STAT1 die Koaktivatoren. Bei den transkriptionellen Koaktivatoren handelt es sich um Histonacetyltransferasen (HAT). Die C-terminale Transaktivierungsdomäne interagiert direkt mit den HAT p300 und dem CREB-Bindeprotein (CBP) (Levy *et al.*, 2002). Die beiden Proteine p300 und CBP acetylieren vornehmlich die Histone H3 und H4 und bewirken eine „Auflockerung“ der Chromatinstruktur, dadurch werden die Abschnitte der DNA für Proteine besser zugänglich. Durch diese Modifikation des Chromatins kann CBP eine Verbindung zwischen den Transkriptionsfaktor cAMP-Antwortelement-Bindeprotein (CREB) und der DNA herstellen.

Die durch IFN γ -aktivierten STAT1-Homodimere induzieren die Genexpression von verschiedenen Zielgenen. Dazu zählen z.B. die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) (Christova *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007) und das Gen des neutrophilen zytosolischen Faktors 4 (NCF4) (Hartman *et al.*, 2005). Die durch die Interferone vom Typ I aktivierten STAT1-STAT2-Heterodimere induzieren z.B. die Transkription des Gens des Somatostatin-Rezeptors 3 (SSTR3), des Galctins 1 (LGALS1) und auch des neutrophilen zytosolischen Faktors 4 (NCF4) (Hartman *et al.*, 2005). Das sind Gene, die in der Immunabwehr und in der Regulation des Stoffwechsels eine große Rolle spielen. STAT1 induziert aber auch die Expression von Genen, die in der Wachstumskontrolle, Zelladhäsion, Apoptose und Zelldifferenzierung mitwirken.

2.2.4 Der Export von STAT1

Im Nukleus werden die STAT1-Dimere, nachdem sie von der DNA dissoziieren, von nukleären Tyrosinphosphatasen dephosphoryliert und sie zerfallen in Monomere. Die nukleäre Form der T-Lymphozytenprotein-Tyrosinphosphatase TC 45 (Levy *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2003; Reich, 2007; Reich *et al.*, 2006; ten Hoeve *et al.*, 2002) spielt bei der Dephosphorylierung der aktiven STAT1-Dimere eine entscheidende Rolle.

Den Export von STAT1 vermittelt das Exportin CRM1. CRM1 erkennt die NES in der DNA-Bindedomäne von monomerem STAT1 und bindet das Protein. Der CRM1-STAT1-Komplex kann nur gemeinsam mit Ran-GTP als trimerer Komplex aus dem Zellkern exportiert werden (Abb. 2.5). Im Zytoplasma interagiert der Kofaktor Ran Binding Protein 1 (RBP1) des GTPase Aktivierungsproteins (RanGAP) mit Ran-GTP und es kommt zur Auflösung des Exportkomplexes und zur Freisetzung von STAT1 (Macara, 2001); (Pemberton *et al.*, 2005). Der RanGAP Kofaktor Nup358 ist ebenfalls an der Dissoziation des RanGTP-Rezeptorkomplexes beteiligt. Das Ran-gebundene GTP wird dann von RanGAP hydrolysiert und es entsteht Ran-GDP.

2.2.5 Die kontinuierliche Translokation von STAT1

Die STAT1-Transkriptionsfaktoren können auch durch einen anderen Transportprozess (Meyer *et al.*, 2003), ohne die Beteiligung von Importinen und eines Zytokinsignals, in den und aus dem Zellkern translozieren: durch die kontinuierliche nukleozytoplasmatische Translokation (Abb. 2.5). Dabei kommt es zu einem konstitutiven Austausch von STAT1-Monomeren zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus.

In ruhenden Zellen können auch die unphosphorylierten STAT1-Proteine die Zellkernmembran passieren. Da es ohne eine Stimulierung zu keiner Phosphorylierung von STAT1 kommt, liegt das STAT1-Protein im unphosphorylierten Zustand als Monomer oder als Dimer in antiparalleler Konfiguration vor. Die STAT1-Monomere haben ein Molekulargewicht von 87 kDa und sind zu groß, um den NPC durch freie Diffusion zu passieren. Proteine, die ein Molekulargewicht von über etwa 50 kDa besitzen, können nur über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus durch die NPCs transportiert werden (Macara, 2001; Fahrenkrog *et al.*, 2003; Pemberton *et al.*, 2005). Trotzdem findet man STAT1-Proteine im Zellkern von unstimulierten Zellen. Diese Art der Translokation von unphosphoryliertem STAT1 benötigt weder Transportfaktoren noch metabolische Energie (Marg *et al.*, 2004). Im Nukleus unterstützt das unphosphorylierte STAT1-Protein zusammen mit dem Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1)-Protein die Genexpression von Low Molecular Mass Polypeptid 2 (LMP2) (Yang *et al.*, 2008). Weitere Funktionen von unphosphoryliertem STAT1 im Zellkern sind nicht bekannt.

STAT1 kann auch ohne CRM1 und ohne metabolische Energie aus dem Zellkern exportiert werden. Nachdem CRM1 spezifisch mit dem nukleären Exportinhibitor Leptomycin B alkyliert und inhibiert wurde, konnte man einen reduzierten Export von STAT1 in unstimulierten Zellen feststellen (Marg *et al.*, 2004). In unstimulierten Zellen, die mit Natriumazid und 2-Deoxyglukose behandelt wurden um die Atmungskette und die Glykolyse zu blockieren, fand ebenfalls ein Export von STAT1 statt (Marg *et al.*, 2004). Es existiert also neben dem Transportfaktor-vermittelten Import und Export ein weiterer Transportmechanismus, der ohne metabolische Energie unphosphorylierte STAT1-Proteine in den und aus dem Zellkern transportiert.

Der genaue Vorgang dieser Translokationsmechanismen ist nicht bekannt, man konnte aber die Interaktion von STAT1 mit Komponenten des NPCs nachweisen (Marg *et al.*, 2004). Das unphosphorylierte STAT1-Protein interagiert mit den FG-Motiven von Nup 153 und Nup 214. Nup 153 ist auf der nukleären Seite der NPCs und Nup 214 auf der zytoplasmatischen Seite verankert (Paulillo *et al.*, 2005). Die C-terminale Domäne von Nup 214 ist sehr flexibel und wurde auf der zytoplasmatischen sowie auch auf der nukleären Seite der NPCs gefunden. Experimente mit Import- und Exportsubstraten zeigten, dass sich der C-Terminus von Nup214 bei Anwesenheit von Importsubstraten auf der nukleären Seite der NPCs befand und mit Exportsubstraten auf der zytoplasmatischen Seite der NPCs. Man vermutet, dass die Transportsubstrate an die FG-Motive der Nups

binden und durch die Bewegung der C-terminalen Domänen importiert bzw. exportiert werden (Fahrenkrog *et al.*, 2003; Paulillo *et al.*, 2005).

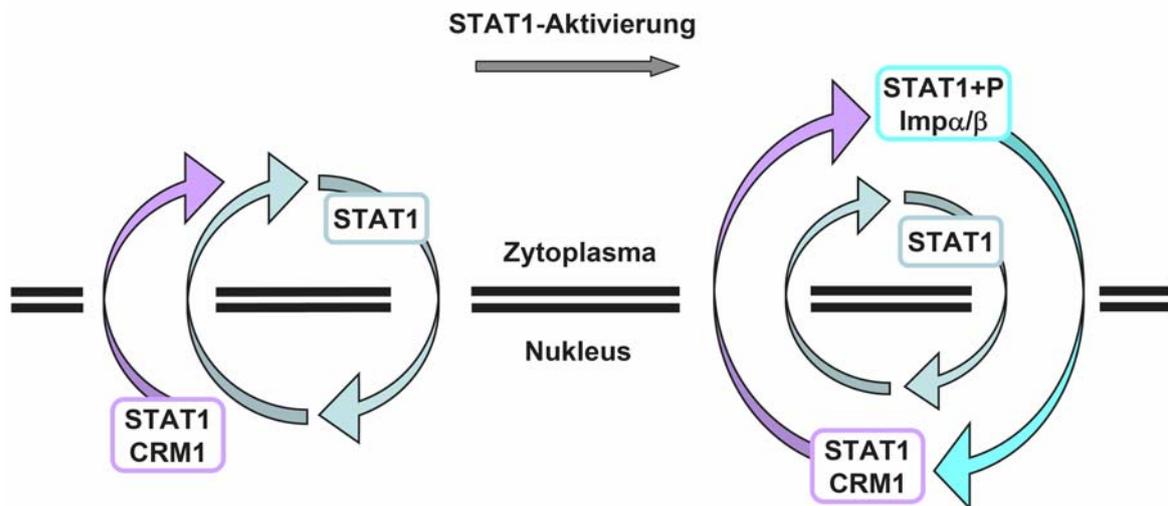


Abbildung 2.6: Die Transportmechanismen von STAT1 in unstimulierten (links) und stimulierten (rechts) Zellen. In unstimulierten Zellen transloziert unphosphoryliertes STAT1 ohne metabolische Energie und Transportfaktoren in den Nucleus und wird mittels CRM1 und einem ATP-unabhängigen Mechanismus aus dem Nucleus exportiert. In stimulierten Zellen werden die STAT1-Proteine phosphoryliert und über einen Transportfaktor-abhängigen Mechanismus in den Zellkern transportiert. Im Zellkern werden dann die STAT1-Proteine dephosphoryliert und aus dem Zellkern exportiert. Die Abbildung wurde modifiziert aus (Vinkemeier, 2004).

Der Zustand der Phosphorylierung ist für den jeweiligen Translokationsmechanismus des STAT1-Proteins verantwortlich (Abb. 2.6).

Wenn das STAT1-Protein als phosphoryliertes Dimer vorliegt, wird es über einen Transportfaktor-vermittelten Mechanismus in den Zellkern importiert und wenn es in unphosphorylierter Form vorliegt, wird es durch einen Translokationsmechanismus ohne die Beteiligung von Transportfaktoren und metabolische Energie importiert. Die Aktivierung und die DNA-Bindung von STAT1 führt zu einer Akkumulation und Retention der STAT1-Proteine im Zellkern (Marg *et al.*, 2004). Im Zellkern wird das STAT1-Protein für den Export dephosphoryliert und über einen Transportfaktor-abhängigen Mechanismus aus dem Zellkern exportiert. Dass auch ein konstitutiver Austausch von unphosphoryliertem STAT1 zwischen Zytoplasma und Nucleus während einer Stimulierung stattfindet, kann man allerdings nicht ausschließen.

2.3 Die Strukturen des Zellkerns

Bis heute weiß man noch sehr wenig über die strukturelle Beschaffenheit des Zellkerns. Man unterteilt ihn in verschiedene funktionell und morphologisch abgetrennte Regionen, mit dem Unterschied, dass diese Bereiche nicht wie die Organellen im Zytoplasma von Membranen umgeben sind (Dundr *et al.*, 2001; Handwerger *et al.*, 2005; Alberts *et al.*, 2007). Da diese Regionen nicht durch Membranen vom restlichen Nukleoplasma abgegrenzt werden, stellt sich die Frage, wodurch es zu dieser Formation und vor allem zu der Aufrechterhaltung der Kerndomänen ohne physikalische Barriere kommt. In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Strukturen des Zellkerns genau beschrieben, um einen Überblick über den Aufbau und die Funktionen dieser Regionen zu geben.

Der Zellkern ist eine membranumschlossene Organelle im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen und enthält den größten Teil der DNA (Karp, 2005; Alberts *et al.*, 2007). Nur eukaryotische Zellen besitzen einen Zellkern, er ist das Unterscheidungsmerkmal zwischen Eukaryoten und Prokaryoten. In HeLa-Zellen hat der Zellkern einen Durchmesser zwischen 5 und 16 μm und lässt sich leicht im Lichtmikroskop erkennen (Abb. 2.7).

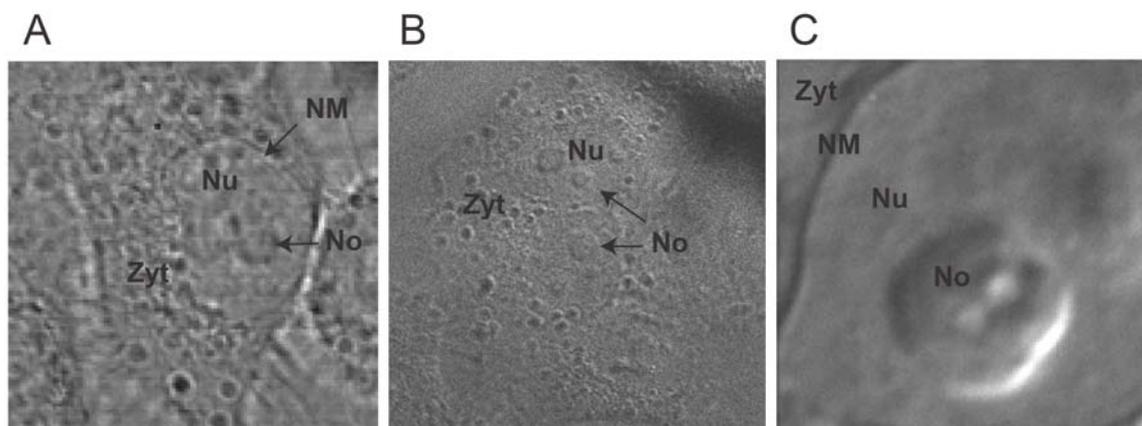


Abbildung 2.7: HeLa-Zellen. A: In diesem Bild ist eine Hellfeld-Aufnahme einer HeLa-Zelle zu sehen. Zyt: Zytoplasma, Nu: Nukleus, NM: Nukleäre Membran, No: Nukleolus. (Objektfeld, $35 \times 35 \mu\text{m}^2$). B: Dieses Bild zeigt die Aufnahme von HeLa-Zellen mit Differentialinterferenzkontrast (DIC). (Objektfeld, $68 \times 68 \mu\text{m}^2$). C: In dieser DIC-Aufnahme wurde ein Teil des Zellkerns einer HeLa-Zelle vergrößert dargestellt. (Objektfeld, $12,2 \times 12,2 \mu\text{m}^2$).

Der Zellkern ist von einer Kernhülle umgeben (Karp, 2005; Alberts *et al.*, 2007). Die Kernhülle ist aus einer Doppelmembran aufgebaut, grenzt die DNA vom Zytoplasma ab und hält den Innenraum des Kerns frei von zytoplasmatischen Organellen. Somit können die Replikation und die Transkription vom Rest der Zelle räumlich getrennt ablaufen. Die Membran besteht aus einer Doppelschicht aus Phospholipiden und wird von Filamenten gestützt. An der Innenseite der Membran befindet sich die Kernlamina, sie besteht aus

Lamininfilamenten. Die Kernmembran ist direkt mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verbunden. Zwischen beiden Membranen befindet sich der perinukleäre Raum, der in das Lumen des ER übergeht. Die beiden Membranen sind durch die Kernporen verbunden, die einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen dem Zytoplasma und dem Kernplasma ermöglichen.

Das Innere des Zellkerns nennt man Nukleoplasma (Abb. 2.8), dort befindet sich die DNA in Form von Chromosomen und dort findet die Genexpression statt. Die Chromosomen liegen als Chromatin organisiert in chromosomalen Territorien vor (Lanctot *et al.*, 2007), in denen sich die Chromosomen mit einer hohen Gendichte hauptsächlich in der Mitte und die Chromosomen mit einer niedrigen Gendichte an der Peripherie befinden (Dundr *et al.*, 2001). Das Chromatin, in dem Gene transkribiert werden, nennt man Euchromatin (Alberts *et al.*, 2007). Es ist acetyliert und liegt daher nur wenig kondensiert vor. Das Heterochromatin beinhaltet die inaktiven DNA-Sequenzen und ist stark kondensiert, dabei unterscheidet man das konstitutive und das fakultative Heterochromatin. Das konstitutive Heterochromatin liegt immer inaktiv vor, da es die DNA beinhaltet, auf der sich keine Gene befinden. Auf dem fakultativen Heterochromatin befinden sich Gene, die selten exprimiert werden.

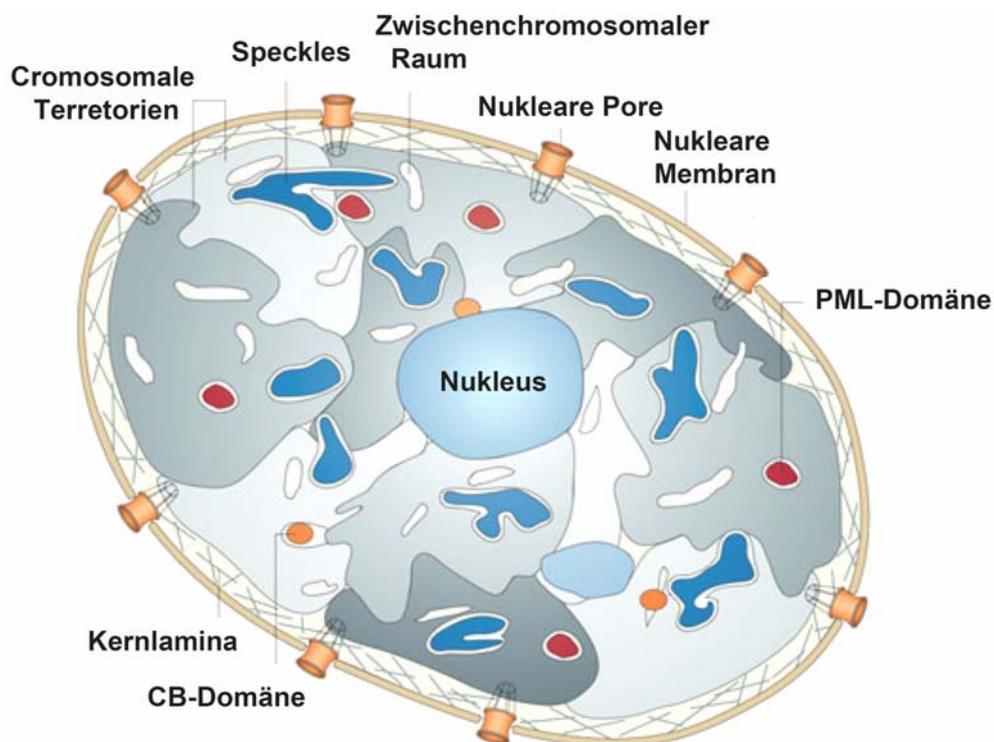


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung eines Zellkerns. Der Zellkern beinhaltet verschiedene Strukturen und Domänen. Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert aus (Lanctot *et al.*, 2007).

Im Nukleoplasma befinden sich wie im Zytoplasma Organellen, welche aber nicht von Membranen umschlossen sind (Handwerger *et al.*, 2005). Diese Kompartimente

unterscheiden sich in ihrer Funktion, allerdings ist über ihren strukturellen Aufbau noch wenig bekannt. Die am besten untersuchten Kernkompartimente sind der Nukleolus, die Spleißfaktor-Kompartimente (SFCs), die Cajalkörperchen (CBs), die promyelozytischen Leukämie-Protein-Domänen (PML) und die Paraspeckles (Dundr *et al.*, 2001) (Abb. 2.9). Die biologische Bedeutung dieser Kerndomänen ist in der Tabelle 2.3 zusammengefasst.

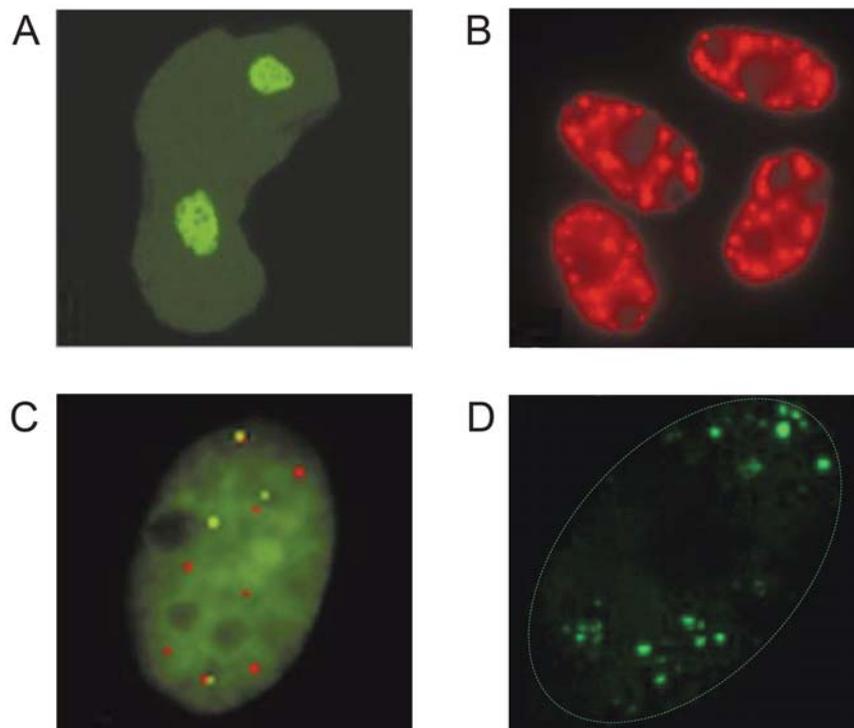


Abbildung 2.9: Die Kerndomänen des Nukleus. In den vier Bildern sind Fluoreszenzaufnahmen von Zellkernen mit A: zwei Nukleoli (grün), B: SFCs (rot), C: PML-Domänen (rot), CBs (grün) und D: Paraspeckles (grün) zu sehen. Abbildungen A-C modifiziert aus (Dundr *et al.*, 2001) und Abbildung D aus (Fox *et al.*, 2005).

Kerndomäne	Anzahl per Nukleus	Durchmesser [µm]	Biologische Bedeutung
Nukleolus	1-3	2-8	Synthese der ribosomalen Untereinheiten
SFCs	unbekannt	1-2	Beinhaltet Spleißkomponenten
CBs	max. 5	0,1-1	Transport und Reifung der RNPs
PML-Domäne	10-30	0,2-1	Spielen eine Rolle in der transkriptionellen Regulation, der Wachstumskontrolle und in der Apoptose
Paraspeckles	2-20	0,5-1	Beinhalten Proteine der Transkription und der RNA-Prozessierung

Tabelle 2.3: Die Kerndomänen und ihre Funktion.

Die auffälligste nukleäre Organelle ist der Nukleolus, man kann ihn aufgrund seiner Größe und Struktur als einzige Kerndomäne im Lichtmikroskop erkennen (Abb. 2.7). In humanen Zellen variiert die Anzahl der Nukleoli, die meisten Zelltypen besitzen ein bis drei Nukleoli (Abb. 2.9A). Im Nukleolus findet die Synthese der ribosomalen Untereinheiten statt, somit ist er an den Tandem-Wiederholungs-Regionen der ribosomalen Gene (rDNA) lokalisiert. Diese Regionen werden Nukleolus-organisierende Regionen (NOR) genannt, sie beinhalten in humanen Zellen ungefähr 180 Kopien der 47 kb langen rDNA-Wiederholungssequenzen, die sich auf den Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 befinden (Dundr *et al.*, 2001). Diese Sequenzen kodieren die 28 S und die 5,8 S rRNA, die in die ribosomale 60 S Untereinheit eingebaut werden und die 20 S rRNA, die in die 43 S Untereinheit eingebaut wird. In HeLa-Zellen sind nur 120 bis 150 von ungefähr 540 rDNA-Genen aktiv. Der Nukleolus selbst besteht aus drei morphologisch unterschiedlichen Komponenten: dem fibrillären Zentrum (FC), das von einer dichten fibrillären Komponente (DFC) umgeben ist und einer granulären Komponente (GC), welche die DFC umhüllt (Abb. 2.10).

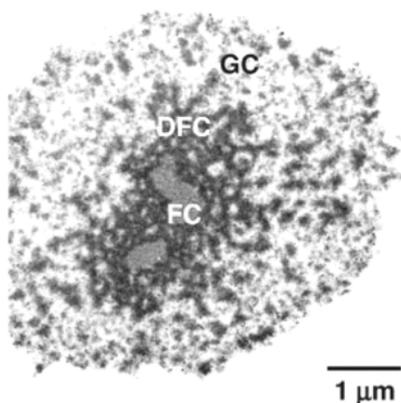


Abbildung 2.10: Die Komponenten des Nukleolus. Dieses Bild zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nukleolus einer *Xenopus laevis* Keimzelle. FC: fibrilläres Zentrum, DFC: dicht fibrilläre Komponente, GC: granuläre Komponente. Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert aus (Handwerger *et al.*, 2005).

In den meisten Nukleoli findet man ungefähr 30 fibrilläre Zentren (Dundr *et al.*, 2001). In jedem Zentrum befinden sich vier Gene. Während der Transkription ist jedes aktive Gen mit 100 bis 200 RNA-Polymerasen I assoziiert. In der DFC wird die Prozessierung und die Modifikation der Vorläufer rRNAs initiiert und in der granulären Komponente werden diese Prozesse fertig gestellt. Zusätzlich findet im Nukleolus die Assemblierung der ribosomalen Partikel statt, dieser Ablauf ist hoch organisiert. Zuerst wird die Vorläufer-rRNA mit den vom Zytoplasma importierten ribosomalen Proteinen zu einem 90 S ribosomalen Vorläuferpartikel zusammengesetzt. Nach der Prozessierung wird das 90 S Partikel in eine 60 S große Untereinheit und eine 40 S Untereinheit getrennt. Die beiden Untereinheiten werden dann separat ins Zytoplasma transportiert und dort zu einem vollständigen Ribosom zusammengefügt. In den Nukleoli findet auch die Assemblierung von einigen Signalerkennungspartikeln (SRPs) statt, bei denen es sich ebenfalls um Ribonukleoproteine handelt. Die SRPs sind am ko-translationalen Transport der Proteine in das ER beteiligt. Des Weiteren finden im Nukleolus post-transkriptionelle Modifikationen von U6 small nuclear RNAs (snRNAs) statt.

Die SFCs werden auch als Speckles bezeichnet (Abb. 2.11) und haben einen Durchmesser von ungefähr 1 bis 2 μm (Vecerova *et al.*, 2004). Es handelt sich dabei um kleine Regionen, die man über das gesamte Nukleoplasma verteilt vorfindet (Abb. 2.9 B). In den SFCs sind die Vorläufer mRNA Spleißfaktoren lokalisiert. Da sich die aktiven Gene nur an der Peripherie aber nicht in den SFCs befinden, nimmt man an, dass die SFCs eine Art Sammelstelle von Spleißkomponenten darstellen. Das Spleißen selbst findet an den Transkriptionsstellen statt (Dundr *et al.*, 2001).

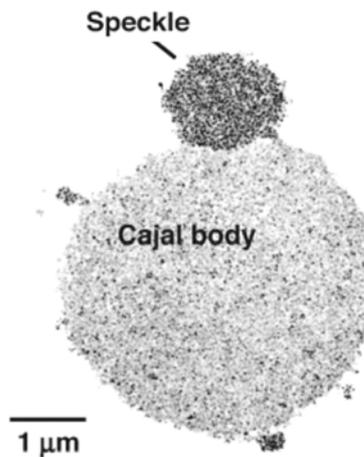


Abbildung 2.11: Speckle und Cajalkörperchen. Dieses Bild zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Speckles und eines Cajalkörperchens einer *Xenopus laevis* Keimzelle. Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert aus (Handwerker *et al.*, 2005).

Die CBs sind 0,1 bis 1 μm kleine kugelförmige Strukturen (Abb. 2.11), von denen im Nukleus bis zu fünf Kopien vorkommen können (Abb. 2.9 C). Die CBs beinhalten eine Reihe von verschiedenen Komponenten: small nuclear Ribonuclein Particle (snRNPs), small nucleolar RNAs (snoRNAs), die Transkriptionsfaktoren TFIIF und TFIIH, der Cleavage Stimulation Factor, der Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor und die nukleoläre Komponente Fibrillarin (Dundr *et al.*, 2001). Die CBs sind am Transport und an der Reifung der snRNPs und der snoRNPs beteiligt. Außerdem rekrutieren sie spezifisch Transkriptions- und Prozessierungsfaktoren zu der snRNA-Transkriptionsstelle. Auffallend ist, dass die CBs präferentiell mit Histonloci ko-lokalisieren. In den CBs findet auch die Assemblierung von Transkriptionskomplexen statt. Ein solcher Komplex ist z.B. das RNA Polymerase II Transkriptosom bestehend aus dem Polymerase II Komplex und Komponenten der RNA-Prozessierung. Es wurden in den CBs auch Komponenten der Polymerase I und III Komplexe gefunden. Aus diesem Grund nimmt man an, dass sich in den CBs auch Polymerase I und III Transkriptosomen bilden können.

Die PML-Kerndomänen sind kugelförmig und haben eine Größe von 0,2 bis 1 μm (Abb. 2.9 C). In jedem Zellkern befinden sich 10 bis 30 PML-Domänen, welche oft mit den CBs assoziiert sind. Sie spielen eine Rolle in der transkriptionellen Regulation, der Wachstumskontrolle und in der Apoptose (Dundr *et al.*, 2001). Das PML-Protein ist essentiell für die Bildung der PML-Domäne, die genaue Funktion des Proteins ist aber unbekannt. Da es aber genauso wie das Protein Sp100 in den PML-Domänen unbeweglich ist, nimmt man an, dass beide strukturelle Proteine der PML-Domäne sind.

Eine funktionelle Störung der PML führt zu einer promyelozytischen Leukämie. Bei Infektionen sind die PML-Domänen mit der viralen Replikations- und Transkriptionsstelle assoziiert. Deswegen vermutet man, dass die PML-Kerndomänen Lagerdepots nukleärer Proteine sind.

Paraspeckles sind unregelmäßig geformte Strukturen und haben eine Größe von ungefähr 0,5 bis 1 μm (Abb. 2.9 D). In den Zellkernen verschiedener Zelltypen variiert die Anzahl der Paraspeckles von 2 bis 20 (Fox *et al.*, 2005). Die Paraspeckles befinden sich im zwischenchromosomalen Raum und sind in der Nähe von Speckles lokalisiert (Bond *et al.*, 2009). Sie existieren nicht in humanen embryonalen Stammzellen sondern bilden sich erst nach ihrer Differenzierung. Paraspeckles beinhalten verschiedene Proteine, die in der Transkription und in der RNA-Prozessierung eine Rolle spielen. Das Paraspeckle-Protein 1 akkumuliert in den Paraspeckles und ist ein typischer Marker für diese Regionen. In der Telophase des Zellzyklus, in der keine RNA Polymerase II Transkription stattfindet, lösen sich die Paraspeckles auf und ihre Komponenten akkumulieren in den Nukleoli. Dort ordnen sich die Paraspeckles-Proteine Halbmondförmig an und bilden die „perinukleoläre Kappe“ (Fox *et al.*, 2005).

Es sind bereits viele Funktionen der nukleären Regionen bekannt und man findet laufend weitere Kompartimente im Nukleus, trotzdem ist der genaue Aufbau dieser Regionen noch weitgehend unbekannt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Aceton	Fluka
Acrylamid (40% Bisacrylamid)	Roth
Alexa Fluor 488	Invitrogen
Anhydrotetracyclin (2 mg/ml)	Clontech
APS	Sigma-Aldrich
ATTO647N	ATTO-TEC
Bio-Gel P-6 DG (Entsalzungsgel, extrafein, <45 µm)	Sigma-Aldrich
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliantblau R 250	Roth
Digitonin	Fluka
DMEM	Biochrom KG
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Fluka
EDTA	Roth
EGTA	Roth
Eisessig	Merck
Ethanol	Fluka
FBS	Hyclone
FITC-Dextran (MW 500 kDa, MW 40 kDa)	Sigma-Aldrich
Gentamycin (10 mg/ml)	Gibco
Hefeextrakt	Roth
HEPES (Pufferan ≥99,5% für die Gewebezucht)	Roth
Iso-Butanol	Merck
Immersionsöl (Type 37 DF, genormt auf 37°C)	Cargille
Kaliumacetat	Roth
L-Glutamin	Biochrom
Magnesiumacetat	Roth
Methanol	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dinatriumdihydrogenphosphat	Roth

Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Ovalbumin	Sigma-Aldrich
PBS (INSTAMED 9,55 g/L)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml)	Biochrom
Proteinmarker	Promega
SDS	Sigma-Aldrich
SDS-Probenpuffer (2-fach konzentriert)	Sigma-Aldrich
SDS-Gelbeladepuffer	Promega
TEMED	Roth
Tris	Roth
Trypsin	Biochrom
Trypton	Roth

Tabelle 3.1: Chemikalien.

3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x YT-Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid pH 7.0, 20 min bei 121°C autoklavieren, Lagerung bei RT, (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Acrylamidgel	Sammelgel 5% (Gesamtvolumen 1 ml) 680 µl destilliertes Wasser 170 µl Acrylamid (30%) 130 µl Tris (1,0 M; pH 6.8) 10 µl SDS (10%) 10 µl APS (10%) 1 µl TEMED Trenngel 12% (Gesamtvolumen 10 ml) 3,3 ml destilliertes Wasser 4 ml Acrylamid (30%) 2,5 ml Tris (1,5 M; pH 8.8) 0,1 ml SDS (10%) 0,1 ml APS (10%) 4 µl TEMED (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)

Coomassie-Entfärbelösung	900 ml Methanol-Wasser-Gemisch (Verhältnis 5:4) 100 ml Eisessig (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Coomassie-Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliantblau R-250 900 ml Methanol/H ₂ O (Verhältnis 1:1) 100 ml Eisessig (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% SDS Lagerung bei RT, (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
GST-Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl 10 mM reduziertes Glutathion pH 8.0, Lagerung bei -20°C, (Amersham, Handbuch 2003)
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar versetzen, 20 min bei 121°C autoklavieren, mit je 10 ml Platten gießen und bei 4°C lagern, (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid pH 7.0, 20 min bei 121°C autoklavieren, Lagerung bei RT, (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Medium für Zellkultur	500 ml DMEM 50 ml FBS 5 ml L-Glutamin (2 mM) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100 U/100 µg/ml) Lagerung bei 4°C
QIAGEN-Elutionspuffer (QF)	125 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 15% Isopropanol pH 8.5, Lagerung bei RT, (QIAGEN, Handbuch 2005)
QIAGEN-Equilibrierungspuffer (QBT)	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15% Isopropanol 0,15% Triton X-100 pH 7.0, Lagerung bei RT, (QIAGEN, Handbuch 2005)

QIAGEN-Lysispuffer (P2)	200 mM NaOH 1% SDS Lagerung bei RT, (QIAGEN, Handbuch 2005)
QIAGEN-Neutralisierungspuffer (P3)	3 M Kaliumacetat pH 5.0, Lagerung bei RT, (QIAGEN, Handbuch 2005)
QIAGEN-Resuspendierungspuffer (P1)	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, Lagerung bei 4°C, (QIAGEN, Handbuch 2005)
QIAGEN-Waschpuffer (QC)	1 M NaCl 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol, Lagerung bei RT, (QIAGEN, Handbuch 2005)
STREP-Elutionspuffer (E)	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin pH 8.0, Lagerung bei 4°C, (Biotagnology, Handbuch 2005)
STREP-Waschpuffer (W)	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8.0, Lagerung bei 4°C, (Biotagnology, Handbuch 2005)
TB	20 mM HEPES 110 mM Kaliumacetat 5 mM Natriumacetat 2 mM Magnesiumacetat 1 mM EGTA 2 mM DTT Der Puffer wird als 10-fach Stammlösung ohne DTT angesetzt, pH 7.3 mit 2 M KOH-Lösung einstellen, Lagerung bei 4°C, (Kubitscheck <i>et al.</i> , 2005)
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8.0, Lagerung bei RT, (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)

Tris-Glycin Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% SDS pH 8.3, Lagerung bei RT, (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
-------------------------------------	---

Tabelle 3.2: Medien, Puffer und Lösungen.

3.1.3 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz
pASK-IBA3- hSTAT1-tc-STREP	Bakterielles Expressionsplasmid mit einem humanen STAT1-tc und einer C-terminalen Fusion an die STREP-Aufreinigungsmarkierung	Ampicillin
Dieses Plasmid stammt von Prof. Uwe Vinkemeier (Medizinische Fakultät, Nottingham, Großbritannien), (Marg <i>et al.</i> , 2004)		
pGEX-2T-GST-NLS	Bakterielles Expressionsplasmid mit einer SV 40 NLS und einer N-terminalen Fusion an die GST-Aufreinigungsmarkierung	Ampicillin
pGEX-2T-GST- hNTF2	Bakterielles Expressionsplasmid mit einem humanen NTF2 und einer N-terminalen Fusion an die GST-Aufreinigungsmarkierung	Ampicillin

Tabelle 3.3: Plasmide.

3.1.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Verwendung	Bezugsquelle
E.coli JM109	Plasmidamplifikation	Promega
E.coli BL21 pLysS	Proteinexpression	Promega

Tabelle 3.4: Bakterienstämme.

Beide kompetenten Bakterienstämme wurden für die Transfektionen der Plasmide (3.1.3) eingesetzt.

3.1.5 Proteine und Peptide

BSA

BSA (Sigma-Aldrich) ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa und wurde als Kontrollprotein in allen Mikroinjektionsexperimenten am LSM verwendet. Es wurde zur Markierung der Injektionsstelle verwendet, da es zu groß ist, um durch die NPCs zu diffundieren.

GST-NLS

Das Fusionsprotein GST-NLS bildet Dimere mit einem Molekulargewicht von 54 kDa, der Durchmesser des Fusionsproteins beträgt ungefähr 5 nm (Grunwald *et al.*, 2006). Die NLS Sequenz stammt vom Simianvirus 40 (SV 40 großes T Antigen) und ist reich an den positiv geladenen AS Lysin und Arginin. Die NLS wird von den nukleären Importrezeptoren erkannt und in den Zellkern importiert. Das GST-NLS Protein wurde als Positivkontrolle für den Rezeptor-vermittelten Import verwendet (Macara, 2001).

NTF2

NTF2 hat ein Molekulargewicht von 15 kDa und bildet Homodimere aus. Der NTF2-Rezeptor transportiert Ran zurück in den Kern und interagiert spezifisch mit den FG-Wiederholungsmotiven der NPCs. NTF2 wurde in den Einzelmolekülexperimenten ko-injiziert um die nukleäre Membran zu markieren (Kubitscheck *et al.*, 2005).

Ovalbumin

Ovalbumin (Sigma-Aldrich) ist ein inertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa. Da es in humanen Zellen keinerlei Interaktionspartner besitzt und frei durch die NPCs diffundieren kann, wurde es zur Untersuchung von nukleären Strukturen verwendet (Speil *et al.*, 2009).

STAT1-tc

Das STAT1-tc ist eine gut charakterisierte Deletionsmutante mit einem Molekulargewicht von 68 kDa. Dieser STAT1-Variante (583 AS) fehlen die ersten 129 AS am NH₂-Terminus und die letzten 38 AS am COOH-Terminus. Dadurch kommt es bei den unphosphorylierten STAT1-tc-Proteinen zu keiner Bildung von Dimeren und somit zu einem Verlust des Rezeptor-vermittelten Imports als auch zur Einbuße der Transkriptionsaktivierung. Diese STAT1-Variante wurde als Negativkontrolle für die aktiven STAT1-Transkriptionsfaktoren verwendet (Marg *et al.*, 2004).

STAT1-wt und STAT1-P

Der STAT1-wt, bestehend aus 750 AS, wurde im Baculovirussystem exprimiert und ein Teil davon anschließend mit Tyrosinkinase am Tyrosin an der Position 701 phosphoryliert (Vinkemeier *et al.*, 1996; Marg *et al.*, 2004). Beide STAT1-Varianten, der STAT1-wt und der phosphorylierte STAT1-wt (STAT1-P), wurden von Prof. Uwe

Vinkemeier zur Verfügung gestellt. Der Transport von phosphorylierten STAT1-wt in den Zellkern ist im Gegensatz zum STAT1-*tc* Protein nur mit Hilfe von Importinen möglich (Marg *et al.*, 2004).

IFN γ

Humanes IFN γ (Calbiochem) wurde als Zytokin verwendet, um die HeLa-Zellen zu stimulieren und das STAT1 zu aktivieren. Es wurde in einer Endkonzentration von 5 ng/ml eingesetzt (Marg *et al.*, 2004).

STAT1 α -Antikörper

STAT1 α p84/p91 (Santa Cruz Biotechnology) ist ein monoklonaler Maus IgG₁ Antikörper und wurde als primärer Antikörper zur Markierung von endogenem STAT1 verwendet.

Ziege-anti-Maus IgG AF635

Ziege-anti-Maus-AF633 (Invitrogen, Molecular Probes) wurde als sekundärer Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt.

TAT-FITC und R9-Tamra

Die Peptide TAT-FITC und R9-Tamra wurden von Christina Cardoso (TU Darmstadt, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Beide Peptide akkumulieren in lebenden Zellen in die Nukleoli und können somit zu deren Markierung eingesetzt werden. TAT-FITC und R9-Tamra wurden in einer Endkonzentration von 100 nM verwendet (Tunnemann *et al.*, 2006).

3.1.6 Farbstoffe

AF 488

Für die Fluoreszenzmarkierung von BSA und NTF2 wurde der Farbstoff Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Molecular Probes) verwendet, er besitzt ein Absorptionsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 519 nm. BSA wurde mit dem AF488-Succinimidylester und NTF2 mit dem AF499-Maleimidester markiert.

ATTO647N

Der Farbstoff ATTO647N (ATTO-TEC) wurde verwendet, um die Transportsubstrate zu markieren, da er über eine sehr gute Quantenausbeute verfügt und am wenigsten Einfluss auf die Funktionalität der zu markierenden Proteine hatte. ATTO647N besitzt ein Absorptionsmaximum bei 644 nm und ein Emissionsmaximum bei 669 nm und wird an die Aminogruppen des Proteins gekoppelt.

3.1.7 Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle
HeLa-S3	HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, die unbegrenzte Fähigkeit zur Zellteilung haben (Marg <i>et al.</i> , 2004).	Prof. Uwe Vinkemeier (Med. Fakultät, Nottingham, Großbritannien)
H2B-GFP- HeLa	Diese Zellen sind HeLa-Zellen, die ein Fusionsprotein aus H2B und GFP exprimieren (Speil <i>et al.</i> , 2009).	Prof. Heinrich Leonhardt (LMU, München, Germany)

Tabelle 3.5: Zelllinien.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Mikrobiologische Methoden

Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien

Von der Lösung mit den kompetenten Bakterienstämmen (JM109, BL21) wurden 100 µl langsam auf Eis aufgetaut und mit mindestens 1 ng Plasmid-DNA (3.1.3.) 10 min lang auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 45 s. Die Bakteriensuspension wurde dann 2 min lang auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Davon wurden 100 µl der Suspension und je 100 µl einer 1:10 und 1:100 Verdünnung jeweils auf einer LB-Agarplatte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Bakterienplatten, welche die entstandenen Bakterienkolonien mit den transformierten Plasmid enthielten, konnten bei 4°C im Kühlschrank für ungefähr einen Monat gelagert werden (Promega, Handbuch 2000).

Aufbewahrung von Bakterien

Um die transformierten Bakterien über lange Zeiträume aufzubewahren, mischt man 80% frische Bakterienkultur mit 20% wasserfreiem Glycerin. Glycerin verhindert die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses und somit die Zerstörung der Zellen. Die Suspension wurde gut gemischt, langsam eingefroren und bei -80°C gelagert.

Amplifizierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil der Bakterien vom Glycerinstock entnommen, in 5 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, gegeben und 8 h lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Davon wurden 2 ml in 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum verdünnt und über Nacht bei 37 °C auf einen Schüttelinkubator gestellt. Die Bakterienzellen wurden bei 6.000 x g 15 min lang bei 4°C zentrifugiert und in 10 ml Puffer P1 (s. QIAGEN-Puffer 3.1.2) resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung mit 10 ml Puffer P2 versetzt, kurz gemischt und 5 min lang bei RT inkubiert, um die Bakterienzellen zu lysieren. Danach wurden 10 ml Puffer P3 zugegeben um die entstandene Suspension zu neutralisieren und Zellreste, Proteine sowie genomische DNA zu präzipitieren. Das Ganze wurde kurz gemischt und 20 min lang auf Eis inkubiert. Um die Zellreste vollständig zu entfernen wurde das Präzipitat bei 20.000 x g 30 min lang bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Währenddessen wurde eine QIAGEN-tip 500 Säule mit 10 ml Puffer QBT equilibriert und der Überstand, der nur die Plasmid-DNA enthielt, zugegeben. Die Plasmid-DNA, die an das Säulenmaterial gebunden hat, wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und dann mit 15 ml Puffer QF eluiert. Anschließend

wurde die gewonnene Plasmid-DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und bei 15.000 x g 30 min lang bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde dann mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bei 15.000 x g 10 min lang bei 4°C zentrifugiert und getrocknet um das restliche Ethanol zu entfernen. Die gereinigte DNA wurde dann in TE-Puffer resuspendiert, bei -20°C aufbewahrt und konnte für weitere Transfektionen verwendet werden (QIAGEN, Handbuch 2005).

3.2.1.2 Biochemische Methoden

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA in Lösungen wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm ermittelt. Der Absorptionswert A_{260} von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Die DNA-Konzentration wird nach dieser Formel berechnet:

$$C_{\text{DNA}} = \frac{A_{260} \cdot K \cdot V}{1000} \quad (3.1)$$

C_{DNA}	Konzentration der DNA [µg/µl]
A_{260}	Absorption bei 260 nm
K	Korrekturfaktor = 50
V	Verdünnungsfaktor

Proteinverunreinigungen lassen sich durch Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} nachweisen, eine sehr reine DNA-Lösung hat einen Wert von $A_{260}/A_{280} = 1,8$.

Bakterielle Expression rekombinanter Proteine

Die Proteine GST-NLS, NTF2 und STAT1-tc wurden im E.coli Stamm BL21 pLysS exprimiert. Die Bakterien wurden mit einer sterilen Spitze aus dem jeweiligen Glycerinstock entnommen, in 75 ml LB-Medium mit Antibiotika gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden 25 ml zu 1L 2x YT-Medium gegeben und bei 37°C auf dem Schüttelinkubator solange vermehrt bis der OD_{600} einem Wert von 0,6 entsprach. Bei erreichter Bakteriendichte wurde die Expression der Proteine mit 1 ml 1M IPTG-Lösung induziert. Die Transkription der gewünschten Gene auf den Vektoren wurde zuvor durch einen Repressor unterdrückt. Erst nach Zugabe von IPTG, das den Repressor band, wurden die Gene transkribiert und anschließend die Proteine exprimiert. Die induzierte Bakteriensuspension wurde 3 h lang bei 37°C auf den Schüttelinkubator gegeben und anschließend 15 min lang bei 4°C und 5.000 x g zentrifugiert. Die Bakterien wurden bei -20°C aufbewahrt. Die Bakterien mit dem STAT1-tc Plasmid wurden bis zu einem OD_{550} von 0,5 vermehrt und mit 200 µg Anhydrotetracyclin (Clontech) induziert, ansonsten waren alle Schritte identisch.

Das eingefrorene Pellet, das aus den Bakterien und den exprimierten Proteinen bestand, wurde in 15 ml eisgekühlten PBS oder für die STREP-Aufreinigung in 10 ml Puffer W (s. STREP-Puffer 3.1.2) resuspendiert und 1 h lang auf Eis unter Schütteln inkubiert. Das

Lysozym, welches auf dem pLysS Plasmid codiert ist, lysiert die Zellwände der Bakterien und unterstützt den Zellaufschluss. Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch durch Ultraschall. Es wurde fünfmal für je 5 Minuten mit Pulsen zu je 1 s auf Eis sonifiziert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 40.000 x g 30 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Die exprimierten Proteine befanden sich im Überstand, ein Aliquot des Überstandes wurde aufgehoben und mittels SDS-PAGE kontrolliert.

Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Die GST-Fusionsproteine wurden mit Glutathion-Sepharose (GE Healthcare) aufgereinigt und somit vom restlichen Bakterienlysate abgetrennt. GST bindet an den Liganden des Säulenmaterials und Verunreinigungen können mit Puffer gewaschen werden (Amersham, Handbuch 2003). GST-NLS und GST-NTF2 wurden mit 1,5 ml Glutathion-Sepharose (GE Healthcare) 1 bis 2 h lang auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Sepharose liegt als Suspension in 20%igem Ethanol vor und wurde vor Verwendung mit 50 ml eisgekühltem PBS dreimal gewaschen, um den Alkohol zu entfernen. Nach jedem Waschgang wurde die Sepharose für 10 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der Inkubation mit dem Protein wurde die Sepharose wieder dreimal mit PBS gewaschen um die Verunreinigungen zu entfernen. Die Glutathion-Sepharose mit den gebundenen GST-Proteinen wurde in eine 5 ml-Mikrosäule überführt und viermal mit 10 ml eisgekühltem PBS gewaschen, um letzte Verunreinigungen zu entfernen. Die GST-Fusionsproteine wurden mit ungefähr 5 ml GST-Elutionspuffer von der Säule eluiert und in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Um sicherzustellen, ob das Protein vollständig eluiert wurde, wurde ein Bradford-Schnelltest durchgeführt: je 5 µl der aufgefangenen Fraktionen wurden mit 95 µl Bradford-Reagenz versetzt, enthielten die Lösungen Protein, kam es zu einem Farbumschlag von braun nach blau. Alle Fraktionen, die Protein enthielten wurden in einem 15 ml 10 kDa Amicon Ultrazentrifugenfilter (Ausschlussgröße 10 kDa, Millipore) vereinigt und mit eisgekühltem PBS umgepuffert. Die Lösungen wurden im Filter bei 4.000 x g 10 min lang bei 4°C zentrifugiert, der Puffer und alle Makromoleküle, die kleiner als 10 kDa sind, gelangten durch die Poren des Filters. Die GST-Fusionsproteine selbst blieben im Filter zurück und wurden durch Zentrifugation auf ein kleineres Volumen aufkonzentriert. Von dieser Proteinlösung wurde die Konzentration bestimmt, ein Aliquot entnommen und mittels SDS-PAGE auf Größe und Reinheit überprüft.

Thrombinspaltung

Da die Proteine nach der Aufreinigung als GST-Fusionsproteine vorlagen, wurden sie mit der Serinprotease Thrombin verdaut, um das GST zu entfernen. Zwischen dem GST und dem Protein befindet sich eine Thrombinschnittstelle (Leu Val Pro Arg ↓ Gly Ser), um das Fusionsprotein zu spalten. Um das NTF2 ohne GST zu gewinnen wurde das GST-NTF2 mit 50 U Thrombinlösung versetzt und über Nacht auf Eis und am folgenden Tag 2 h lang bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 200 µl p-Aminobenzamidin-Agarose (Sigma) dreimal mit PBS gewaschen und bei 10.000 x g 30 s lang bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Verdau zu der Agarose pipettiert und 1 h lang bei 750 rpm inkubiert. Das p-

Aminobenzamidin ist ein synthetischer Inhibitor von Serinproteasen. Das Thrombin bindet an die p-Aminobenzamidin-Agarose und wird so aus der Proteinlösung entfernt. Die Agarose wurde dann in eine 5 ml-Mikrosäule überführt und mit je 1 ml eisgekühltem PBS solange gewaschen, bis in den aufgefangenen 1 ml Fraktionen kein Protein mehr mittels Bradford-Schnelltest nachgewiesen werden konnte. Die Fraktionen wurden in einem Amiconfilter vereinigt, mit PBS gewaschen und auf ein kleineres Volumen eingeeengt. Ein Aliquot wurde als Kontrolle für die SDS-PAGE aufgehoben.

Aufreinigung der STREP-Fusionsproteine

Die Aufreinigung der STREP-Fusionsproteine erfolgte ähnlich wie die der GST-Fusionsproteine (Biotagnology, Handbuch 2005). Die Säule besteht aus 1 ml STREP-Tactin-Sepharose (Biotagnology), an die das STREP mit hoher Affinität bindet. Zuerst wurde die Säule mit 2 ml Puffer W bei 4°C equilibriert und dann die STREP-STAT1-*tc* Proteinlösung zugegeben. Danach wurde die Säule fünfmal mit 1 ml Puffer W gewaschen, um jegliche Verunreinigungen zu entfernen. Das Protein wurde mit 3 ml Puffer E in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Nach der Durchführung des Bradford-Schnelltests wurden die positiven Fraktionen vereinigt und in einem Amiconfilter mit einer Porengröße von 30 kDa umgepuffert und eingeeengt. Ein Aliquot wurde für die SDS-PAGE aufgehoben.

Farbstoffmarkierung der Proteine

Für die Farbstoffreaktion ist es wichtig, dass in der Lösung der richtige pH-Wert vorliegt, damit die Reaktion selektiv ablaufen kann (siehe Protokolle: Amin- und Thiol-reaktive Proben von Invitrogen, Molecular Probes und Amin-reaktive ATTO-Farbstoffe von ATTO-TEC). Für die Farbstoffmarkierung mit den Succinimidylestern wurden die Proteinlösungen mit einem 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer mit einem pH-Wert von 8.3 in einem Amiconfilter umgepuffert, damit die Proteine in leicht basischer Lösung vorlagen. Bei diesen pH-Wert liegen die Aminogruppen des Proteins in nicht protonierter Form vor und der Amin-reaktive Farbstoff wird kovalent mit den Aminogruppen des Proteins verknüpft.

Hingegen reagieren die Maleimidderivate bei einem pH-Wert von 7 bis 7.5 selektiv mit den Thiolgruppen des Proteins, da in diesem Bereich die Thiolgruppen des Proteins nucleophil sind, wobei die Aminogruppen in protonierter Form vorliegen und somit relativ unreaktiv sind. Deswegen wurden die Proteine bei der Reaktion mit Maleimiden mit TB ohne DTT mit einem pH-Wert von 7 bis 7.5 in einem Amiconfilter umgepuffert und auf eine Konzentration von 50 bis 100 µM verdünnt. Die Proteinlösung wurde equimolar mit dem Farbstoff versetzt und 1h lang bei RT lichtgeschützt inkubiert. Unmittelbar nach der Reaktion wurde das gefärbte Protein mittels Gelchromatographie vom freien Farbstoff getrennt.

Gelchromatographie

Das P6 DG Entsalzungsgel (BioRad) wurde am Vortag mit PBS vermischt, damit das Gel lang genug quellen konnte. Eine Säule mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Höhe von 15 cm wurde mit dem gequollenen Material befüllt. Die aufzureinigende Proteinlösung

wurde auf die Säule aufgebracht und nach Größe aufgetrennt. Durch die poröse Oberfläche der Sepharosematrix wurden die Proteine nach Größe aufgetrennt. Die kleineren Moleküle können in die Poren des Gels eindringen, wodurch ihre Wandergeschwindigkeit in der Säule vermindert wird. Während die großen Moleküle zu groß sind um in die Poren zu gelangen und dadurch um die Gelpartikel herum diffundieren. Somit durchlief das markierte Protein die Säule schneller als der freie Farbstoff. Da die verwendeten Farbstoffe im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbierten, konnte man die Trennung visuell verfolgen. Die Eluate wurden in kleinen Fraktionen (0,5 bis 1 ml) aufgefangen und das darin befindliche Protein mit dem Bradford-Schnelltest nachgewiesen. Die Eluate wurden in einem Amiconfilter vereinigt und auf ein kleines Volumen eingeeengt. Das gereinigte, markierte Protein wurde mittels SDS-PAGE auf seine Reinheit und Größe überprüft und die Konzentration bestimmt. Bei den mit ATTO647N markierten Proteinen wurde auch das Markierungsverhältnis ermittelt. Danach wurden die Proteine in kleinen Aliquots (5-10 µl) schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Bestimmung des Markierungsverhältnisses

Da an ein Protein bei equimolarer Markierung nur ein Farbstoffmolekül kovalent gebunden sein sollte, wurde die Markierungsrate mittels UV-VIS Absorptionsspektrometrie überprüft (siehe Protokoll: Amin-reaktive ATTO-Farbstoffe von ATTO-TEC). Zuerst wurde die Absorption bei 280 nm gemessen um die Proteinkonzentration zu bestimmen und dann wurde die Absorption des Farbstoffes bestimmt. Das Absorptionsmaximum von ATTO647N liegt bei 644 nm. Die Markierungsrate (M) wird mit der folgenden Formel berechnet:

$$M = \frac{C_{\text{Farbstoff}}}{C_{\text{Protein}}} = \frac{\varepsilon_{\text{Protein}} \cdot A_{\text{Farbstoff}}}{\varepsilon_{\text{Farbstoff}} \cdot (A_{\text{Protein}} - K_{\text{Farbstoff}} \cdot A_{\text{Farbstoff}})} \quad (3.2)$$

- C Konzentration
- ε Molarer Extinktionskoeffizient
- A Absorption
- K Korrekturfaktor ($K_{\text{Farbstoff}, 280} = \varepsilon_{280}/\varepsilon_{\text{max}}$, $K_{\text{ATTO647N}, 280} = 0,05$)

Die Markierungsrate der fluoreszenzmarkierten Proteine muss optimal 1 betragen, da dann an jedem Protein im Mittel genau ein Farbstoffmolekül gekoppelt wurde. Die Proteine wurden in 5 bis 10 µl kleinen Aliquots aufgeteilt, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) wurde eine Standardreihe zur Erstellung einer Kalibriergerade erstellt, die die lineare Beziehung zwischen Absorption und Konzentration wiedergibt. Dazu wurden als Standardlösungen fünf verschiedene BSA-Lösungen mit einer Konzentration von 0, 250, 500, 750 und 1000 µg/ml BSA in einem Gesamtvolumen von jeweils 50 µl mit demselben Puffer, in dem sich die zu untersuchende Proteinlösung befand, hergestellt.

Von den zu untersuchenden Proteinlösungen wurden ebenfalls verschiedene Verdünnungen hergestellt, um sicherzustellen, dass die gemessenen Absorptionen im Bereich der Kalibriergerade der Standardlösungen liegen. Alle Lösungen wurden mit 1,5 ml Bradford-Reagenz (Sigma) versetzt, gemischt und mindestens 5 min lang inkubiert, um die Reaktion vollständig ablaufen zu lassen. Die Proteine bilden einen Komplex mit dem Farbstoff Brilliantblau, dabei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 zu 595 nm, die braune Lösung färbt sich blau. Je mehr Protein in der Lösung enthalten ist, umso intensiver ist die Blaufärbung. Die Absorptionen der Lösungen wurden bei 595 nm am Spektrometer Genesys 10UV (Thermo Spectronic) gemessen und die Konzentration mittels Kalibriergerade bestimmt.

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Stoffgemischen in der biochemischen Analytik. In einem Gel auf Polyacrylamid-Basis wandern Proteine unterschiedlicher Masse im elektrischen Feld mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Daher erfolgt entlang der Strecke eine Aufspaltung des Gemisches in seine einzelnen Bestandteile. Das Polyacrylamidgel ist die stationäre Phase und besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Der Radikalstarter APS und TEMED werden zum Schluss zur Lösung zugefügt, da diese Substanzen zur Quervernetzung des Bisacrylamid führen. Je höher die Acrylamidkonzentration ist, desto kleiner werden die Poren im Gel und desto geringer ist die Mobilität der Proteine. Das anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladungen der Proteine, wodurch alle Proteine nach außen hin dieselbe negative Ladungsverteilung aufweisen. Zusätzlich müssen die Proteine denaturiert vorliegen, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit ausschließlich von der Molekülmasse abhängt. Die Fraktionen wurden vor der Auftrennung mit dem SDS-haltigen Ladepuffer versehen und 5 min lang auf 95°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Das vorbereitete Gel wurde senkrecht in der Elektrophoresekammer angebracht und diese daraufhin mit Elektrophoresepuffer befüllt. Jeweils 10 µl der Proteinproben und eines Proteinmarkers wurden auf das Sammelgel aufgetragen. Die PAGE wurde bei einer Spannung von 90 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel durchgeführt und beendet, sobald sich der die Lauffront markierende Farbstoff, erkennbar als blaue Bande, am unteren Ende des Gels befand. Die Detektion von Banden des freien Farbstoffes und des fluoreszenzmarkierten Proteins erfolgte durch Beleuchtung des Gels mit UV-Licht unmittelbar nach der Elektrophorese.

Coomassiefärbung

Die Detektion von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel erfolgte durch das Anfärben des Gels mit dem Farbstoff Brilliantblau (Neuhoff *et al.*, 1988). Coomassie-Brilliantblau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, welcher sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und Proteine unspezifisch anfärbt. Das Gel wurde in die Färbelösung für mindestens 2 h unter leichtem Schwenken eingelegt, bis die Proteinbanden vollständig blau gefärbt waren. Da sich auch das gesamte

Polyacrylamidgel blau färbte, musste das Gel mit einer Coomassie-Entfärbelösung wieder entfärbt werden bis nur noch die Proteinbanden im Gel gefärbt waren. Anschließend wurde das Gel in Wasser aufbewahrt, was zu einem Quellen des Gels führte, wodurch die Proteinbanden deutlicher sichtbar wurden. Danach wurden die Gele unter sichtbarem Licht fotografiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Passagieren von Zellen

Die HeLa-S3 und die H2B-GFP-HeLa Zellen sind adhärente, epitheliale Zelllinien, die bei 37 °C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) CO₂ in 10 ml Zellkulturflaschen kultiviert wurden. Beide Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 90% passagiert, was üblicherweise nach jedem zweiten bis dritten Tag erfolgte. Zuerst wurden die Zellen mit 10 ml 37°C warmen PBS vorsichtig gewaschen, um das Medium vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml 0,25%igen Trypsin solange verdaut, bis sie sich durch Schütteln vom Boden lösten. Durch die sofortige Zugabe von 9,5 ml 37°C warmen Medium, wurde das Trypsin neutralisiert und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt, um sie zu vereinzeln. Die Zellsuspension wurde dann 1:5 bis 1:10 verdünnt. Davon wurden 10 ml in eine neue Flasche überführt und in den Brutschrank gestellt. Die H2B-GFP-HeLa Zellen wurden mit 100 µg/ml Gentamycin (Gibco) kultiviert. Für die Messungen am Mikroskop wurden die Zellen einen Tag zuvor gesplittet und in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:6 ausgesät. Je 1 ml der Verdünnung wurde in eine Kammer, in der sich ein steriles Deckglas befand, einer 12-well Platte pipettiert. Wichtig war, dass die Zellen am folgenden Tag nicht zu dicht waren, damit sich die Zellen am Boden des Deckgläschen (15 x 15 mm²) ausbreiten konnten, was die Mikroinjektion in das Zytoplasma erleichterte.

Einfrieren von Zellen

Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Um das Überleben der Zellen zu gewährleisten wurde das Frostschutzmittel DMSO beigemischt, welches die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens verhindert. Die Zellen ließ man bis zu einer Konfluenz von circa 90% wachsen, dann wurden sie trypsinisiert und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 5 min lang bei 1.000 x g zentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium (90% FBS und 10% DMSO) vorsichtig resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert. Optimal sollten die Zellen dann pro Minute um ein Grad abgekühlt werden. Um die Zellen extrem langsam einzufrieren, wurden die Röhrchen vereinzelt in eine mit Zellstoff ausgelegte Styroporbox gelegt und über Nacht in den -80°C Gefrierschrank gestellt. Danach wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt.

Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und dabei nicht geschüttelt, um ein Zerreißen der Zellen zu vermeiden. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit vorgewärmtem Medium gemischt und 5 min lang bei 1.000 x g zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und in einer 10 ml Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.2.2 Immunhistochemische Methoden

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Für fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern kultiviert und verschieden lange mit 5 ng/ml IFN γ (0, 1, 5, 10, 15, 30, 45 min; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h und über Nacht) inkubiert, um den Effekt des IFN γ auf endogenes STAT1 zu testen. Die Deckgläser wurden zuerst zweimal mit eiskaltem PBS gespült, 5 min lang mit Methanol bei -20°C fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Deckgläser für 1 h mit 3% BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit einem STAT1 spezifischen Primärantikörper in einer 1:500 Verdünnung in PBS mit 3% BSA für 1 h inkubiert und fünfmal mit PBS gewaschen, um die überschüssigen Antikörper (Ab) vollständig zu entfernen. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit dem Sekundärantikörper Ziege anti-Maus-IgG-AF635 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS mit 3% BSA versetzt und ebenfalls 1 h lang inkubiert. In diesem Schritt bindet der zweite Antikörper an den ersten und markiert indirekt das endogene STAT1 in den Zellen. Um einen Hintergrund mit dem Sekundärantikörper zu vermeiden, wusch man die Deckgläser fünfmal mit PBS. Die Deckgläser wurden für die Messung am Mikroskop in Edelstahlkammern eingesetzt und mit PBS bedeckt, um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden.

3.2.2.3 Mikroskopische Methoden

Mikroinjektion und Messung am konfokalen Laserscanning Mikroskop

Für die Mikroinjektion wurden die Deckgläser mit den kultivierten Zellen in Edelstahlkammern eingesetzt und mit Medium (ohne Phenolrot) bedeckt. Das Medium wurde mit 20 mM HEPES versetzt um den pH-Wert konstant zu halten. Die zu injizierenden Proteine wurden mit TB auf eine Konzentration von 7 μ M verdünnt und um Aggregate in der Proteinlösung zu vermeiden, bei 22.000 x g 15 min lang bei 4°C zentrifugiert. Femtotip 2 Mikroinjektionsnadeln (Eppendorf) wurden mit 3 μ l Lösung befüllt und an den FemtoJet Mikroinjektor (Eppendorf) angeschlossen. Die Lösungen wurden mit einem Druck von 40 bis 60 fPa 1 s lang in das Zytoplasma der Zellen injiziert.

Alle Messungen erfolgten am konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta (Zeiss) und wurden unter physiologischen Bedingungen im Inkubator XL-LSM (Zeiss) des

Mikroskops bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von einer Stunde nach der Injektion beobachtet und alle 15 min wurde ein Bild aufgenommen. Bei der IFN γ -Inkubation wurde das Zytokin unmittelbar nach der Mikroinjektion in das Medium pipettiert. Für die Anregung der AF488 und FITC Farbstoffe wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt und für die Detektion der Fluoreszenz ein Bandpassfilter von 500-530 nm verwendet. Für den Farbstoff ATTO647N wurde ein HeNe-Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm und ein Langpassfilter von 650 nm verwendet. Weiterhin wurden im Strahlengang ein Hauptfarbteiler UV/488/543/633 und ein NebenfARBteiler NFT545 eingesetzt. Für alle Versuche wurde das 63x Öl-Objektiv 63x NA 1.40 Oil "Plan-Apochromat" DIC M27 (Zeiss) benutzt. Die Bilder wurden mit einer Pixelverweildauer von 1,61 μ s aufgenommen.

Quantitative Auswertung von Fluoreszenzintensitäten

Die quantitative Analyse der subzellulären Verteilung der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte unter Verwendung des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ (W. S. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008). Für die Bestimmung der intranukleären Ovalbuminkonzentration wurden die Fluoreszenzintensitäten im Nukleoplasma (Nu) und im Nukleolus (No) von 19 mikroinjizierten Zellen gemessen und davon jeweils die Intensität des Hintergrundes abgezogen. Die gemessenen Intensitätswerte des Ovalbumins wurden auf 1 normiert und mit den Standardabweichungen in ein Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. Dazu wurde das Programm Origin 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) verwendet.

Für die Bestimmung der Importrate wurden die Fluoreszenzintensitäten im Zytoplasma und im Zellkern wie oben beschrieben bestimmt und der Quotient von nukleärer zu zytoplasmatischer Fluoreszenzintensität errechnet. Für jede Proteinvariante wurden 10 bis 15 Zellen analysiert (Speil *et al.*, 2009).

Einzelmolekülmikroskop

Das Einzelmolekülmikroskop ist ein auf Sensitivität und Aufnahmegeschwindigkeit hin optimiertes Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3.1), das zur Detektion und räumlich-zeitlichen Verfolgung einzelner Moleküle verwendet wird. Es basiert auf ein inverses Mikroskopstativ Axiovert 200TV (Zeiss). Zur Fluoreszenzanregung wurde ein Cobalt-Laser (Cobolt Dual Calypso, 100 mW) mit den Wellenlängen von 488 und 532 nm und ein Dioden-Laser (Cube 635, 25 mW, Coherent, Santa Clara, USA) mit einer Wellenlänge von 635 nm eingesetzt. Über den AOTF wurde die Intensität und Wellenlänge des Laserstrahles gesteuert. Nach Passieren des AOTFs wurde der Laserstrahl in eine Glasfaser eingekoppelt und zum Mikroskop geleitet. Dort wurde der Laserstrahl über den Dichromat auf die Probe gelenkt und Fluoreszenz angeregt.

Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde über denselben Strahlengang zurückgelenkt und mit einer hochsensitiven EM-CCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) -Kamera iXon DV 860-BI (Andor Technologies, Belfast, Ireland) detektiert. Die Kamera wird zur Reduktion des thermischen Rauschens mit Hilfe eines Peltier-Elements, das an eine Wasserkühlung angeschlossen ist, auf ungefähr -90°C gekühlt. Um das reflektierte

Laserlicht im Detektionsstrahlengang auszublenden, wurde für jede Laserwellenlänge ein Notch-Filter (488, 532, 633 nm) eingebaut und das anregende Laserlicht geblockt. Für die Kinetikmessungen wurde das 63x Öl-Objektiv 63x NA 1.40 Oil "Plan-Apochromat" DIC M27 (Zeiss) und das 63x Öl-DIC-Objektiv 63x NA 1.3 Imm Korr LCI "Plan-Neofluar" DIC M27 (Zeiss) verwendet. Die EM-CCD-Kamera enthält einen Chip mit 128 x 128 Pixel von jeweils einer Pixelgröße von 24 x 24 μm^2 . Die 4-fache Vergrößerungsoptik in Kombination mit der 63er Vergrößerung des Objektivs ergab dann effektiv eine Pixelgröße von 95,2 x 95,2 nm^2 und somit hatte der gesamte Aufnahmebereich eine Größe von 12,2 x 12,2 μm^2 . Zur Steuerung der Kamera wurde die Software SOLIS (Andor) mit hohen Bildaufnahmezeiten von 100 bis 200 Hz verwendet. Das entsprach einer Belichtungszeit von 5 bis 10 ms. Mit diesen Einstellungen wurden Aufnahmesequenzen von 1000 bis 2000 Einzelbilder aufgenommen und analysiert (Siebrasse *et al.*, 2007; Veith *et al.*, 2006).

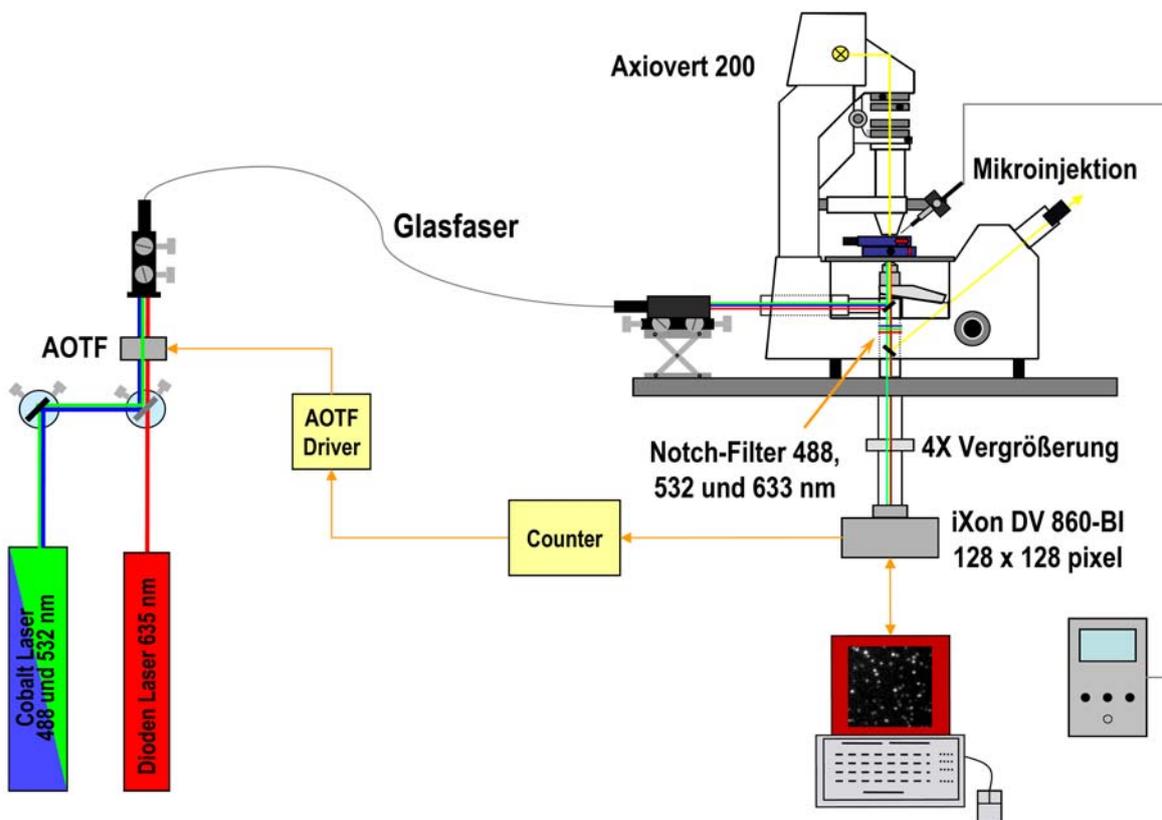


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Einzelmolekülmikroskopbaus.
Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert aus (Siebrasse *et al.*, 2007).

Auflösungsvermögen und Lokalisierungsgenauigkeit der Signale am Einzelmolekülmikroskop

Das Auflösungsvermögen quantifiziert die Unterscheidbarkeit von einzelnen Partikel (Pedrotti *et al.*, 2008). Da die einzelnen Partikel deutlich kleiner als das Auflösungsvermögen sind, werden sie als „beugungsbegrenzte Signale“ abgebildet. Die

radialsymmetrische Intensitätsverteilung dieser beugungsbegrenzten Signale in der Bildebene wird als Airyfunktion bezeichnet. Wenn sich zwei Objektpunkte näher kommen und das Intensitätsmaximum des ersten Objektes sich im ersten Intensitätsminimum der Airyscheibe des zweiten Objektes befindet, können die Signale der beiden Objektpunkte nach Rayleigh gerade noch voneinander getrennt werden (Abb. 3.2).

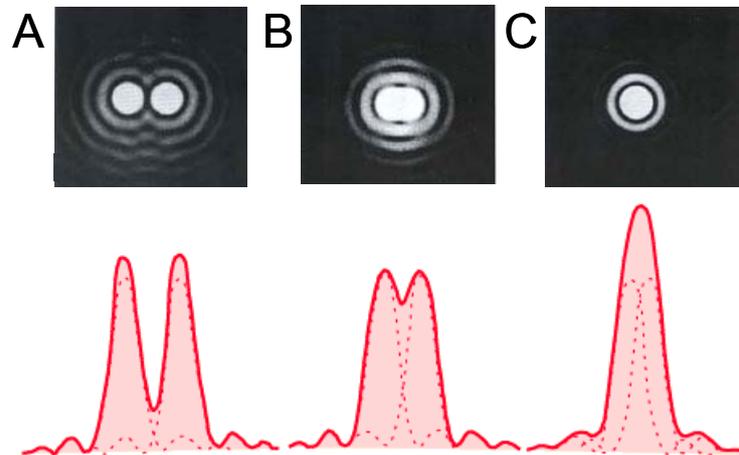


Abbildung 3.2: Das Auflösungsvermögen nach dem Rayleigh-Kriterium. Die oberen Bilder zeigen die Airyscheiben von sich zwei näher kommenden beugungsbegrenzten Punkten. (A) Die Maxima der Punkte liegen weit genug auseinander um beide Objekte eindeutig zu unterscheiden. (B) Das Maximum des einen Beugungsmusters fällt in das Minimum des anderen und dadurch können sie nach Rayleigh gerade noch aufgelöst werden. (C) Der Abstand zwischen den beiden Punkten ist zu klein um sie noch auflösen zu können. Grafik modifiziert von [URL 1].

Die laterale und axiale Auflösung wird anhand des Rayleigh-Kriteriums mit den folgenden Gleichungen angenähert:

$$r_{xy} = \frac{0,61\lambda_0}{n \sin \alpha} = \frac{0,61\lambda_0}{NA} \quad (3.3)$$

$$r_z = \frac{\lambda_0}{2n \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad (3.4)$$

- n Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektiv
- α Halber Öffnungswinkel
- λ Detektionswellenlänge [μm]
- NA Numerische Apertur

Das laterale Auflösungsvermögen entspricht bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer numerischen Apertur von 1,4 ungefähr 210 nm. Die Airyfunktion kann auch durch eine zweidimensionale Gaußfunktion angenähert werden (Kues, 2001). Dadurch kann man die genaue Position des Signals bestimmen, indem man durch einen Fitprozess das Zentrum der Intensitätsverteilung ermittelt.

Die Lokalisierungsgenauigkeit ist ein Maß dafür, wie genau die Position eines einzelnen beugungsbegrenzten Signals von einem Teilchen, das kleiner als das Auflösungsvermögen des Mikroskops ist, bestimmt werden kann und hängt vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SVR) ab (Kubitscheck *et al.*, 2000). In allen Messungen wurden Fluorophore mit hoher Fluoreszenzausbeute und Photostabilität (ATTO und Alexa Fluor Farbstoffe) verwendet und in nanomolarer Konzentration eingesetzt, um ein gutes SVR zu erlangen und das Hintergrundrauschen zu minimieren.

Für die Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit, wurde die fluoreszenzmarkierten Proteine in einem 2%igen Agarosegel auf eine pikomolare Konzentration verdünnt und auf ein Deckglas pipettiert. Nach der Aushärtung des Gels, in dem die Moleküle vollkommen immobil vorlagen, wurde das Deckglas in eine beheizbare Edelstahlkammer gesetzt und mit PBS bedeckt. Die Messung wurde bei 37°C mit dem 63x Öl-Objektiv mit einer NA von 1,4. durchgeführt. Für die Experimente bei 37°C wurde ein spezielles Immersionsöl (Type 37 DF, Cargille) verwendet, dass bei 37°C einen Brechungsindex von 1,515 hat. Die Belichtungszeit betrug 5 ms und die Aufnahmezeit 191,57 Hz. In den Aufnahmen wurden die Moleküle als beugungsbegrenzte Lichtflecken lokalisiert (Abb. 3.3). Um die laterale Auflösung der Partikel zu bestimmen, wurde mittels ImageJ entlang der x und y Richtung die Intensitätsverteilung aufgetragen.

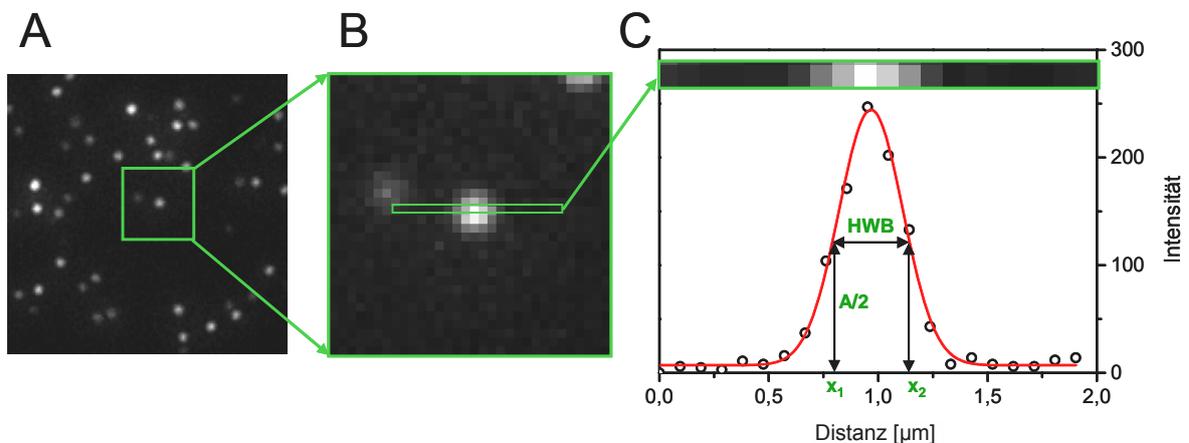


Abbildung 3.3: Ermittlung der Halbwertsbreite und Lokalisierungsgenauigkeit eines Partikels durch Anpassung einer zweidimensionalen Gaußfunktion. (A) Dieses Einzelmolekülbild zeigt den gesamten Aufnahmebereich von 128 x 128 Pixel, das entspricht einer Größe von 12,2 x 12,2 μm^2 . Es sind die einzelnen immobilen Partikel auf dem Deckglas zu sehen. (B) In diesem Bild ist die Vergrößerung eines Signals zu sehen, die Fläche des Objektfeldes hat eine Größe von 3 x 3 μm^2 . In ImageJ wird ein 1 Pixel breiter Balken (Grün) über das gesamte Signal und das Signalmaximum gelegt, und die Intensität pro Pixel gemessen. (C) Die Intensitätsverteilung wird in Origin 8.0 in einem Graphen gegen die Distanz aufgetragen, mit einer Gaußfunktion angepasst und so die HWB ermittelt.

Die so erhaltene Intensitätsverteilung des Partikels kann durch eine Gaußfunktion angepasst werden und somit das Maximum des Signals unter Berücksichtigung des Rauschsignals B_0 ermittelt werden. Die Gleichung für die Gaußsche Normalverteilung lautet:

$$I(x) = B_0 + A_0 \cdot \exp\left[-\frac{(x - x_0)^2}{2\sigma_x^2}\right] \quad (3.5)$$

x_0	Ort des Maximums der Verteilung
σ	Standardabweichung
A_0	Amplitude
B_0	Konstanter Rauschuntergrund

Ein weiteres Maß für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ist die Halbwertsbreite (HWB). Die HWB ist der Abstand zwischen den Orten x_1 und x_2 , an denen die Intensität auf die halbe Signalthöhe über dem Hintergrund abgefallen ist, sie lässt sich auch mit der Standardabweichung nach dieser Gleichung berechnen:

$$\text{HWB} = [x_1 - x_2] = 2\sigma\sqrt{2\ln 2} \quad (3.6)$$

In x-Richtung ergab sich eine mittlere HWB für Ovalbumin-ATTO647N von 300 ± 10 nm. Aus der Varianz der ermittelten Molekülpositionen in x- und y-Richtung kurz hintereinander liegender Zeitpunkte wurde dann eine Lokalisierungsgenauigkeit für Ovalbumin-ATTO647N von ungefähr 10 nm bestimmt.

Mikroinjektionsmessungen am Einzelmolekülmikroskop

Die Deckgläser mit den am Vortag ausgesäten Zellen wurden in eine beheizbare Edelstahlschale eingesetzt und mit vorgewärmten phenolrotfreiem Medium, dem frisch HEPES-Puffer auf eine Endkonzentration von 20 mM zugesetzt wurden, bedeckt. Zuvor wurden die zu injizierenden Proteine GST-NLS und Ovalbumin in TB auf 1 bis 10 nM verdünnt. Die STAT1-Proteine wurden bei einer Konzentration von 7 nM eingesetzt. Die Referenzproteine NTF2, TAT-FITC und R9-Tamra wurden auf eine Konzentration von 100 nM und die FITC-Dextrane mit einem Molekulargewicht von 40 und 500 kDa auf 2 μ M verdünnt. NTF2 wurde bei allen STAT1-Experimenten in das Zytoplasma ko-injiziert, da es selektiv an den NPC bindet und somit die Kernmembran markiert um den Zellkern und das Zytoplasma gut voneinander zu unterscheiden. TAT-FITC und R9-Tamra wurden verwendet um die Nukleoli zu markieren. Das FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 500 kDa wurde in den Nukleus injiziert um die exakte Größe der Nukleoli mittels Größenausschluss zu bestimmen. Somit konnte man die Nukleoli von dem restlichen Nukleoplasma differenzieren. Die Proteinlösungen wurden zusammengemischt und bei 22.000 x g 15 min lang bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Mikroinjektionsnadeln (Femtotip 2, Eppendorf) mit 3 μ l Lösung befüllt und an den FemtoJet Mikroinjektor (Eppendorf) angeschlossen. Die Lösungen wurden mit einem Druck von 40 bis 60 fPa 1 s lang in das Zytoplasma der Zellen injiziert. Die Messungen wurden bei 37°C unter der Verwendung des auf 37°C normierten Immersionsöls (Type 37 DF, Cargille) durchgeführt. Bei der STAT1-Aktivierung wurde nach der Mikroinjektion die IFN γ -Lösung direkt in das Medium pipettiert und eine halbe Stunde lang inkubiert. Die Deckgläser mit den Zellen wurden nach mindestens einer Stunde ausgewechselt. ATTO647N wurde bei 635 nm mit

dem Diodenlaser angeregt, FITC sowie AF488 wurden bei 488 nm und Tamra bei 532 nm mit dem Cobalt-Laser angeregt.

Für die Ovalbuminmessungen wurde das 63x Öl-DIC-Objektiv 63x NA 1.3 Imm Korr LCI "Plan-Neofluar" DIC M27 (Zeiss) mit einem Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Prisma benutzt, um mittels DIC Aufnahmen die Nukleoli vom restlichen Nukleoplasma unterscheiden zu können. Die durch die DIC-Prismen erzeugten hellen und dunklen Ränder in den DIC-Aufnahmen, um die Nukleoli plastisch darzustellen, führten zu einer vergrößerten Darstellung der abgebildeten Nukleoli. Dadurch konnten die Umrisse aber nicht die Größe und Position der Nukleoli bestimmt werden. Die Größe und Position der Nukleoli in den DIC-Aufnahmen wurden nachträglich mit Fluoreszenzaufnahmen von markierten Nukleoli verglichen und korrigiert (s. nächster Abschnitt). Die Position der Kernmembran wurde durch das NTF2 Signal ermittelt. Es wurden 38 Filme von 24 Zellkernen, die mit den Dioden-Laser (635 nm) beleuchtet wurden, mit 1000 Bildern einer Bildrate von 191,6 Hz und einer Belichtungszeit von 5 ms (Auslesezeit 0,22 ms pro Bild) aufgenommen. Davor und danach wurden immer ein DIC-Bild und ein kurzer Film mit 50 Bildern von NTF2 aufgenommen, um zu kontrollieren, ob sich die Zelle während der Aufnahme bewegt hat und um die Position und Größe des Nukleoplasmas und der Nukleoli zu bestimmen. Mittels ImageJ wurden dann in den Ovalbuminfilmen unter der Verwendung der Referenzbilder -und filme die jeweils zu untersuchende Region markiert, ausgeschnitten und als neuer Film gespeichert. Dadurch konnten die Ovalbuminmoleküle in den beiden intranukleären Strukturen getrennt ausgewertet werden.

Für die STAT-Messungen wurde das 63x Öl-Objektiv 63x NA 1.40 Oil "Plan-Apochromat" DIC M27 (Zeiss) verwendet. Es wurden Sequenzen bestehend aus 1000 bis 2000 Bilder mit einer Bildrate von 191,6 Hz und einer Belichtungszeit von 5 ms mit 635 nm aufgenommen. Vor und nach der Sequenz wurde ein Film mit 50 Bildern mit 488 nm aufgenommen, um die Position der Membran mittels NTF2 zu bestimmen und eine Zellbewegung während der Aufnahmen festzustellen. Für jede Proteinvariante wurden mindestens 6 bis 15 Zellen untersucht und pro Zelle wurden 2 bis 8 Filme aufgenommen.

Korrektur der Aufnahmen mit Differentialinterferenzkontrast (DIC)

Aufnahmen mit DIC wurden herangezogen, um die exakten Umrisse des Nukleolus zu lokalisieren. Da aber bei diesen Aufnahmen durch die plastische Darstellung die Nukleoli größer dargestellt wurden und somit deren exakte Position nicht bestimmt werden konnte, wurde die Position und Größe der Nukleoli durch Fluoreszenzaufnahmen korrigiert.

Durch die Mikroinjektion von R9-Tamra, welches im Nukleolus akkumuliert, wurden die Nukleoli fluoreszenzmarkiert und durch die nukleare Injektion von 500 kDa Dextranen, wurde das restliche Nukleoplasma markiert. Die Umrisse der fluoreszenzmarkierten Regionen waren durch die Weitfeld-Aufnahmen unscharf, dafür konnte aber die Position und die Größe der Nukleoli exakt ermittelt werden um die Umrisse der Nukleoli in den DIC-Bildern in die richtige Position zu verschieben und deren Größe zu korrigieren. Von den DIC und Fluoreszenzaufnahmen wurden die Umrisse der Nukleoli in ImageJ markiert und der Schwerpunkt bestimmt. Insgesamt wurden 5 Zellen vermessen. Die ermittelten Differenzen zwischen den DIC- und den Fluoreszenzaufnahmen waren immer gleich.

Somit wurden die Grenzen der Nukleoli in allen DIC-Bildern in die richtige Position verschoben und deren Größe korrigiert. Die ermittelten Umriss der Nukleoli konnten abgespeichert und in den dazugehörigen Ovalbuminsequenzen geladen werden. Durch Ausschneiden der gewünschten Regionen war es möglich die einzelnen Ovalbuminmoleküle im Nukleolus und Nukleoplasma separat auszuwerten (Speil *et al.*, 2009).

Einzelpartikeltracking

Einzelpartikeltracking ist eine Methode, um die Position der aufgenommenen Partikel zu identifizieren und ihre Bewegung zu verfolgen. Für die Auswertung der Ovalbuminfilme wurde das ImageJ Plugin „ILTracker“ (Ingo Lepper Software, Münster, Deutschland) verwendet, das speziell für die Verfolgung von Einzelpartikelsignalen entwickelt wurde. Das Einzelpartikeltracking mit dem ILTracker erfolgte manuell. Mit diesem Plugin wurden die genauen Positionen der Signale bestimmt, indem deren Intensitätsverteilungen mit einer zweidimensionalen Gaußfunktion gefittet und die x- und y-Positionen der Maxima gespeichert wurden. Zwischen den Bildern einer Sequenz liegt eine definierte Zeitspanne, in der sich das Partikel nur mit einer erwartenden Sprungdistanz bewegen kann. Das Dreifache der Wurzel des mittleren Verschiebungsquadrats (RMS) definiert ein Intervall, indem sich 99,7% der möglichen Sprungdistanzen befinden, die ein Partikel per Diffusion in der Zeit t zurücklegen kann (Veith, 2007). Diese erwartete Sprungdistanz berechnet man über diese Gleichung:

$$r_{\max} = 3 \cdot \text{RMS} = 3 \cdot \sqrt{4D\Delta t} \quad (3.7)$$

r	hydrodynamischer Radius [m]
RMS	Wurzel des erwarteten mittleren Verschiebungsquadrat (Root mean square)
D	Diffusionskoeffizient [m^2/s]
T	Zeit [s]

Die theoretische Berechnung des Diffusionskoeffizienten D eines Partikels mit einem hydrodynamischen Radius r , das sich in einer Lösung der Viskosität η bei der absoluten Temperatur T bewegt, erfolgt über die Stokes-Einstein-Gleichung (Atkins *et al.*, 2006):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (3.8)$$

k	Boltzmann-Konstante [$1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$]
T	Temperatur [K]
η	Viskosität der Lösung [$\text{kg/m}\cdot\text{s}$]

Die Signale, die keinen größeren räumlichen Abstand als 3RMS aufwiesen, wurden zu einer Trajektorie (Bewegungspfad) verknüpft (Abb. 3.4). Die Proben wurden hoch verdünnt eingesetzt, damit die Partikel in den Aufnahmen eindeutig einander zugewiesen werden konnten und es zu keinen Falschzuweisungen kam.

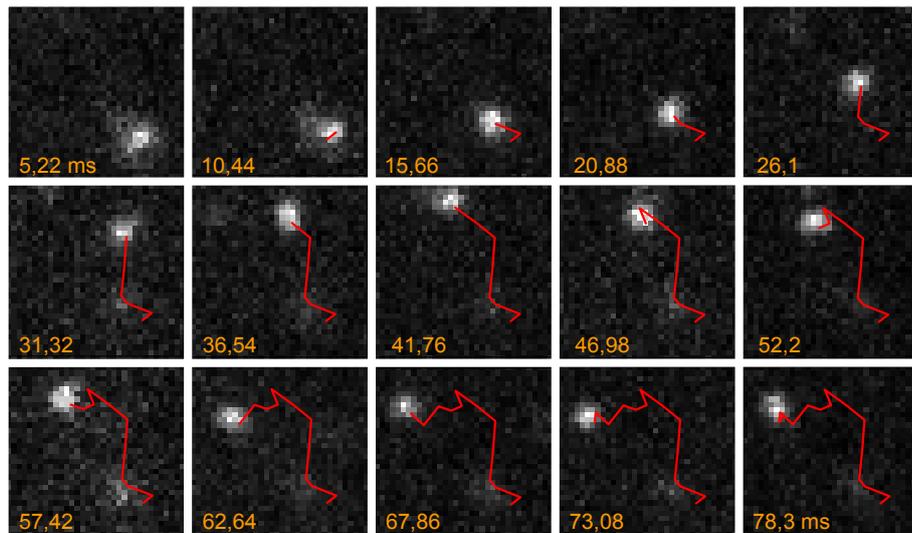


Abbildung 3.4: Einzelpartikeltracking. Die Bildsequenz zeigt die schrittweise Verfolgung eines Moleküls mit verschiedenen langen Sprungweiten. Die Filmsequenz wurde mit einer Belichtungszeit von 5 ms und einer Bildrate von 191,6 Hz aufgenommen. In jedem Bild wurde die Position des Maximums des Signals mit einer zweidimensionalen Gaußfunktion angenähert, die Positionen gespeichert und anschließend zu einer Trajektorie zusammengefügt. Die Trajektorie zeigt die gesamte Bewegung eines Moleküls über einem Zeitraum von 78 ms. (Objektfeld, $3,3 \times 3,3 \mu\text{m}^2$).

Die STAT1-Filme wurden aufgrund der großen Datenmenge mit dem Trackingprogramm Diatrack 3.01 (Semasoft) ausgewertet. Mit diesem Programm erfolgte das Tracking mit einer automatischen Suchroutine. In Diatrack wurden die Filme geladen, der Hintergrund abgezogen und ein Schwellenwert für die Intensität eingestellt, um die Signale nach ihrer Intensität zu selektionieren. Das Maximum von jedem Signal wurde mit einer zweidimensionalen Gaußfunktion angenähert und nach Eingabe des 3RMS wurden die Koordination automatisch zu Trajektorien verbunden (Veith, 2007). Wenn durch starke Schwankungen des SNR Trajektorien abgebrochen wurden, wurde der Schwellenwert neu gesetzt oder über die betreffenden Regionen ein ROI gesetzt.

Sprungweitenanalyse

Mit dieser Analyse kann man Populationen unterschiedlicher Beweglichkeit differenzieren und Diffusionskoeffizienten verschiedener Molekülpopulationen eines Proteins getrennt ermitteln. Die Berechnung der Diffusionskoeffizienten wurde mit dem Programm Origin 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die mit ILTracker und Diatrack erstellten Trajektorien wurden importiert und davon die Sprungweiten berechnet. Mit speziellen Skripten (Siebrasse *et al.*, 2008; Veith, 2007) wurden alle „ersten“ Sprungdistanzen JD1 (Jump Distance 1), das sind die Vektorlängen zwischen den Positionen eines Partikels in zwei direkt aufeinander folgenden Bildaufnahmen, ermittelt (Abb. 3.5). Es konnten auch die Sprungdistanzen bis zum zweiten Bild (JD2), dritten Bild (JD3), vierten Bild (JD4), usw. bestimmt werden.

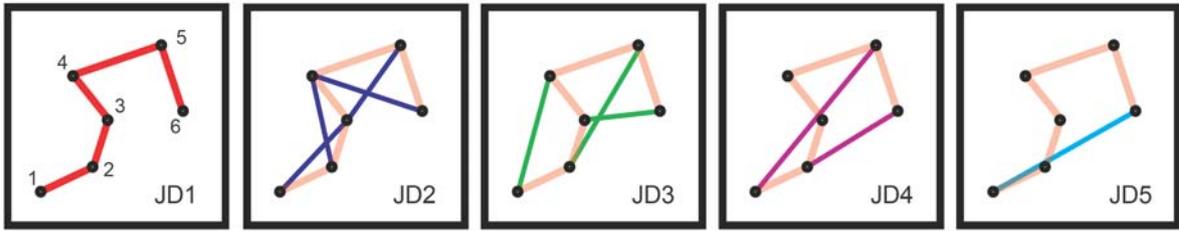


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung einer Sprungweitenanalyse: Die schwarzen Punkte veranschaulichen die Positionen des Partikels und die roten Linien die Sprungweiten JD1 zwischen allen aufeinander folgenden Bildern. Die Sprungweiten JD2 (Blau) entsprechen den Distanzen zwischen jedem zweiten Bild, die JD3 (Grün) zwischen jedem dritten Bild, etc.

Die Bewegungen der Partikel wurden in einem Objektbereich von $12,2 \times 12,2 \mu\text{m}^2$ verfolgt und gaben keine Information auf die Mobilitäten der Partikel entlang der Z-Achse. Die Sprungdistanzen mit größeren zeitlichen Abständen (JD10) verwendete man, um nur sehr langsame Bewegungen oder immobile Partikel zu untersuchen. Die Wahrscheinlichkeit über längere Zeiträume langsame Partikel zu beobachten ist höher, da die schnellen Partikel weniger Zeit benötigen, um den Fokus zu durchqueren.

Die Verteilung der Sprungweiten wurde mittels eines Histogramms dargestellt. Die absoluten Häufigkeiten der Verteilung wurden in relative Sprungweithäufigkeiten umgerechnet. Im Diagramm wurde die relative Häufigkeitsdichte (y) gegen die Sprungweiten (x) in nm aufgetragen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Partikel ausgehend vom Startpunkt nach einer Zeit t in einem Kreisring mit dem Radius r gefunden werden kann, wird über eine Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion angenähert.

$$p(r, t) dr = \frac{1}{4\pi D \Delta t} e^{-r^2/(4D\Delta t)} 2\pi r dr \quad (3.9)$$

Setzt sich eine Probe aus Populationen unterschiedlicher Beweglichkeit zusammen, so wurde die Sprungweitenverteilung mit der folgenden Funktion angenähert:

$$y = \sum_{i=1}^4 x \cdot \frac{A_i}{2D_i t} \cdot e^{\frac{-x^2}{4000 \cdot D_i \cdot t \cdot \text{ms}}} \quad (3.10)$$

- A_i Relativer Anteil der Komponente
- D_i Diffusionskoeffizient der Komponente in $\mu\text{m}^2/\text{s}$

Durch die Anpassung der Funktion an das Histogramm wurde der Diffusionskoeffizient des Partikels bestimmt, bei Populationen mit verschiedener Beweglichkeit wurden bis zu vier verschiedene Diffusionskoeffizienten bestimmt. Die Parameter D und A wurden angepasst, um eine minimale Abweichung der Funktion zu erreichen. Um die relativen Anteile der verschiedenen identifizierten Populationen untereinander zu vergleichen,

wurde die Funktion auch mit fix gesetzten Parametern angepasst (Siebrasse *et al.*, 2007; Siebrasse *et al.*, 2008; Speil *et al.*, 2009).

Die Ermittlung der Bindungsdauer

In Zellen, in denen Ovalbumin-ATTO647N-Moleküle wiederholt an derselben Stelle beobachtet wurden, wiesen die Moleküle eine Lokalisierungs-genauigkeit in x- und y-Richtung von ungefähr 47,6 nm (0,5 Pixel) auf. Um die Bindungsdauer der Partikel zu bestimmen, wurden alle ermittelten Trajektorien nach Länge der Sprungweiten sortiert. In Origin 8.0 wurden mit einem Skript (Veith, 2007; Siebrasse *et al.*, 2009) alle Sprünge die mindestens zweimal hintereinander kleiner als 143 nm (1,5 Pixel) waren, das entsprach der dreifachen Lokalisierungs-genauigkeit, als Bindungsereignisse aussortiert. Solche Bindungen konnten auch innerhalb einer Trajektorie beliebig oft vorkommen. Die Verteilung der ermittelten Häufigkeit der Ereignisse wurde in einem Histogramm gegen die Zeit aufgetragen und mit dieser Gleichung exponentiell gefittet:

$$y = y_0 + A \cdot e^{-x/t} \quad (3.11)$$

Durch die Anpassung der exponentiellen Abnahme an das Histogramm wurde die durchschnittliche Verweildauer t des Proteins in ms abgeschätzt (Kubitscheck *et al.*, 2005; Speil *et al.*, 2009).

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung von fluoreszenzmarkierten Proteinen

4.1.1 Expression und Reinigung der Proteine

4.1.1.1 Präparation von GST-Fusionsproteinen

Das Fusionsprotein GST-NLS wurde in den Mikroinjektionsexperimenten als Kontrolle für den Transportfaktor-abhängigen Kernimport verwendet. Die NLS wird im Zytoplasma von den Importinen erkannt, gebunden und in den Zellkern transportiert. NTF2 wurde in allen Einzelmolekülexperimenten eingesetzt, da es spezifisch an die FG-Wiederholungsmotive der NPCs bindet und dadurch die Zellkernmembran markiert. Somit ist es möglich die Kernhülle mit hoher Lokalisierungsgenauigkeit auf den Fluoreszenzaufnahmen zu bestimmen, um den Zellkern von der restlichen Zelle zu unterscheiden und auch getrennt auswerten zu können.

Die einzelnen Schritte der Proteinpräparation und Aufreinigung wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert. Die mit Coomassie gefärbten Gele sind in Abbildung 4.1 zu sehen. Auf der Bahn M wurde der Proteinmarker aufgetragen. Die Molekulargrößen der im Marker enthaltenen Proteine sind neben den Proteinbanden angegeben. Anhand des Markers können die Molekulargewichte der Proben abgeschätzt werden. In Bahn 1 (Abb. 4.1 A) wurde das geklärte Bakterienlysat aufgetrennt. Es weist eine sehr starke Proteinbande mit einer Größe von kleiner 30 kDa auf, das dem Molekulargewicht von GST-NLS entspricht. Das GST aus dem pGEX-Vektor (GST von *Schistosoma japonicum*) hat eine Größe von 26 kDa und die SV 40 NLS eine Größe von 0,9 kDa. In den Bahnen 2 bis 6 wurden die aufgefangenen Eluate der GST-Säule aufgetragen. Es ist jeweils eine einzelne Proteinbande in der Bahn 2 und 3 bei einer Größe von kleiner 30 kDa zu sehen, die man der Molekulargröße des GST-NLS-Proteins zuordnen kann. Somit befand sich das gesamte eluierte GST-NLS in den ersten beiden Fraktionen. Außerdem ist in dem Gelbild ersichtlich, dass diese beiden Fraktionen keine Verunreinigungen durch andere Proteine enthielten. Diese beiden Fraktionen wurden in einem Amiconfilter vereinigt, umgepuffert, eingengt und anschließend die Konzentration für die Fluoreszenzmarkierung bestimmt. In der letzten Bahn wurde zusätzlich ein fluoreszenzmarkiertes GST-NLS-AF647 als Größenkontrolle aufgetragen.

Die Expression und die Aufreinigung von GST-NTF2 ist in Abbildung 4.1 B zu sehen. In der Bahn 1 wurde wieder das Bakterienlysat aufgetragen. Nachdem das Bakterienlysat mit der Glutathion-Sepharose inkubiert worden war, wurde die Sepharose zentrifugiert und der Überstand als zusätzliche Kontrolle in der Bahn 2 aufgetrennt. Die aufgefangenen Eluate wurden in den Bahnen 3 bis 5 aufgetragen. GST-NTF2 hat eine Größe von

ungefähr 40 kDa, es besteht aus dem GST-Teil mit etwa 26 kDa und dem 15 kDa großen NTF2. Die GST-NTF2-Proteinbanden kann man bei einer Größe von circa 40 kDa in allen drei Bahnen erkennen. Jedoch war der Proteingehalt der in den Bahnen 4 und 5 aufgetragenen Eluate im Vergleich zu dem in der Bahn 1 aufgetragenen Eluat vernachlässigbar klein. Deswegen wurde nur von der Proteinlösung der ersten Fraktion ein Verdau mit Thrombin angesetzt, um das GST-NTF2-Fusionsprotein zu spalten. In der letzten Bahn wurde das mit Thrombin-verdaute aufgereinigte NTF2-Protein aufgetragen. In den Bahnen 3 und 6 sind auch Verunreinigungen durch andere Proteine zu sehen, da aber NTF2 nur für die Kernporenmarkierung eingesetzt wurde, wurde dieser geringe Anteil an Fremdproteinen nicht durch eine Wiederholung der Affinitätschromatographie ein zweites mal gereinigt. Von dem aufgereinigten NTF2 wurde dann die Konzentration für die darauf folgende Markierung mit dem Farbstoff bestimmt.

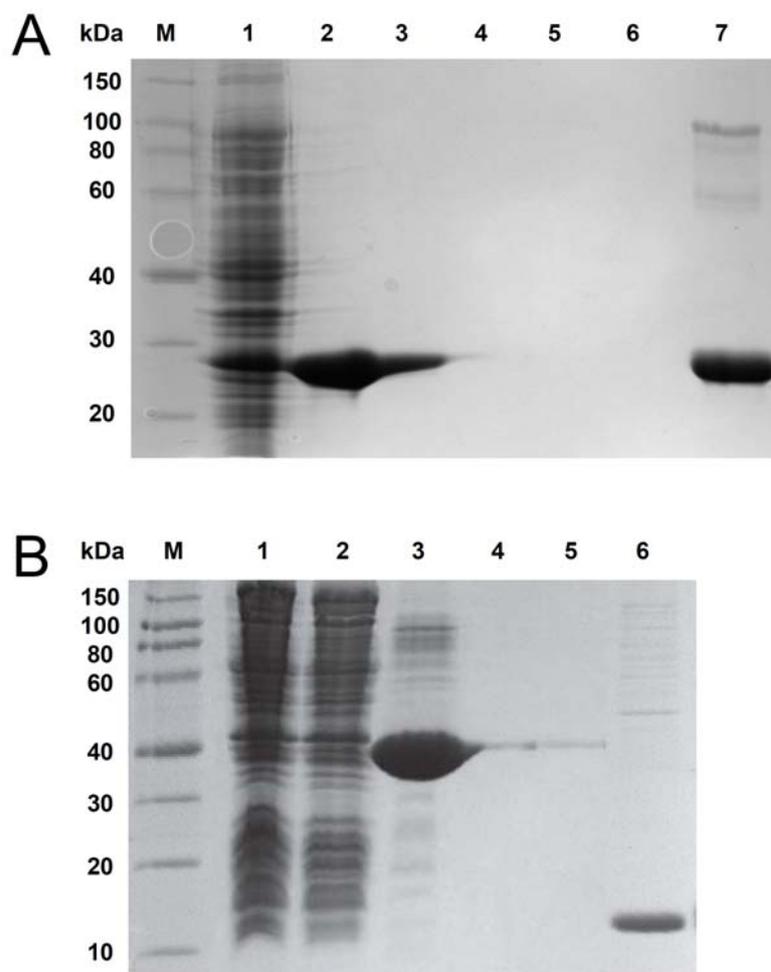


Abbildung 4.1: GST-Expression: Polyacrylamidgelle mit Coomassie gefärbt. (A) Auf dem Gel wurden das Bakterienlysate und die Eluate der GST-NLS Expression und GST-Aufreinigung aufgetragen. Die Bande M zeigt den Proteinmarker, die Banden 2 bis 6 zeigen die einzelnen Eluate und die Bande 7 ein bereits hergestelltes und mit AF647 markiertes GST-NLS als Kontrolle. (B) Auf dem Gel wurden die Überstände und Eluate der GST-NTF2 Expression und Aufreinigung aufgetragen. M: Proteinmarker, 1: Bakterienlysate, 2: Überstand nach dem Binden des GST-NTF2 an die Glutathion-Sepharose, 3-5: Eluate und 6: aufgereinigtes NTF2 nach dem Thrombinverdau.

4.1.1.2 Präparation des STREP-Fusionsproteins

In dieser Arbeit sollen die Mobilitäten von verschiedenen STAT1-Proteinen auf Einzelmolekülebene untersucht werden. Das STAT1-wt-Protein sowie das phosphorylierte STAT1-wt-Protein (3.1.5) und das Plasmid mit der STAT1-tc DNA (3.1.3) wurden von Prof. Uwe Vinkemeier (Medizinische Fakultät, Nottingham, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Das STREP-markierte STAT1-wt-Protein wurde in Sf9-Insektenzellen mittels Baculovirus-Expressionssystem hergestellt, da der Wildtyp nur in eukaryotischen Zellen funktionell exprimiert werden kann. Allerdings konnte man die kürzere Deletionsmutante STAT1-tc funktionell in Bakterien exprimieren.

Das STAT1-tc-Protein wurde in *E.coli* exprimiert und anschließend mit einer STREP-Affinitätschromatographie aufgereinigt (3.2.1.2). Das Bakterienlysate der STAT1-tc Expression und die aufgefangenen Fraktionen der STREP-Affinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Reinheit überprüft.

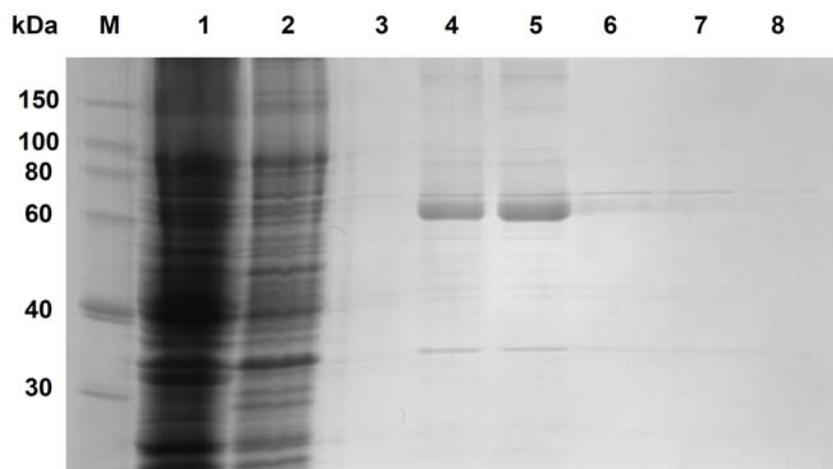


Abbildung 4.2: STAT1-tc-Expression: Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt. M: Protein-marker, 1: Bakterienlysate, 2: Durchlauf nach dem Auftragen des Bakterienlysats auf die STREP-Säule, 3-8: aufgefangene Eluate. Die Bahnen 4 bis 7 zeigen bei über 60 kDa die STAT1-tc (68 kDa)-Banden.

Die erste Bahn zeigt wieder das Bakterienlysate. In der zweiten Bahn wurde der aufgefangene Durchlauf, nach Auftragen des Überstandes auf die STREP-Säule, aufgetrennt. In den darauf folgenden Bahnen von 3 bis 8 wurden dann alle aufgefangenen Eluate aufgetragen. Das STAT1-tc hat ein Molekulargewicht von 68 kDa und war in größeren Mengen im zweiten und dritten Eluat enthalten. Die beiden Eluate wurden in einem Amiconfilter vereinigt, für die anschließende Fluoreszenzmarkierung umgepuffert und eingengt. Danach wurde die Konzentration nach Bradford bestimmt.

4.1.2. Farbstoffmarkierung der Proteine

Das BSA wurde in allen LSM-Experimenten ko-injiziert, um eine Beschädigung der Kernmembran nachzuweisen und auch die Stabilität des Zellkerns über den Zeitraum der Messung zu kontrollieren. Außerdem markiert es die Injektionsstelle in den Zellen, da es zu groß ist, um durch die NPCs zu diffundieren. Nach der Kopplungsreaktion von BSA mit dem Farbstoff AF488 wurde das Reaktionsgemisch gelchromatographisch aufgereinigt und die Reinheit der aufgefangenen Fraktionen mittels SDS-PAGE überprüft. Direkt nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Licht betrachtet, um zu überprüfen, ob sich noch freier Farbstoff in den aufgefangenen Eluaten befand (Abb.4.3 A, unteres Bild). Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (Abb. 4.3 A, oberes Bild). Die Bahn M zeigt den aufgetrennten Marker. In der Bahn 1 wurde die unmarkierte BSA-Lösung aufgetragen, deshalb ist auch auf dem UV-Bild keine Bande zu erkennen. In Bahn 2 wurde das Reaktionsgemisch, welches das gefärbte BSA mit freiem Farbstoff enthielt, aufgetragen. Die Laufstrecke des fluoreszenzmarkierten Proteins ist im Vergleich zum ungefärbten BSA etwas kürzer, da es durch den gebundenen Farbstoff ein größeres Molekulargewicht besitzt. Das gefärbte BSA (66 kDa) ist im UV-Bild in Bahn 2 als Bande bei ungefähr 60 kDa zu erkennen. Als zweite Bande ist der ungebundene Farbstoff bei der Lauffront des Gels (kleiner 20 kDa) zu sehen. In den Bahnen 3 bis 9 wurden die aufgefangenen Eluate aufgetrennt. Im UV-Bild ist in den einzelnen Fraktionen kein freier Farbstoff zu sehen und im Coomassie-Bild sind fast keine Verunreinigungen zu erkennen. Die Fraktionen 3 bis 7 wurden in einem Amiconfilter vereinigt, umgepuffert, eingengt und nochmals mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abb.4.3. B). In der Bahn 1 ist zum Vergleich wieder die unmarkierte BSA-Lösung zu sehen, in Bahn 2 die Farbstoffreaktion und in Bahn 3 das eingengte BSA-AF488. Das markierte BSA enthält keinen freien Farbstoff und kaum Proteinverunreinigungen.

Das zuvor exprimierte NTF2 wurde ebenfalls mit AF488 markiert und genauso aufgereinigt, wie das markierte BSA. In Abbildung 4.4 A ist die Coomassiefärbung und das UV-Bild von unmarkiertem NTF2 und aufgereinigtem NTF2-AF488 zu sehen. Der Unterschied zwischen fluoreszenzmarkierten und unmarkierten NTF2 ist auf dem Gel mit Coomassiefärbung deutlich zu erkennen, da durch die Kopplung des Farbstoffes AF488 an NTF2 das Molekulargewicht des Proteins größer wurde. Das NTF2-AF488 wurde wie das BSA-AF488 in den Einzelmolekülexperimenten ko-injiziert, da es die Zellkernmembran markiert und man dadurch den Zellkern von der restlichen Zelle unterscheiden kann.

Die zu untersuchenden Proteine Ovalbumin, GST-NLS und die verschiedenen STAT1-Varianten wurden mit dem Farbstoff ATTO647N markiert. Da die Zellen Autofluoreszenz aufweisen, wurden die Transportproteine mit einem Farbstoff im längerwelligen Spektralbereich markiert, um bei den Einzelmolekülexperimenten störende Hintergrundsignale durch Autofluoreszenz zu vermeiden und ein gutes SVR zu gewährleisten. Um die Funktionalität der Proteine nicht zu beeinträchtigen, wurden alle Reaktionen im Verhältnis 1:1 angesetzt, damit an jedem Protein nur ein einziges

Farbstoffmolekül bindet. Anschließend wurden die Markierungsverhältnisse der aufgereinigten fluoreszenzmarkierten Transportproteine gemessen und es wurde bei allen Proteinlösungen ein Wert von kleiner 1 ermittelt.

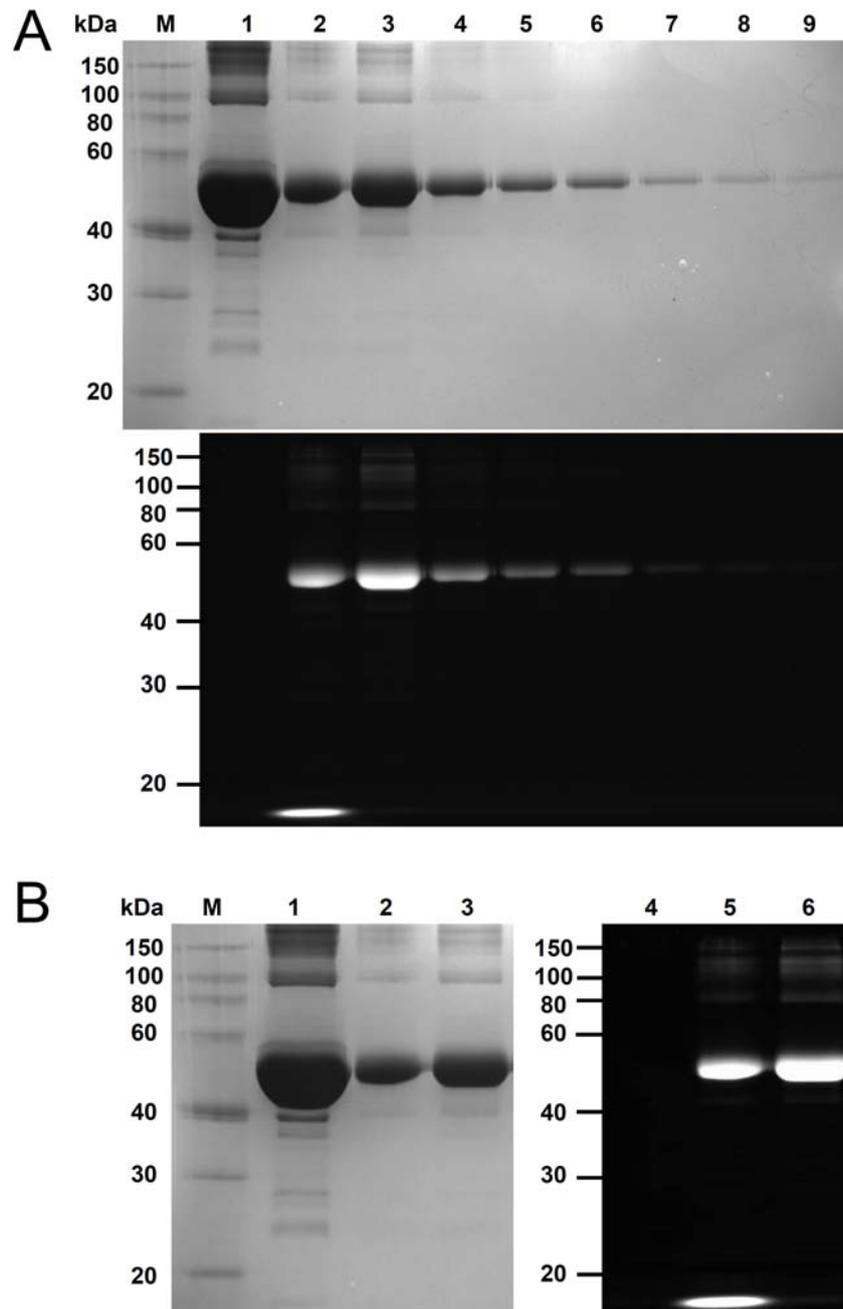


Abbildung 4.3: Farbstoffmarkierung von BSA mit AF488. (A) Das obere Bild zeigt das Gel nach der Coomassiefärbung und die Reinheit der Proteine, das dazugehörige UV-Bild darunter zeigt nur den Farbstoff AF488. In den Bahnen 2-6 ist das markierte BSA und in der Bahn 2 auch die Bande des überschüssigen freien Farbstoffes (< 20 kDa) zu erkennen. 1: BSA-Lösung, 2: Farbstoffreaktion mit AF488, 3-9: aufgefangene Eluate. (B) Nach der Vereinigung und Einengung der Fraktionen 3-7 in einem Amiconfilter, wurde die Lösung noch einmal kontrolliert. M: Proteinmarker, 1/4: BSA-Lösung, 2/5 (UV-Bild): Farbstoffreaktion mit AF488, 3/6 (UV-Bild): aufgereinigtes und eingeengtes BSA-AF488.

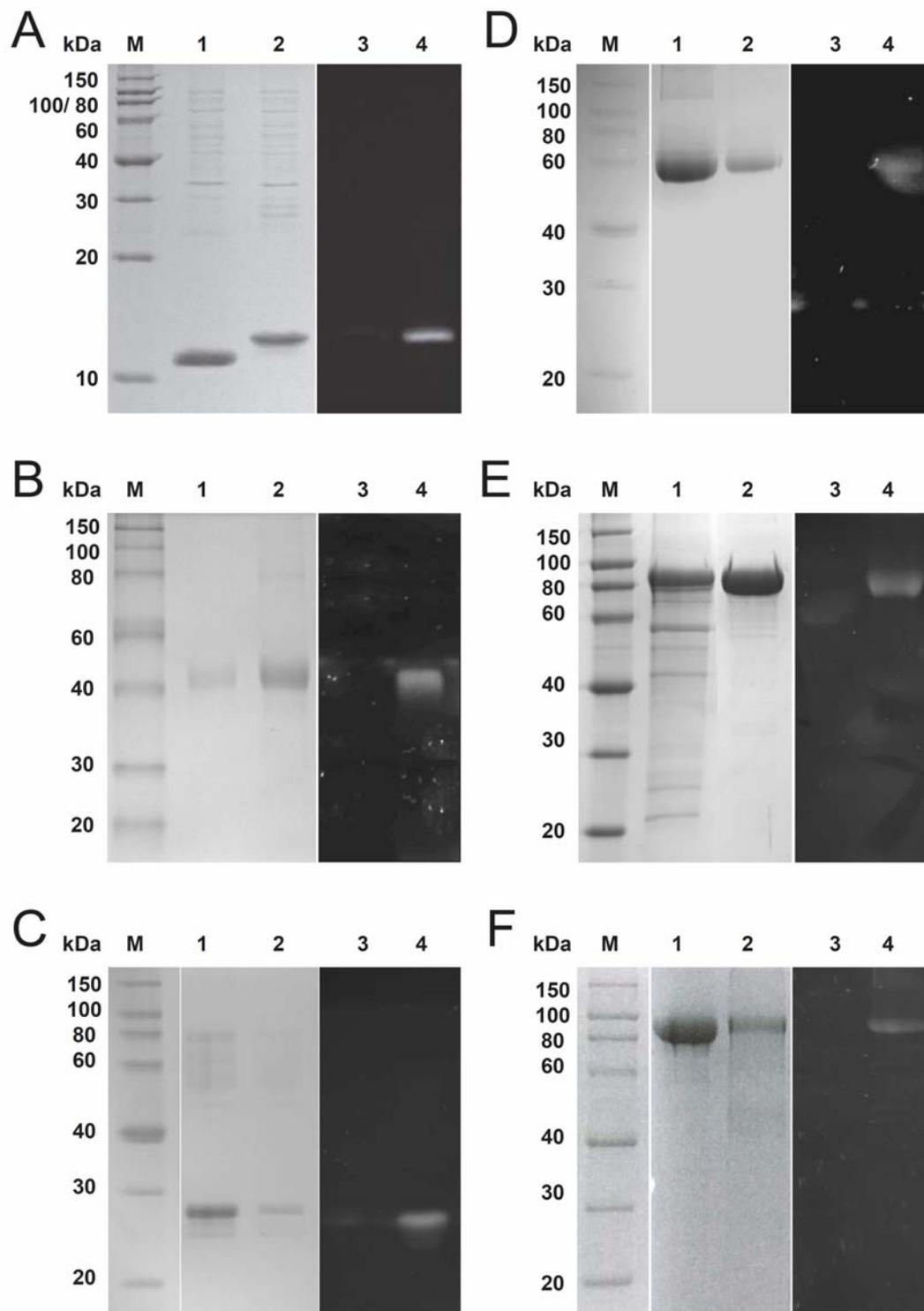


Abbildung 4.4: Farbstoffmarkierung der Proteine. (A) NTF2 (15 kDa), (B) Ovalbumin (43 kDa), (C) GST-NLS (27 kDa), (D) STAT1-tc (68 kDa), (E) STAT1-wt (87 kDa) und (F) STAT1-P (~87 kDa). Die Coomassiefärbung jeweils auf der linken Seite zeigt die aufgetrennten Proteinlösungen mit den darin enthaltenen Proteinverunreinigungen. Das dazugehörige UV-Bild jeweils auf der rechten Seite zeigt, ob freier Farbstoff in der fluoreszenzmarkierten Proteinlösung enthalten ist. M: Proteinmarker, 1/3: Protein-Lösung vor der Farbstoffmarkierung, 2/4: aufgereinigtes, fluoreszenzmarkiertes Protein.

Die Proteinlösungen wurden dann mittels SDS-PAGE auf Reinheit und darauf, ob sie freien Farbstoffs enthalten, überprüft. In Abbildung 4.4 sind die Coomassiefärbungen und die UV-Bilder der Proteine vor und nach der Kopplungsreaktion mit ATTO647N zu sehen: in Abbildung 4.4 B Ovalbumin, in C GST-NLS, in D STAT1-tc, in E STAT1-wt und in F STAT1-P. In den Bildern der Coomassie-gefärbten Gele sieht man, dass die fluoreszenzmarkierten aufgereinigten Proteine kaum Verunreinigungen durch andere Proteine enthielten. Die roten Farbstoffe konnten aufgrund der zur Verfügung gestandenen Gerätschaften zur Überprüfung auf freien Farbstoff nur mit UV-Licht angeregt werden, deswegen sind die Farbstoffbanden schwächer zu sehen. Aber auch nach einer Überbelichtung konnte man keine weiteren Banden und somit auch keinen ungebundenen Farbstoff feststellen.

Anschließend wurden von allen Proteinlösungen die Proteinkonzentration nach Bradford (Tab. 4.1) bestimmt und die Proteine bei -80°C aufbewahrt

Proteine	Konzentration [g/l]
BSA-AF488	5,9
NTF2-AF488	0,9
Ovalbumin-ATTO647N	0,5
GST-NLS-ATTO647N	3,5
STAT1-tc-ATTO647N	1
STAT1-wt-ATTO647N	1,2
STAT1-P-ATTO647N	7,7

Tabelle 4.1: Proteinkonzentrationen der fluoreszenzmarkierten Proteine.

4.2 Die Mobilität von Ovalbumin im Zellkern

Für die Untersuchung der Mobilitäten von einzelnen STAT1-Molekülen in Zellen unter physiologischen Bedingungen mussten die dafür benötigten Mess- und Analysemethoden etabliert werden. Um die Optimierung zu erleichtern wurde zuerst ein Protein, das sich inert verhält, im Zellkern analysiert. Verteilungs- und Mobilitätsstudien von dem Protein Ovalbumin wurden dazu verwendet um die Unterschiede von zwei nukleären Regionen, dem Nukleoplasma und dem Nukleolus, aufzuklären und dienten als Vorarbeit für die Analyse der STAT1-Proteine.

Ovalbumin ist ein inertes Protein, das frei in den und aus dem Zellkern diffundieren kann. Somit ist dieses Protein ideal, um das Nukleoplasma und den Nukleolus zu untersuchen, da man jede Änderung des Verhaltens des Proteins direkt mit der unterschiedlichen Beschaffenheit dieser Bereiche assoziieren kann. Unterschiedliche Mobilitäten von Ovalbumin würden z.B. auf eine unterschiedliche Viskosität hinweisen bzw. auf Unterschiede der effektiven Diffusionskoeffizienten, immobile Moleküle mit langer Aufenthaltsdauer an gleicher Stelle würden auf unspezifische Interaktionen hinweisen.

Somit ermöglicht die Einzelmolekülmikroskopie durch die Beobachtung von einzelnen Ovalbuminmolekülen in lebenden Zellen die Beschaffenheit des Nukleoplasmas und des Nukleolus zu untersuchen. Da es bis heute noch unklar ist, wodurch sich die nukleären Kerndomänen vom restlichen Nukleoplasma abgrenzen, soll die Analyse der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Nukleoplasmas und des Nukleolus wichtige Informationen über die molekulare Organisation des Zellkerns liefern.

4.2.1 Die Verteilung von Ovalbumin in Zellen

Um einen Überblick von der Verteilung des fluoreszenzmarkierten Ovalbumins innerhalb lebender Zellen und vor allem innerhalb des Zellkerns zu erhalten, wurden zuerst Experimente am LSM durchgeführt. Ovalbumin sollte sich über die gesamte Zelle homogen verteilen, da es frei in den und aus dem Kern diffundieren kann und keine Interaktionspartner in humanen Zellen besitzt. Das mit ATTO647N-markierte Ovalbumin wurde zusammen mit BSA-AF488 und TAT-FITC in das Zytoplasma von HeLa-Zellen injiziert und die Verteilung des Ovalbumins eine Stunde lang am LSM bei 37°C beobachtet (Abb. 4.5 A).

Im ersten Bild der Abbildung 4.5 sind die Signale, die durch die Fluoreszenz der Farbstoffe AF488 und FITC ausgelöst wurden, zu sehen. Das BSA-AF488 markiert die Injektionsstelle und kontrolliert die Integrität der Kernmembran. Das TAT-FITC akkumuliert in den Nukleoli und markiert diese Region. Dieses Bild wurde erst eine Stunde nach der Mikroinjektion aufgenommen, um zu zeigen, dass die nukleäre Membran während der gesamten Messung intakt war. In den restlichen Bildern sind die konfokalen Aufnahmen des Ovalbumins 2 min, 15 min, 30 min, 45 min und eine Stunde nach der Mikroinjektion zu sehen. Wie erwartet verteilte sich das Ovalbumin gleichmäßig in den

Zellen, da es passiv durch die NPCs diffundieren kann. Bereits 30 min nach der Mikroinjektion von Ovalbumin konnte man eine homogene Verteilung des Proteins in HeLa-Zellen sehen. Nur von den Nukleoli wurde das Ovalbumin zum größten Teil ausgeschlossen. Dieser Effekt war sehr auffällig und wurde auch bei den STAT1-Proteinen beobachtet (siehe Abb. 4.14).

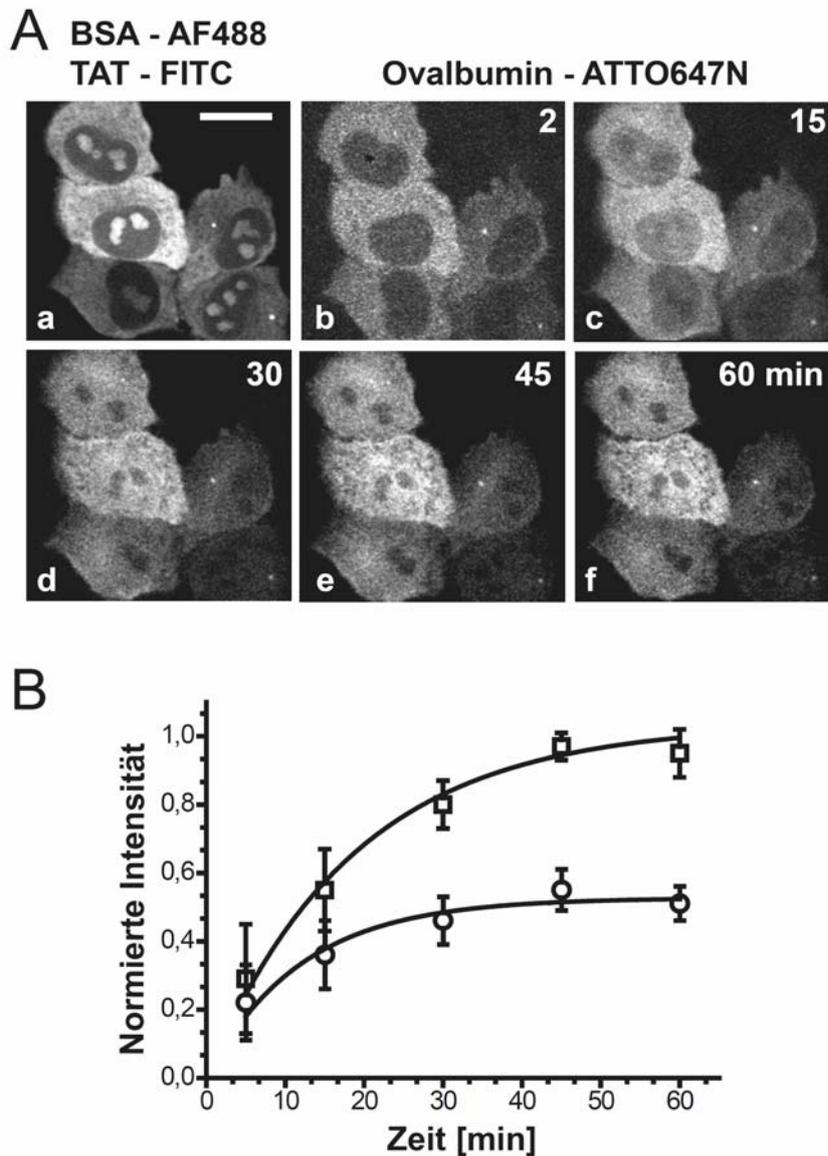


Abbildung 4.5: Verteilung von fluoreszenzmarkiertem Ovalbumin in HeLa-Zellen. (A) Im ersten Bild (a) ist das BSA-AF488 im Zytoplasma und das TAT-FITC in den Nukleoli zu sehen, die beiden Proteine wurden mit dem Ovalbumin in das Zytoplasma ko-injiziert um den jeweiligen Bereich zu markieren. Das BSA wurde auch verwendet, um die Integrität der Kernhülle zu kontrollieren. Die Bilder (b-f) zeigen den zeitlichen Verlauf der Verteilung von Ovalbumin-ATTO647N. Nach 30 min ist das Ovalbumin in den Zellen homogen verteilt, nur in den Nukleoli ist wenig Protein zu sehen. Der Balken entspricht einer Größe von 20 μm . (B). Für die Quantifizierung der Ovalbuminkonzentration wurden die Fluoreszenzintensitäten von 19 Zellen analysiert. Die gemessenen Intensitätswerte wurden normiert und mit einer Exponentialfunktion (schwarze Linie) angepasst. Die Quadrate repräsentieren die gemessenen Werte im Nucleoplasm, die Kreise die Werte in den Nucleoli und die Balken die Standardabweichung.

Anschließend wurde die Verteilung von Ovalbumin in den Mikroinjektionsexperimenten quantifiziert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität im Nukleoplasma und in den Nukleoli von 19 Zellen wurde berechnet und auf die im Nukleoplasma maximal gemessene Intensität normiert. Die ermittelten Werte wurden mit einer Exponentialfunktion angepasst, um die Unterschiede der Verteilungen deutlicher zu machen. In den Nukleoli war um 50% weniger Ovalbumin als im Nukleoplasma. In diesem Graphen ist ersichtlich, dass im Nukleoplasma bis 60 min nach der Mikroinjektion von Ovalbumin die Ovalbuminkonzentration kontinuierlich anstieg, während sich in den Nukleoli 30 min nach der Mikroinjektion die Konzentration von Ovalbumin kaum änderte. Die Analyse einzelner Ovalbuminmoleküle mittels Einzelmolekülmikroskopie soll Aufschluss über die unterschiedliche Verteilung des Ovalbumins zwischen den beiden nukleären Strukturen geben.

4.2.2 Die Analyse einzelner Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und im Nukleolus

Durch die Verfolgung einzelner Moleküle im Millisekundenbereich und mit Nanometergenauigkeit kann die Bewegung einzelner Ovalbuminmoleküle bestimmt werden. Die Analyse der Ovalbuminmobilität wurde verwendet um die physikalischen Eigenschaften des Nukleoplasmas und der Nukleoli zu charakterisieren.

Um das Verhalten der einzelnen Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und Nukleolus zu analysieren, wurden Ovalbumin-ATTO647N und NTF2-AF488 in das Zytoplasma von HeLa-Zellen ko-injiziert und am Einzelmolekülmikroskop bei 37°C beobachtet. Nach Diffusion von Ovalbumin in den Zellkern wurden Filmsequenzen von je 1000 Einzelbildern mit einer Belichtungszeit von 5 ms und einer Bildrate von 191,57 Hz aufgezeichnet. Davor und danach wurde jeweils ein Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Bild aufgenommen um eine Zellbewegung ausschließen zu können und die Umrisse und die Position der Nukleoli zu lokalisieren. Zusätzlich zu den DIC-Bildern wurde ein kurzer Film des NTF2-Signals registriert um die exakte Position der Kernmembran zu bestimmen und ebenfalls eine Verschiebung der Zelle festzustellen.

Das Nukleoplasma und der Nukleolus mussten in allen Zellen mit hoher Präzision lokalisiert werden, um die Bewegung von Ovalbumin in den beiden Bereichen getrennt untersuchen zu können. Das wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt. Mittels DIC ist es möglich die exakten Umrisse der Nukleoli abzubilden, aber durch die hellen und dunklen Ränder in den DIC-Aufnahmen wurden die Nukleoli größer abgebildet. Somit mussten die Abbildungen der Nukleoli mittels DIC nachträglich mit Fluoreszenzaufnahmen korrigiert werden (Abb. 4.6).

Es wurden hohe Konzentration an R9-Tamra in das Zytoplasma der HeLa-Zellen injiziert und nachdem es in den Nukleoli akkumulierte (Martin *et al.*, 2007), wurden kurze Filmsequenzen aufgenommen. Allerdings erschienen die Fluoreszenzaufnahmen, da sie mit einem Weitfeldmikroskop aufgezeichnet wurden, verwaschen (Abb. 4.6, Fluoreszenzaufnahme R9-Tamra) und die Umrisse konnten aufgrund der hohen

Hintergrundfluoreszenz nicht mit derselben Genauigkeit wie in den DIC-Bildern ermittelt werden. Deswegen wurden in beiden Aufnahmen die Schwerpunkte der Nukleoli bestimmt und verglichen, um die Größe und die Positionen der Nukleoli in den DIC-Aufnahmen zu korrigieren. Da die Umrisse der Nukleoli in den Fluoreszenzaufnahmen unscharf erschienen, wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt mit dem Unterschied, dass nicht die Nukleoli sondern nur das Nukleoplasma markiert wurde. FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 500 kDa wurde in hoher Konzentration in den Zellkern injiziert und verteilte sich im gesamten Nukleoplasma mit Ausnahme der Nukleoli, da es aufgrund der Größe von den Nukleoli ausgeschlossen wird (Gorisch *et al.*, 2003).

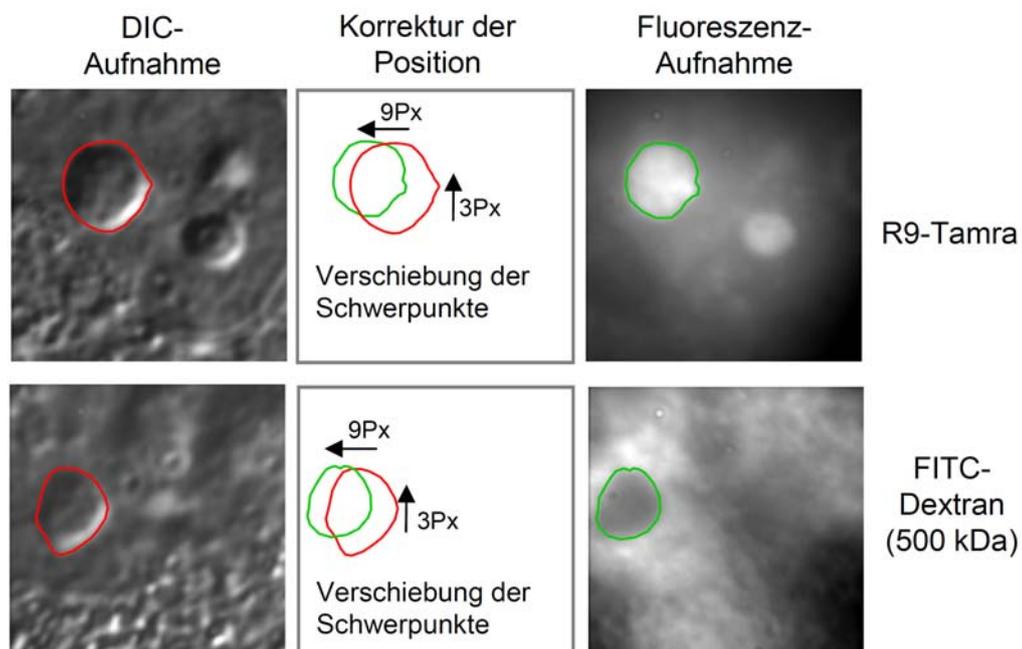


Abbildung 4.6: Korrektur der DIC-Aufnahmen. Die DIC-Aufnahmen ermöglichten eine genaue Lokalisierung der Umrisse der Nukleoli, aber durch die plastische Darstellung wurden die Nukleoli größer abgebildet. In den Fluoreszenzaufnahmen hingegen konnte man die exakte Position und die Größe aber nicht die Umrisse der Nukleoli bestimmen. Deshalb wurden die Fluoreszenzaufnahmen herangezogen um die Größe und Position der Umrisse der Nukleoli in den Dic-Aufnahmen zu korrigieren. Die linken Bilder zeigen einen $12,2 \times 12,2 \mu\text{m}^2$ großen Ausschnitt von einer injizierten Zelle. Es ist teilweise die Kernmembran als doppelte Linie zu erkennen. Die erhobenen Strukturen sind die Nukleoli, in jedem Bild ist einer davon mit einer roten Linie umrandet. Auf der rechten Seite befinden sich die dazugehörigen Fluoreszenzbilder, im oberen Bild sind die Nukleoli durch die Färbung mit R9-Tamra in hellgrau zu erkennen, in der unteren Aufnahme ist ein Nukleus durch den Größenausschluss des 500 kDa großen FITC-Dextrans in dunkelgrau zu erkennen. Die Umrisse wurden mit einer grünen Linie markiert und durch die Bestimmung der Schwerpunkte die genaue Größe und Lokalisation der Nukleoli in den Fluoreszenzbildern und DIC-Bildern ermittelt. Somit wurde von den exakt ermittelten Umrisen in rot, in den Bildern in der Mitte, die Größe korrigiert und jeweils in die richtige Position verschoben.

Insgesamt wurden so sechs Zellen analysiert, wobei sich reproduzierbar ein Versatz von drei Pixel in horizontaler und von neun Pixel in vertikaler Ausrichtung ergab. Daher wurden die Umrisse von allen Nukleoli in den DIC-Aufnahmen entsprechend verschoben

und die Größen korrigiert. Nach Feststellung der exakten Position der Nukleoli sowie der Zellkernmembran, durch die NTF2 Aufnahmen, wurden die identifizierten Umrissse der jeweiligen Zellbereiche auf die Ovalbuminsequenzen übertragen und als separate Sequenz abgespeichert. Dadurch konnte man die Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und in den Nukleoli separat analysieren (Abb. 4.7).

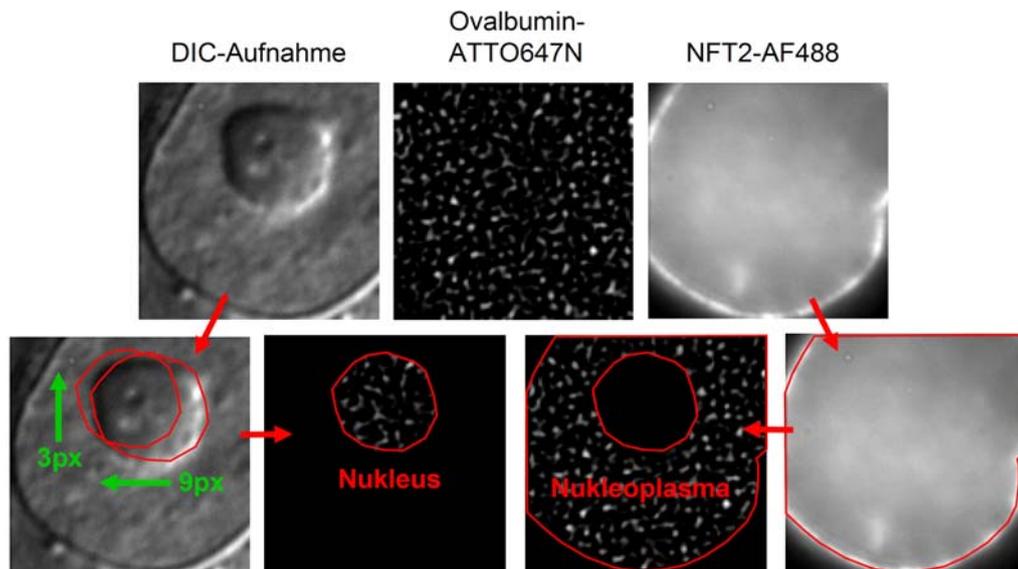


Abbildung 4.7: Trennung der Ovalbuminsequenzen. In der oberen Reihe ist auf der linken Seite die DIC-Aufnahme abgebildet, man kann deutlich die Zellkernmembran als dicke, dunkelgraue Linie und die erhobene, plastische Struktur des Nukleolus erkennen. In der Mitte sieht man ein Bild einer Gauß-gefilterten Ovalbuminsequenz und rechts davon die Z-Projektion der dazugehörigen NTF2-Aufnahme. Nach der Markierung der Grenzen der jeweiligen Bereiche, sowie Größen- und Positionskorrektur des Nukleolus, wurden die Umrissse auf die Ovalbuminsequenz übertragen. Somit war es möglich die Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und in den Nukleoli separat auszuwerten. (Objektfeld, $12,2 \times 12,2 \mu\text{m}^2$).

4.2.3 Einzelpartikeltracking von Ovalbumin im Zellkern

Um die Bewegungen von Ovalbumin im Nukleoplasma und in den Nukleoli zu verfolgen, wurde das Java-Plugin „ILTracker“ mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ verwendet. Die Position der Signale wurden mit einer zweidimensionalen Gaußfunktion angepasst und die x- und y-Position des Maximums der Intensitätsverteilung gespeichert. Die Auswahl der Partikel selbst sowie deren Verknüpfung zu einer Trajektorie erfolgte allerdings manuell, somit wurde jedes Bild einzeln betrachtet. In Abbildung 4.8 sind zwei Trajektorien von Ovalbuminmolekülen mit unterschiedlichen Bewegungen im Nukleoplasma (grau) von HeLa-Zellen dargestellt. Darunter sind die vergrößerten vereinzelter Bilder der Kontrast-verstärkten Ovalbuminsequenz über eine Gesamtdauer von 31,3 ms zu sehen. In der linken Sequenz ist ein sehr schnelles Ovalbuminmolekül dargestellt. Da sich das Molekül auch entlang der Z-Achse bewegte, war das Hintergrundrauschen stärker als bei dem immobilen Molekül (Abb. 4.8 B). Die gesamte

Bewegung wurde als Trajektorie in dem Bild oberhalb der Sequenz mit der gleichen Vergrößerung abgebildet. Auf der rechten Seite sieht man die Bildsequenz von einem immobilen Ovalbuminmolekül. Dieses Molekül lieferte ein Fluoreszenzsignal mit einem höheren SRV als das mobile Molekül, da es sich in lateraler sowie axialer Richtung kaum bewegte und somit das Hintergrundrauschen schwächer war. In der abgebildeten Trajektorie des immobilen Moleküls kann man eine Überlappung der einzelnen Signale erkennen, da dasselbe Molekül an der gleichen Position wiederholt detektiert wurde, was auf eine Interaktion hinweist. Insgesamt wurden 38 Filme von 24 Zellkernen für die nukleoplasmatische Region und für den Nukleolus separat getrackt.

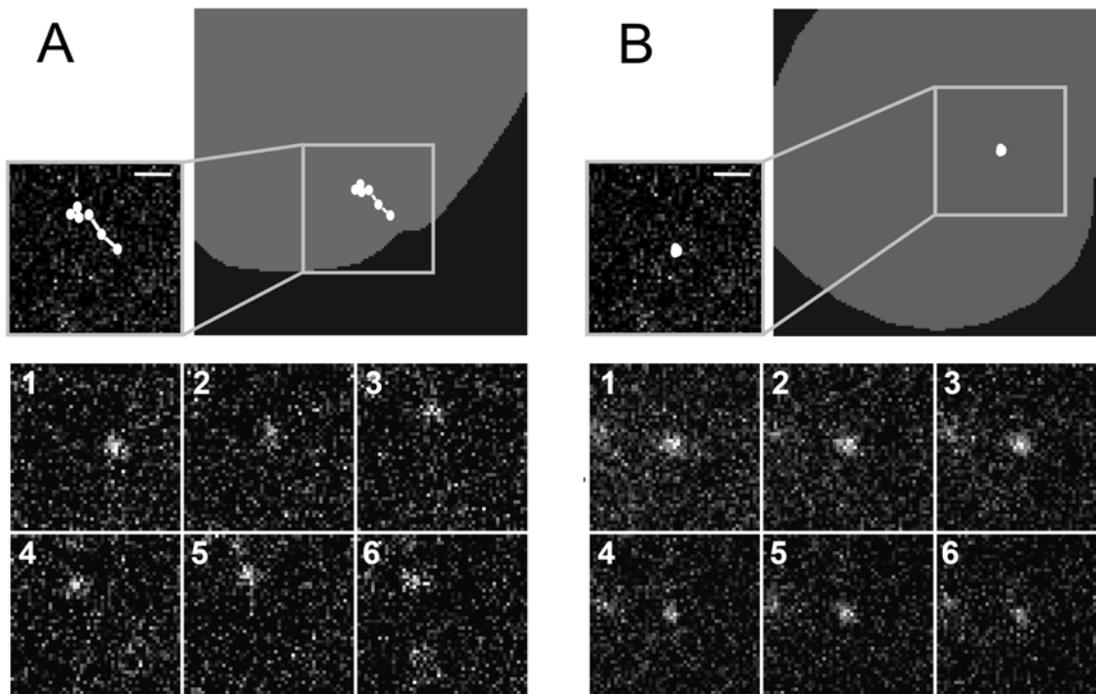


Abbildung 4.8: Trajektorie von einem mobilen und immobilen Ovalbuminmolekül. Die großen Bilder zeigen die schematische Darstellung des Zytosols (schwarz), des Zellkerns (grau) und die Position der identifizierten Trajektorie. Die Punkte zeigen die Position der Moleküle und die Linien die Sprungdistanzen zwischen den Bildern. (Objektfeld, $12,2 \times 12,2 \mu\text{m}^2$). Im kleineren Bild links davon ist die Trajektorie in der gleichen Vergrößerung wie in der Sequenz darunter dargestellt. (Objektfeld, $1 \times 1 \mu\text{m}^2$). Die Dynamik eines mobilen (A) und immobilen (B) Ovalbuminmoleküls sind in den Einzelbildern von Filmsequenzen zu sehen. Die Sequenzen wurden mit einer Belichtungszeit von 5 ms und einer Bildrate von 191,57 Hz aufgenommen.

Die Verteilung der in den beiden Bereichen identifizierten Trajektorien soll Aufschluss über die unterschiedliche Beschaffenheit der nukleären Regionen geben. In Abbildung 4.9 ist eine charakteristische Verteilung der Ovalbumintrajektorien in beiden Regionen gezeigt. Im Nukleoplasma sowie im Nukleolus bewegten sich die Moleküle mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und konnten daher auch unterschiedlich lange verfolgt werden. Im Nukleoplasma ist auch eine Trajektorie eines immobilen Ovalbuminmoleküls zu sehen. Die Darstellung der Verteilung der Ovalbumintrajektorien im Zellkern zeigt, dass

unterschiedliche Bewegungstypen vorliegen. Als nächstes wurden, um die Verteilung dieser verschiedenen Mobilitäten zu quantifizieren, die Diffusionskoeffizienten für jede dieser Populationen mittels Sprungweitenanalyse ermittelt.

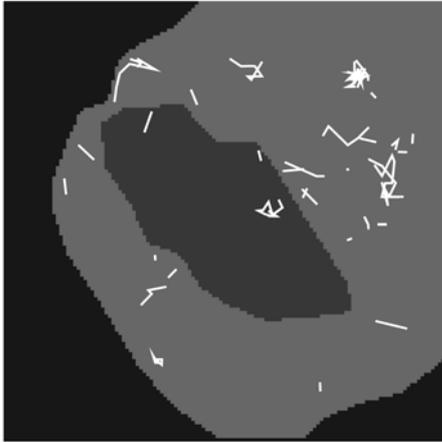


Abbildung 4.9: Verteilung der Ovalbumintrajektorien im Nukleoplasma und im Nukleolus. Das Bild zeigt die schematische Darstellung eines Zellkerns (Zytoplasma: schwarz, Nukleoplasma: hellgrau, Nukleolus: dunkelgrau) mit allen identifizierten Ovalbumintrajektorien (weiß). In beiden Regionen sind Bewegungen mit verschiedenen langen Sprungdistanzen zu sehen. (Objektfeld, 12,2x12,2 μm^2).

4.2.4 Sprungweitenanalyse von Ovalbumin

Die Analyse der Sprungweitenverteilung von den ermittelten Ovalbumintrajektorien ermöglicht Populationen mit unterschiedlich großen Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Um einen Gesamtüberblick über die verschiedenen Bewegungen von Ovalbumin in beiden nukleären Regionen zu bekommen, wurde nicht nur die Häufigkeitsdichte der Sprungdistanzen nach jedem aufgenommenen Bild (JD1), sondern auch die Sprungdistanzen nach jedem zweiten (JD2), dritten (JD3), vierten (JD4), fünften (JD5), zehnten (JD10) und zwanzigsten (JD20) Bild analysiert. In Abbildung 4.10 sind die Sprungweitenhistogramme der JD1, JD3 und JD10 dargestellt. Nach Anpassung einer Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion an die Sprungweitenverteilung JD1 wurden vier verschiedene Mobilitäten identifiziert. Um die erhaltenen Werte von allen Sprungweitenverteilungen in beiden nukleären Bereichen besser miteinander vergleichen zu können, wurden bei der Anpassung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion an das Histogramm die Parameter teilweise konstant gehalten (Tab 4.2).

Im Nukleoplasma wurden vier Populationen mit Diffusionskoeffizienten von $D_1 = 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem Anteil von nur 5%, $D_2 = 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit 16 %, $D_3 = 2,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit 51% und $D_4 = 13,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem relativen Anteil von 26% gefunden. Moleküle mit einem D von $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ werden als immobil angesehen, da ihre Sprungdistanz kleiner als die Lokalisierungsgenauigkeit von immobilen ATTO647N-markierten Ovalbuminmolekülen in Zellen am Einzelmolekülmikroskop von ungefähr 50 nm ist (3.2.2.3., Speil et al., 2009). Der Hauptanteil der identifizierten Ovalbuminmobilitäten waren jedoch schnelle Bewegungen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die meisten Ovalbuminmoleküle frei diffundieren. In den Histogrammen mit den Sprüngen über größere Zeitabstände verschob sich die Verteilung nach links (Abb.4.10). Erwartungsgemäß wurden langsame Ovalbuminmoleküle mit kurzen Sprungdistanzen identifiziert, da die Wahrscheinlichkeit

sehr lange Sprünge über einen längeren Zeitraum zu ermitteln sehr gering ist, weil die schnellen Moleküle weniger Zeit benötigen, um aus der Fokusebene zu diffundieren. Die Mobilitätsverteilung der Sprungdistanzen nach jedem dritten Bild, das entspricht einem Zeitfenster von 15,66 ms, zeigte höhere Anteile von D_1 und D_2 und wesentlich kleinere Anteile von den schnellen Populationen.

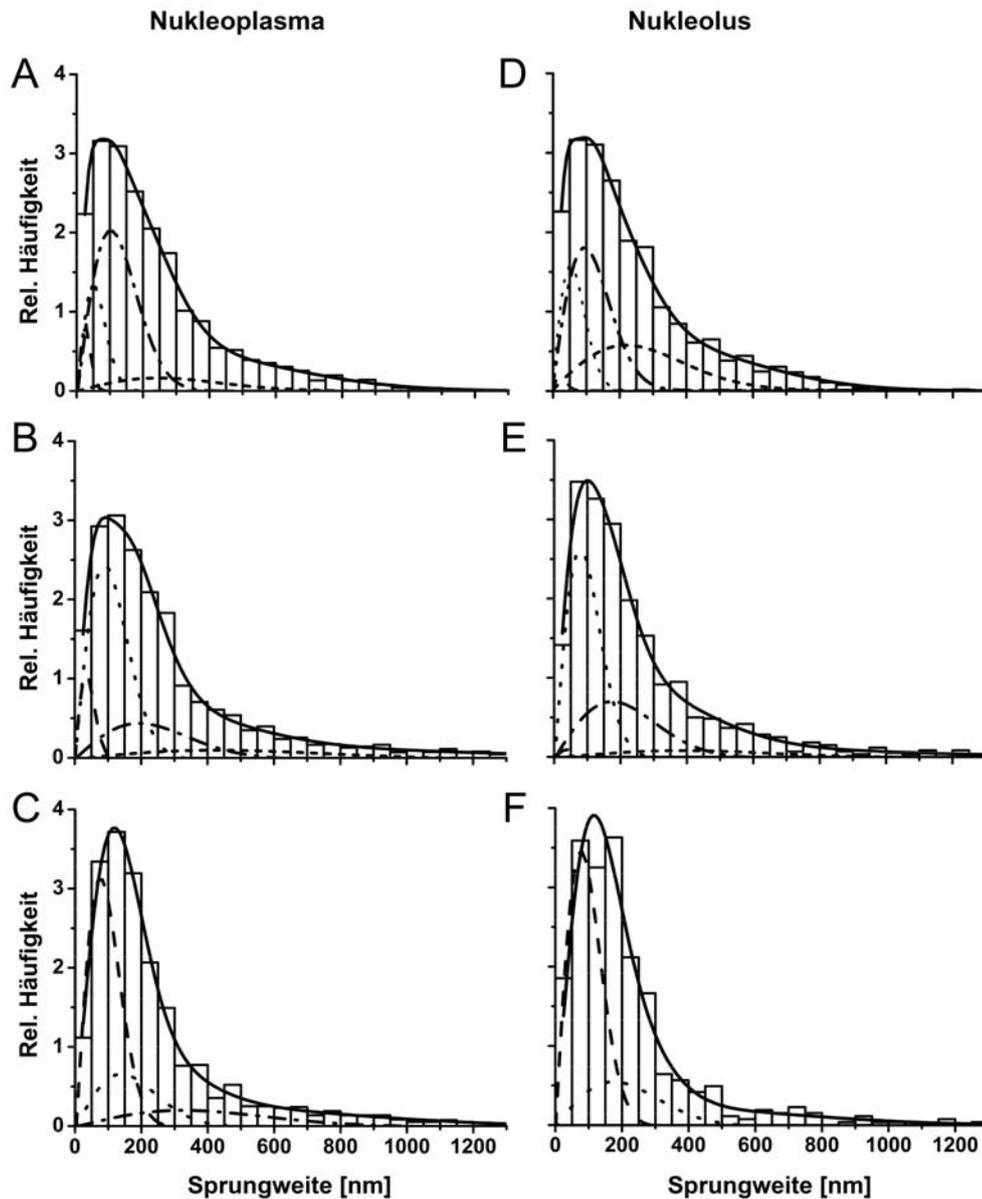


Abbildung 4.10: Histogramme der Sprungweitenverteilung von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus. In (A) und (D) sind die Verteilungen in beiden nuklearen Regionen nach jedem Bild gezeigt. Die Dauer eines Sprunges, die ein Molekül von einem Bild zum nächsten zurücklegte, entsprach der Aufnahmezeit von 5,22 ms. In den Diagrammen (B) und (E) wurden die Sprungweiten nach jedem dritten Bild, alle 15,66 ms, gegen die relative Häufigkeit aufgetragen. Das Histogramm in (C) und in (F) zeigt die Sprungweitenverteilung nach jedem zehnten Bild, das entspricht einer Zeit von 52,2 ms. Die Verteilungen wurden mit einer Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion angepasst (schwarze durchgezogene Linie) und vier verschiedene Diffusionskoeffizienten identifiziert (gestrichelte Linien). Die resultierenden Werte der Funktion wurden in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Ähnlich verhielt es sich mit der Sprungweitenverteilung nach jedem zehnten Bild. Es erfolgten mehr als die Hälfte aller Sprünge mit einem D von $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Lange Sprünge mit einem D_4 von $13,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ konnten nicht identifiziert werden. Im Nukleolus wurden sehr ähnliche Werte gefunden. Die D und die dazugehörigen relativen Anteile in Prozent von den in Abbildung 4.10 gezeigten Histogrammen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

JD	A_1 [%]	D_1 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_2 [%]	D_2 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_3 [%]	D_3 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_4 [%]	D_4 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	N
Diffusionskoeffizienten im Nukleoplasma									
JD1	$5 \pm 0,2$	$0,1^*$	16 ± 1	$0,5 \pm 0,03$	51 ± 1	$2,2 \pm 0,1$	26 ± 1	$13,4 \pm 0,6$	7422
JD1	$6 \pm 0,2$	$0,1^*$	$19 \pm 0,4$	$0,5^*$	52 ± 1	$2,5^*$	24 ± 1	12^*	7422
JD3	9 ± 1	$0,1 \pm 0,01$	55 ± 2	$0,6 \pm 0,02$	22 ± 2	$2,8 \pm 0,5$	12 ± 2	$13,7 \pm 3$	4658
JD10	58 ± 3	$0,1 \pm 0,003$	23 ± 2	$0,4 \pm 0,1$	17 ± 2	$2,4 \pm 0,3$			1916
Diffusionskoeffizienten im Nukleolus									
JD1	1 ± 1	$0,12 \pm 0,08$	22 ± 5	$0,7 \pm 0,1$	44 ± 4	$2,1 \pm 0,3$	32 ± 2	$11,2 \pm 1$	2030
JD1	$0,2 \pm 0,3$	$0,1^*$	22 ± 1	$0,5^*$	53 ± 1	$2,5^*$	25 ± 1	12^*	2030
JD3	8 ± 1	$0,1^*$	51 ± 2	$0,4 \pm 0,02$	31 ± 2	$2,2 \pm 0,2$	9 ± 2	11^*	1202
JD10	67 ± 3	$0,1 \pm 0,01$	25 ± 3	$0,7 \pm 0,1$					529

Tabelle 4.2: Diffusionskoeffizienten der Sprungweitenverteilung von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus. JD, Sprungweite; A, relativer Anteil; D, Diffusionskoeffizient; N, Anzahl der Sprünge. Alle Werte resultierten aus der angepassten Wahrscheinlichkeits-dichtefunktion an die Histogramme aus Abbildung 4.10. Die Anteile der immobilen Mobilitätspopulationen nehmen in den Sprungweitenverteilungen mit zunehmenden Zeitabständen zu. In der Verteilung der JD1 überwiegen die Anteile der schnellen Moleküle.

Die Mobilitäten zwischen den beiden nukleären Regionen unterschieden sich nur geringfügig. Im Nukleoplasma wurde ein kleiner Anteil von 5% an immobilen Molekülen in den JD1 Histogramm gefunden, während der Anteil an unbeweglichen Ovalbumin in den Nukleoli vernachlässigbar klein war und nur 1% ergab. Umgekehrt verhielt es sich bei der schnellsten Population, im Nukleoplasma wurden 26% und in den Nukleoli 32% an schnellen Molekülen mit einem D von ungefähr $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden. 51% der Sprünge im Nukleoplasma und 44% der Sprünge in den Nukleoli erfolgten mit einem D von ungefähr $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$. 16% der Moleküle bewegten sich im Nukleoplasma sehr langsam mit einem D von $0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und 22% in den Nukleoli mit einem D von $0,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Auch die Anzahl der detektierten Sprungweiten war in beiden nukleären Regionen fast identisch, wenn man berücksichtigt, dass in HeLa-Zellen die Fläche des Nukleoplasmas um das drei- bis vierfache größer ist als die Fläche der Nukleoli. Mittels Sprungweitenanalyse wurden keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Ovalbuminmobilitäten im Nukleoplasma und im Nukleolus von HeLa-Zellen gefunden.

4.2.5 Bindungsdauer der Ovalbuminmoleküle in den nukleären Regionen

Da in Abbildung 4.9 Ovalbuminmoleküle wiederholt an derselben Stelle beobachtet wurden, wurde die Bindungsdauer dieser Moleküle bestimmt. Dazu wurden die Sprungdistanzen der Trajektorien nach ganz bestimmten Kriterien aussortiert. Es wurde die Häufigkeit aller Sprünge die kleiner als 1,5 Pixel (143 nm) ist, das entspricht ungefähr der dreifachen Lokalisierungsgenauigkeit des Mikroskops, ermittelt (3.2.2.3., Speil et al., 2009). Diese Einschränkung der Sprungdistanzen sollte nur die Sprünge der unbeweglichen Moleküle auch innerhalb einer Trajektorie aussortieren. Für die Analyse der Bindungsdauer wurde die Häufigkeit gegen die Trajektorienlänge mit Sprungdistanzen kleiner 143 nm als Bindungsdauer in ms in ein Histogramm aufgetragen (Abb. 4.11). Die Häufigkeitsverteilung wurde dann mit einer Exponentialfunktion angepasst und dadurch die Bindungsdauer von Ovalbumin im Nukleoplasma und in den Nukleoli bestimmt. Die Bindungsdauer im Nukleoplasma betrug $8 \pm 0,3$ ms und im Nukleolus $6,3 \pm 0,3$ ms. Somit binden die Moleküle im Nukleoplasma circa 2 ms länger als in den Nukleoli. Die Anzahl der Ereignisse, bezogen auf die Größe der Flächen des Nukleoplasmas und der Nukleoli, ergab jedoch kaum einen Unterschied.

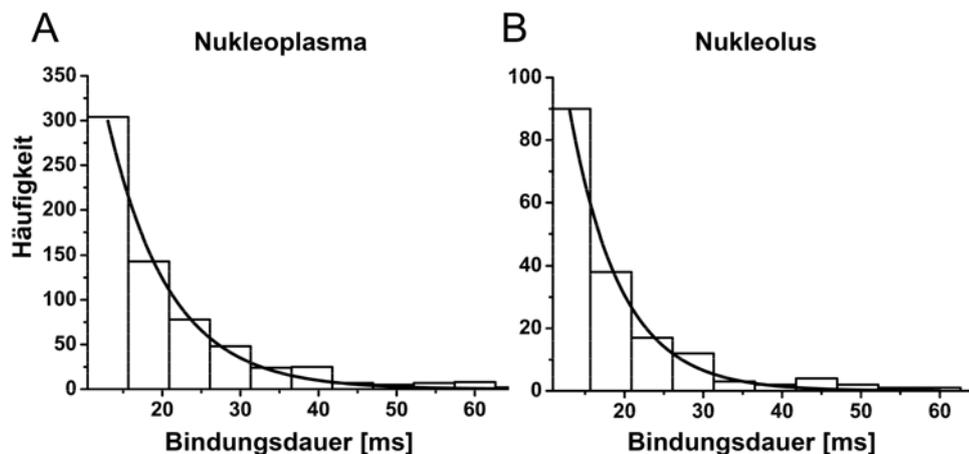


Abbildung. 4.11: Bindungsdauer der Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und im Nukleolus. Die beiden Histogramme zeigen die Häufigkeitsverteilungen der Bindungsdauer in der nukleoplasmatischen Region (A) und in den Nukleoli (B). Die Verteilungen wurden mit einer Exponentialfunktion gefittet und die jeweilige Bindungsdauer in ms ermittelt.

4.2.6 Zusammenhang zwischen der Chromatindichte und der Ovalbuminverteilung im Zellkern

Es wurde die Verteilung des Chromatins mit der Verteilung von Ovalbumin verglichen, da viele Proteine mit Chromatin in Wechselwirkung treten, was zu einer eingeschränkten

Diffusion und zu einer erhöhten Aufenthaltsdauer innerhalb eines begrenzten Bereichs führen kann (Grunwald *et al.*, 2008).

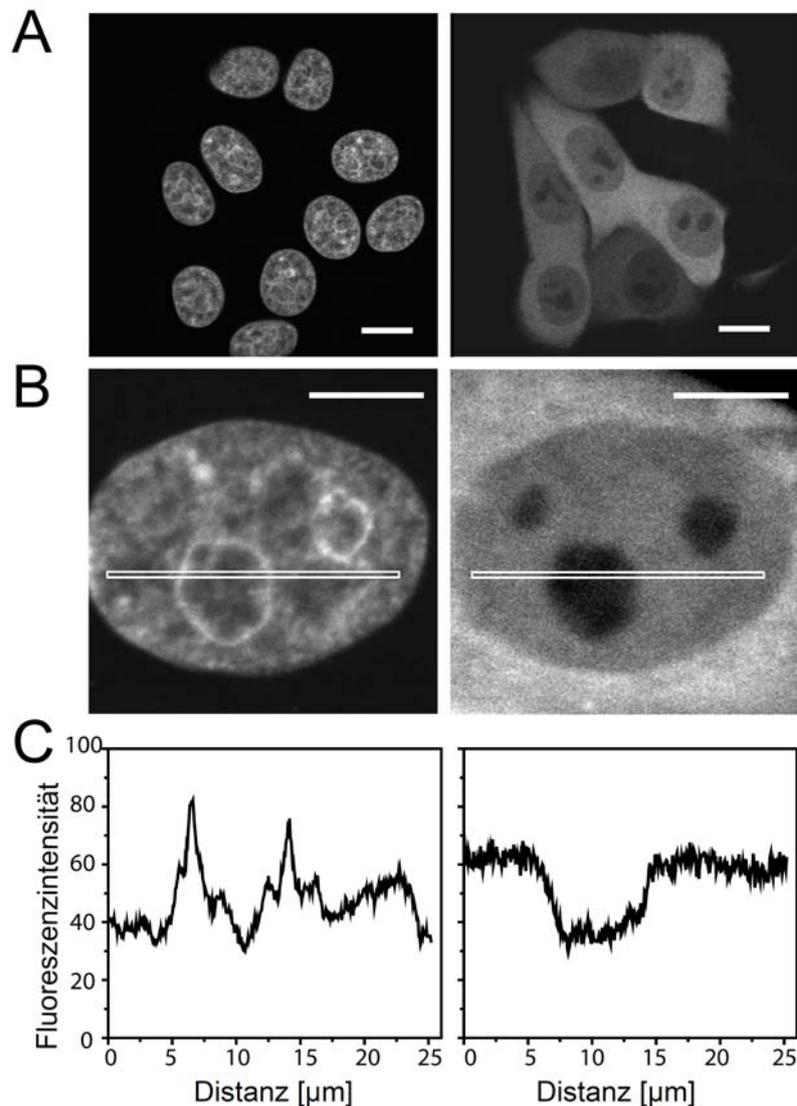


Abbildung 4.12: Verteilung des Ovalbumins im Zellkern von H2B-GFP-Zellen. (A) Ovalbumin-ATTO647N wurde in das Zytoplasma von H2B-Zellen injiziert. Nach der Diffusion von Ovalbumin in den Zellkern wurde die Fluoreszenz von H2B-GFP (links) und die von Ovalbumin-ATTO647N (rechts) konfokal abgebildet. Der Balken entspricht einer Länge von $20 \mu\text{m}$. (B) Um die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten besser vergleichen zu können wurde ein Zellkern vergrößert dargestellt. Auf der linken Seite wurde die Verteilung des Chromatins und auf der rechten Seiten die Verteilung von Ovalbumin dargestellt. Der Balken entspricht einer Länge von $10 \mu\text{m}$. (C) Entlang des weißen schmalen Rahmens in Abbildung B wurden die Intensitätsprofile von H2B-GFP und Ovalbumin-ATTO647N gemessen und die Fluoreszenzintensität gegen die Distanz in μm in den Graphen aufgetragen.

Um die Chromosomenterritorien sichtbar zu machen, verwendete man HeLa-Zellen, die stabil ein Histon 2B-GFP-Fusionsprotein (H2B-GFP-Zellen) exprimierten. In diese Zellen wurde Ovalbumin-ATTO647N in das Zytoplasma injiziert und am LSM konfokal abgebildet (Abb. 4.12). Das linke Bild in Abbildung 4.12 A zeigt die Fluoreszenz des H2B-GFP und

die rechte Aufnahme die Fluoreszenz von Ovalbumin-ATTO647N in den gleichen Zellen. Ein Zellkern wurde in der Abbildung 4.12 B vergrößert dargestellt, um die Verteilung des Chromatins mit der von Ovalbumin besser miteinander vergleichen zu können. In der vergrößerten Darstellung kann man das Chromatin als schleifenförmige Struktur im gesamten Zellkern erkennen, während sich das Ovalbumin im Nukleoplasma homogen verteilt. In den Nukleoli war wie in allen anderen Mikroinjektionsexperimenten die Konzentration an Ovalbumin extrem gering. Eine Intensitätsmessung der Fluoreszenzverteilung entlang der in Abbildung 4.12 B eingezeichneten weißen Linie zeigt eindeutig, wie unterschiedlich die beiden Verteilungen sind. Entlang der gesamten Achse kommt es zu keiner Übereinstimmung der beiden Signale. Das Intensitätsprofil von Chromatin ist im Vergleich zu dem des Ovalbumins sehr unregelmäßig. Ovalbumin verteilte sich über die gesamte nukleoplasmatische Region homogen und blieb von den Nukleoli ausgeschlossen. Das Ovalbumin zeigte keine Wechselwirkung mit Chromatin.

4.3 Die Mobilität der STAT1-Proteine in humanen Zellen

Die STAT1-Proteine besitzen die Eigenschaft ankommende Signale vom Rezeptor an der Zellmembran direkt zu den Zielgenen im Zellkern zu transportieren, dadurch ist es möglich die Bewegungen von signalübermittelnden Proteinen im Zytoplasma sowie im Nukleus während der Signaltransduktion auf Einzelmolekülebene optisch zu erfassen. Um die intrazelluläre Dynamik der STAT1-Proteine vor und nach Aktivierung in lebenden humanen Zellen zu ermitteln werden die fluoreszenzmarkierten STAT1-Proteine auf ihre Funktionalität getestet und anschließend mittels Einzelmolekülmikroskopie untersucht.

Die Gruppe von Prof. Uwe Vinkemeier (Marg *et al.*, 2004) charakterisierte die intrazelluläre Verteilung von verschiedenen rekombinanten STAT1-Varianten und stellte fest, dass aktive sowie auch inaktive STAT1-Moleküle in den Zellkern transportiert werden. Durch die Untersuchung der unterschiedlichen Bewegungen und Interaktionen von aktiven und inaktiven STAT1-Einzelmolekülen soll hier der STAT1-Signaltransduktionsweg und die STAT1-Regulation weiter aufgeklärt werden. Es werden drei STAT1-Varianten analysiert: der Wildtyp, der in HeLa-Zellen mit und ohne IFN- γ Stimulierung untersucht wird, der phosphorylierte Wildtyp STAT1-P, die aktive Form von STAT1, und STAT1-tc eine Deletionsmutante, die in unphosphorylierter Form als Monomer vorliegt (Wenta *et al.*, 2008) und die inaktive Form von STAT1 darstellt.

4.3.1 Die intrazelluläre Verteilung der STAT1-Proteine

Zuerst wurden die Verteilung und die Funktionalität der fluoreszenzmarkierten STAT1-Proteine in lebenden HeLa-Zellen mittels Mikroinjektionsexperimente am LSM analysiert. Es wurden zwei weitere Proteine zur Kontrolle untersucht, zum einem GST-NLS, es repräsentiert den aktiven Transport in den Zellkern, und zum anderen das Referenzprotein Ovalbumin, da dieses sich neutral verhält und frei in den und aus dem Zellkern diffundieren kann. Die Proteine wurden in das Zytoplasma injiziert und eine Stunde lang unter Verwendung des Inkubators bei 37°C am LSM beobachtet. Alle 15 min wurde die Verteilung des Proteins durch eine konfokale Aufnahme ermittelt. Die Verteilung des STAT1-wt wurde auch in IFN γ -stimulierten Zellen untersucht, dabei wurde IFN γ unmittelbar nach der Mikroinjektion dem Medium zugefügt.

Bevor jedoch das IFN γ in den Mikroinjektionsexperimenten eingesetzt wurde, musste dessen Wirksamkeit auf STAT1 getestet werden. Es wurden HeLa-Zellen verschieden lange mit IFN γ stimuliert und danach eine Immunfluoreszenzfärbung von endogenem STAT1 durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der endogenen STAT1-Verteilung in HeLa-Zellen wurde durch konfokale Aufnahmen ermittelt (Abb. 4.13). Es ist eindeutig eine Zunahme der intranukleären STAT1-Konzentration zu erkennen, das bestätigte die Aktivierung der STAT1-Signalübertragung durch die Stimulierung der Zellen mit IFN γ . In den Mikroinjektionsexperimenten wurden die Zellen eine Stunde lang mit IFN γ inkubiert

und beobachtet, da der Unterschied der STAT1-Verteilung in den konfokalen Aufnahmen nach einer Inkubationszeit von ein und fünf Stunden sehr gering war.

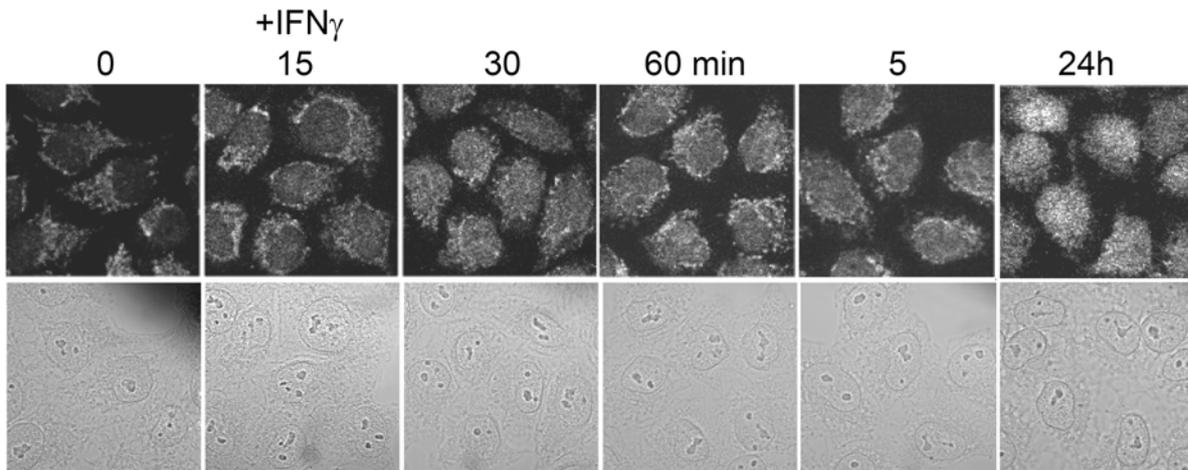


Abbildung 4.13: Effekt von IFN γ auf endogenes STAT1 in HeLa-Zellen. Um die Funktion und den Einfluss des IFN γ zu testen, wurden HeLa-Zellen mit IFN γ für die in der Grafik angegebenen Zeiten inkubiert und unter Verwendung eines STAT1-Antikörpers eine Immunfärbung durchgeführt. Danach wurde die Fluoreszenzintensität des endogenen STAT1 konfokal abgebildet (obere Bilderreihe). Die Bilder in den unteren Reihen zeigen die dazugehörigen Hellfeldaufnahmen. (Objektfeld, 65x65 μm^2).

Bei jeder Messung wurde BSA-AF488 ko-injiziert, um die Injektionsstelle zu markieren und die Integrität der Kernhülle zu kontrollieren. In Abbildung 4.14 sind die intrazellulären Verteilungen von GST-NLS (A), Ovalbumin (B), STAT1-tc (C), STAT1-wt (D), STAT1-P (E) und von STAT1-wt nach IFN γ -Stimulierung 2, 30 und 60 min nach der Mikroinjektion zu sehen.

Das GST-NLS wurde sofort in den Zellkern transportiert und zeigte eine Akkumulation über die gesamte Dauer der Aufnahme. Das Ovalbumin zeigte wie in Abbildung 4.5 eine homogene Verteilung über die gesamte Zelle mit Ausnahme der Nukleoli. Die beiden inaktiven STAT1-Varianten, STAT1-tc sowie STAT1-wt, verhielten sich ähnlich wie Ovalbumin. 30 min nach der Mikroinjektion konnte man STAT1-tc und STAT1-wt im Zellkern erkennen, obwohl beide Proteine in unstimulierter Form vorlagen. Allerdings verteilten sich die inaktiven Varianten nicht homogen in der gesamten Zelle, sondern der Großteil der Proteine befand sich im Zytoplasma. Hingegen zeigten die aktiven Varianten, STAT1-P und der STAT1-wt nach IFN γ -Stimulierung teilweise eine Akkumulation in den Zellkernen. Es konnte über die gesamte Dauer der Messung ein kontinuierlicher Anstieg des Fluoreszenzsignals der aktiven Varianten beobachtet werden. Diese deutlich stärkere Translokation von STAT1-P und den aktivierten STAT1-wt im Zellkern deutet darauf hin, dass beide Proteine als aktive Homodimere vorlagen und ein aktiver Transport in den Zellkern stattfand.

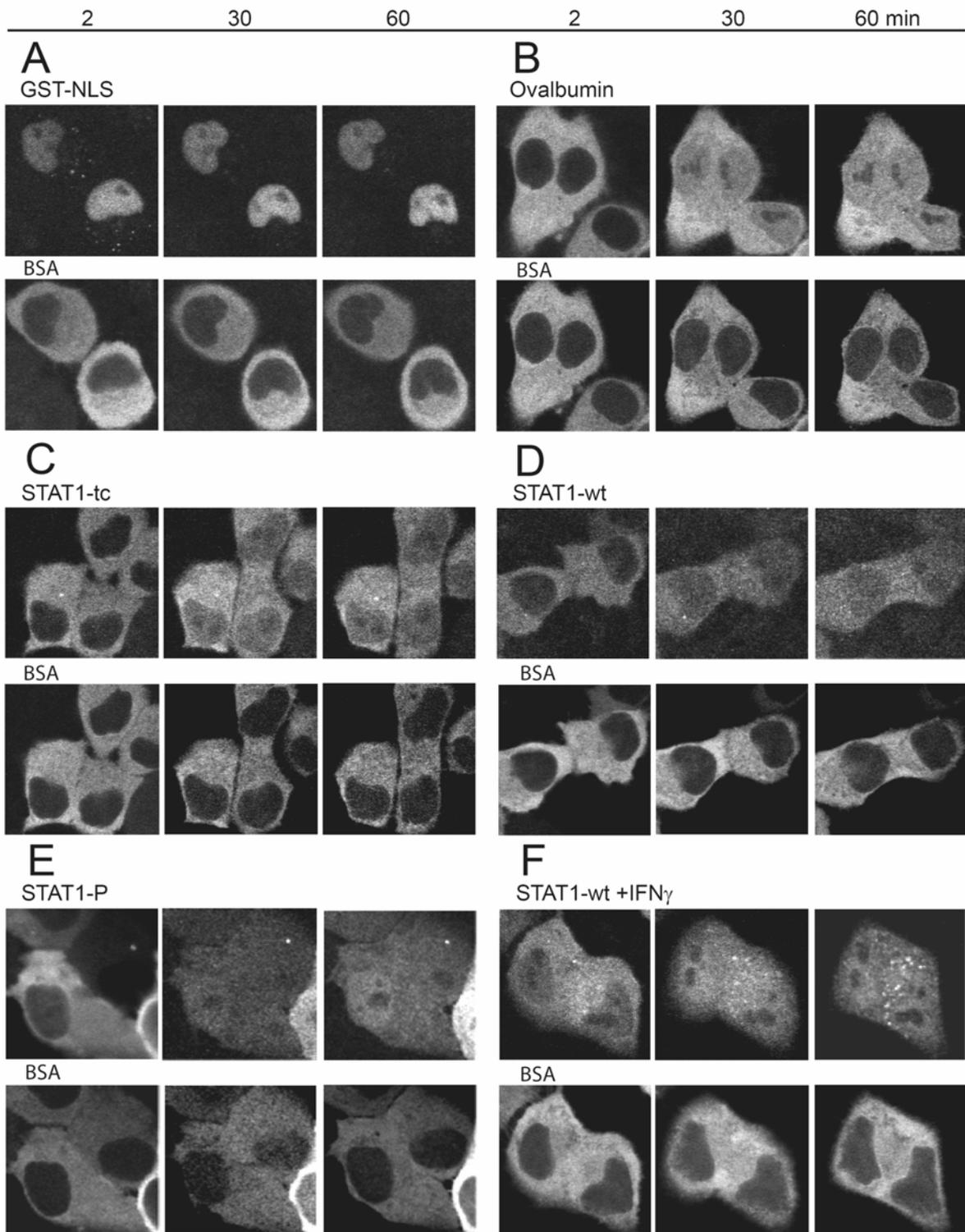


Abbildung 4.14: Die intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten STAT1-Proteine in HeLa-Zellen. Die Bilder in der oberen Reihe zeigen die Verteilungen der ATTO647N-markierten Proteine: (A) GST-NLS, (B) Ovalbumin, (C) STAT1-tc, (D) STAT1-wt, (E) STAT1-P und (F) STAT1-wt nach IFN γ Stimulierung in HeLa-Zellen. Die Bilder in der unteren Reihe zeigen die Verteilungen des ko-injizierten BSA-AF488. Die Zellen wurden 2, 30 und 60 min nach der Mikroinjektion aufgenommen. (Objektfeld, 50x50 μm^2).

Um die intrazellulären Verteilungen der Proteine aus Abbildung 4.14 zu quantifizieren, wurden die Fluoreszenzintensitäten von mindestens zehn injizierten Zellen für jedes Protein gemessen und der Quotient von nukleärer zu zytoplasmatischer gemittelter Fluoreszenzintensität bestimmt.

Die ermittelten Importraten wurden in Abbildung 4.15 graphisch dargestellt. Im Diagramm sind die Unterschiede zwischen aktivem und inaktivem STAT1 sehr deutlich zu erkennen. Die Importraten von STAT1-P und von aktivierten STAT1-wt verdeutlichen den kontinuierlichen Transport der aktiven STAT1-Proteine in den Zellkern. Die Werte der beiden aktiven Varianten sind fast identisch. Der einzige Unterschied zwischen STAT1-P und dem IFN γ -aktivierten STAT1-wt ist nach 15 min zu sehen. Diese Verzögerung des stimulierten STAT1-wt-Imports kann an der noch unvollständigen Aktivierung des STAT1-wt liegen, da erst nach der Mikroinjektion mit IFN γ stimuliert wurde und das STAT1-P bereits in aktiver Form vorlag. Bereits nach 30 min war mehr aktives STAT1 im Zellkern als im Zytoplasma. Dieses Ergebnis beweist, dass die Aktivierung von STAT1-Proteinen zu einer Akkumulation von STAT1 im Zellkern führt.

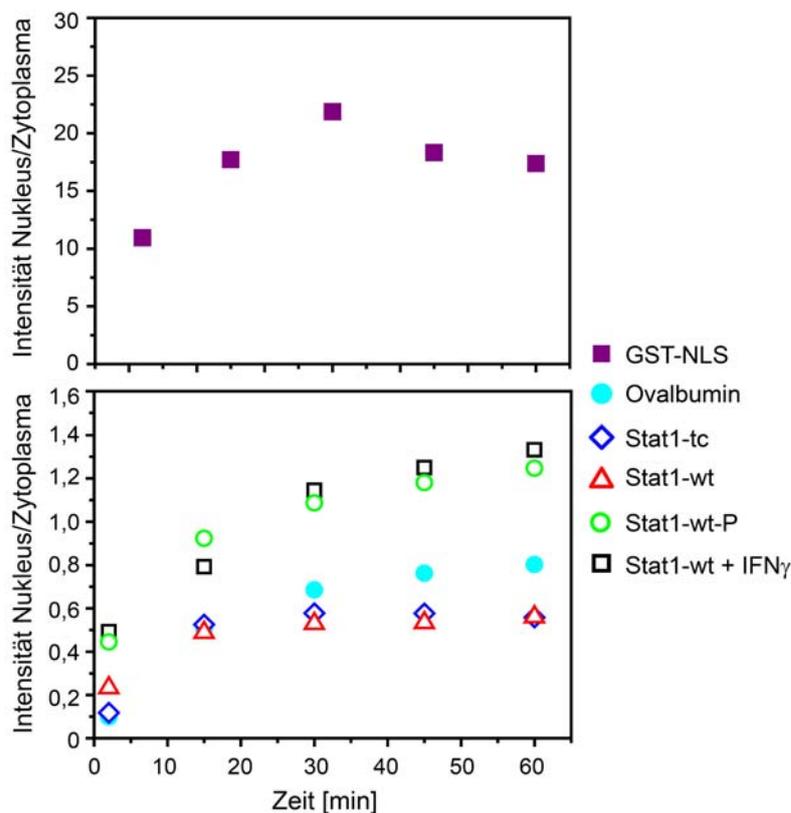


Abbildung 4.15: Quantifizierung der Importkinetiken der STAT1-Proteine. Aus den konfokalen Aufnahmen wurden die Fluoreszenzintensitäten der Transportsubstrate im Zytoplasma und Nukleus ermittelt und der Quotient von nukleärer zu zytoplasmatischer gemittelter Fluoreszenzintensität berechnet. In den Diagrammen wurden die erhaltenen Werte gegen die Zeit aufgetragen. Die Standardabweichung der Werte betrug ungefähr 5% und im Falle von GST-NLS ungefähr 10%. Die Fehlerbalken wurden aufgrund der Übersichtlichkeit nicht in die Graphen eingezeichnet. Für jedes Protein wurden mindestens 10 Zellen gemessen.

Zwischen den Importraten von STAT1-*tc* und den unstimulierten STAT1-*wt* kann man fast keinen Unterschied feststellen. Bei beiden inaktiven Varianten wurden in den Aufnahmen, die 15 min nach der Mikroinjektion aufgezeichnet wurden, Importraten von nur 0,5 bestimmt. In allen darauf folgenden Aufnahmen der inaktiven Varianten bis 1 Stunde nach der Mikroinjektion wurden sehr ähnliche Importraten ermittelt. Bei Ovalbumin kann man im Diagramm ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg der Importraten sehen. In den Aufnahmen 1 Stunde nach der Mikroinjektion wurde eine Importrate von 0,8 ermittelt und somit verteilte sich Ovalbumin in den Zellen nur annähernd homogen. Die Werte von GST-NLS wurden in dem oberen Diagramm dargestellt, da das GST-NLS sofort im Zellkern akkumulierte und sehr hohe Importraten von 10 bis weit über 20 ermittelt wurden.

4.3.2 Die intrazelluläre Verteilung der einzelnen STAT1-Moleküle

Die Untersuchung der einzelnen fluoreszenzmarkierten STAT1-Moleküle in HeLa-Zellen erfolgte unter 37°C am Einzelmolekülmikroskop. Diesmal wurden die STAT1-Proteine und Ovalbumin in nanomolarer Konzentration zusammen mit NTF2-AF488 in das Zytoplasma der Zellen injiziert. Von den ATTO647N-markierten Proteinen wurden Sequenzen von je 1000 bis 2000 Einzelbilder mit einer Belichtungszeit von 5 ms und einer Bildrate von 191,57 Hz aufgenommen. Durch diese hohe zeitliche Auflösung und einer Lokalisierungs Genauigkeit von Ovalbumin-ATTO647N am Einzelmolekülmikroskop von ungefähr 10 nm (3.2.2.3) konnte man die Bewegungen einzelner Ovalbumin- und STAT1-Moleküle in den Zellen visualisieren. Zusätzlich wurde davor und danach ein kurzer Film von NTF2-AF488 aufgenommen um die Zellkernmembran zu lokalisieren und eine Verschiebung der Zelle festzustellen. In der Abbildung 4.16 A sind die Fluoreszenzsignale von ATTO647N und AF488 gemeinsam in einem Bild dargestellt, dadurch kann man die Kernmembran und das Signal eines einzelnen STAT1-*wt*-Moleküls im Zytoplasma der Zellen erkennen. In der Bildsequenz daneben ist das Signal desselben STAT1-*wt*-Moleküls in einer Sequenz aus 60 Einzelbilder über 300 ms lang zu sehen (Abb. 4.16 B). Diese Bilder sind allerdings vergrößert dargestellt und zeigen einen 2,4x2,4 µm² großen Bereich, damit die Bewegungen des Moleküls besser zu erkennen sind. Bei den Aufnahmen bewegte sich das STAT1-*wt*-Molekül auch in axialer Richtung, deswegen kann man das Fluoreszenzsignal des Moleküls in manchen Bildern wie z.B. in den Bildern 1 bis 12 sehr deutlich erkennen während z.B. in den Bildern 13 bis 16 das Signal weniger gut zu sehen ist, da sich die Moleküle bei den Aufnahmen der Bilder 1 bis 12 in der Fokusebene befanden und bei den Bildern 13 bis 16 aus dem Fokus bewegten.

In Abbildung 4.16 C ist die gesamte Bewegung des Moleküls als Trajektorie dargestellt, hieraus ist ersichtlich, dass sich dieses Molekül sehr schnell und mit großen Sprungdistanzen von Bild zu Bild bewegte. Erwartungsgemäß verhielt sich dieses STAT1-*wt*-Molekül im Zytoplasma von HeLa-Zellen wie ein frei diffundierendes Protein (Reich, 2007) ohne Interaktionen einzugehen, die zu einer Verlangsamung der Bewegung geführt hätten und durch die Länge der Sprungdistanzen zu erkennen gewesen wären.

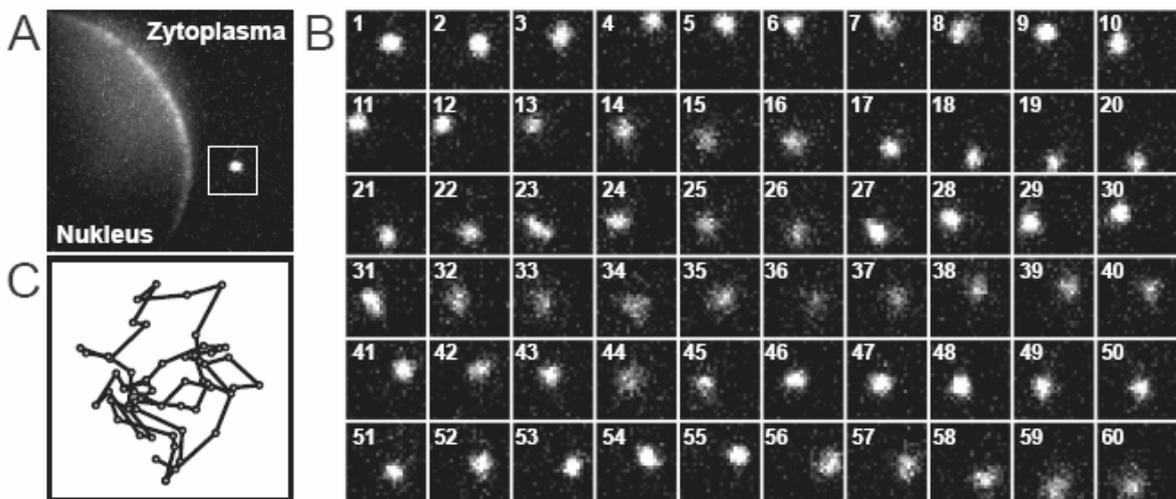


Abbildung. 4.16: Visualisierung eines einzelnen STAT1-wt-Moleküls in HeLa-Zellen. (A) In diesem Bild wird je eine Aufnahme mit ATTO647N und AF488 gemeinsam dargestellt. Das NTF2-AF488 markiert die Kernmembran, wodurch man das Zytoplasma vom Nukleus eindeutig identifizieren kann. In dem weißen Rahmen ist das Signal von einem STAT1-wt-Molekül zu sehen. (Objektfeld, $12,2 \times 12,2 \mu\text{m}^2$). (B) Diese Sequenz zeigt das in (A) dargestellte Signal des STAT1-wt Moleküls über 300 ms lang. Die Belichtungszeit betrug 5 ms und die Bildrate 191,57 Hz. (Objektfeld, $2,4 \times 2,4 \mu\text{m}^2$). (C) Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Trajektorie des STAT1-Moleküls aus (B). Die Punkte repräsentieren die Positionen der Moleküle und die Linien die zwischen den Bildern zurückgelegten Sprungweiten. (Objektfeld, $2,4 \times 2,4 \mu\text{m}^2$).

Insgesamt wurden für jedes Protein mindestens 16 bis 35 Filme aufgenommen und anschließend mit Diatrack ausgewertet. Die Sprungweiten der identifizierten Positionen der Signale wurden mit dem Programm Origin berechnet und mittels dazugehörigen NTF2-Aufnahmen entweder dem Zytoplasma oder dem Nukleus zugeordnet. Die mit Diatrack identifizierten Trajektorien wurden zusammen mit dem dazugehörigen NTF2-Bild in Abbildung 4.17 dargestellt, sie zeigen die intrazellulären Verteilungen der einzelnen Moleküle.

Ovalbumin zeigt schnelle und langsame Bewegungen und eine gleichmäßige Verteilung der Moleküle im Zytoplasma und im Nukleoplasma der HeLa-Zellen. Im Zytoplasma sowie im Nukleus kann man auch die Signale von teilweise komplett unbeweglichen Ovalbuminmolekülen erkennen. Die weißen Flecken in den Bildern stellen die immobilen Moleküle dar, da in diesen Bereichen die Moleküle wiederholt an derselben Position gefunden wurden und sich die einzelnen Signale der Moleküle, die in den Abbildungen als Kreise dargestellt sind, überlappen (Speil *et al.*, 2009).

Die STAT1-tc sowie STAT1-wt-Moleküle wurden hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen beobachtet. Bei den Trajektorien der beiden inaktiven STAT1-Varianten kann man wie bei Ovalbumin große und kleine Sprungdistanzen sehen. Im Gegensatz dazu bewegten sich die aktiven Varianten, STAT1-P und der $\text{IFN}\gamma$ -stimulierte STAT1-wt sehr langsam und die Moleküle befanden sich hauptsächlich im Nukleus. Dort kam es zu einer Immobilisierung der Moleküle. Bei dem STAT1-wt nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulierung wurden fast keine Moleküle im

Zytoplasma gefunden und im Zellkern waren fast alle Moleküle immobil. Im Zytoplasma bewegten sich die aktiven STAT1-Varianten ebenfalls langsamer.

In Abbildung 4.17 ist die Veränderung der Mobilität und die Verteilung der einzelnen Moleküle, die durch die STAT1-Aktivierung hervorgerufen wurde, deutlich zu sehen. Eine Sprungweitenanalyse soll Aufschluss über die Verteilung der Populationen mit unterschiedlichen Mobilitäten geben.

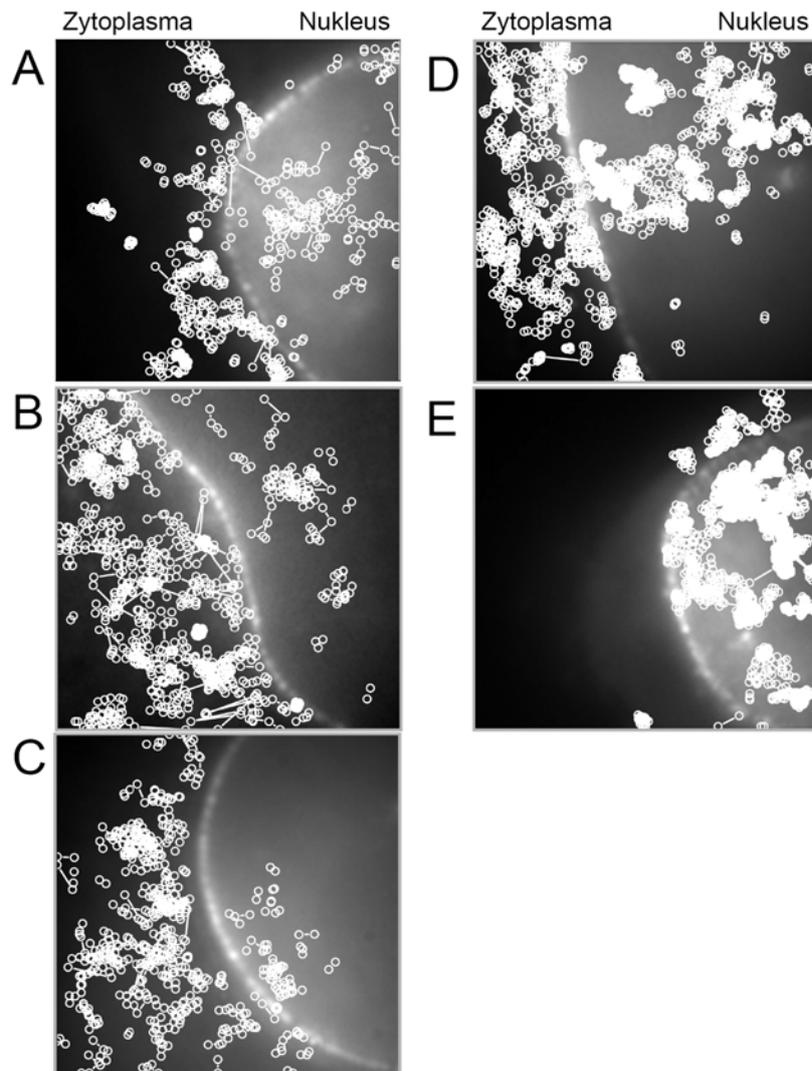


Abbildung 4.17: Die intrazelluläre Verteilung der einzelnen STAT1-Moleküle in HeLa-Zellen. Die Bilder veranschaulichen jeweils die Verteilung aller identifizierten Trajektorien (weiß) und das NTF2-Signal (Grauwerte) in einer lebenden HeLa-Zelle. Das NTF2 bindet an die NPCs und markiert die Zellkernmembran. Die weißen Kreise der Trajektorien stellen die einzelnen Positionen der Moleküle dar und die Verbindungslinien die Sprungweiten. Alle Filmsequenzen wurden mit einer Belichtungszeit von 5 ms und einer Bildrate von 191,57 Hz aufgenommen. (Objektfeld, $12,2 \times 12,2 \mu\text{m}^2$). (A) Ovalbumin, (B) STAT1-tc, (C) STAT1-wt, (D) STAT1-P, (E) STAT1-wt nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulierung.

4.3.3 Sprungweitenanalyse der STAT1-Proteine

Die Analyse der Sprungweiten wurde dazu verwendet, um die Verteilung der verschiedenen Bewegungen der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus zu quantifizieren. Durch eine Anpassung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion an die Sprungweitenhistogramme war die Annahme von mindestens vier Populationen mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten erforderlich, um die Sprungweitenverteilungen (JD1) ideal zu beschreiben. Da für jedes Protein die identifizierten Diffusionskoeffizienten unterschiedlich waren, wurden die Werte gemittelt um die resultierenden relativen Anteile der vier verschiedenen Populationen der Proteine miteinander vergleichen zu können. Anschließend wurden die Sprungweitenverteilungen (JD1) mit einer Vierkomponenten-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion unter Verwendung der vier gemittelten Diffusionskoeffizienten $D_1 = 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_3 = 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_4 = 12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, die einer Sprungdistanz von 50 nm, 100 nm, 250 nm und 500 nm entsprechen, angepasst. Die Sprungweitenverteilungen der STAT1-Proteine und von Ovalbumin im Zytoplasma und im Nukleus sind in Abbildung 4.18 zu sehen.

Moleküle mit einem Diffusionskoeffizienten von nur $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ repräsentieren die unbeweglichen Moleküle, da sie nur Sprungweiten von 50 nm zurücklegen und das der Lokalisierungsgenauigkeit von immobilen Ovalbumin-ATTO647N in HeLa-Zellen am Einzelmolekülmikroskop entsprach. Die Immobilisierung der Moleküle weist darauf hin, dass diese Moleküle Bindungen eingehen. Die sehr langsamen Bewegungen der Moleküle wurden mit einem D von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$ beschrieben, da diese Moleküle weder binden noch frei diffundieren sondern in ihrer Bewegung eingeschränkt sind. Die schnellen Bewegungen sowie die frei diffundierenden Moleküle wurden mit einem D von 3 und $12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ beschrieben.

Die Anpassung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion an die Sprungweitenverteilung wurde in den Histogrammen in Abbildung 4.18 als schwarze Linie dargestellt. Die farbigen Linien repräsentieren die Beiträge der vier verschiedenen Diffusionskoeffizienten.

Da die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion an die Sprungweitenverteilungen mit konstant gehaltenen Parametern angepasst wurde, können die erhaltenen Anteile der verschiedenen Mobilitäten zwischen den STAT1-Varianten direkt miteinander verglichen werden. Die relativen Anteile der Diffusionskoeffizienten in Prozent sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Ovalbumin zeigte eine ähnliche Verteilung von allen vier verschiedenen Mobilitäten in beiden Regionen. Die größten Populationen der Ovalbuminmoleküle hatten einen D von $0,475$ und $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Das war sehr überraschend, da das inerte Protein Ovalbumin keine Interaktionen in humanen Zellen eingehen sollte. Trotzdem wurden bei Ovalbumin im Zytoplasma 16% der Sprünge mit einem D von $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und 41% mit einem D von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und im Zellkern 17% mit einem D von $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und 34% mit einem D von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden. Die STAT1-tc-Trajektorien im Zytoplasma wiesen ebenfalls eine sehr homogene Verteilung von allen Mobilitätspopulationen auf. Im Zellkern jedoch war STAT1-tc von allen Proteinen das mobilste Protein.

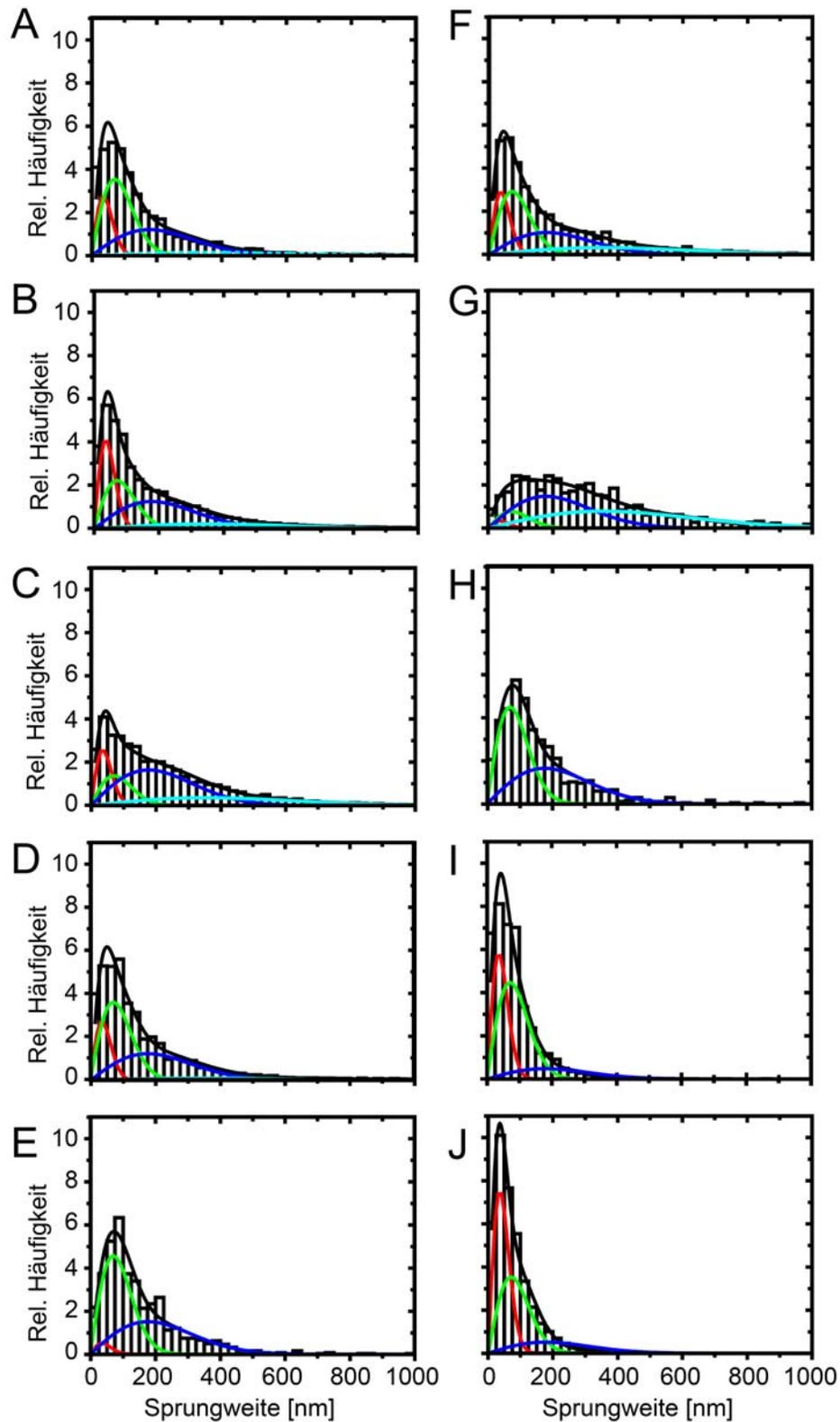


Abbildung 4.18: Die Sprungweitenverteilungen der STAT1-Proteine. Die Histogramme zeigen die Sprungweitenverteilungen der STAT1-Proteine und des Ovalbumins im Zytosol (A-E) und im Zellkern (F-J). Die Verteilungen wurden mit einer Vierkomponenten-Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion unter Verwendung der Diffusionskoeffizienten $D_1 = 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_3 = 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_4 = 12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ angepasst. Die schwarze Linie zeigt die Anpassung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion und die farbigen Linien stellen die Beiträge der einzelnen Populationen dar. (A, F) Ovalbumin, (B, G) STAT1-tc, (C, H) STAT1-wt, (D, I) STAT1-P, (E, J) STAT1-wt nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulierung. Alle Resultate wurden in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Im Nukleus erfolgten 46% der Sprünge mit einem D von $12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 43% mit einem D von $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 9% mit einem D von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und nur 2 % der Sprünge mit einem D von $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Somit bewegten sich fast 90% der STAT1-tc Moleküle sehr schnell im Zellkern. Diese gemessene hohe Mobilität im Nukleus zeigt, dass sich STAT1-tc hauptsächlich als frei diffundierendes Protein im Zellkern befindet und im Nukleus kaum Interaktionen eingeht. STAT1-tc liegt in unphosphorylierter Form als Monomer vor und kann somit auch nicht an die DNA binden (Marg *et al.*, 2004; Vinkemeier *et al.*, 1996; Wenta *et al.*, 2008).

Proteine	A ₁ [%] von D ₁ = 0,12 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	A ₂ [%] von D ₂ = 0,475 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	A ₃ [%] von D ₃ = 3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	A ₄ [%] von D ₄ = 12 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	N
Diffusionskoeffizienten im Zytoplasma					
Ovalbumin	16 ± 1	41 ± 2	35 ± 4	8 ± 5	3475
STAT1-tc	24 ± 1	26 ± 2	37 ± 2	13 ± 3	12204
STAT1-wt	15 ± 1	16 ± 1	48 ± 2	21 ± 3	7299
STAT1-P	16 ± 1	42 ± 3	36 ± 4	6 ± 5	6547
STAT1-wt + IFN γ	3 ± 2	53 ± 3	44 ± 3	0	1329
Diffusionskoeffizienten im Nukleus					
Ovalbumin	17 ± 0,4	34 ± 1	30 ± 1	19 ± 1	1949
STAT1-tc	2 ± 1	9 ± 2	43 ± 3	46 ± 4	910
STAT1-wt	0	52 ± 1	48 ± 2	0	781
STAT1-P	34 ± 3	52 ± 4	14 ± 5	0	17034
STAT1-wt + IFN γ	44 ± 1	41 ± 2	15 ± 2	0	22412

Tabelle 4.3: Die Anteile der Diffusionskoeffizienten der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus. A, relativer Anteil; D, Diffusionskoeffizient; N, Anzahl der Sprünge. Die Werte sind die Resultate der Sprungweitenanalyse aus Abbildung 4.18. Die Diffusionskoeffizienten von D₁ = 0,12 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, D₂ = 0,475 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, D₃ = 3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und D₄ = 12 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ entsprechen einer Sprungdistanz von 50 nm, 100 nm, 250 nm und 500 nm.

STAT1-wt war im Zytoplasma mobiler als Ovalbumin und STAT1-tc. Die größte Population mit 48% hatte einen D von $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die relativen Anteile der anderen Mobilitätspopulationen waren alle sehr ähnlich und wiesen Werte von 15 bis 21% auf. Im Zellkern hingegen waren die STAT1-wt-Moleküle deutlich langsamer als Ovalbumin und STAT1-tc. Die schnellste Population konnte gar nicht nachgewiesen werden. Es konnten aber auch keine Sprünge mit einem D von $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ identifiziert werden. Bei den aktiven STAT1-Varianten kam es zu einer Immobilisierung im Zellkern. Mehr als 80% der Sprünge von STAT1-P sowie von IFN γ -stimulierten STAT1-wt erfolgten mit einem D von $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ oder $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$, somit waren jeweils mehr als 80% der STAT1-P-Moleküle und IFN γ -stimulierten STAT1-wt-Moleküle immobil oder wiesen eine stark eingeschränkte Bewegung auf.

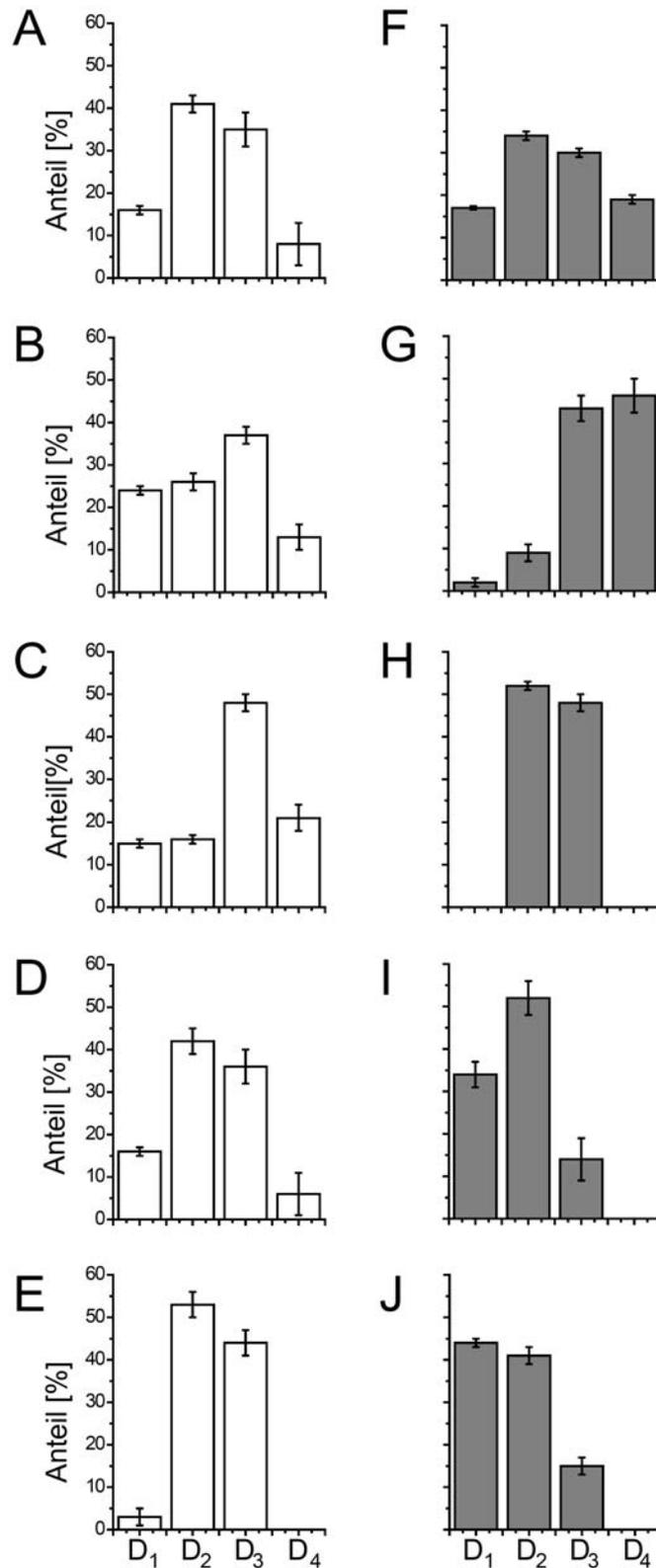


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der Verteilung der Diffusionskoeffizienten der STAT1-Proteine. Die einzelnen Säulen in den Diagrammen repräsentieren die relativen Anteile der Diffusionskoeffizienten $D_1 = 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_3 = 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_4 = 12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in Prozent. Die Werte wurden aus der Tabelle 4.3 entnommen. Die Säulen in weiß stellen die Anteile im Zytoplasma (A-E) und die Säulen in grau im Nukleus (F-J) dar. (A, F) Ovalbumin, (B, G) STAT1-tc, (C, H) STAT1-wt, (D, I) STAT1-P, (E, J) STAT1-wt nach IFN γ -Stimulierung.

Bei beiden Varianten wurden keine Sprünge mit einem D von $12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden. Das deutet darauf hin, dass die Aktivierung der STAT1-Moleküle zu einer Verlangsamung und Immobilisierung der einzelnen STAT1-Moleküle im Nukleus führte. Im Zytoplasma bewegten sich die aktiven STAT1-Varianten ebenfalls langsamer als die anderen Proteine. Die größten Mobilitätspopulationen hatten einen D von $0,475$ und $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einen relativen Anteil von 36 bis 53% . Bei den STAT1-wt-Molekülen führte die Stimulierung der Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ zu einem Verlust der schnellsten Population.

In Tabelle 4.3 ist auch die Anzahl der untersuchten Sprünge, die zur Sprungweitenanalyse beigetragen haben, angegeben. Im Vergleich zu den aktiven STAT1-Varianten fällt auf, dass die Anzahl der detektierten Sprünge der inaktiven Varianten im Nukleoplasma deutlich geringer war. Im Zytoplasma wurden von den aktiven STAT1-Varianten im Vergleich zu den inaktiven Varianten weniger Sprünge detektiert. Anhand der Anzahl der Sprünge kann man auch die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der einzelnen Moleküle der verschiedenen Proteine erkennen.

Die Immobilisierung durch die Aktivierung der STAT1-Proteine wird nochmals in einem Säulendiagramm in Abbildung 4.20 dargestellt, um die Veränderung der Mobilität deutlich zu machen. Auf der linken Seite sind die Verteilungen der unterschiedlichen Mobilitätspopulationen im Zytoplasma als weiße Säulen zu sehen (Abb. 4.20 A-E). Jede dieser Säulen stellt den relativen Anteil von einem der vier Diffusionskoeffizienten in Prozent dar, beginnend von links mit $D_1 = 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Im Zytoplasma sind die verschiedenen Mobilitäten relativ gleichmäßig verteilt, erst die STAT1-Aktivierung führt zu einer Verringerung der Mobilität. Viel stärker ist der Effekt der Verlangsamung der STAT1-Moleküle durch die Aktivierung von STAT1 im Nukleus zu sehen. In den Diagrammen in der Abbildung G bis F kann man anhand der Höhe der Säulen eine Immobilisierung der STAT1-Moleküle durch die STAT1-Aktivierung erkennen. Ovalbumin zeigt eine sehr homogene Verteilung der verschiedenen Bewegungen. Das inaktive STAT1-tc Protein zeigt die höchste Mobilität im Kern, der Wildtyp zeigt eine deutlich langsamere Mobilität als STAT1-tc, weist aber keine immobilen Moleküle auf. Bei den aktiven STAT1-Varianten waren bereits fast die Hälfte der Moleküle immobil und es kam fast zum kompletten Verlust der beiden schnellen Komponenten. Nur ein geringer Teil der aktiven STAT1 Moleküle bewegte sich mit einem Diffusionskoeffizienten von $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Diese Unterschiede der Mobilitätsverteilungen zwischen den aktiven und inaktiven Varianten stellen die Auswirkungen der STAT1-Aktivierung dar.

4.3.4 Bindungsdauer der STAT1-Proteine

Durch die Aktivierung des STAT1-Signalweges kommt es zu einer Immobilisierung der aktivierten STAT1-Proteine. Aktivierte STAT1-Dimere binden im Zellkern an die DNA um die Transkription von ihren Zielgenen zu aktivieren (Levy *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2004; Reich, 2007; Reich *et al.*, 2006). In der Abbildung 4.17 wurden STAT1- und Ovalbuminmoleküle wiederholt an denselben Positionen beobachtet und wiesen auf eine Bindung hin.

Eine vergrößerte STAT1-wt Trajektorie nach IFN γ -Stimulierung im Zellkern zeigt die verschiedenen Formen der Bewegung in Abbildung 4.21. Auf der rechten Seite sind große Sprungdistanzen zu sehen, hier bewegte sich das Molekül mit einer großen Geschwindigkeit von rechts nach links über eine Distanz von 0,8 μm . Auf der linken Seite der Grafik in dem farbig markierten Bereich bewegte sich das Molekül viel langsamer und band. Um die Dauer solcher Bindungsereignisse zu bestimmen, wurden alle Sprünge die sich nicht weiter als 143 nm bewegten, das entspricht der dreifachen Lokalisierungsgenauigkeit (s. 4.2.5) aussortiert. Auch innerhalb von Trajektorien, wie in Abbildung 4.21 können wiederholt Bindungsereignisse stattfinden. Die Häufigkeit dieser aussortierten Bindungsereignisse wurde in einem Histogramm gegen die Zeit in ms aufgetragen (Abb. 4.22).

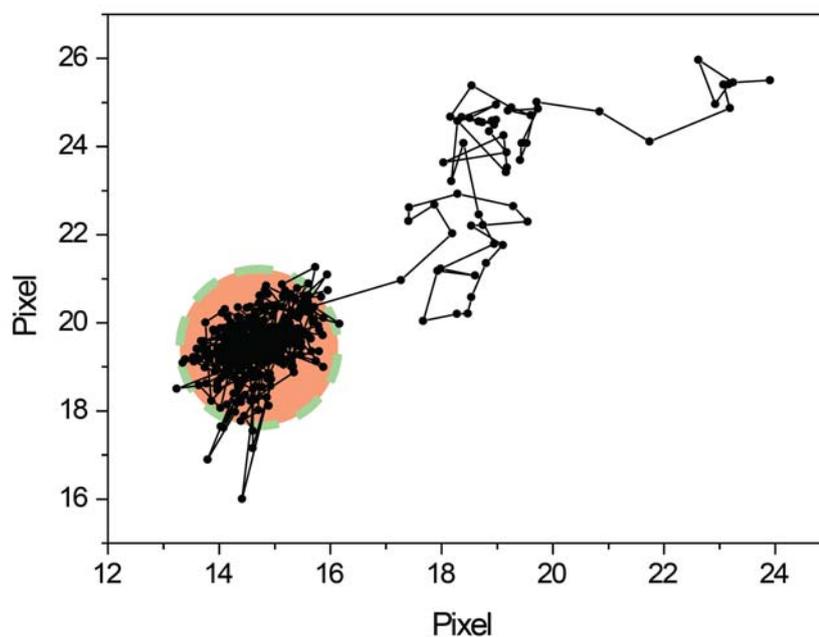


Abbildung 4.21: Einzelne STAT1-wt-Trajektorie nach IFN γ -Stimulierung. Eine Trajektorie eines IFN γ -stimulierten STAT1-wt-Moleküls mit einer Länge von 270 Sprüngen zeigt verschiedene Formen von Mobilitäten. In dem farbig markierten Bereich ist das Molekül immobil und außerhalb des Bereichs bewegt es sich schnell und mit großen Sprungdistanzen. Ein Pixel entspricht 95,2 nm.

Die Verteilungen wurden mit einer Exponentialfunktion angepasst, um die Bindungsdauer zu ermitteln. Die schwarze Linie in den Diagrammen repräsentiert die exponentielle Abnahme der Bindungsdauer in Abhängigkeit der Zeit. Die erhaltenen Resultate sind in der Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Die ermittelte Bindungsdauer der Proteine im Zytoplasma sind alle sehr ähnlich und liegen zwischen 4,3 und 5,3 ms. Es ist eine Tendenz, einer längeren Bindungsdauer durch die Aktivierung von STAT1 zu erkennen, aber nicht signifikant genug um einen eindeutigen Unterschied zwischen der Bindungsdauer der aktiven und inaktiven STAT1-Proteine festzustellen.

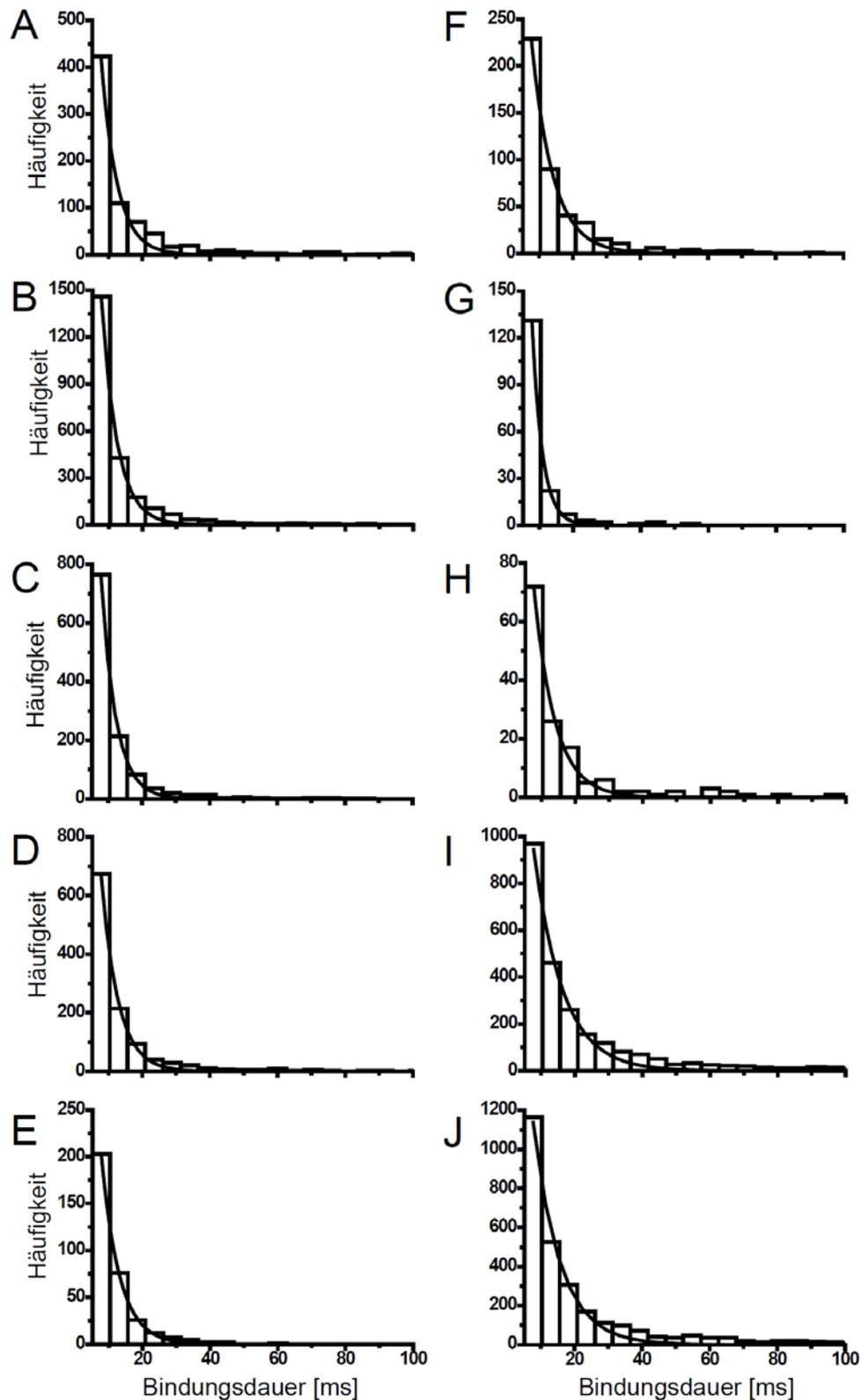


Abbildung 4.22: Die Bestimmung der Bindungsdauer der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nucleus. Die Histogramme zeigen die Häufigkeitsverteilungen der Bindungsereignisse im Zytoplasma (A-E) und im Zellkern (F-J). (A, F) Ovalbumin, (B, G) STAT1-tc, (C, H) STAT1-wt, (D, I) STAT1-P, (E, J) STAT1-wt nach IFN_γ -Stimulierung. Die durchschnittliche Bindungsdauer wurde durch die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Häufigkeitsverteilung ermittelt. Die Resultate sind in der Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Proteine	Bindungsdauer in ms	
	Zytoplasma	Nukleus
Ovalbumin	4,7 ± 0,1	6,3 ± 0,2
STAT1-tc	4,6 ± 0,04	3,0 ± 0,1
STAT1-wt	4,3 ± 0,02	6,2 ± 0,3
STAT1-P	4,9 ± 0,04	8,5 ± 0,1
STAT1-wt + IFN γ	5,3 ± 0,1	8,0 ± 0,1

Tabelle 4.4: Die Bindungsdauer der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus. Die Werte wurden durch die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Häufigkeitsverteilungen in Abbildung 4.22 ermittelt und in ms angegeben.

Im Zellkern hingegen ist die Bindungsdauer der aktiven STAT1-Varianten mit $8,5 \pm 0,1$ ms und $8,0 \pm 0,18$ ms deutlich länger als die des Wildtyps mit $6,2 \pm 0,3$ ms und die des Kontrollproteins Ovalbumin mit $6,3 \pm 0,2$ ms. Auffallend ist auch die extrem kurze Bindungsdauer der Deletionsmutante von nur $3,0 \pm 0,1$ ms, das beweist, dass STAT1-tc im Nukleus keine Bindungen eingeht, da die ermittelte Dauer sogar weit kürzer ist als die Dauer der Aufnahme eines Bildes von 5,22 ms. Die Bindungsdauer von Ovalbumin im Vergleich zu die von STAT1-tc deutet darauf hin, dass Ovalbumin im Zellkern von humanen Zellen unspezifische Bindungen eingeht, obwohl es als inertes Protein in humanen Zellen keine Interaktionen eingehen sollte. Die Unterschiede der Bindungsdauer zwischen den aktiven STAT1-Varianten und dem STAT1-wt betragen nur ungefähr 2 ms. Die Anzahl der identifizierten Bindungsereignisse zwischen den verschiedenen STAT1-Varianten waren jedoch sehr unterschiedlich (Tab.4.5).

Proteine	Anzahl der Bindungsereignisse	
	Zytoplasma	Nukleus
Ovalbumin	743	446
STAT1-tc	2413	169
STAT1-wt	1173	142
STAT1-P	1146	2506
STAT1-wt + IFN γ	334	2884

Tabelle 4.5: Die Bindungsereignisse der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus. In der Tabelle ist die Anzahl der analysierten Bindungsereignisse aus Abbildung 4.22 angegeben.

Im Nukleus wurden bei den aktiven Varianten STAT1-P und STAT1-wt nach IFN γ -Stimulierung 2506 und 2884 Bindungsereignisse gefunden. Bei den inaktiven STAT1-

Varianten wurden deutlich weniger Bindungsereignisse identifiziert. Bei STAT1-tc wurden nur 169 und bei STAT1-wt nur 142 Bindungsereignisse gefunden. Davon waren bei STAT1-tc ungefähr 130 von 169 und bei STAT1-wt ungefähr 70 von 142 Ereignisse sehr kurze Bindungsereignisse mit einer Dauer von 7,8 ms, während bei den aktiven Varianten weit mehr als 200 Bindungsereignisse mit einer Dauer von 18,3 ms und weit über 100 Bindungsereignisse mit einer Dauer von 28,7 ms gefunden wurden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die immobilen STAT1-Moleküle in der Abbildung 4.17 als weiße Regionen gut ersichtlich waren und die größten Bereiche von immobilen Molekülen bei den aktiven STAT1-Varianten zu sehen waren. Von den 446 identifizierten Bindungsereignissen bei Ovalbumin waren mehr als die Hälfte sehr kurze Bindungsereignisse mit einer Dauer von 7,8 ms. Im Zytoplasma wurden bei allen Proteinen hauptsächlich kurze Bindungsereignisse mit einer Dauer von 7,8 ms gefunden. STAT1-tc wies die meisten Bindungsereignisse auf. Bei STAT1-wt und der aktiven Variante STAT1-P war die Anzahl der Bindungsereignisse von 1173 und 1146 fast gleich. Bei Ovalbumin wurden 743 und bei dem mit IFN γ -aktivierten STAT1-wt wurden nur 334 Bindungsereignisse gefunden.

5. Diskussion

5.1 Die Mobilität von Ovalbumin im Zellkern

Die Verteilungs- und Mobilitätsstudien des Proteins Ovalbumin sollen Aufschluss über die Beschaffenheit des Zellkerns geben. Ovalbumin ist ein inertes Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa, das durch freie Diffusion in den und aus dem Zellkern gelangt. Somit kann sich Ovalbumin über die gesamte Zelle verteilen und eignet sich hervorragend um verschiedene intrazelluläre Strukturen zu untersuchen. Der Zellkern weist verschiedene Bereiche mit unterschiedlichen Funktionen auf, aber im Gegensatz zu den Organellen im Zytoplasma sind diese nicht von Membranen umgeben. Trotzdem grenzen sie sich wie die zytoplasmatischen Organellen voneinander ab. Um heraus zu finden wodurch diese Abgrenzung erfolgt, wurden mittels Einzelmolekülmikroskopie die Bewegungen von einzelnen Ovalbuminmolekülen im Nukleoplasma und im Nukleolus beobachtet. Unterschiede im Verhalten des Proteins würden auf eine unterschiedliche Beschaffenheit und Zugänglichkeit dieser Bereiche hinweisen, da sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften der nukleären Regionen auf die Dynamiken der Ovalbuminmoleküle auswirken. Unterschiedliche Mobilitäten deuten z.B. auf verschiedene Viskositäten hin.

5.1.1 Intrazelluläre und intranukleäre Verteilung von Ovalbumin

Die konfokalen Aufnahmen der Mikroinjektionsexperimente von fluoreszenzmarkierten Ovalbumin in HeLa-Zellen unter optimalen physiologischen Bedingungen (Abb. 4.5 A) zeigten eine homogene Verteilung des Ovalbumins in der gesamten Zelle, nur in den Nukleoli war weniger Protein zu sehen. Dieses Phänomen konnte man auch bei allen STAT1-Proteinen beobachten (Abb. 4.14). Die Quantifizierung (Abb. 4.5 B) der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen verdeutlichte die unterschiedliche Verteilung von Ovalbumin im Zellkern: im Vergleich zum Nukleoplasma befand sich nur halb so viel Ovalbumin in den Nukleoli. In einer Studie, in der die Verteilung von FITC-Dextran mit unterschiedlichen Molekulargrößen von 42 bis 2500 kDa im Zellkern analysiert wurden (Görisch *et al.*, 2003), wurde ein größenabhängiger Ausschluss der Dextrane aus den Nukleolus beobachtet. Der Quotient von nukleolärer zu nukleoplasmatischer Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran mit einer Größe von 42 kDa ergab einen Wert von 0,46. Die unterschiedliche Verteilung von Ovalbumin sowie von den FITC-Dextranen in den beiden nukleären Regionen weist auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit und somit auf eine unterschiedliche Beschaffenheit des Nukleoplasmas und des Nukleolus hin. Um diesen sehr auffälligen Effekt genauer zu untersuchen, wurden die Verteilung und

die Bewegung der einzelnen Ovalbuminmoleküle mittels Einzelmolekülmikroskopie beobachtet. Allerdings zeigten diese Aufnahmen eine sehr homogene Verteilung der Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma sowie im Nukleolus (Abb. 4.9). In beiden Regionen konnten unterschiedlich lange Sprungweiten festgestellt werden, die über den gesamten Zellkern gleichmäßig verteilt waren. An einzelnen Positionen wurden wiederholt unbewegliche Moleküle gefunden, die auf Interaktionen hindeuteten. Diese Bewegungseinschränkung konnte aber in beiden Regionen in gleichem Maße beobachtet werden. Die mittels Einzelmolekülmikroskopie aufgenommenen Filmsequenzen zeigten keine unterschiedliche Verteilung und Mobilität von Ovalbumin zwischen dem Nukleoplasma und dem Nukleolus.

5.1.2 Sprungweitenanalyse von Ovalbumin

Die Sprungweitenanalyse gab einen detaillierten Einblick über die Mobilität von Ovalbumin in den beiden nukleären Regionen (Abb. 4.10). Für Ovalbumin wurden vier verschiedene Diffusionskoeffizienten mit Werten von $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $2,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $13,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ im Nukleoplasma und $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $0,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $2,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $11,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ im Nukleolus identifiziert. Die relativen Anteile der vier verschiedenen Mobilitätspopulationen im Nukleoplasma und in dem Nukleolus unterschieden sich nur geringfügig (Tab. 4.2). Dieses Ergebnis war überraschend, da die Wahrscheinlichkeit größere Sprünge im Nukleoplasma zu erfassen wesentlich höher ist als im Nukleolus, weil das Nukleoplasma ungefähr drei bis vierfach größer ist als der Nukleolus. Trotzdem wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den identifizierten Diffusionskoeffizienten und den relativen Anteilen in den beiden nukleären Regionen gefunden. Um die relativen Anteile der Diffusionskoeffizienten direkt miteinander vergleichen zu können, wurde zusätzlich eine Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion mit fest gesetzten Parametern von $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ angepasst. Die resultierenden Anteile der verschiedenen Diffusionskoeffizienten waren in beiden nukleären Regionen fast identisch. Die schnellste Ovalbuminpopulation hatte einen Anteil von 25% und wies mit einem Diffusionskoeffizienten von $12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf freie Diffusion hin. Der Wert passt gut mit dem theoretisch berechneten Wert von $97 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und mit dem von Ovalbumin in wässriger Pufferlösung gemessenen Diffusionskoeffizienten von $90 \mu\text{m}^2/\text{s}$ überein (Ritter, Siebrasse, Veith, Veenendaal und Kubitscheck, unveröffentlichte Daten), es ist allerdings zu beachten, dass im Zellkern die Viskosität ungefähr sieben Mal so hoch ist wie in wässriger Lösung (Lang *et al.*, 1986). Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung (s. Gl. 3.8) kann der Diffusionskoeffizient von Ovalbumin bei freier Diffusion unter Berücksichtigung des Molekulargewichts von 43 kDa und bei einer angenommenen Viskosität der Lösung von 1 berechnet werden. Dieses Resultat bestätigt, dass Ovalbumin im Zellkern von humanen Zellen frei diffundieren kann. Der größte Anteil der Ovalbuminmoleküle mit über 50% bewegte sich im Nukleoplasma und im Nukleolus mit einem Diffusionskoeffizienten von $2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Moleküle diffundieren nicht frei sondern bewegen sich etwas langsamer.

20% der Ovalbuminmoleküle bewegten sich stark eingeschränkt mit einem Diffusionskoeffizienten von nur $0,5\mu\text{m}^2/\text{s}$. Diese Einschränkung der Mobilität wurde in vielen Mobilitätsstudien im Zellkern gezeigt (Grunwald *et al.*, 2008; Siebrasse *et al.*, 2008; Speil *et al.*, 2009) und wird durch eine Behinderung durch nukleäre Moleküle oder Strukturen oder durch einen zu geringen frei zugänglichen Raum hervorgerufen. Der einzige Unterschied in der Mobilität von Ovalbumin zwischen dem Nukleoplasma und dem Nukleolus wurde bei der immobilen Mobilitätspopulation gefunden, da diese nur im Nukleoplasma mit einem Anteil von 6% identifiziert werden konnte.

Wenn man alle Ergebnisse der Sprungweitenanalyse zusammenfasst, sind die Werte der identifizierten Ovalbuminmobilitäten und die dazugehörigen Anteile im Nukleoplasma und im Nukleolus sehr ähnlich, so dass man auch ähnliche Viskositäten in beiden Bereichen annehmen kann. Vergleichbare Resultate wurden auch in einer Mobilitätsstudie von Streptavidin-NLS in primären Mäusemyoblasten (C2C12-Zellen) gefunden (Grunwald *et al.*, 2008). Dieses Protein zeigte auf Einzelmolekülebene eine homogene Verteilung im gesamten Zellkern wie Ovalbumin und bei den Messungen am konfokalen Mikroskop eine geringere Proteinkonzentration in den Nukleoli als im restlichen Nukleoplasma. Das Streptavidin-NLS konnte ebenfalls frei in und aus den nukleären Kompartimenten diffundieren ohne an den jeweiligen Übergängen zwischen den verschiedenen Domänen länger zu verweilen. Somit konnte man eine Behinderung durch eine physikalische Barriere an den Grenzen um das jeweilige Kompartiment ausschließen, was zu einer unterschiedlichen intranukleären Verteilung der Proteine hätte führen können.

Die unterschiedliche Verteilung wurde nur bei den LSM-Aufnahmen beobachtet, da auch die Anzahl der untersuchten Sprünge bezogen auf die Größe der Fläche des Nukleoplasmas und des Nukleolus in beiden nukleären Regionen annähernd gleich waren. Im Vergleich zu den Messungen am Einzelmolekülmikroskop wurde bei den Experimenten am LSM ungefähr die tausendfache Menge an Ovalbumin in die Zellen injiziert. Das deutet darauf hin, dass die Anzahl der Sprünge die zur Analyse der Sprungweitenverteilung beigetragen haben zu gering war und deshalb keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der vier Mobilitätspopulationen von Ovalbumin in den beiden nukleären Regionen identifiziert werden konnten.

5.1.3 Bindungsdauer von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus

In den Aufnahmen mittels Einzelmolekülmikroskopie konnten unbewegliche Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und im Nukleolus beobachtet werden, obwohl sich Ovalbumin in humanen Zellen wie ein inertes Protein verhalten sollte, das keine Interaktionen eingeht. Mittels Sprungweitenanalyse wurde die immobile Population von Ovalbumin im Nukleoplasma mit einem relativen Anteil von 5% und im Nukleolus mit 1 % gefunden. Bei der Analyse mit ausschließlich konstant gehaltenen Parametern wurde die immobile Population nur im Nukleoplasma mit einem Anteil von 6 % gefunden.

Durch die Bestimmung der Bindungsdauer der unspezifischen Bindungsereignisse einzelner Ovalbuminmoleküle in den beiden nukleären Regionen sollten Unterschiede in der Dauer der Bindung von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus festgestellt werden. Tatsächlich wurde im Nukleoplasma eine Bindungsdauer von $8 \pm 0,3$ ms und im Nukleolus einer Dauer von $6,3 \pm 0,3$ ms ermittelt. Die unterschiedliche Verteilung von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus wurde wahrscheinlich durch die unterschiedlich lange Dauer der Interaktionen von Ovalbumin in den beiden Regionen hervorgerufen. Die Anzahl der gefundenen Bindungsereignisse waren jedoch, bezogen auf die Fläche der beiden nukleären Regionen, im Nukleoplasma mit ungefähr 600 und im Nukleus mit circa 200 gleich groß. Allerdings wurde eine ähnliche Anzahl an Bindungsereignisse in beiden Regionen erwartet, da in den Fluoreszenzaufnahmen mittels Einzelmolekülmikroskopie die Positionen, in denen man die immobilisierten Moleküle wiederholt beobachtet hatte, über den gesamten Zellkern gleichmäßig verteilt waren.

Um herauszufinden, ob die längere Bindungszeit im Nukleoplasma durch Interaktionen mit dem Chromatin verursacht wurde, wurde die Lokalisierung des Chromatins mit der von Ovalbumin in H2B-GFP-Zellen verglichen. Da Chromatin die dominierende Struktur im Nukleoplasma ist, das verschieden dicht gepackt vorliegt und sich wie ein Netzwerk über das gesamte Nukleoplasma verteilt, wurde vermutet, dass das Chromatin zu einer Immobilisierung von Ovalbumin führt. Allerdings waren in den Aufnahmen der Fluoreszenzintensitäten verschiedene Verteilungen von Ovalbumin und Chromatin im Nukleus zu sehen (Abb. 4.12). Es wurden keine Regionen gefunden, in denen die Signale von Ovalbumin mit den Fluoreszenzsignalen des Chromatins übereinstimmten, womit man eine Bindung von Ovalbumin an das Chromatin ausschließen kann.

Die Interaktionen der einzelnen Ovalbuminmoleküle im Zellkern könnten aber auch durch den an das Ovalbumin gekoppelten Farbstoff hervorgerufen worden sein. Um das zu vermeiden, wurden die Kopplungsreaktionen von Ovalbumin und den STAT1-Proteinen mit dem Farbstoff ATTO647N im Verhältnis 1:1 angesetzt und anschließend das Markierungsverhältnis, das bei jeder Proteinlösung kleiner ≤ 1 war, überprüft. Trotzdem kann man eine Beeinträchtigung durch den Farbstoff gerade auf Einzelmolekülebene nicht komplett ausschließen.

Die Untersuchung der intranukleären Mobilität von Ovalbumin wurde dazu verwendet um die Mess- und Analysemethoden für die Untersuchung der intrazellulären Dynamik der STAT1-Transkriptionsfaktoren zu entwickeln und die experimentellen Techniken in humanen Zellen unter optimal physiologischen Bedingungen zu optimieren.

5.2 Die intrazelluläre Dynamik der STAT1-Proteine

Die Untersuchung der intrazellulären Dynamik von STAT1-Transkriptionsfaktoren mittels Einzelmolekülmikroskopie soll komplexe molekulare Prozesse wie die Signalübermittlung in Zellen sowie das Verhalten von Transkriptionsfaktoren im Nukleus aufklären. Die Besonderheit der STAT1-Proteine ist, dass sie ankommende Signale direkt vom Rezeptor an der Zellmembran zu den Zielgenen im Nukleus übermitteln und dort die Transkription dieser Gene aktivieren (Levy *et al.*, 2002; Reich *et al.*, 2006). Das ermöglicht die Beobachtung eines gesamten Signaltransduktionsweges in lebenden Zellen.

Der Transkriptionsfaktor STAT1 befindet sich präferentiell im Zytoplasma und liegt dort hauptsächlich als Monomer vor. Nach der Stimulation mit Zytokinen werden die STAT1-Monomere an spezifischen Tyrosinresten durch die aktivierten Januskinasen phosphoryliert. Die phosphorylierten Monomere können daraufhin durch ihre SH2-Domäne dimerisieren. Durch die Dimerisierung wird die dimerspezifische NLS demaskiert, von den Importinen erkannt und STAT1 in den Zellkern transportiert. Dort bindet STAT1 an spezifische DNA-Sequenzen, die Promotoren und initiiert die Transkription ihrer Zielgene. Aber auch ohne Zytokinsignal gelangen die inaktiven STAT1-Proteine in den Nukleus, dabei kommt es zu einem konstitutiven Austausch von unphosphoryliertem STAT1 zwischen Zytoplasma und Nukleus ohne die Beteiligung von Importinen und metabolische Energie (Meyer *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2004).

Diese Eigenschaften der STAT1-Proteine eignen sich perfekt dazu, um die Komplexität und die Dynamik von zellulären Signalwegen aufzuklären, indem man die intrazellulären Dynamiken von aktiven und inaktiven STAT1-Proteinen auf Einzelmolekülebene analysiert und vergleicht. Um sicher zu stellen, dass die Proteine in aktiver oder inaktiver Form vorliegen, wurden drei verschiedene STAT1-Varianten analysiert: der Wildtyp (STAT1-wt) mit und ohne IFN- γ Stimulierung, der phosphorylierte Wildtyp (STAT1-P) und die N- und C-terminal verkürzte Deletionsmutante STAT1-tc. STAT1-P liegt als phosphoryliertes Dimer vor und stellt die aktive Form von STAT1 dar und STAT1-tc die inaktive Form von STAT1, da es nicht phosphoryliert vorliegt und durch die Deletion des N-Terminus nicht dimerisieren kann (Vinkemeier *et al.*, 1996; Wenta *et al.*, 2008). Der N-Terminus von STAT1 beinhaltet Sequenzhomologien (Vinkemeier *et al.*, 1996; Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000; Wenta *et al.*, 2008), die zu einer Dimerisierung von inaktivem STAT1-wt führen können. Jedoch liegen diese Dimere in einer antiparallelen Konformation vor und die Bindung an die DNA ist schwach (Wenta *et al.*, 2008). Die Tyrosinphosphorylierung ist unerlässlich für eine effektive Bindung an die DNA, da die Bildung von phosphorylierten Dimeren die DNA-Bindeaktivität von STAT1 um mehr als das 200fache erhöht (Wenta *et al.*, 2008).

5.2.1 Intrazelluläre Verteilung der STAT1-Proteine

Das unterschiedliche Verhalten zwischen aktiven und inaktiven STAT1-Varianten war bereits bei den konfokalen Aufnahmen eindeutig ersichtlich. Der Wildtyp und die Deletionsmutante zeigten eine annähernd homogene Verteilung in der gesamten Zelle. Die phosphorylierte Variante sowie der Wildtyp nach IFN γ -Stimulierung waren hingegen hauptsächlich im Nukleus lokalisiert und zeigten teilweise eine Akkumulation im Zellkern (Abb. 4.14). Zusätzlich wurden die Verteilungen von zwei Kontrollproteinen GST-NLS und Ovalbumin untersucht. GST-NLS wird über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus in den Zellkern transportiert und Ovalbumin kann aufgrund von einem Molekulargewicht von 43 kDa durch die NPCs diffundieren. Erwartungsgemäß akkumulierte GST-NLS im Zellkern und Ovalbumin verteilte sich gleichmäßig in der Zelle. Ovalbumin wurde auch in allen weiteren Experimenten als Referenzprotein eingesetzt, da es frei in den und aus dem Zellkern diffundieren kann und keine spezifischen Interaktionen in humanen Zellen eingeht.

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten und die daraus ermittelten Importraten verdeutlichten die unterschiedlichen Verteilungen von aktiven und inaktiven STAT1 sowie von GST-NLS und Ovalbumin im Zytoplasma und im Zellkern (Abb. 4.15). Die höchsten Importraten wurden bei GST-NLS ermittelt und Ovalbumin verteilte sich nahezu homogen in den HeLa-Zellen. Wie erwartet, wurde aktives STAT1 in den Zellkern transportiert und akkumulierte dort bereits 30 min nach der Mikroinjektion in das Zytoplasma der Zellen. Hingegen stellte sich bei dem unstimulierten Wildtyp und der Deletionsmutante bereits nach 15 min ein Gleichgewicht ein und es befanden sich nur halb so viele Proteine im Nukleus als im Zytoplasma.

Die Mikroinjektionsexperimente am LSM zeigten den Effekt der STAT1-Aktivierung in HeLa-Zellen, den Zusammenhang der STAT1-Phosphorylierung mit dem aktiven Transport in den Zellkern und der damit verbundenen Akkumulation. Es konnte aber auch die Translokation von inaktivem STAT1 in den Zellkern nachgewiesen werden. Ähnliche Resultate wurden in einer Veröffentlichung der Gruppe von Prof. Uwe Vinkemeier (Marg *et al.*, 2004) präsentiert, sie analysierten den Import von verschiedenen STAT1-Varianten in den Zellkern und fanden heraus, dass der unstimulierte Wildtyp ohne metabolische Energie und Transportfaktoren in den Nukleus translozieren kann.

5.2.2 Intrazelluläre Verteilung einzelner STAT1-Moleküle

Die Analyse der intrazellulären Verteilung der STAT1-Varianten und des Kontrollproteins Ovalbumin mittels Einzelmolekülmikroskopie (Abb.4.17) bestätigten die Beobachtungen am LSM. Die einzelnen Ovalbuminmoleküle waren gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Im Zytoplasma und im Nukleus konnte man unterschiedlich lange Sprungdistanzen in den Ovalbumintrajektorien und auch Trajektorien von unbeweglichen Molekülen erkennen. STAT1-tc hielt sich hauptsächlich im Zytoplasma auf und es

befanden sich nur wenige STAT1-tc Moleküle im Zellkern. Die Bewegungen von STAT1-tc im Zytoplasma sowie im Zellkern waren sehr unterschiedlich, man konnte sehr schnelle Moleküle mit großen Sprungweiten aber auch Bereiche mit immobilen Molekülen erkennen. Der Wildtyp wies eine ähnlich heterogene Mobilität wie die Mutante auf, jedoch waren weniger große Sprungweiten zu sehen. Die intrazelluläre Verteilung der STAT1-wt Moleküle ist ebenfalls mit der Verteilung der Mutante vergleichbar, da sich die meisten Moleküle wie beim inaktiven STAT1-tc im Zytoplasma der Zellen befanden. Die geringe Anzahl an Molekülen im Zellkern sowie die Beobachtungen und die Quantifizierung der intrazellulären Proteinverteilungen in den konfokalen Aufnahmen weisen darauf hin, dass die inaktiven Varianten nicht über den Importin-vermittelten Translokationsmechanismus in den Zellkern importiert werden und dadurch dieser Translokationsweg vollständig wegfällt. Im Vergleich zur intrazellulären Verteilung von Ovalbumin führte die Translokation von inaktiven STAT1 in den Zellkern nicht zu einer gleichmäßigen Verteilung der Moleküle in der gesamten Zelle. Bei den aktiven STAT1-Varianten verhielt sich das genau umgekehrt. Das STAT1-P sowie der STAT1-wt nach IFN γ -Stimulierung waren hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und bewegten sich im Gegensatz zu den inaktiven STAT1-Molekülen sehr langsam. Im Nukleus verursachte die Aktivierung von STAT1 eine Immobilisierung der STAT1-Moleküle, da ein Großteil der Moleküle wiederholt an denselben Positionen zu sehen war. Dieser Effekt war bei den Experimenten mit dem IFN γ -stimulierten Wildtyp noch stärker ausgeprägt. Die Immobilisierung der aktiven STAT1-Varianten im Zellkern wurde voraussichtlich durch die Bindung der Moleküle an die DNA hervorgerufen.

5.2.3 Sprungweitenanalyse von STAT1

Für die statistische Analyse der Mobilitäten der STAT1-Varianten wurde die Sprungweitenanalyse mit vier konstant gehaltenen Diffusionskoeffizienten $D_1 = 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_3 = 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_4 = 12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ durchgeführt, um die relativen Anteile der unterschiedlichen Bewegungen besser untereinander vergleichen zu können. Diese vier verschiedenen Diffusionskoeffizienten wurden durch eine Anpassung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion unter der Annahme von vier Populationen an die Sprungweitenhistogramme und anschließender Mittelung der Werte für jede Population bestimmt (4.3.3). Der Diffusionskoeffizient von $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ beschreibt die immobilen Moleküle, da die resultierende Sprungweite von 50 nm der Lokalisierungsgenauigkeit von Ovalbumin-ATTO647N in lebenden Zellen entspricht, während die frei diffundierenden STAT1-Proteine mit einem Diffusionskoeffizienten von $12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ beschrieben werden. Ähnliche Werte wurden mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung für den STAT1-wt ermittelt. Mit einem Molekulargewicht von 87 kDa und bei einer angenommenen Viskosität von 8,1 cP im Zytoplasma (Lang *et al.*, 1986) wurde ein Diffusionskoeffizient von $9,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und bei einer angenommenen Viskosität von 6,6 cP im Nukleus ein Wert von $11,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für eine freie Diffusion von STAT1-wt bestimmt. Die restlichen zwei Diffusionskoeffizienten mit den Werten von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ beschreiben die

Bewegungen, die z.B. durch Komplexbildung mit anderen Proteinen oder durch zu wenig frei zugänglichen Raum zu einer eingeschränkten Diffusion führen (Grunwald *et al.*, 2008; Siebrasse *et al.*, 2008; Hager *et al.*, 2009; Speil *et al.*, 2009).

Die Mobilität von Ovalbumin war im Zytoplasma und im Nukleus sehr ähnlich. Die meisten Sprünge erfolgten mit einem D von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und wiesen auf eine eingeschränkte Bewegung von Ovalbumin hin, obwohl Ovalbumin keine Interaktionen in humanen Zellen eingehen sollte. Nur 8% des Ovalbumins diffundierten frei im Zytoplasma und im Nukleus betrug der Anteil 19%. Über 15% von Ovalbumin war im Zytoplasma und im Nukleus immobil. Die Quantifizierung der Mobilitäten zeigte erhebliche Unterschiede zwischen aktiven und inaktiven STAT1-Varianten. STAT1-tc bewegte sich im Zellkern am schnellsten, 46% der Proteine diffundierten frei und 43% diffundierten mit einem Diffusionskoeffizienten von $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Der unstimulierte Wildtyp bewegte sich zwar deutlich langsamer als die Mutante, enthielt aber weder immobile noch frei diffundierende Moleküle, 52 % der Sprünge wiesen einen D von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und 48% einen D von $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf. Erst bei den aktiven STAT1-Varianten war eine Immobilisierung zu sehen. Von den phosphorylierten STAT1-Molekülen waren 34% immobil und 52% bewegten sich extrem langsam mit einem Diffusionskoeffizienten von $0,475 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dieser Effekt war bei dem STAT1-wt nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulierung noch stärker ausgeprägt. 44% der Moleküle waren immobil und 41% der Moleküle bewegten sich sehr langsam. Bei beiden aktiven STAT1-Varianten konnten keine frei diffundierenden Moleküle nachgewiesen werden. Auch im Zytoplasma verursachte die STAT1-Aktivierung eine Verlangsamung der STAT1-Mobilität. Während bei den inaktiven STAT1-Varianten eine annähernd homogene Verteilung von allen vier Mobilitätstypen gefunden wurde, zeigte das phosphorylierte STAT1 nur einen geringen Anteil und der $\text{IFN}\gamma$ stimulierte STAT1-wt einen vollständigen Verlust der schnellsten Population.

Die Ergebnisse der Sprungweitenanalyse von Ovalbumin im Zytoplasma von HeLa-Zellen waren sehr überraschend, da sich die einzelnen Ovalbuminmoleküle sehr langsam bewegten und auch immobil waren. Die Population mit freier Diffusion war mit nur 8% die kleinste. Diese stark eingeschränkte Diffusion von Ovalbumin wurde möglicherweise durch unspezifische Interaktionen mit Strukturen bzw. Molekülen im Zytoplasma von HeLa-Zellen hervorgerufen. Das weist darauf hin, dass sich Ovalbumin nicht wie ein inertes Protein verhält und als Referenzprotein, welches keine Interaktionen in humanen Zellen zeigen sollte, nicht geeignet ist. Der unstimulierte Wildtyp sowie die Mutante zeigten deutlich höhere Mobilitäten, die schnellste Population von STAT1-wt hatte sogar einen Anteil von über 20%. Eine Veröffentlichung von Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP)- und Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)-Experimenten mit unphosphoryliertem STAT1-GFP zeigte, dass sich STAT1 im gesamten Zytoplasma humaner Fibrosakoma-Zellen mit und ohne ATP sehr schnell bewegt, vergleichbar mit freiem GFP (Lillemeier *et al.*, 2001; Reich, 2007). In unstimulierten Zellen liegt der Wildtyp wie erwähnt als Monomer oder als antiparalleles Dimer vor (Vinkemeier, 2004; Vinkemeier *et al.*, 1996), dadurch kommt es auch nicht zu Interaktionen mit den

Importinen. Somit können sich die STAT1-wt Moleküle ungehindert im Zytoplasma der HeLa-Zellen bewegen und weisen vor allem sehr schnelle Mobilitäten auf.

STAT1-tc bewegte sich im Zytoplasma langsamer als der Wildtyp, obwohl STAT1-tc in unphosphorylierter Form vorliegt und durch die Deletion der Amino-terminalen Domäne nur als Monomer vorkommen kann.

Nur bei der Dimerisierung von phosphorylierten STAT1 kommt es auch zu einer Demaskierung der dimerspezifischen NLS (Meyer *et al.*, 2004). Die Demaskierung der NLS ist notwendig, um von den Transportfaktoren erkannt zu werden, die den aktiven Import von STAT1 in den Zellkern vermitteln. Nur durch die Bindung der Transportfaktoren an das aktivierte STAT1-Dimer wird ein Importkomplex gebildet, das führt zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Radius und dadurch zu einer eingeschränkten Diffusion. Der Importkomplex, der aus dem STAT1-Homodimer, dem Importin α und Importin β besteht, hätte ein Molekulargewicht von ungefähr 331 kDa. Unter der Berücksichtigung der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich für den Importkomplex bei einer Viskosität von 8,1 cP im Zytoplasma ein Radius von 4,5 nm und ein Diffusionskoeffizient von $6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermitteln. Für den monomeren STAT1-wt mit einer Größe von 87 kDa wurde ein Radius von 2,9 nm und einen D von $9,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt. Somit führte wahrscheinlich die Bildung des Importkomplexes zu der Verlangsamung der Mobilität der aktiven STAT1-Moleküle im Vergleich zu inaktivem STAT1.

Im Zellkern bewegte sich Ovalbumin im Vergleich zum STAT1-tc sehr langsam. Wie im Zytoplasma bewegte sich Ovalbumin auch im Nukleus stark eingeschränkt. In den Aufnahmen mit dem Einzelmolekülmikroskop waren im Zytoplasma wie im Zellkern mehrere Bereiche mit immobilisierten Ovalbuminmolekülen zu sehen, die wahrscheinlich durch unspezifische Bindungen verursacht wurden. Das bestätigt nochmals, dass sich Ovalbumin weder im Zytoplasma noch im Zellkern von HeLa-Zellen wie ein inertes Protein verhält. Im Gegensatz dazu wurden in der Mobilitätsanalyse von STAT1-tc fast ausschließlich schnelle Populationen gefunden. Dieses Resultat war nicht überraschend, da STAT1-tc durch die Deletion des N-Terminus keine antiparallelen Dimere ausbilden kann, um mit der DNA in Wechselwirkung zu treten (Vinkemeier *et al.*, 1996; Wenta, 2008; Wenta *et al.*, 2008), so dass langsame Bewegungen von STAT1-tc sowie immobile STAT1-tc Moleküle im Zellkern nicht zu erwarten waren. Mit FRAP-Experimenten wurden in HeLa-Zellen, die verschiedene rekombinante STAT1-GFP-Fusionsproteine exprimierten, ebenfalls verschiedene Mobilitäten von STAT1 im Nukleus ohne und nach einer IFN γ -Stimulierung nachgewiesen (Lodige *et al.*, 2005). STAT1-wt-GFP zeigte in den stimulierten Zellen eine reduzierte Mobilität, während STAT1-tc-GFP in den stimulierten sowie in den unstimulierten Zellen keine unterschiedliche Mobilität aufwies.

Bei der Analyse von STAT1-wt wurden keine immobilisierten und frei diffundierende Moleküle gefunden, aber trotzdem war eine Reduktion der Mobilität im Vergleich zu STAT1-tc erkennbar. In Electrophoretic Mobility Shift Assay-Experimenten mit GAS-Sonden wurde gezeigt, dass eine mindestens 200fach höhere Konzentration an antiparallelen STAT1-Dimeren notwendig ist, um eine vergleichbare DNA-Bindeaktivität wie das phosphorylierte Dimer zu erreichen (Wenta *et al.*, 2008). Trotzdem reguliert unphosphoryliertes STAT1 die

Transkription einiger Caspasegene und die des LMP2-Gens (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000). Dabei bildet das unphosphorylierte STAT1 mit dem IRF1-Protein einen Komplex und bindet an die Promoterregion von LMP2 um dessen Transkription zu unterstützen (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2008). Die Mobilitätsanalyse und die Aufnahmen der einzelnen STAT1-wt-Moleküle zeigten, dass sich STAT1-wt im Zellkern von HeLa-Zellen stark eingeschränkt bewegte aber nicht immobil war.

Im Nukleus deutet die Immobilisierung der aktiven STAT1-Varianten auf eine DNA-Bindung hin, da die aktivierten STAT1-Homodimere an die Promotoren binden um die Transkription ihrer Zielgene zu initiieren (Meyer *et al.*, 2004; Reich, 2007; Reich *et al.*, 2006). Bei den aktiven Varianten war ungefähr die Hälfte der Moleküle im Zellkern immobil und die andere Hälfte der Moleküle bewegte sich sehr langsam. Auch in FRAP-Experimenten mit einem anderen Transkriptionsfaktor, dem Glukokortikoidrezeptor, wurden um 10 bis 100fach kleinere Diffusionskoeffizienten gefunden als man ausgehend vom Molekulargewicht des Proteins erwartet hätte (Hager *et al.*, 2009), da Transkriptionsfaktoren nicht nur an die DNA binden sondern auch mit regulatorischen Proteinen und mit Transkriptionskofaktoren oft große Komplexe bilden, wodurch sie sich wesentlich langsamer bewegen. Zusätzlich kann es auch zu einer Verringerung der Mobilität kommen, wenn die Transkriptionsfaktoren entlang der DNA ihre spezifischen Bindungsstellen suchen und somit wiederholt mit der DNA interagieren. Abbildung 5.1 veranschaulicht drei Möglichkeiten, die nach aktueller Vorstellung zu einer eingeschränkten Diffusion von STAT1-Transkriptionsfaktoren in Nukleus führen können.

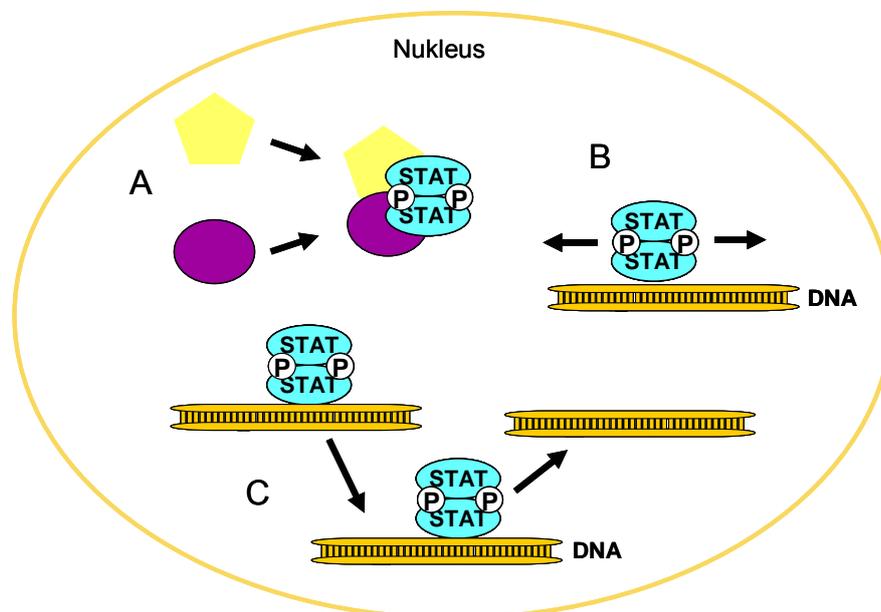


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Modelle, die zu einer eingeschränkten Mobilität von STAT1-Transkriptionsfaktoren im Nukleus führen. Es sind die drei Möglichkeiten dargestellt, die zu einer eingeschränkten Bewegung von aktiven STAT1 führen können. (A) STAT1 interagiert mit regulatorischen Proteinen und bildet große Proteinkomplexe. (B) STAT1 bewegt sich entlang der DNA, um die spezifischen Bindungsstellen zu finden. (C) STAT1 interagiert und dissoziiert wiederholt mit und von der DNA, um die Bindungsstellen zu finden.

5.2.4 Bindungsdauer der STAT1-Proteine

Die Sprungweitenanalyse zeigte, dass die Aktivierung von STAT1 zu einer Immobilisierung von STAT1 im Zellkern führte. Dieser Effekt wird voraussichtlich durch die spezifische Bindung der aktiven Homodimere an die DNA hervorgerufen. Um die Dauer dieser Bindungen zu ermitteln, wurde die Bindungsdauer der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus bestimmt und verglichen. Im Zytoplasma ist die ermittelte Bindungsdauer der aktiven und inaktiven STAT1-Varianten sehr ähnlich. Die Bindungsdauer der aktiven STAT1-Proteine ist etwas länger, aber der Unterschied ist sehr klein. Im Nukleus sind die Werte unterschiedlicher, das phosphorylierte STAT1-Protein zeigte die längste Bindungsdauer mit $8,5 \pm 0,1$ ms, danach folgt der mit $\text{IFN}\gamma$ -stimulierte Wildtyp mit $8,0 \pm 0,1$ ms, Ovalbumin mit $6,3 \pm 0,2$ ms, der unstimulierte Wildtyp mit $6,2 \pm 0,3$ ms und die Deletionsmutante mit der kürzesten Dauer von nur $3,0 \pm 0,1$ ms. Die längeren Bindungszeiten der aktiven STAT1-Proteine würden im Vergleich zu der Bindungsdauer der anderen Proteine auf eine spezifische Bindung hinweisen, allerdings wurde in der Vorstudie mit Ovalbumin ebenfalls eine Bindungsdauer von 8 ms ermittelt, obwohl Ovalbumin keine spezifischen Bindungen in humanen Zellen eingehen sollte. Dadurch stellte sich heraus, dass sich diese Methode nicht zur Bestimmung der Bindungsdauer von einzelnen Molekülen eignet, da in den Aufnahmen bei den aktiven STAT1-Molekülen im Gegensatz zu Ovalbumin viel längere Bindungsereignisse beobachtet wurden. Bei der Bestimmung der Bindungsdauer wurden alle Sprünge, die keine größeren Distanzen als die dreifache Lokalisierungsgenauigkeit von ungefähr 50 nm zurücklegten aussortiert. Somit wurden auch Sprünge die nicht in einem eingeschränkten Bereich durch immobile Moleküle erfolgten sondern von Molekülen mit sehr langsamen Bewegungen mit aussortiert. Es wird bereits eine neue Analysemethode entwickelt, die genau diese Problematik berücksichtigt.

Viel größer waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Proteinen bei der Anzahl der identifizierten Bindungsereignisse. Im Zytoplasma wurden 743 Bindungsereignisse bei der Analyse von Ovalbumin, 2413 bei STAT1-tc, 1173 bei STAT1-wt, 1146 von STAT1-P und nur 334 bei STAT1-wt nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulierung identifiziert. Jedoch waren die identifizierten Ereignisse im Zytoplasma hauptsächlich sehr kurze Bindungsereignisse mit einer Dauer von 7,8 ms. Bei STAT1-tc waren 1459 von 2413 und bei STAT1-wt 765 von 1173 kurze Ereignisse mit einer Aufenthaltsdauer von 7,8 ms. Im Nukleus hingegen wurden bei Ovalbumin 446, bei STAT1-tc nur 169, bei STAT1-wt ebenfalls nur 142 und bei den aktiven STAT1-Varianten STAT1-P 2506 und bei dem $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten STAT1-wt 2884 Bindungsereignisse gefunden. Bei den beiden aktiven STAT1-Varianten wurden jeweils über 200 Bindungsereignisse mit einer Dauer von 18,3 ms und über 100 mit einer Dauer von 28,7 ms identifiziert. Diese unterschiedliche Verteilung der verschiedenen STAT1-Varianten wurde bereits in den konfokalen Aufnahmen gezeigt und bestätigt die Fähigkeit der aktiven Varianten im Zellkern zu akkumulieren.

Es kann wie folgt zusammengefasst werden:

- Ovalbumin verhält sich in humanen Zellen nicht wie ein inertes Protein, da es unspezifische Interaktionen eingeht
- STAT1 wurde im Zellkern von unstimulierten Zellen beobachtet
- Die STAT1-Aktivierung führte zu einer eingeschränkten Mobilität der STAT1-Moleküle und zu einer Akkumulation von STAT1 im Zellkern
- Aktives STAT1 bewegte sich im Zytoplasma im Vergleich zu inaktivem STAT1 sehr langsam, da wahrscheinlich die Interaktion mit den Transportrezeptoren zu einer eingeschränkten Mobilität führte
- Die Hälfte der STAT1-Transkriptionsfaktoren bewegte sich im Zellkern stark eingeschränkt, weil sie möglicherweise mit anderen Proteinen interagierten oder ihre Bindungsstellen in der DNA suchten, und die andere Hälfte von STAT1 war immobil, da sie voraussichtlich spezifisch an die DNA banden
- STAT1-tc bewegte sich im Zellkern sehr schnell, was darauf hindeutet, dass es durch die Deletionen am N- und C-Terminus wahrscheinlich keine Interaktionen eingehen kann

5.3 Ausblick

Um weitere Einblicke in die intrazelluläre Dynamik einzelner STAT1-Moleküle während der Signaltransduktion zu erhalten, könnte man Interaktionspartner von STAT1, wie z.B.: die Transportrezeptoren Importin α und β oder Koaktivatoren der Transkription mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren und dadurch die Interaktionen visualisieren und die Dauer der Interaktionen bestimmen. Somit könnte man auch den Transport des Importkomplexes und die Translokation von inaktiven STAT1 durch die NPCs sowie Interaktionen mit den Komponenten der NPCs beobachten.

Die Untersuchung dieser Protein-Protein-Wechselwirkungen könnte man auch mit Förster-Resonanzenergietransfer-Experimenten durchführen. Der erste Schritt der STAT1-Signaltransduktion ist die Aktivierung von STAT1 an den Zytokinrezeptor in der Zellmembran. Da diese Interaktionen direkt an der Zellmembran stattfinden, könnte man diese Bindungsereignisse mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie untersuchen, da man mit dieser Methode einen deutlich höheren Kontrast erzielt.

Somit könnte man die einzelnen Schritte der STAT1-Signaltransduktion auf Einzelmolekülebene beobachten und analysieren und die jeweilige Dauer der einzelnen Reaktionen bestimmen.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., L. A.H., und P.J. S. 2000. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, 4. Aufl.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, und P. Walter. 2007. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 5. Aufl.
- Atkins, P.W., und J. de Paula. 2006. Physikalische Chemie. Wiley VCH, 4. Aufl.
- Begitt, A. 2004. Nucleocytoplasmatischer Transport und Geninduktion durch den Transkriptionsfaktor STAT1. Dissertation, freie Universität Berlin.
- Bond, C.S., und A.H. Fox. 2009. Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *J Cell Biol.* 186:637-44.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Campbell, N.A., und J.B. Reece. 2009. Biologie. Pearson Studium, 8. Aufl.
- Chatterjee-Kishore, M., K.L. Wright, J.P. Ting, und G.R. Stark. 2000. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J.* 19:4111-22.
- Christova, R., T. Jones, P.J. Wu, A. Bolzer, A.P. Costa-Pereira, D. Watling, I.M. Kerr, und D. Sheer. 2007. P-STAT1 mediates higher-order chromatin remodelling of the human MHC in response to IFN γ . *J Cell Sci.* 120:3262-70.
- Copeland, N.G., D.J. Gilbert, C. Schindler, Z. Zhong, Z. Wen, J.E. Darnell, Jr., A.L. Mui, A. Miyajima, F.W. Quelle, J.N. Ihle, und et al. 1995. Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics.* 29:225-8.
- Decker, T., P. Kovarik, und A. Meinke. 1997. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res.* 17:121-34.
- Dundr, M., und T. Misteli. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.* 356:297-310.
- Fahrenkrog, B., und U. Aebi. 2003. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:757-66.
- Fox, A.H., C.S. Bond, und A.I. Lamond. 2005. P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Mol Biol Cell.* 16:5304-15.
- Gorisch, S.M., K. Richter, M.O. Scheuermann, H. Herrmann, und P. Lichter. 2003. Diffusion-limited compartmentalization of mammalian cell nuclei assessed by microinjected macromolecules. *Exp Cell Res.* 289:282-94.
- Grunwald, D., A. Hoekstra, T. Dange, V. Buschmann, und U. Kubitscheck. 2006. Direct observation of single protein molecules in aqueous solution. *Chemphyschem.* 7:812-5.
- Grunwald, D., R.M. Martin, V. Buschmann, D.P. Bazett-Jones, H. Leonhardt, U. Kubitscheck, und M.C. Cardoso. 2008. Probing intranuclear environments at the single-molecule level. *Biophys J.* 94:2847-58.

- Grunwald, D., B. Spottke, V. Buschmann, und U. Kubitscheck. 2006b. Intranuclear binding kinetics and mobility of single native U1 snRNP particles in living cells. *Mol Biol Cell*. 17:5017-27.
- Hager, G.L., J.G. McNally, und T. Misteli. 2009. Transcription dynamics. *Mol Cell*. 35:741-53.
- Handwerger, K.E., J.A. Cordero, und J.G. Gall. 2005. Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low-density, sponge-like structure. *Mol Biol Cell*. 16:202-11.
- Hartman, S.E., P. Bertone, A.K. Nath, T.E. Royce, M. Gerstein, S. Weissman, und M. Snyder. 2005. Global changes in STAT target selection and transcription regulation upon interferon treatments. *Genes Dev*. 19:2953-68.
- Karp, G. 2005. *Molekulare Zellbiologie*. Springer, 4.Aufl.
- Kovarik, P., M. Mangold, K. Ramsauer, H. Heidari, R. Steinborn, A. Zotter, D.E. Levy, M. Muller, und T. Decker. 2001. Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *Embo J*. 20:91-100.
- Kramer, O.H., und T. Heinzel. 2010. Phosphorylation-acetylation switch in the regulation of STAT1 signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 315:40-8.
- Kubitscheck, U., O. Kuckmann, T. Kues, und R. Peters. 2000. Imaging and tracking of single GFP molecules in solution. *Biophys J*. 78:2170-9.
- Kubitscheck, U., D. Grunwald, A. Hoekstra, D. Rohleder, T. Kues, J.P. Siebrasse, und R. Peters. 2005. Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 168:233-43.
- Kues, T. 2001. Visualisierung einzelner Proteinmoleküle und Analyse ihrer Trajektorien in intakten Zellkernen mittels Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie. Dissertation, Universität Bremen.
- Kues, T., R. Peters, und U. Kubitscheck. 2001. Visualization and tracking of single protein molecules in the cell nucleus. *Biophys J*. 80:2954-67.
- Lanctot, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli, und T. Cremer. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet*. 8:104-15.
- Lang, I., M. Scholz, und R. Peters. 1986. Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J Cell Biol*. 102:1183-90.
- Levy, D.E., und J.E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:651-62.
- Lillemeier, B.F., M. Koster, und I.M. Kerr. 2001. STAT1 from the cell membrane to the DNA. *Embo J*. 20:2508-17.
- Lodige, I. 2006. Untersuchungen zur Rolle des Kernexportes des Transkriptionsfaktors STAT1 in der Cytokinabhängigen Geninduktion. Dissertation.
- Lodige, I., A. Marg, B. Wiesner, B. Malecova, T. Oelgeschlager, und U. Vinkemeier. 2005. Nuclear export determines the cytokine sensitivity of STAT transcription factors. *J Biol Chem*. 280:43087-99.
- Macara, I.G. 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 65:570-94, table of contents.

- Marg, A., Y. Shan, T. Meyer, T. Meissner, M. Brandenburg, und U. Vinkemeier. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol.* 165:823-33.
- Martin, R.M., G. Tünnemann, H. Leonhardt, und M.C. Cardoso. 2007. Nucleolar marker for living cells. *Histochem Cell Biol.* 243–251.
- Meyer, T., A. Begitt, I. Lodige, M. van Rossum, und U. Vinkemeier. 2002. Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *Embo J.* 21:344-54.
- Meyer, T., A. Marg, P. Lemke, B. Wiesner, und U. Vinkemeier. 2003. DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev.* 17:1992-2005.
- Meyer, T., und U. Vinkemeier. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem.* 271:4606-12.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, und W. Ehrhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9:255-62.
- Pau, M.J. 2004. Leukämische Fusionsproteine mit Tyrosinkinase-Aktivität induzieren eine konstitutive Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 und verursachen eine maligne Transformation von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Dissertation.
- Paulillo, S.M., E.M. Phillips, J. Koser, U. Sauder, K.S. Ullman, M.A. Powers, und B. Fahrenkrog. 2005. Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J Mol Biol.* 351:784-98.
- Pedrotti, F., L. Pedrotti, W. Bausch, und H. Schmidt. 2008. *Optik für Ingenieure.* Springer, 4.Aufl.
- Pemberton, L.F., und B.M. Paschal. 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic.* 6:187-98.
- Peters, R. 2009. Functionalization of a nanopore: the nuclear pore complex paradigm. *Biochim Biophys Acta.* 1793:1533-9.
- Pollard, T.D., und W.C. Earnshaw. 2007. *Cell Biology.* Spektrum, 2. Aufl.
- Reich, N.C. 2007. STAT dynamics. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18:511-8.
- Reich, N.C., und L. Liu. 2006. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol.* 6:602-12.
- Ribbeck, K., und D. Gorlich. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J.* 20:1320-30.
- Robertson, G., M. Hirst, M. Bainbridge, M. Bilenky, Y. Zhao, T. Zeng, G. Euskirchen, B. Bernier, R. Varhol, A. Delaney, N. Thiessen, O.L. Griffith, A. He, M. Marra, M. Snyder, und S. Jones. 2007. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods.* 4:651-7.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, und B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol.* 148:635-51.
- Sambrook, J., und D. Russel. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3. Aufl.

- Schindler, C., D.E. Levy, und T. Decker. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem.* 282:20059-63.
- Sekimoto, T., N. Imamoto, K. Nakajima, T. Hirano, und Y. Yoneda. 1997. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *Embo J.* 16:7067-77.
- Siebrasse, J.P., D. Grunwald, und U. Kubitscheck. 2007. Single-molecule tracking in eukaryotic cell nuclei. *Anal Bioanal Chem.* 387:41-4.
- Siebrasse, J.P., und U. Kubitscheck. 2009. Single molecule tracking for studying nucleocytoplasmic transport and intranuclear dynamics. *Methods Mol Biol.* 464:343-61.
- Siebrasse, J.P., R. Veith, A. Dobay, H. Leonhardt, B. Daneholt, und U. Kubitscheck. 2008. Discontinuous movement of mRNP particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:20291-6.
- Speil, J., und U. Kubitscheck. 2009. Single ovalbumin molecules exploring nucleoplasm and nucleoli of living cell nuclei. *Biochim Biophys Acta.*
- ten Hoeve, J., M. de Jesus Ibarra-Sanchez, Y. Fu, W. Zhu, M. Tremblay, M. David, und K. Shuai. 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol.* 22:5662-8.
- Tunnemann, G., R.M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer, und M.C. Cardoso. 2006. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *Faseb J.* 20:1775-84.
- Vecerova, J., K. Koberna, J. Malinsky, E. Soutoglou, T. Sullivan, C.L. Stewart, I. Raska, und T. Misteli. 2004. Formation of nuclear splicing factor compartments is independent of lamins A/C. *Mol Biol Cell.* 15:4904-10.
- Veith, R. 2007. Untersuchung der intranukleären Mobilität endogener und inerter Nanopartikel in *Chironomus tentans* mit Hilfe hochsensitiver lasermikroskopischer Verfahren. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Vinkemeier, U. 2004. Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit. *J Cell Biol.* 167:197-201.
- Vinkemeier, U., S.L. Cohen, I. Moarefi, B.T. Chait, J. Kuriyan, und J.E. Darnell, Jr. 1996. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *Embo J.* 15:5616-26.
- Wenta, N. 2008. Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung auf die Selbstassoziation des Transkriptionsfaktors STAT1. Dissertation, Freie Universität Berlin
- Wenta, N., H. Strauss, S. Meyer, und U. Vinkemeier. 2008. Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:9238-43.
- Yang, J., und G.R. Stark. 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res.* 18:443-51.

Internetlink:

URL 1: <http://www.xenophilia.com/zb/zb0012a.htm>

7. Abkürzungsverzeichnis

α	halber Öffnungswinkel
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
AOTF	akustooptischer Filter
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum-Albumin
CB	Cajalkörperchen
CBP	CREB-Bindeprotein
CC	Vier-Helix-Bündeldomäne
CREB	cAMP Antwortelement-Bindeprotein
C	Konzentration
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindedomäne
DFC	dichte fibrilläre Komponente
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsNLS	dimer-spezifische NLS
DTT	Dithiothreitol
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
F	Phenylalanin
FBS	Fötale Kälberserum
FC	fibrilläres Zentrum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Glycin
GAS	IFN γ -aktivierte Stelle
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat

GST	Glutathion-S-Transferase
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HWB	Halbwertsbreite
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Imp	Importin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IRF	Interferonregulationsfaktor
ISGF	Interferon-stimulierter Genfaktor
ISRE	Interferon-stimulierte Antwortelemente
JAK	Januskinase
JD	Sprungweite
λ	Wellenlänge
L	Linkerdomäne
LB	Luria Bertani
N	Brechungsindex
NA	numerische Apertur
NCF	neutrophiler zytosolischer Faktor
NES	nukleares Exportsignal
NLS	nukleares Lokalisierungssignal
No	Nukleolus
NOR	Nukleolus-organisierende Regionen
NPC	nuklearer Porenkomplex
N-Terminus	Amino-Terminus
NTF2	nuklearer Transportfaktor 2
Nu	Nukleus
OD	optische Dichte
P	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor
PML	promyelozytisches Leukämie-Protein
R9	Arginin-reiches Peptid
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
RNP	Ribonukleopartikel
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
σ	Standardabweichung
S	Serin

Scr	Sarcoma
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFC	Spleißfaktor-Kompartimente
SH2	Src-Homologie 2
snRNA	kleine nukleäre RNA
snoRNA	kleine nukleoläre RNA
SRP	Signalerkennungspartikel
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STREP	Streptavidin
SV 40	Simian Virus 40
SVR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tamra	Carboxytetramethylrhodaminsuccinimidylester
TAT	Transactivator of Transcription
TB	Transportpuffer
tc	truncated
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Tyr	Tyrosin
U	unphosphoryliert
Wt	Wildtyp
Y	Tyrosin

8. Abbildungsverzeichnis

2.1. Signalübertragung in Zellen	10
2.2. Schematische Darstellung der STAT1-Varianten STAT1-wt und STAT1-tc	13
2.3. Schematische Darstellung der STAT1-Domänen	16
2.4. Schematische Darstellung der STAT1-Aktivierung	18
2.5. Schematische Darstellung des Rezeptor-vermittelten STAT1-Transports und der STAT1-Translokation in den und aus dem Zellkern	20
2.6. Die Transportmechanismen von STAT1 in unstimulierten (links) und stimulierten (rechts) Zellen	23
2.7. HeLa-Zellen	24
2.8. Schematische Darstellung eines Zellkerns	25
2.9. Die Kerndomänen des Nukleus	26
2.10. Komponenten des Nukleolus	27
2.11. Speckle und Cajalkörperchen	28
3.1. Schematische Darstellung des Einzelmolekülmikroskopaufbaus	47
3.2. Das Auflösungsvermögen nach dem Rayleigh-Kriterium	48
3.3. Ermittlung der Halbwertsbreite und Lokalisierungsgenauigkeit eines Partikels durch Anpassung einer zweidimensionalen Gaußfunktion	49
3.4. Einzelpartikeltracking	53
3.5. Schematische Darstellung einer Sprungweitenanalyse	54
4.1. GST-Expression: Polyacrylamidgelen mit Coomassie gefärbt	57
4.2. STAT1-tc Expression: Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt	58
4.3. Farbstoffmarkierung von BSA mit AF488	60
4.4. Farbstoffmarkierung der Proteine	61
4.5. Verteilung von fluoreszenzmarkierten Ovalbumin in HeLa-Zellen	64
4.6. Korrektur der DIC-Aufnahmen	66
4.7. Trennung der Ovalbuminsequenzen	67
4.8. Trajektorie von einem mobilen und immobilen Ovalbuminmolekül	68
4.9. Verteilung der Ovalbumintrajektorien im Nukleoplasma und im Nukleolus	69
4.10. Histogramme der Sprungweitenverteilung von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus	70
4.11. Bindungsdauer der Ovalbuminmoleküle im Nukleoplasma und im Nukleolus	72
4.12. Verteilung des Ovalbumins im Zellkern von H2B-GFP-Zellen	73
4.13. Effekt von IFN γ auf endogenes STAT1 in HeLa-Zellen	76
4.14. Die intrazelluläre Verteilung der fluoreszenzmarkierten STAT1-Proteine in HeLa-Zellen	77

4.15. Quantifizierung der Importkinetiken der Transportsubstrate	78
4.16. Visualisierung eines einzelnen STAT1-wt-Moleküls in HeLa-Zellen	80
4.17. Die intrazelluläre Verteilung der einzelnen STAT1-Moleküle in HeLa-Zellen	81
4.18. Die Sprungweitenverteilungen der STAT1-Proteine	83
4.20. Schematische Darstellung der Verteilung der Diffusionskoeffizienten der STAT1-Proteine	85
4.21. Einzelne STAT1-wt-Trajektorie nach IFN γ -Stimulierung	87
4.22. Die Bestimmung der Bindungsdauer der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus	88
5.1. Schematische Darstellung der Modelle, die zu einer eingeschränkten Mobilität von STAT1-Transkriptionsfaktoren im Nukleus führen	100

9. Tabellenverzeichnis

2.1. Die biologische Bedeutung der STAT-Proteine	15
2.2. Zusammenstellung der Zytokine, Januskinasen, Signalmoleküle und deren Reaktionen.	18
2.3. Die Kerndomänen und ihre Funktion	26
3.1. Chemikalien	30
3.2. Medien, Puffer und Lösungen.	31
3.3. Plasmide	34
3.4. Bakterienstämme	34
3.5. Zelllinien.	37
4.1. Proteinkonzentrationen der fluoreszenzmarkierten Proteine	62
4.2. Diffusionskoeffizienten der Sprungweitenverteilung von Ovalbumin im Nukleoplasma und im Nukleolus.	71
4.3. Die Anteile der Diffusionskoeffizienten der STAT1-Varianten im Zytoplasma und im Nukleus	84
4.4. Die Bindungsdauer der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus	89
4.5. Die Bindungsereignisse der STAT1-Proteine im Zytoplasma und im Nukleus	89

12. Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen:

Speil, J., und U. Kubitscheck. 2009. Single ovalbumin molecules exploring nucleoplasm and nucleoli of living cell nuclei. *Biochim Biophys Acta*. 1803:396-404.

Konferenzbeiträge:

Speil, J., Tamir, I., Marschler, S., Gebeshuber, C. and Beug, H. 2005. Polarity genes as tumor processors: function in EMT? Poster, IMP Recess, Vienna, Austria.

Speil, J., Siebrasse, JP., Veith, R., Vinkemeier, U. and Kubitscheck, U. 2007. Nucleocytoplasmic transport and intranuclear mobility of STAT1 transcription factors. Poster, Workshop: Moving Cells from Molecules to Animals, Rehovoth, Israel.

Speil, J., und Kubitscheck, U. 2009. Protein distribution and dynamics in nuclear compartments. Poster, Focus on Microscopy, Krakau, Poland.

Speil, J., Siebrasse, JP., Baumgart, E., Vinkemeier, U. and Kubitscheck; U. 2009. Intracellular Dynamics of Single STAT1 Transcription Factors upon Cytokine Stimulation. Poster, 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, USA.

Speil, J., Siebrasse, JP., Baumgart, E., Vinkemeier, U. and Kubitscheck; U. 2010. Single STAT1 Transcription Factor Dynamics upon Cytokine Stimulation. Poster, 33rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Regensburg, Germany.