

**Untersuchungen
zur Funktion von Koaktivatoren
in der JAK-STAT-vermittelten
Transkriptionsaktivierung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Claudia Monika Litterst
aus Kürzell (Baden)

Frankfurt (2002)
(D F 1)

vom Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter: Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz, Frau PD Dr. Schnierle

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 STAT-FAMILIE.....	1
1.2 BIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON STAT5	2
1.3 BIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON STAT6	3
1.4 BEDEUTUNG VON STAT6 BEI PATHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN.....	4
1.5 STRUKTUR DER STAT-PROTEINE	5
1.6 JAK/STAT-SIGNALWEG	5
1.7 REGULATION DER GENEXPRESSION.....	6
1.7.1 Basale Transkription	6
1.7.2 Koaktivatoren.....	7
1.8 TRANSAKTIVIERUNG DURCH STAT-PROTEINE.....	11
1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
2. MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 MATERIAL.....	16
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	16
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	16
2.1.3 Enzyme und Rekombinante Proteine.....	17
2.1.4 Antikörper	17
2.1.5 Oligonukleotide.....	18
2.1.6 Vektoren	19
2.1.7 Bakterien und Bakterien-Medien	22
2.1.8 Zellkultur und Zellkulturmedien.....	23
2.2. METHODEN	23
2.2.1 Klonierungstechniken und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	23
2.2.2 Zellkultur	28
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	30
3. ERGEBNIS	38
3.1 UNTERSUCHUNG DER BETEILIGUNG DER p160/SRC-1-KOAKTIVATOR-FAMILIE BEI DER STAT5- VERMITTELTEN GENAKTIVIERUNG	38
3.1.1 Bedeutung der p160/SRC-1-Koaktivator-Familie für die STAT5-vermittelte Transaktivierung	38
3.1.2 Rekrutierung von p160/SRC-1-Koaktivatoren durch die Transaktivierungsdomäne von STAT5 in Zellen.....	40
3.1.3 Interaktion von STAT5 und NCoA-1	42

3.1.4 Bedeutung der verschiedenen funktionellen Domänen von NCoA-1 bei der STAT5-vermittelten Transaktivierung.....	44
3.1.5 Effekt der Überexpression von isolierten AD2-Domänen der p160/SRC-Koaktivatoren auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung	49
3.2 UNTERSUCHUNG DER BETEILIGUNG DER P160/SRC-KOAKTIVATORFAMILIE BEI DER KOAKTIVIERUNG VON STAT6	51
3.2.1 Bedeutung der p160/SRC-1-Koaktivator-Familie für die STAT6-vermittelte Transaktivierung	51
3.2.2 Interaktion von STAT6 und p160/SRC-1-Koaktivatoren in vitro.....	53
3.2.3 Untersuchung der Wirkung von NCoA-1 auf die STAT6-Transaktivierungsdomäne in Fusion mit einer heterologen DNA-Bindungsdomäne.....	54
3.2.4 Vergleich des Transaktivierungspotentials von Vollängen-STAT6 und einer Deletionsmutante.....	56
3.2.5 Koimmunpräzipitationsexperimente mit NCoA-1 und STAT6	57
3.2.6 Kartierung der Bindungsstellen für CBP und NCoA-1 innerhalb der Transaktivierungsdomäne von STAT6	58
3.2.7 Kartierung der STAT6-Bindestelle in NCoA-1	60
3.2.8 Identifizierung von essentiellen Domänen von NCoA-1 für die Koaktivierung von STAT6...	63
3.2.9 Effekt der Überexpression der funktionellen Domänen von NCoA-1 auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung.....	65
3.2.10 Untersuchung der Interaktion von NCoA-1 und verschiedenen STAT-Proteinen in vitro ...	68
3.3 CHARAKTERISIERUNG DES LXXLL-MOTIVS VON STAT6 ALS BINDUNGSMOTIV FÜR DIE INTERAKTION MIT NCOA-1.....	69
3.3.1 Einsatz von Peptiden und Antikörpern zur Identifizierung des NCoA-1-Bindungsmotivs in der STAT6-Transaktivierungsdomäne.....	69
3.3.2 Identifizierung eines Bindungsmotivs in STAT6, das die in vitro-Interaktion mit NCoA-1 vermittelt.....	73
3.3.3 Bedeutung des LXXLL-Motivs von STAT6 für die Interaktion mit NCoA-1 in Zellen	74
3.3.4 Mutation des LXXLL-Motivs in STAT6.....	76
3.3.5 Struktureller und funktioneller Vergleich des LXXLL-Motivs von STAT6 mit anderen LXXLL-Motiven.....	82
3.4 STAT6-NCOA-1-INTERAKTION ALS ANGRIFFSPUNKT FÜR DIE INHIBITION DER STAT6-VERMITTELTEN TRANSAKTIVIERUNG.....	84
3.4.1 Prinzip des Ansatzes: Identifizierung von potenziell inhibitorischen Domänen in Reporterexperimenten.....	84
3.4.2 Effekt der Überexpression der STAT6/NCoA-1-Interaktionsdomänen auf die Expression von CD23.....	87
3.4.3 Effekt der Überexpression der aminoterminalen Region von NCoA-1 auf die Expression der 12/15-Lipoxygenase	88

3.4.4 Effekt der Überexpression der carboxyterminalen Region von STAT6 auf die Expression der 12/15-Lipoxygenase.....	90
3.4.5 Aufbau eines Test-Systems für die (Hochdurchsatz)-Suche von Substanzen, die die Interaktion von NCoA-1 und STAT6 hemmen.....	92
4. DISKUSSION.....	95
4.1 REGULATION DER GENEXPRESSION.....	95
4.2 KOAKTIVIERUNG DER STAT-PROTEINE DURCH P160/SRC-PROTEINE.....	95
4.3 INTERAKTIONEN.....	99
4.4 MECHANISMUS DER KOAKTIVIERUNG.....	101
4.5 SYNERGISMUS VON STAT5 UND STAT6 MIT ANDEREN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.....	105
4.6 VERGLEICH DER KOAKTIVIERUNG VERSCHIEDENER STATS.....	106
4.7 CHARAKTERISIERUNG DES LXXLL-MOTIV IN DER STAT6-TRANSAKTIVIERUNGSDOMÄNE.....	109
4.8 STRUKTUR DES LXXLL-MOTIVS.....	110
4.9 HEMMUNG DES IL-4/STAT6-SIGNALWEGES DURCH BLOCKIEREN DER STAT6/NCoA-1-INTERAKTION IN ZELLEN.....	111
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	118
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	120
7. LITERATUR.....	122
8. ANHANG.....	132
8.1 LEBENS LAUF.....	132
8.2 VERÖFFENTLICHUNGEN.....	133
8.3 PATENTE.....	134
8.4 VERÖFFENTLICHTE ABSTRACTS.....	134
8.5 DANKSAGUNG.....	135

1. Einleitung

1.1 STAT-Familie

Bei vielzelligen Organismen ist ein ständiger Informationsaustausch zwischen verschiedenen Geweben und Organen erforderlich, damit jede Zelle flexibel an den jeweiligen physiologischen Zustand angepasst werden kann. Die Kommunikation zwischen den Zellen wird durch Zytokine und andere Signalmoleküle vermittelt, die durch Bindung an zelluläre Rezeptoren die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege auslösen und so die Proliferation und Differenzierung von Zellen steuern. Metazoen haben die multifunktionellen STAT-Proteine entwickelt, die als Signalübermittler und als Transkriptionsfaktoren agieren können. Es handelt sich um latente Transkriptionsfaktoren, die bei Bindung von Zytokinen und Wachstumshormonen an ihre Transmembran-Rezeptoren aktiviert werden und in die Regulation der Genexpression eingreifen können. STAT-Proteine sind an der Regulation unterschiedlichster biologischer Programme beteiligt, wie z. B. Embryonalentwicklung, Organbildung und Immunität (O'Shea et al., 2002). In Säugern wurden insgesamt 7 verschiedene, strukturell sehr ähnliche STAT-Proteine STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 gefunden. Während STAT3 und STAT5 in den meisten Zelltypen vorkommen und durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden, haben die anderen STAT-Proteine eine spezifische Rolle bei der Immunabwehr (Akira, 1999). STAT1 und STAT2 sind Signalüberträger der Interferon-Antwort. STAT4 und STAT6 vermitteln die durch IL-12 bzw. durch IL-4 und IL-13 induzierte Genexpression, die beispielsweise die Polarisierung von naiven Th-Zellen zu Th1 bzw. Th2 Zellen reguliert.

1.2 Biologische Funktionen von STAT5

Es gibt zwei sehr verwandte STAT5-Gene STAT5a und STAT5b.

Beide Gene werden in den meisten Geweben exprimiert. Die STAT5-Proteine STAT5a und STAT5b werden durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert, z. B. durch Zytokine der IL-2- und der IL-3-Familie, Wachstumshormon und Prolaktin. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung von hämatopoietischen Zellen: Sowohl bei Stammzellen als auch bei myeloiden Vorläuferzellen vermittelt STAT5 den anti-apoptotischen und wachstumsstimulierenden Effekt von Zytokinen (Kieslinger et al., 2000; Snow et al., 2002). Außerdem wurde eine Funktion bei der Differenzierung von Th2-Zellen beschrieben (Kagami et al., 2001).

Trotz der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten der beiden STAT-Proteine gibt es spezifische Funktionen. STAT5b vermittelt den durch Wachstumshormon induzierten Geschlechtsdimorphismus und reguliert die Expression von geschlechtsspezifischen Genen in der Leber (Teglund et al., 1998). Die molekularen Ursachen für die verschiedenen biologischen Effekte von STAT5a und STAT5b sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Zweifellos beeinflussen gewisse strukturelle Unterschiede in der STAT5-Transaktivierungsdomäne oder feine Unterschiede in der DNA-Bindungs-Affinität der STAT5-Dimere die Genregulation. Außerdem wurde postuliert, daß der Zelltyp-spezifische Expressionslevel der STAT-Proteine ebenso für diese Effekte verantwortlich ist (Grimley et al., 1999).

Die bekannteste Funktion von STAT5a und STAT5b besteht in der durch Prolaktin-Stimulation induzierten terminalen Differenzierung der Brustdrüse und der Bildung von Milchproteinen während der Schwangerschaft, z. B. von β -Kasein, Whey acidic Protein (WAP) und β -Lactoglobulin (Liu et al., 1995; Wakao et al., 1992). In dieser Arbeit wird die Prolaktin-induzierte Expression des β -Kasein-Gens als Modellsystem für die Untersuchung der STAT5-vermittelten Genexpression verwendet.

1.3 Biologische Funktionen von STAT6

STAT6 wird durch Stimulation mit IL-4 und IL-13 aktiviert. Beide Zytokine steuern die humorale Immunabwehr. Die Eliminierung von extrazellulären Pathogenen wird durch die Aktion verschiedener Immunzellen und Zellen aus anderen Geweben, wie z. B. Lunge und Darm bewerkstelligt; diese Prozesse werden von Th2-Zellen koordiniert. Die Funktion von STAT6 bei der Regulation dieser Prozesse wurde durch Studien mit STAT6 $-/-$ Mäusen untersucht (Kaplan et al., 1996; Shimoda et al., 1996; Takeda et al., 1996): STAT6-Knockout-Mäuse entwickeln keine Th2-Antwort nach einer Infektion mit extrazellulären Parasiten. Die IL-4-induzierte Proliferation und Differentiation von Th2-Zellen ist gestört. B-Zellen ohne STAT6-Gen haben einen Defekt in der IL-4-induzierten Expression von CD23 und MHC-Klasse II, welche die Bindung bzw. Präsentation von Antigenen vermitteln. Außerdem fehlt in den Mäusen die charakteristische Bildung von IgG1 und IgE nach dem Kontakt mit Nematoden. IgE vermittelt die Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen durch Antigene; beim Kontakt mit Antigenen schütten diese Zellen Mediatoren aus, welche verschiedene physiologische und anatomische Veränderungen auslösen, die zu einem Ausschluß der Parasiten aus dem Körper führen sollen, nämlich Entzündung, Juck- und Hustenreiz, Tränenfluß, Verengung der Atemwege, Schleimbildung, Erbrechen und Durchfall (Sutton und Gould, 1993; Corry, 2002).

Der Klassenwechsel von Antikörpern wird durch Rekombinationsereignisse in den Genen, die für den konstanten Bereich der schweren Kette der Antikörper kodieren, vollzogen. Die Transkription des GL (Keimbahn) ϵ Transkripts, einer nicht kodierenden Region, die vor dem Exon 1 im $C\epsilon$ -Locus liegt, ist Voraussetzung für die DNA-Rekombination und damit den Klassenwechsel zum IgE-Isotyp. Die Aktivierung des GL ϵ Promotors wird durch STAT6 und NF κ B induziert (Linehan et al., 1998). STAT6 reguliert in Lungenepithelzellen die Expression von Chemokinen, die die Rekrutierung von Th2-Zellen und Eosinophilen in die Lunge vermitteln (Mathew et al., 2001).

1.4 Bedeutung von STAT6 bei pathologischen Veränderungen

Asthma ist eine chronische Krankheit, die durch Verengung und Entzündungen der Atemwege sowie Airway-Hyperresponsiveness (AHR) gekennzeichnet ist. Bei atopischen, asthmatischen Erkrankungen liegt ein erhöhter Serum-IgE-Spiegel vor, Eosinophile werden verstärkt in die Lunge rekrutiert und erhöhte Mengen Schleim produziert. Die Pathogenese von Asthma läßt sich auf eine Polarisation der Immunantwort auf einen Th2-Phänotyp zurückführen. Die Population der Th2-Zellen in der Lunge ist vergrößert, dies führt zu einer verstärkten Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie einem erhöhten IgE-Titer, was letztlich die pathophysiologischen Prozesse hervorruft (Brombacher, 2000).

Die Beteiligung von STAT6 bei diesen Prozessen wurde durch das Studium von STAT6 $-/-$ Mäusen belegt: STAT6 ist notwendig für die AHR-Antwort, die Schleimbildung sowie die Rekrutierung von Eosinophilen in die Lunge (Akimoto et al., 1998; Kuperman et al., 1998). Diese Studien zeigen, daß STAT6 ein zentraler Faktor bei der Pathogenese von Asthma ist. Daher wurde postuliert, daß die Inhibition des IL-4/STAT6-Signalweges die Symptome asthmatischer Erkrankungen lindern könnte (Foster, 1999; Grunewald et al., 1998; Tomkinson et al., 2001).

Eine neuere Studie berichtete, daß in Hodkin- und Reed-Sternberg (HRS)-Zellen von Hodkin-Lymphoma konstitutiv aktives STAT6 vorliegt (Skinnider et al., 2002). Dies läßt sich auf eine autokrine Stimulation durch IL-13 zurückführen, das ein wichtiger Wachstumsfaktor dieser HRS-Zellen ist (Skinnider et al., 2001). Somit ist STAT6 ein Angriffspunkt für die Therapie dieser Leukämie (Skinnider et al., 2002).

STAT6-defiziente Mäuse haben eine stärkere anti-Tumor-Immunität gegen verschiedene primäre und metastasierende Tumore als Wildtyp-Mäuse (Kacha et al., 2000; Ostrand-Rosenberg et al., 2000). Die spontane Rückbildung von Tumoren läßt sich vermutlich mit einer höheren Menge von zytotoxischen T-Zellen erklären, die in den STAT6 $-/-$ Mäusen gefunden wurde. Daher wurde postuliert, daß die pharmakologische Inhibition von STAT6 *in vivo* einen positiven Einfluß auf die Tumor-Abwehr hat.

1.5 Struktur der STAT-Proteine

Die STAT-Proteine haben einen charakteristischen Aufbau aus verschiedenen funktionellen Domänen (zusammengefaßt in Hoey und Schindler, 1998):



Abb. 1-1 Schematischer Aufbau der STAT-Proteine

Die aminoterminalen Domäne (N-term), die Coiled coil-Domäne, die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die SH2-Domäne, das konservierte Tyrosin und die Transaktivierungsdomäne (TAD) sind eingezeichnet.

Die aminoterminalen Domäne ist wichtig für die Tetramerbildung von STAT-Proteinen. Die sich daran anschließende Coiled coil-Domäne fungiert als Proteininteraktionsdomäne. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) hat eine Immunglobulin-ähnliche Struktur. Die Linker-Domäne verbindet die DBD mit der SH2-Domäne. Die SH2-Domäne, die die Bindung von phosphorylierten Tyrosinen vermittelt, ist am meisten konserviert. Sie ermöglicht die Bindung an den jeweiligen Zytokin-Rezeptor und die STAT-Dimerisierung. Direkt im Anschluß an die SH2-Domäne befindet sich ein konserviertes Tyrosin, was bei der Aktivierung der STATs phosphoryliert wird. Am carboxyterminalen Ende liegt die Transaktivierungsdomäne (TAD), welche sowohl im Bezug auf die Länge als auch auf die primäre Aminosäuresequenz bei den verschiedenen STAT-Proteinen erheblich variiert.

1.6 JAK/STAT-Signalweg

Die Signalübertragung von der Zytokin-Stimulation bis zur Aktivierung der STAT-Proteine ist in Abb. 1-2 schematisch dargestellt (Kisseleva et al., 2002): Die Bindung von extrazellulären Polypeptidliganden (Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine) an ihre Transmembran-Rezeptoren führt zur Rezeptordimerisierung und zur Autophosphorylierung von Rezeptor-assoziierten JAK-Kinasen. Die aktivierten JAK-Kinasen phosphorylieren wiederum konservierte Tyrosine des Rezeptors und schaffen so eine Bindestelle für die SH2-Domäne der STAT-Proteine.

Die JAK-Kinasen phosphorylieren die Rezeptor-gebundenen STAT-Moleküle. Dies induziert die Dimerisierung der STAT-Proteine, wobei die SH2-Domäne des einen Monomers mit dem konservierten phosphorylierten Tyrosin des anderen STAT-Moleküls interagiert. STAT-Dimere translozieren in den Zellkern, binden an ihre Bindungs-Elemente (GAS-Elemente) im Promotor von Zielgenen und regulieren die Genexpression.

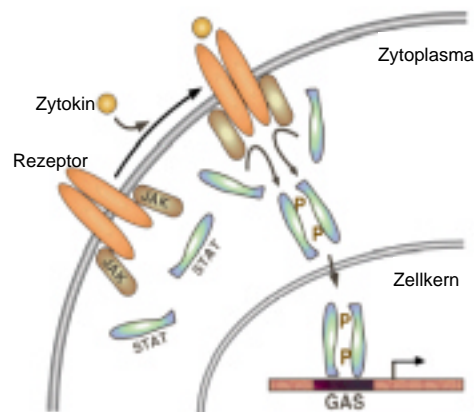


Abb. 1-2 Schematische Darstellung des JAK/STAT-Signalwegs.

Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor werden Rezeptor-assoziierte JAK-Kinasen aktiviert und vermitteln die Phosphorylierung der STATs. Aktivierte STATs dimerisieren und translozieren in den Kern, wo sie an GAS-Elemente im Promotor von Zielgenen binden und die Regulation der Genexpression beeinflussen (modifiziert nach Schindler, 2002).

1.7 Regulation der Genexpression

1.7.1 Basale Transkription

Die Expression Protein-kodierender Gene wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkriptions-Initiation reguliert. Der Aufbau des Präinitiationskomplexes, der aus der DNA-Matrize, der RNA-Polymerase II und 5 sogenannten generellen Transkriptionsfaktoren besteht, stellt hierbei den limitierenden Schritt der Initiation dar. Somit bestimmt die Bindung der generellen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II an den Promotor die Häufigkeit der Initiationen, d. h. die Promotorstärke.

Die sogenannte basale Transkription kann *in vitro* mithilfe von gereinigten Faktoren und einer nicht in Chromatin verpackten DNA-Matrize dargestellt werden (Orphanides et al., 1996; Reinberg et al., 1998; Woychik and Hampsey, 2002): Die Initiation wird durch die Bindung der TBP-Untereinheit von TFIID an die TATA-Box im Promotor gestartet.

Danach folgt die Rekrutierung von TFIIB und einem Komplex aus TFIIIF, TFIIIE, TFIIH und der nicht-phosphorylierten RNA-Polymerase II. Nach dem Aufschmelzen der Promotor-DNA und der Transkriptionsinitiation wird der carboxyterminale Schwanz der RNA-Polymerase phosphoryliert. Dies ermöglicht die Freigabe des Promotors und den Übergang in die Elongationsphase der Transkription.

Obwohl die generellen Transkriptionsfaktoren für die Initiation der basalen Transkription *in vitro* ausreichend sind, werden für die Transkription von in Chromatin verpackten Genen weitere Faktoren gebraucht. Die transkriptionellen Aktivatoren bestimmen, welche Gene angeschaltet werden sollen, indem sie an bestimmte Erkennungssequenzen in Promotoren von Zielgenen binden. Die Koaktivatoren binden selbst nicht an DNA, werden aber von den Aktivatoren an die jeweiligen Promotoren rekrutiert. Sie integrieren die regulatorische Information verschiedener Aktivatoren und geben sie an den Transkriptions-Apparat weiter.

1.7.2 Koaktivatoren

1.7.2.1 Bedeutung von Koaktivatoren

Koaktivatoren haben einen modulären Aufbau aus verschiedenen Domänen, die multiple Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln oder enzymatische Funktionen tragen (McKenna et al., 1999). Die Funktionsweise der Koaktivatoren besteht darin, daß sie den Aufbau des Präinitiationskomplexes fördern und so die Transkription stimulieren können. Koaktivatoren erhöhen z. B. die Zugänglichkeit der Promotor-DNA für generelle Transkriptionsfaktoren, indem sie die Chromatinstruktur verändern. Dies geschieht über Histon-Modifikationen, wie Acetylierung und Methylierung oder in einer ATP-abhängigen Weise. Außerdem rekrutieren sie aktiv verschiedene Komponenten des generellen Transkriptionsapparats an den Ziel-Promotor und fördern so die Bildung des Präinitiationskomplexes. Der mehrstufige Prozeß der Initiation der Genexpression erfordert in den einzelnen Phasen die Aktion verschiedener Koaktivatoren (Lemon and Tjian, 2000; McKenna et al., 1999).

Höhere Organismen haben Koaktivatorfamilien mit verschiedenen Mitgliedern entwickelt, die untereinander strukturell sehr ähnlich sind, aber spezifische Funktionen ausüben können. Die hoch konservierten Koaktivatoren p300 und CBP werden von verschiedenen Transkriptionsfaktoren rekrutiert. Sie haben redundante aber auch spezifische Funktionen (Kawasaki et al., 1998) und werden im folgenden kollektiv als p300/CBP bezeichnet. p300/CBP besitzt intrinsische Histonacetyltransferase (HAT) -Aktivität (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996) und kann mit Komponenten des generellen Transkriptionsapparats interagieren (Nakajima et al., 1997). p300/CBP assoziiert mit Mitgliedern der p160/SRC-Koaktivatoren (Chen et al., 1997; Kamei et al., 1996; Yao et al., 1996).

1.7.2.2 p160/SRC-Familie

Die Mitglieder der p160/SRC-Familie wurden als Koaktivatoren der nukleären Hormonrezeptoren identifiziert. Da diese Proteine von verschiedenen Gruppen identifiziert wurden, kam es zu einer mehrfachen Namengebung: In dieser Arbeit werden gemäß der kanonischen Nomenklatur die Termini NCoA-1 (auch SRC-1), NCoA-2 (auch TIF2, GRIP1) und NCoA-3 (RAC3, AIB1, ACTR, p/CIP, TRAM-1) verwendet. Die verschiedenen Familienmitglieder weisen auf Proteinebene eine Homologie von 40% auf und haben einen konservierten Aufbau aus funktionellen Domänen (zusammengefaßt in Leo und Chen, 2000) (s. Abb. 1-3):

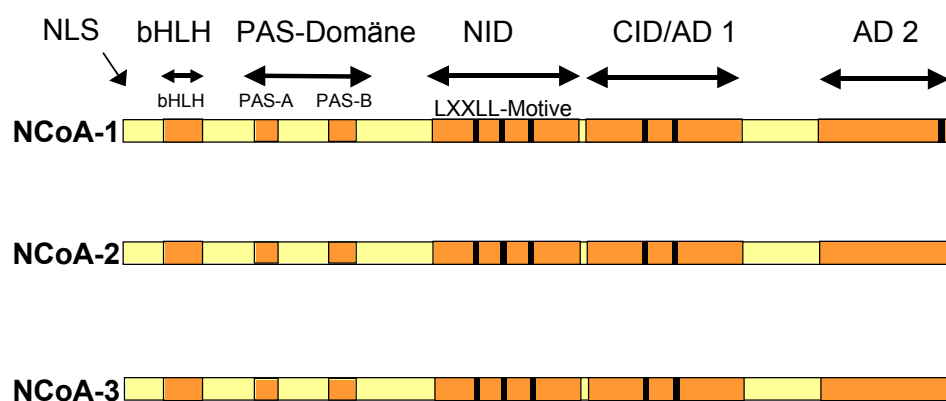


Abb. 1-3 Schematischer Aufbau der p160/SRC-Proteine NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3. Die Lage der Kernlokalisationssequenz (NLS), der basic-Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH), der PAS-Domäne, der Interaktionsdomäne für die nukleären Hormonrezeptoren (NID) bzw. für CBP (CID/AD1) und der 2. Transaktivierungsdomäne AD2 sind eingezeichnet. Schwarze Balken repräsentieren LXXLL-Motive.

Die aminoternale Domäne enthält eine Kernlokalisations-Sequenz (NLS) sowie eine basic-Helix-Loop-Helix-Domäne, deren Funktion nicht geklärt ist. Die sich anschließende PAS-Domäne besteht aus zwei Untereinheiten PAS-A und PAS-B. PAS-Domänen wurden in verschiedenen transkriptionellen Regulatorproteinen gefunden, wie z. B. bei Period (Per), Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und Single-minded (Sim). PAS-Domänen vermitteln Homo- und Heteromultimerisierung von PAS-Proteinen. Es gibt gewisse Hinweise auf die Existenz von multimeren Komplexen aus p160/SRC-Faktoren (McKenna et al., 1998).

Die zentrale NID-Domäne vermittelt die Bindung an nukleäre Hormonrezeptoren. Sie enthält 3 sogenannte LXXLL-Motive, wobei L für Leucin und X für eine beliebige Aminosäure steht. NCoA-1 besitzt ein zusätzliches LXXLL-Motiv am äußersten Carboxyterminus.

In der carboxyterminalen Region befinden sich zwei Domänen mit Transaktivierungsfunktion AD1 und AD2. AD1 vermittelt die Interaktion mit p300/CBP und wird daher auch als CBP-Interaktionsdomäne (CID) bezeichnet. Die zweite Transaktivierungsdomäne AD2 vermittelt die Interaktion mit anderen Effektorproteinen, nämlich den Methyltransferasen, wie z. B. CARM1 und PRMT1 (Chen et al., 1999b; Koh et al., 2001), die sowohl Histone als auch andere Proteine methylieren können.

NCoA-1 und NCoA-3 besitzen eine schwache intrinsische HAT-Aktivität (Chen et al., 1997; Kurokawa et al., 1998; Spencer et al., 1997). Die HAT-Domäne liegt jeweils in der carboxyterminalen Region.

Für NCoA-1 wurde eine Interaktion mit den basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFIIB beschrieben (Takeshita et al., 1996).

Neben den nukleären Hormonrezeptoren wird eine Reihe von verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren durch p160/SRC-Koaktivatoren koaktiviert, z. B. AP1, p53, Serum reponse Factor, NF κ B und STAT1 (Kim et al., 1998; Korzus et al., 1998; Lee et al., 1999; Lee et al., 1998; Na et al., 1998).

NCoA-3 hat eine besondere Funktion beim Steroid-abhängigen Wachstum von Zellen, denn es wurde in verschiedenen Brust- und Eierstocktumoren eine Überexpression dieses Koaktivators gefunden (Anzick et al., 1997).

Bei nukleären Hormonrezeptoren ist der Mechanismus der Transaktivierung schon sehr gut untersucht. In zahlreichen Studien wurde die Bedeutung der Koaktivatoren SWI-SNF, p300/CBP, p/CAF, TRAP/DRIP und p160/SRC bei der Transaktivierung von verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren analysiert und ein Modell für die Ereignisse am Promotor aufgestellt (Dilworth and Chambon, 2001; Shang et al., 2000; Shang et al., 2002). Es wurde postuliert, daß an jedem Promotor spezifische Koaktivator-Komplexe in einer bestimmten Reihenfolge rekrutiert werden müssen (McKenna und O'Malley, 2002).

Zunächst binden nukleäre Hormonrezeptoren den SWI/SNF-Komplex, der den Promotor durch Chromatin-Umbau für generelle Transkriptionsfaktoren zugänglicher macht. Acetyltransferasen, wie p300/CBP und p/CAF, treiben die Öffnung des Promotors durch Histonacetylierung weiter voran. Diese Proteine werden in einem Komplex mit p160/SRC-Koaktivatoren rekrutiert, wobei deren Funktion hauptsächlich in der Stabilisierung der Interaktion der nukleären Hormonrezeptoren mit p300/CBP besteht (Sheppard et al., 2001). Außerdem sind sie mit Methyltransferasen assoziiert, die abhängig vom Promotor oder dem Zelltyp eine Rolle bei der Genaktivierung spielen können (Chen et al., 2000; Lee et al., 2002). Im Anschluß löst sich der p160/SRC-p300/CBP-Koaktivator-Komplex von den nukleären Hormonrezeptoren. Neuere Studien postulieren, daß eine p300-abhängige Acetylierung der p160/SRC-Faktoren dabei die Interaktion mit den nukleären Hormonrezeptoren reguliert (Chen et al., 1999a). Statt dessen wird der TRAP/DRIP-Komplex rekrutiert, der den Kontakt zum basalen Transkriptionsapparat herstellt und so die Bildung des Präinitiationskomplexes induziert.

Die nukleären Hormonrezeptoren binden an LXXLL-Motive in den Koaktivatoren der p160/SRC-Familie (Heery et al., 1997). Diese Motive kommen in mehreren Kopien vor. Es gibt 3 Motive in der Interaktionsdomäne, die den Kontakt zu den nukleären Hormonrezeptoren herstellt. Die Motive unterscheiden sich in den flankierenden Sequenzen.

Über das Kontaktieren von ausgewählten LXXLL-Motiven innerhalb der Bindungsdomäne der p160/SRC-Koaktivatoren wird die Bindungsspezifität der nukleären Hormonrezeptoren zu ihren Koaktivatoren reguliert (Darimont et al., 1998; Ding et al., 1998; McInerney et al., 1998).

1.8 Transaktivierung durch STAT-Proteine

Die GAS-Elemente in den Promotoren von STAT5- und STAT6-Zielgenen befinden sich in enger Nachbarschaft zu Bindungselementen von anderen Transkriptionsfaktoren:

Im β -Kasein-Promotor, der von STAT5 aktiviert wird, wurden mehrere CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) -Bindungsstellen gefunden. STAT5 wirkt synergistisch mit C/EBP β und dem Glukokortikoidrezeptor bei der Transaktivierung des β -Kasein-Gens (Stocklin et al., 1996; Wyszomierski und Rosen, 2001). Es wurde eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Glukokortikoidrezeptor und STAT5 gefunden (Stocklin et al., 1996). C/EBP β und der Glukokortikoidrezeptor stabilisieren die DNA-Bindung von STAT5 (Wyszomierski und Rosen, 2001). Außerdem wurde diskutiert, daß eine gemeinschaftliche Rekrutierung von Koaktivatoren Ursache für den Synergismus sein könnte.

In den Promotoren von STAT6-Zielgenen liegen neben den GAS-Elementen oftmals Bindestellen für NF κ B und C/EBP. Bei der Transaktivierung des GL (Keimbahn) ϵ -Transkripts wurde ein positiver Effekt dieser Faktoren auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung beobachtet. NF κ B und STAT6 interagieren direkt miteinander (Shen und Stavnezer, 1998). Der Synergismus von NF κ B und STAT6 wurde durch kooperative DNA-Bindung erklärt (Messner et al., 1997). C/EBP β stabilisiert die DNA-Bindung von STAT6 (Mikita et al., 1998). Bei dem humanen Promotor wurde außerdem eine Beteiligung von PU.1 bei der synergistischen Transaktivierung des GL ϵ -Promotors gefunden (Stutz and Woisetschlager, 1999). PU.1 wirkt möglicherweise auch stabilisierend auf den DNA-Protein-Komplex.

Die Transaktivierungsdomänen von STAT5 und STAT6 unterscheiden sich sowohl in ihrer Länge (s. Abb. 1-4) als auch in ihrer Aminosäuresequenz. Die kürzere STAT5-Transaktivierungsdomäne hat ein sehr schwaches Transaktivierungspotential, wenn sie an die heterologe GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert wird (Moriggl et al., 1997).

Dennoch ist STAT5 ein sehr starker Transaktivator des β -Kasein-Promotors. Daher wurde postuliert, daß STAT5 durch andere Transkriptionsfaktoren, die eine starke Transaktivierungsdomäne besitzen, wie der Glukokortikoid-Rezeptor, bei der Transaktivierung des β -Kasein-Gens unterstützt wird.

Innerhalb der STAT5-Transaktivierungsdomäne wurde eine amphipatische α -Helix identifiziert (STAT5a AS 751-761), die für die Transaktivierungsfunktion essentiell ist (Wang et al., 2000a), (s. Abb. 1-4). Eine andere Studie berichtete zeitgleich, daß 2 hydrophobe Aminosäuren innerhalb dieser Helix notwendig für die Transaktivierungsfunktion sind (Callus und Mathey-Prevot, 2000). Welche Faktoren an diese Helix binden, ist nicht bekannt.

Außerdem wurde berichtet, daß STAT5 über seine Coiled coil-Domäne mit dem Corepressor SMRT interagieren kann (Nakajima et al., 2001). Vermutlich liegt die Funktion dieser Wechselwirkung in einer Attenuation der Genexpression.

Die Transaktivierungsdomäne von STAT6 ist sehr viel komplexer gebaut, sie hat im GAL4-System ein 10 mal stärkeres Potential als die von STAT5 (Moriggl et al., 1997). Innerhalb der STAT6-Transaktivierungsdomäne konnten verschiedene autonome Elemente identifiziert werden, die im GAL4-System Transaktivierungsfunktion besitzen (Goenka et al., 1999; Lu et al., 1997; Moriggl et al., 1997) (s. Abb. 1-4).

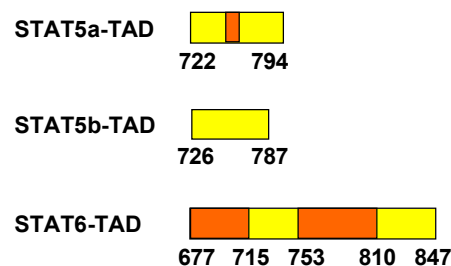


Abb. 1-4 Vergleich der Transaktivierenden Domänen von STAT5 und STAT6.

Die Endposition der Transaktivierungsdomänen (TAD) und die Lage der essentiellen α -Helix in STAT5 bzw. der autonomen Domänen in STAT6 (Goenka et al., 1999) sind in orange eingezeichnet.

Über den Mechanismus der Transaktivierung von STAT-Proteinen ist noch nicht sehr viel bekannt. Es wurde beschrieben, daß STAT1, STAT2, STAT3, STAT5a, STAT5b und STAT6 den Koaktivator p300/CBP rekrutieren (Bhattacharya et al., 1996; Gingras et al., 1999; Horvai et al., 1997; Paulson et al., 1999; Pfitzner et al., 1998). Vermutlich wird über die Bindung von p300/CBP der Kontakt zum Transkriptionsapparat hergestellt.

Das N-Myc-interactor Protein Nmi stabilisiert die Wechselwirkung von STATs, insbesondere die von STAT5, mit p300/CBP und steigert so die STAT-abhängige Transkription (Zhu et al., 1999). Nmi interagiert mit der Coiled coil-Region der STAT-Proteine.

P300/CBP fungiert als Koaktivator von verschiedenen Klassen von Transkriptionsfaktoren, wie den schon erwähnten nukleären Hormonrezeptoren, AP1-Faktoren und NF κ B (Bannister und Kouzarides, 1995; Gerritsen et al., 1997). Da p300/CBP ein limitierender Faktor in Zellen ist, gibt es einen Wettbewerb um diesen gemeinsamen Koaktivator. Die Konkurrenz stellt einen molekularen Mechanismus für die Vernetzung von verschiedenen Signalwegen dar. Dies wurde beim *Crosstalk* des IFN γ - und des Ras/AP1- Signalweges beobachtet (Horvai et al., 1997).

Obwohl die Transaktivierungsdomänen von STAT1, STAT5 und STAT6 in ihrer Sequenz sehr große Unterschiede aufweisen, können sie einen Kontakt zu p300/CBP ausbilden. Die Interaktion der STAT-Proteine erfolgt jedoch mit völlig verschiedenen Bereichen von p300/CBP (s. Abb. 1-5).

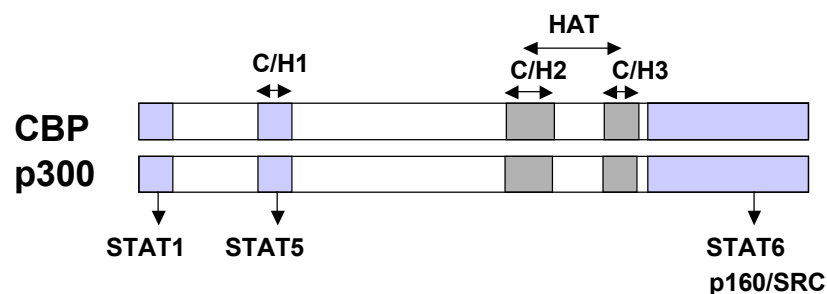


Abb. 1-5 Schematische Darstellung der Struktur von p300/CBP.

Die Lage der Cystein-Histidin-reichen Regionen C/H1-3 und der HAT-Domäne sind eingezeichnet. Die Pfeile zeigen die Kontaktstellen der angegebenen Interaktions-Partner.

STAT1 bindet an die aminoterminalen Region von CBP. Es rekrutiert einen Koaktivator-Komplex aus p300/CBP und dem p160/SRC-Koaktivator NCoA-3.

Die HAT-Aktivität von NCoA-3 ist essentiell für die Transaktivierung (Korzus et al., 1998; Torchia et al., 1997).

Interessanterweise wurde die Bindungsstelle für STAT6 auf einen Bereich von p300/CBP kartiert, der auch den Kontakt zu den p160/SRC-Koaktivatoren herstellt (s. Abb. 1-5). Eine Beteiligung dieser Koaktivatoren bei der Rekrutierung von p300/CBP erscheint daher möglich.

Es gibt bei den komplexen Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren Koaktivatoren neben Kontaktstellen, die für verschiedene Transkriptionsfaktoren relevant sind, Bindungsmotive, die sehr spezifische Wechselwirkungen vermitteln. Dies wurde durch Mikroinjektionsexperimente mit Peptiden deutlich: Peptide, die von der aminoterminalen CBP-Sequenz abgeleitet wurden (AS 1-22) bzw. von der NCoA-3-Sequenz, die die Interaktion mit CBP vermittelt, können die Interferon- γ -induzierte Transaktivierung eines Reportergens hemmen (Torchia et al., 1997). Interessanterweise wird die Funktion der nukleären Hormonrezeptoren, die eine andere Region von p300/CBP rekrutieren, durch dieses CBP-Peptid nicht inhibiert. Das Peptid, das sich von der NCoA-3-Sequenz ableitet, inhibiert jedoch die Transaktivierung der nukleären Hormonrezeptoren und STAT1 gleichermaßen. Durch die Blockierung von spezifischen Interaktionen können folglich gezielt einzelne Signalwege ausgeschaltet werden. Diese neuartige Möglichkeit könnte eine wichtige Anwendung in der Therapie von Krankheiten finden, die durch die Deregulation von bestimmten Signalwegen gekennzeichnet sind.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Insgesamt gibt es nur wenige Informationen über Koaktivatoren, die an der STAT5 und STAT6-vermittelten Transaktivierung beteiligt sind. In dieser Arbeit sollen verschiedene Fragestellungen bezüglich des Transaktivierungsmechanismus dieser STAT-Proteine behandelt werden:

- ❖ STAT5 und STAT6 rekrutieren beide p300/CBP, die mit der NCoA-Koaktivator-Familie (p160/SRC) assoziiert sind. Es soll die Bedeutung der Familienmitglieder NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 für die Transaktivierung der STAT-Proteine STAT5a, STAT5b und STAT6 untersucht werden.
- ❖ Die p160/SRC-Koaktivatoren haben verschiedene funktionelle Domänen, die die Wechselwirkung mit Effektorproteinen vermitteln oder eine enzymatische Aktivität tragen. Es soll analysiert werden, welche dieser Domänen für die Koaktivierung von STAT5a, STAT5b und STAT6 benötigt werden.
- ❖ Die Rekrutierung von Koaktivatoren geschieht über komplexe Wechselwirkungen. Es soll untersucht werden, ob die Rekrutierung der p160/SRC-Koaktivatoren über direkte Protein-Protein-Interaktionen vermittelt wird. Bei einer direkten Wechselwirkung sollen die Interaktionsdomänen in den STAT-Proteinen und in den p160/SRC-Koaktivatoren charakterisiert werden.
- ❖ Protein-Protein-Interaktionen werden häufig durch Sequenz-Motive vermittelt, wie z. B. Leuzin-Zipper. Es soll untersucht werden, ob die Interaktionen von STAT5 und STAT6 mit p160/SRC-Koaktivatoren durch Protein-Interaktionsmotive vermittelt werden.
- ❖ Bei der transkriptionellen Genaktivierung interagieren Transkriptionsfaktoren an den von ihnen regulierten Promotoren mit verschiedenen Koaktivatoren. Daher soll die Bedeutung der Interaktionen von STAT-Proteinen mit p160/SRC-Koaktivatoren bei verschiedenen Zielgenen analysiert werden. Hierbei soll geklärt werden, ob die Interaktionen Zielstrukturen für die Hemmung der STAT-regulierten Genexpression darstellen können. Für diesen Ansatz sollen inhibitorische Polypeptide generiert werden, die in Zellen überexprimiert werden können und essentielle Interaktionen kompetitiv inhibieren können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Grundchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) in der Qualitätsstufe p.a. bezogen. Radiochemikalien wurden von Amersham Biosciences (Freiburg) geliefert. Als Proteaseinhibitor wurde der Proteaseinhibitor-Cocktail Complete™ von Böhlinger (Mannheim) verwendet, Phosphataseinhibitoren (Cocktail 1 und 2) wurden von Sigma (Taufkirchen) bezogen. Molekulargewichtsmarker für Proteine (Benchmark) und DNA-Fragmente (1 kb+-Leiter) wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde der Protein-Assay-Kit von Biorad (München) verwendet. Plastikmaterial und Filtersysteme für Labor und Zellkultur wurden von den Firmen Biozym (Oldendorf), Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Schleicher&Schüll (Dassel), BD Bioscience (Heidelberg) oder Nalgene (Rochester, NY, USA) bezogen. Elektroporationsküvetten stammten von Biorad (München).

2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Lösungen und Puffer wurden autoklaviert (20 min. bei 121°C und 2.0 bar) oder im Falle der Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

10xTBE	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8.0
1xTAE	40 mM Tris/Essigsäure, 1mM EDTA, pH 8.0
TE, pH 8.0	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
DEPC-Wasser	0.2 % (v/v) DEPC
2xHBS	0.28 M NaCl, 50 mM HEPES/NaOH pH 7.05, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
TBS/T	10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v), Tween 20
SDS-Laufpuffer	250 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.
Anoden-Puffer 1	300 mM Tris/HCl pH 10.4, 10% (v/v) Methanol
Anoden-Puffer 2	25 mM Tris/HCl pH 10.4, 10% (v/v) Methanol
Kathoden-Puffer	25 mM Tris/HCl pH 9.4, 40 mM ε-Caprönsäure, 10% (v/v) Methanol

Alle weiteren in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind im Methodenteil an der entsprechenden Stelle angegeben.

2.1.3 Enzyme und Rekombinante Proteine

2.1.3.1 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von NEB (Schwalbach) oder MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

T4-DNA-Ligase	NEB, Schwalbach	Alkalische Phosphatase	NEB, Schwalbach
Klenow Enzym	NEB, Schwalbach	Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Polynukleotidkinase	NEB, Schwalbach	Vent-Polymerase	NEB, Schwalbach

2.1.3.2 Rekombinante Proteine

Insekten-Zellen, die Histidin-Volllängen-STAT6-Fusionsprotein zusammen mit der Lyn-Kinase exprimierten, wurden freundlicherweise von Silke Hobbie zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Antikörper

Antigen	Name/ Charakteristik	Spezies	Hersteller/Referenz
CD23	Monoklonal, PE-gekoppelt	Maus	BD Bioscience, Pharmingen, Heidelberg
Eotaxin-3	Polyklonal	Ziege	Tebu, Frankfurt
Eotaxin-3	Polyklonal, biotinyliert	Ziege	Tebu, Frankfurt
Fc-Block	monoklonal	Ratte	BD Bioscience, Pharmingen, Heidelberg
Living colors Full-length Äquoria victoria	polyklonal	Kaninchen	Clontech, Heidelberg
Myc-Epitop	monoklonal	Maus	BD Bioscience, Heidelberg
Penta-Histidin	monoklonal	Maus	Qiagen, Hilden
SRC-1 C-terminale Region	C20, polyklonal	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
SRC-1 (AS 350-765)	M341, polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
SRC-1 (AS 477-947)	1135, monoklonal	Maus	Biomol, Hamburg
STAT5 (AS 451-649)	monoklonal	Maus	BD Bioscience, Heidelberg
STAT6 aminoterminal Region	monoklonal	Maus	Zymed, Berlin
STAT6 aminoterminal Region	polyklonal	Kaninchen	Zymed, Berlin

STAT6 (AS 818-837)	polyklonal	Kaninchen	R&D, Wiesbaden
STAT6 (AS 794-814)- Peptid 1,	polyklonal, Kaninchen 68, 69	Kaninchen	Eurogentec, Hestel, Belgien
STAT6 (AS 817-830)- Peptid 2	polyklonal, Kaninchen 70, 71		
STAT6 (AS 830-847)- Peptid 3	polyklonal, Kaninchen 72, 73		

Sekundäre Meerettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper, die gegen Maus IgG und Kaninchen-IgG gerichtet sind, wurden von Amersham Biosciences, Freiburg bezogen.

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (München) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Name	Verwendungszweck/Referenz	Sequenz
Clau12	5'-Primer mit EcoRI ab AS 1251 von Maus-NCoA-1	cccgaattcatttgccccatctc
Clau13A	3'-Primer mit XhoI ab AS 1405 von Maus-NCoA-1	ccgctcgagctagtctgtagtc
Clau15A	3'-Primer mit XmaI ab AS 794 von Maus-STAT5a	gagcccgggggacagggagc
Clau19	5'-Primer mit EcoRI ab AS von Maus-NCoA-2	cggaattcatttactggggctac
Clau20A	3'-Primer mit XhoI ab AS von Maus-NCoA-2	ccgctcgagtcagcagatttcc
Clau22	5'-Primer mit EcoRI ab AS 722 von Maus-STAT5a	cggaattccaggctccttcccc
Clau23A	3'-Primer mit BamHI ab AS 794 von Maus-STAT5a	cgggatcctcaggacagggagc
Clau24	5'-Primer mit EcoRI ab AS 726 von Maus-STAT5b	cggaattcgatcaggctccttc
Clau28A	3'-Primer mit NheI ab AS 787 von Maus-STAT5b	ctagctagctcatgactgtgcg
Clau31	5'-Primer mit EcoRI ab AS 792 von humanem STAT6	gcgaattcccctcctctgc
Clau32A	3'-Primer mit XhoI ab AS 848 von humanem STAT6	ccgctcgagtcaccaactg
Clau33	5'-Primer mit XhoI ab AS 1 von Maus-NCoA-1	cgctcgagatgagtggccttg
Clau35A	3'-Primer mit XbaI ab AS 462 von Maus-NCoA-1	gctctagagaacctgcctgtg
Clau36	5'-Primer mit XbaI ab AS 100 von Maus-NCoA-1	gctctagatcctcgagcagc
Clau39A	3'-Primer mit XbaI ab AS 571 von Maus-NCoA-1	gctctagatgaattctgtgagctc
Clau43A	3'-Primer mit XhoI ab AS 462 von Maus-NCoA-1	cgctcgaggaacctgcctgtt
L3Mutrev	3'-Primer mit XbaI ab AS 848 von humanem STAT6	gctctagatcaccaactgggggtg
Clau50A	3'-Primer mit XhoI ab AS 462 von humanem NCoA-1	cgctcgagtgaactggcctg
Clau60	5'-Primer mit BamHI ab AS 257 von Maus-NCoA-1	tggatcctaacaggtgtagaatc
Clau61A	3'-Primer mit XhoI ab AS 420 von Maus-NCoA-1	gcctcgaggcggttactctggc
Clau62A	3'-Primer mit XhoI ab AS 441 von Maus-NCoA-1	gcctcgaggtcccttggtgtg

mutfow	Sense-Strang-Primer für Mutagenese von L802,805 zu A in humanem STAT6	cccactgaacaggagcgcacta aggctctcctggagggg
mutrev	Anti-Sense-Strang-Primer für Mutagenese von L802,805 zu A in humanem STAT6	cccctccaggagagccttagtgg cgtcctgttcagtggg
EcoRI-STAT5a	5'-Primer mit EcoRI ab AS 1 von Maus-STAT5a	ggaattccatggcgggctggattc ag
EcoRI-STAT5b	5'-Primer mit EcoRI ab AS 1 von Maus-STAT5b	ggaattccatggctatgtggatac acag
SmaI-STAT5b	3'-Primer mit XmaI ab AS 787 von Maus-STAT5b	gagcccgggtcatgactgtgc
Xho-STAT6	5'-Primer mit XhoI ab AS 1 von Maus-STAT5	ccgctcgagtgatgtctctgtgg
Kpn-STAT6	3'-Primer mit KpnII ab AS 847 von Maus-STAT5b	ggggtacctcaccaactggg
H15-LOX5'	Primer für humane 12/15-Lipoxygenase (Schnurr et al., 1999)	ggggctggccgacctcgctatc
H15-LOX3'		tcctgtgcggggcagctggagc
EOTAX3Fow	Primer für humanes Eotaxin-3 (Hoeck und Woisetschlager, 2001)	gcctgattgcagcatcatgatgg
EOTAX3Rev		cggatgacaattcagctgagtcac
GAPDH5'	Primer für humane GAPDH (Worm et al., 1998)	gatgacatcaagaaggtggtg
GAPDH3'		gctgtagccaaattcgttgc
I-Epsilon-F	Oligos für EMSA-Probe -117/-97 von Maus-GL ϵ -Promotor	gtcaactcccaagaacagaa
I-Epsilon-R		ttctgttcttgggaagttgac

2.1.6 Vektoren

2.1.6.1 Bakterielle Expressionsvektoren

A Expressionsvektoren für GST-Fusionsproteine

Zur Generierung von GST-Konstrukten wurden die Plasmide pGEX-AHK, pGEX-KGK (von Thorsten Heinzl) sowie pGEX-4T-3 und pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet.

Name/ Derivat von	Kodiertes Insert	Bezugsquelle/Referenz
pCo1 / pGEX-AHK	Maus-NCoA-1 AS 1-787	Diese Arbeit, mit dem Praktikanten Cornelius Abel
pGEX-STAT6 AS 677-847 / pGEX-4T-2	Humanes STAT6 AS 677-847	Labor Groner
pCla30.1 / pGEX-AHK	Humanes STAT6 AS 791-847	Diese Arbeit
pCla33.2 / pGEX-AHK	Humanes STAT6 AS 677-791	Diese Arbeit
pCla41 / pGEX-4T-3	Maus-NCoA-1 AS 570-1442	Diese Arbeit
pCla42 / pGEX-5X-1	Ratte-NCoA-1 AS 806-1442	Diese Arbeit
pCla71 / pGEX-5X-1	Humanes STAT6 AS 642-847	Diese Arbeit, mit den Praktikanten Jörg Mehnert und Jürgen Grief
pCla72 / pGEX-5X-1	Humanes STAT6 AS 642-847 mit L802,805 zu A Mutation	

B Expressionsvektoren für Hexa-Histidin-Fusionsproteine

Für die Herstellung sämtlicher Hexa-Histidin-Fusionsproteine wurde die Vektorserie pet30a/b/c von Novagen verwendet. Die Transkription erfolgt von einem T7-Promotor aus, das translatierte Fusionsprotein enthält eine Thrombin- sowie eine Enterokinase-Spaltstelle.

Name	Kodiertes Insert	Referenz
pCla69	Maus-NCoA-1 AS 213-462	Diese Arbeit
pPhil3	Maus-NCoA-1 AS 257-462	Diese Arbeit, mit dem Praktikanten Philipp Schild
pPhil4	Maus-NCoA-1 AS 213-441	
pPhil5	Maus-NCoA-1 AS 213-420	
pPhil6	Maus-NCoA-1 AS 257-420	

2.1.6.2 Klonierungs-Vektoren mit T7/T3 Promotoren zur *in vitro*-Transkription

Name	Kodiertes Insert	Bezugsquelle
pBSK-STAT2	humanes STAT2	Markus Heim, Universitäts-Hospital, Basel
pBSK-hSTAT5a	humanes STAT5a	Fabrice Gouillieux (Universität Picardie-Jules Verne, Amiens, Frankreich)
pBSK-mSTAT5B	Maus-STAT5B	

2.1.6.3 Expressionsvektoren für Säugerzellen

A Reporterplasmide

Der Reporter pCH110 enthält das *LacZ*-Gen getrieben vom SV40-Promotor.

Luziferase-Reporter:

Name/Vektor-Typus	Luziferase-Reporterplasmid mit folgenden Promotor-Elementen	Bezugsquelle/Referenz
(GAL4-RE)3TK-LUC	3 GAL4-Bindestellen	(Moriggl et al., 1997)
N4(STAT-RE)3 LUC	3 STAT6-Bindestellen	(Moriggl et al., 1997)
N4(STAT-RE)4 LUC	4 STAT6-Bindestellen	Silke Hobbie
pCla9/ pGL3	β-Kasein-Promotor (-344 bis -1)	Diese Arbeit

B generelle Expressionsvektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Expressionsvektoren verwendet, die teils einen CMV-Promotor (pCMX, pCDNA3), teils einen SV40-Promotor (pSG5, pSG6), teils einen Adenovirus-Promotor (pXM) enthalten.

Name/Vektor-Typus	kodiertes Insert	Referenz/ Bezugsquelle
pXM-STAT5a	Maus-STAT5a	(Moriggl, 1996)
pXMSTAT5b	Maus-STAT5b	(Moriggl, 1997)
pXM-STAT6	humanes STAT6	(Moriggl, 1997)
pXM-STAT6(AS 1-792)	AS 1-792 vom humanen STAT6	(Moriggl, 1997)
pCDNA3-STAT1	STAT1	Markus Heim, Universitäts-Hospital, Basel
pSG5-hSTAT3	humanes STAT3	(Caldenhoven, 1996)
pSG6-SRC-1a	Ratten-SRC-1a	Ludger Klein-Hitpass Universitätsklinikum, Essen
pSG6-SRC-1e	Ratten-SRC-1e	
pSG5-hSRC-1e	humanes SRC-1e	Malcom Parker, Molecular Endocrinology Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, London, UK
pSG5-hSRC-1e ΔPAS	humanes SRC-1e, AS 381-1399	
pSG5-hSRC-1e ΔAD1	humanes SRC-1e, ohne AS 1053-1123	
pSG5-hSRC-1e ΔAD2	humanes SRC-1e, AS 1-1240	
pCla44 / pSG6	Ratten-SRC-1, AS 1-571	Diese Arbeit

pCla43 / pSG6	Maus-NCoA-1, AS 1-361	Diese Arbeit
pCla32.2 / pSG6	Ratten-SRC-1, AS 1-787	Diese Arbeit
pXM-mSTAT4	humanes STAT4	(Yamamoto, 1994)
pCla37.1/pCMXPL2	humanes STAT4	Diese Arbeit
pCMX-NCoA-1	Maus-NCoA-1	Joe Torchia, University of West Ontario, London, Canada
pCMX-NCoA-2	Maus-NCoA-2	
pCMX-NCoA-3	Maus-NCoA-3	
pCla70.5 / pXM	humanes STAT6 mit L802,805 zu A	Diese Arbeit
pCDNAI-PRLR	Lange Form des Prolaktinrezeptors	(Moriggl, 1996)
pCla49.9 / pCDNA3-HisB	Maus-NCoA-1, AS 361-571	Diese Arbeit
pCla73 / pCDNA3-HisB	Maus-NCoA-1, AS 313-462	Diese Arbeit

C Expressionsvektoren für Fusionsproteine mit der DNA-Bindedomäne von GAL4

Folgende Fusions-Konstrukte stammen von pCMV-GAL4-DBD ab, der für die Region AS 1 bis 147 von GAL4 kodiert.

Name	Kodiertes Insert	Referenz
pCla24.10	Maus-STAT5A AS 722-794	Diese Arbeit
pCla29.1	Maus-STAT5B AS 726-787	Diese Arbeit
pCMV-GAL4-DBD-STAT6(677-847)	Humanes STAT6 AS 677-847	(Moriggl et al., 1997)
pCMV-GAL4-DBD-STAT6(677-792)	Humanes STAT6 AS 677-792	(Moriggl et al., 1997)
pCMV-GAL4-DBD-STAT6(792-847)	Humanes STAT6 AS 792-847	(Moriggl et al., 1997)
pCla116.1	Humanes STAT6 AS 792-847	Diese Arbeit
pCla117.6	Humanes STAT6 AS 792-847 mit L802, 805 zu A	Diese Arbeit

D Expressionsvektoren für Fusionsproteine mit N-terminalem Hexa-Myc-Anhang

Diese Konstrukte leiten sich von pCS2+ ab, der für ein Fusionsprotein mit Hexa-Myc kodiert.

Name	Kodiertes Insert	Referenz/ Bezugsquelle
pCS2+SRC-1(569-805)	AS 569-805 von Ratten-SRC-1	Ludger Klein-Hitpass (Universitätsklinikum, Essen)
pCS2+SRC-1(804-1032)	AS 804-1032 von Ratten-SRC-1	
pCS2+SRC-1(1208-1442)	AS 1208-1442 von Ratten-SRC-1a	
PCS2+SRC-1(1208-1420)	AS 1208-1420 von Ratten-SRC-1e	
PCS2+SRC-1(1258-1442)	AS 1258-1442 von Ratten-SRC-1a	
pCla16.1	AS 1314-1463 von Maus-NCoA-2	Diese Arbeit
pCla17.1	AS 1251-1405 von Maus-NCoA-1	Diese Arbeit
pCla20.10	AS 1303-1398 von Maus-NCoA-3	Diese Arbeit
pCla36.2	AS 792-847 von humanem STAT6	Diese Arbeit
pCla47.5	AS 1-462 von Ratten-SRC-1	Diese Arbeit
pCla48.1	AS 100-462 von Maus-NCoA-1	Diese Arbeit
pCla50.5	AS 1-361 von Ratten-SRC-1	Diese Arbeit
pCla51.1	AS 213-462 Ratten-SRC-1	Diese Arbeit
pCla52.1	AS 1-571 von Ratten-SRC-1	Diese Arbeit

E Expressionsvektoren für Fusionsproteine mit GFP

Folgende Konstrukte leiten sich von pECFP-C1 (Clontech, BD Bioscience) ab, der für ein Fusionsprotein mit Enhanced Cyanofluorescent Protein kodiert.

Name	Kodiertes Insert	Referenz
pCFP-STAT5a	AS 1-794 von Maus-STAT5a	Philipp Schild, Diplomarbeit
pCla125	AS 1-847 von humanem STAT6	
pCla126	AS 1-847 von humanem STAT6 mit der Mutation L802, 805 zu A	

F Retrovirale Expressionsvektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der bicistronische Vektor Pinco verwendet, der sich von MLV ableitet und als Marker-Gen EGFP enthält (Grignani et al., 1998).

Name	Insert	Bezugsquelle
Pinco	-	Pier Pelicci, Milano
Pinco (N1-571), (pCla113)	Maus-NCoA-1 AS 1-571	Diese Arbeit
Pinco (S792-847), (pCla79)	Humanes STAT6 AS 792-847	Diese Arbeit

2.1.7 Bakterien und Bakterien-Medien

2.1.7.1 Bakterien

Als Wirtstamm für molekularbiologische Arbeiten dienen die *Escherichia Coli*-Stämme: DH5a und XL1blue. Zur Gewinnung von Proteinen wurde der Stamm BL21 DE3LysS verwendet. Dieser Stamm wurde unter Chloramphenicol-Selektion gehalten.

Stamm	Genotyp
DH5a	<i>endA1 hsdR17(rk⁻ mk⁻) supE44 thi⁻ λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 80dlacI^qZD M15</i>
BL21(DE3) pLysS	<i>F ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dcm (DE3) pLysS (Cm^R)</i>
XL-1 blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi⁻ relA1 lac⁻ F'(traD36 proAB+ lacI^qZD M15)</i>

2.1.7.2 Medien

Medienbestandteile bzw. -zusätze für Bakterien wurden von Invitrogen (Karlsruhe) und Difco (Augsburg) und bezogen. Die Medien mit deionisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Antibiotika wurden den Medien und Platten in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml	Chloramphenicol	34 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml		

2.1.8 Zellkultur und Zellkulturmedien

Sämtliche Medien, fötales Kälberserum, Antibiotika und Zusätze für die Kultur von Säugerzellen wurden von Biowhittaker (Verviers, Belgien) und Invitrogen (Karlsruhe) geliefert. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Zelllinien und die zugehörigen Kulturmedien:

Zelllinie	Zelltyp	ATCCNummer /Referenz/Quelle	Medium
Ba/F3-IL-4R	Maus-Prä-B-Zellen, stabil transfiziert mit humanem IL-4-Rezeptor α und γ	(Curiel et al., 1997)	RPMI, 5% WEHI-Kulturüberstand
HepG2	Humane hepatozelluläre Karzinom-Zellen	HB-8065	DMEM
HeLa	Adenomakarzinom-Zellen, Zervix	CCL-2	DMEM
M12.4.1	B-Zelllinie	Paul Rothman, New York	RPMI
NCI-H292	Humane Lungenepithel-Zellen	Böhriger-Ingelheim	RPMI
WEHI 293T	Maus-Myelomonozyten	(Lee et al., 1982)	RPMI
293T	Humane fötale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus 5 DNA	CRL-1573	DMEM
293-GPG	Verpackungszelllinie, mit GAG und POL von MLV sowie ENV von VSV-G	Chris Nolan, Stanford	DMEM, G418, NEM, Puromycin, Doxycyclin

Alle Medien enthielten 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin. FCS wurde zur Inaktivierung von Komplement vor Gebrauch für 30 min. bei 56°erhitzt.

2.2. Methoden

2.2.1 Klonierungstechniken und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation chemokompetenter Bakterien

Die Präparation chemokompetenter Bakterien (der Stämme DH5a, XL-1 blue, BL21DE3) erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983).

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

Chemokompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde mit der Bakteriensuspension gemischt und für 20 min. auf Eis inkubiert.

Die Bakterien wurden für 2 min. bei 42°C hitzegeschockt und anschließend für 2 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien mit 400 µl LB-Medium versetzt und für 30-60 min. bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3 Analytische Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim, 1983) und anschließender Butanol-Fällung der DNA: Das geklärte Bakterien-Lysat wurde mit 1.5 Vol 6M Guanidiniumisothiocyanat und 2 Vol Butanol versetzt. Die gefällte DNA wurde pelletiert (20000g, 10 min. bei 4°C), mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl Wasser aufgenommen. Die Ausbeute lag bei 1-3 µg/ml Kulturvolumen.

2.2.1.4 Präparative Plasmidisolierung

Die Kultur der Bakterien und die Aufreinigung der Plasmide aus der Übernachtskultur erfolgte nach dem Qiagen Maxi Plasmid Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch über den OD₂₆₀-Wert bestimmt (1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml DNA). Die Ausbeute lag bei 200-500 µg. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.1.5 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)-Extraktion und Ethanol-Fällung

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Vol Lithiumchlorid-Lösung (5M LiCl, 1x TE pH 8.0) und 1 Vol PCI-Lösung (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1) versetzt. Das Gemisch wurde homogenisiert (Vortex) und zentrifugiert (20000 g, 5 min.). Die wässrige Oberphase wurde mit 3 Vol Ethanol versetzt. Die DNA wurde pelletiert (20000 g, 20 min.), mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in Wasser aufgenommen.

2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren DNA an kurzen, definierten Nukleotidsequenzen.

Die DNA wurde mit den entsprechenden Enzymen unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Puffer, Enzymmenge, Temperatur, Reaktionszeit) inkubiert.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Mithilfe der T4-DNA-Ligase können komplementär überhängende oder stumpfe DNA-Enden kovalent verknüpft werden. Das Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiester-Brücke zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe von doppelsträngiger DNA. Die Reaktion wurde mit der T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (NEB, Schwalbach) durchgeführt.

2.2.1.8 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

5'-Enden von linearisierten Plasmiden wurden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Selbstligation zu verhindern. Nach dem Restriktionsverdau wurde pro µg eingesetzte DNA 0.5 U Alkalische Phosphatase zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Fragmenten

Klenow Enzym (das große Fragment der DNA-Polymerase I von E. coli) agiert als DNA-abhängige 5'-3'-Polymerase mit 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Diese Reaktion wurde für das Auffüllen von 3'-überhängenden Enden angewandt, wenn diese als stumpfe Enden ligiert werden sollten. Die Reaktion wurde mit dem Klenow Enzym nach Angaben des Herstellers (NEB, Schwalbach) durchgeführt.

2.2.1.10 Hybridisierung von komplementären DNA-Einzelsträngen

Die komplementären Einzelstränge wurden im molaren Verhältnis 1:1 in 1x NEB Puffer 2 gemischt (je ca. 25 ng/µl) und für 2 min. auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden im Heizblock zum Abkühlen auf RT stehen gelassen. Die doppelsträngige DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.11 Kinasieren von stumpfen DNA-Enden zur radioaktiven Endmarkierung

Die T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert den Transfer und Austausch von organischem Phosphat der γ-Position von ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe von Polynukleotiden.

200 ng doppelsträngige 21mer-DNA wurde in einem Volumen von 15 µl mit 25 pMol γ -³²P-dATP (mit einer spezifischen Aktivität > 3000 Ci/mmol) und 20 U T4-Polynukleotid-Kinase in 1x PNK-Puffer gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zum Abtrennen der nicht eingebauten Nukleotide wurde eine microSpin™G25Säule (von Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Aktivität wurde in einem Szintillationsmeßgerät (TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyzer) bestimmt.

2.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wird die Größe von DNA-Fragmenten analysiert. Für Fragmente kleiner als 4 kb wurden 1-2%ige Agarose Gele mit 1xTBE-Puffer, für größere Fragmente 0.8%ige Agarose-Gele mit 1xTAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde vor dem Gießen der Gele mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 10x-DNA-Proben-Puffer (25% (w/v) Ficoll, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylen-cyanol) gemischt und in die Taschen der Gele geladen. Die Elektrophorese wurde bei 1-5 V/cm durchgeführt. Die Gele wurden nach dem Lauf unter UV-Licht photographiert. Als Größenstandard diente die 1 kb-Leiter.

2.2.1.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA-haltige Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation aus dem Agarose-Block ausgeschleudert, wobei ein 0.5 ml-Reaktionsgefäß mit einem kleinen Loch am Boden, gestopft mit einem Glaswolle-Pfropf, als Filter fungierte und die Lösung in einem 1.5ml Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Die DNA wurde über PCI-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung aufgereinigt.

Alternativ wurde die Aufreinigung mit NucleanII von Energene (Regensburg) durchgeführt.

2.2.1.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR wird spezifisch ein DNA-Abschnitt zwischen zwei bekannten Regionen amplifiziert.

Dies geschieht mit einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar und einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z. B. von *Thermus aquaticus*, Taq) (Saiki et al., 1988). Eine Standard-PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: 1-20 ng DNA wurde mit je 10pMol der beiden Primer, 5 µl des 10xPuffers, 1 µl 10 mM dNTP's in 50 µl Gesamtvolumen angesetzt.

Die Reaktion erfolgte in der T-Gradient PCR-Maschine (Whatmann Biometra®, Goettingen). Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 94°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 U Vent_R® DNA-Polymerase (NEB) gestartet. Danach folgten 25-30 Zyklen mit:

Denaturieren:	94°C	20 sec
Hybridisieren.	50-60°C	30 sec.
Synthese:	72°C	1min./1kb Amplifikat

Zur Synthese unvollständiger Produkte wurde anschließend für 8 min. bei 72°C inkubiert.

2.2.1.15 Positionsgerichtete Mutagenese

Die positionsgerichtete Mutagenese wurde mithilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene® (Amsterdam) durchgeführt.

2.2.1.16 Isolation von RNA aus Zellen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen wurde mithilfe des peqGOLD Trifast™ Reagenz von Peqlab (Erlangen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.17 RT-PCR

2 µg total-RNA wurde mit 200 ng Hexamer-Primern, 4 U Omniscript™ Reverse Transkriptase, 10 U RNase-Inhibitor, dNTPs (0.5 mM Endkonzentration) in 1x RT-Puffer (Omniscript™ Reverse Transcriptase, Qiagen) in 20 µl Volumen revers transkribiert. Von dieser cDNA wurden jeweils 1-2 µl für die nachfolgende PCR mit Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Folgende Gen-Transkripte wurden amplifiziert:

Gen	Referenz für Primer	Länge des PCR-Produkts	Hybridisierungstemperatur
12/15-Lipoxygenase	(Schnurr et al., 1999)	432 bp	65°C
Eotaxin-3	(H o e c k u n d Woisetschlager, 2001)	323 bp	60°C
Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH)	(Worm et al., 1998)	210 bp	65°C

Die PCR wurde jeweils unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einer anfänglichen Denaturierungsphase (94°C, 4 min.) wurden 25-35 PCR-Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt (94°C, 30sec.), einem Hybridisierungsschritt (Temp. s. Tabelle, 35 sec.) und einem Syntheseschritt (72°C, 35 sec.). Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

A Kultur von Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Inkubator mit feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen oder -Flaschen kultiviert.

B Präparation von IL-3-haltigem Medium mithilfe der IL-3-produzierenden WEHI-Zellen

5x10⁴ WEHI-Zellen/ml Medium wurden über Nacht kultiviert. An den 3 darauffolgenden Tagen wurde die Zellsuspension jeweils 1:1 mit frischem Medium verdünnt. Am 4. Tag wurde der IL-3-haltige Überstand durch Zentrifugation gewonnen, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

C Stimulation von Zellen mit Zytokinen

Die folgenden Zytokine wurden in den angegebenen Mengen eingesetzt:

Schaf-Prolaktin (Sigma)	5 µg/ml	Maus IL-4 (Tebu)	10ng/ml
Humanes IL4 (Tebu)	10ng/ml	Retinsäure (Sigma)	10 ⁻⁶ M

2.2.2.2 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren adhärenter Zellen wurden die Zellen zunächst 2x mit PBS gewaschen.

Danach für ca. 5 min. mit trypsinhaltiger Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neuen Schalen ausgesät. Suspensionszellen wurden durch Verdünnen der Zellsuspension mit frischem Medium passagiert.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Zellpellet einer konfluenten Schale bzw. aus einer dichten Zellsuspension wurde in Einfriermedium (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO) aufgenommen, in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die Zellen wurden im 37°C-Wasserbad rasch aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und pelletiert (400g, 5 min., RT). Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

2.2.2.4 Transiente Transfektion von Zellen

A Calcium-Phosphat-Präzipitation

293T-Zellen wurden nach der Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode transfiziert (Graham und van der Eb, 1973). Hierfür wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion ausgesät (Zellzahl s. u.). Die DNA-Lösung wurde mit Calciumchlorid gemischt und mit Wasser auf das entsprechende Volumen ergänzt (s. u.) . Zu dieser Lösung wurde tropfenweise 2xHBS unter Vortexen zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Präzipitate auf den Zellen verteilt. Die Kristalle wurden nach 16 Stunden durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen für weitere 24 bis 48 Stunden kultiviert. Es wurden folgende Mengen eingesetzt:

Kulturschale	Zellzahl	DNA	Vol der DNA-CaCl ₂ -Lsg	2.5 M CaCl ₂	2xHBS
10cm-Schale	2 Mio	5-10 µg	500 µl	50 µl	500 µl
12-Loch-Schale	150000	1-3 µg	50 µl	5 µl	50 µl

B Elektroporation

M12.4.1-Zellen und Ba/F3-IL-4R-Zellen wurden mit Elektroporation transfiziert. Hierfür wurden 1×10^7 bzw. 5×10^6 Zellen mit 20 µg DNA (der Ansatz wurde mit pUC oder pBSK ergänzt) in einem Volumen von 500 µl serumfreien Medium für 5 min. bei RT inkubiert und bei 300 bzw. 350 V und 960µF elektroporiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 37°C im Inkubator wurden die Zellen in serumhaltiges Kulturmedium überführt und weiter kultiviert.

Sollten die Zellen in einem Reporterexperiment mit Zytokin stimuliert werden, so wurden die Zellen nach 4 Stunden in zwei Ansätze geteilt, ein Ansatz mit Zytokin versetzt und für weitere 20 Stunden kultiviert.

C Transfektion mithilfe von verschiedenen Transfektionsreagenzien

HeLa-Zellen, HepG2-Zellen und 293GPG-Zellen wurden mit Superfekt Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für die Transfektion von NCI-H292-Zellen wurden das Reagenz Fugene™6 (Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Sollten die Zellen in einem Reporterexperiment mit Zytokin stimuliert werden, so wurden die entsprechenden Ansätze am Tag nach der Transfektion mit Zytokin versetzt und für weitere 16 Stunden kultiviert.

2.2.2.5 Virale Transduktion von Zellen

Als Verpackungszelllinie wurden 293GPG-Zellen verwendet, die die viralen Kapselproteine und die Polymerase von MLV konstitutiv exprimieren und die das G-Glyco-Hüllprotein vom Vesikulären Stomatitis-Virus induzierbar exprimieren (Tetoff-System).

Je 200000 Zellen wurden auf mit Gelatine beschichteten Sechser-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit je 2 µg der retroviralen DNA und 10 µl Superfekt (Qiagen, Hilden) transfiziert. Nach ca. 5-6 Tagen wurden die Überstände, die den Virus enthalten, gesammelt. Die Zielzellen (je 200000) wurden in Sechser-Platten ausgesät und für 24 Stunden mit den Virus-Überständen inkubiert. Dies wurde 1-2 x wiederholt. Danach wurden die Zielzellen wieder in ihrem Wachstumsmedium weiterkultiviert und die Transduktionseffizienz überprüft.

2.2.2.7 FACS-Analyse von Zellen

Bestimmung der CD23-Expression: 1×10^6 M12.4.1-Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und in 100 µl PBS für 5 min. mit 1 µg F_cBlock auf Eis inkubiert. Danach wurden 1 µg PE-gekoppelter Anti-CD23-Antikörper zugegeben und weitere 20 min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und im FACS-Calibur analysiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 NETN2-Gesamt-Zellextrakte

Die Zellen wurden in eiskaltem PBS gewaschen und abgeschabt. Die Zellen wurden pelletiert (1000 g, 5 min., 4°C) und in eiskaltem Lysepuffer (NETN2: 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerol), der mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt wurde, resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat geklärt (20000g, 10 min., 4°C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

2.2.3.2 Detergenz-freie WCE-Gesamt-Zellextrakte für EMSA

Die Zellen wurden in eiskaltem PBS gewaschen und abgeschabt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 g und 4°C wurde das Zellpellet in 3-5 Vol (bezogen auf das Zellpellet) Lysepuffer (WCE: 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.9, 400 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol), der mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden durch 3-maliges Frieren (flüssiger Stickstoff) und Tauen (37°C Wasserbad) lysiert. Das Lysat wurde geklärt (5 min. bei 20000g, 4°C) und für EMSA-Experimente verwendet.

2.2.3.3 Zellysate für Reporterexperimente

Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und abgeschabt. Das Zellpellet wurde in 50 µl Lysepuffer (25 mM Glycylglycin, pH 7.8, 8 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 15% (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) Triton-X100) lysiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat zentrifugiert (20000g, 10 min., 4°C).

2.2.3.4 Bestimmung der Luziferase- und β-Galaktosidase-Aktivität

Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden je 10 µl Zellextrakt in eine Mikrotiterplatte (Microlite™2, Dynex, Frankfurt) pipettiert und in einem Luminometer (MicroLumat LB96 P, EG&G Berthold) nach Zugabe von 50 µl Luziferin-Lösung (20 mM Tricine/NaOH, pH 7.8, 1.07 mM [MgCo₃]₄•Mg[OH]₂•5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 33 mM DTT, 270 µM Coenzym A, 470 µM Luziferin, 530 µM ATP) analysiert.

Die Luziferase oxidiert das Luziferin in einer ATP-abhängigen Reaktion, wobei Licht emittiert wird. Die auftretende Lichtemission nach Injektion von Luziferin wurde über einen Zeitraum von 30 sec. bei 562 nm gemessen.

Für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität wurde je 3.3 µl Zellextrakt mit 33.3 µl Reaktionspuffer (1mM MgCl₂, 100 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 1x Galacton (Tropix, Bedford)) in einer Mikrotiterplatte für 45-120 min. inkubiert. Die nach Injektion von 50 µl Verstärker (200 mM NaOH, 10 % (v/v) Emerald Lumineszenz-Verstärker (Tropix, Bedford)) auftretende Lichtemission wurde ebenfalls im Luminometer mit der gleichen Einstellung wie bei der Luziferase-Messung gemessen. Die Luziferase-Werte wurden über die β-Galaktosidase-Werte normiert. Der normierte Wert ergibt sich durch Multiplikation des jeweiligen Luziferase-Werts mit dem Quotienten von Durchschnitts-β-Galaktosidase-Wert (aller Werte eines Transfektionsansatzes) und dem jeweiligen β-Galaktosidase-Wert einer Probe. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt und ausgewertet.

2.2.3.5 *In vitro*-Transkription und Translation

Die Transkription von cDNA und die anschließende Synthese von Proteinen in Gegenwart von ³⁵S-Methionin wurde mithilfe des TNTQuickcoupled Reticulocyte lysate System (Promega Deutschland GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) werden Polypeptide in Proteingemischen nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurde das mini-Protean II Gelelektrophoresesystem von Biorad (München) verwendet. Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele wurde dem Protokoll von Sambrook (1989) entnommen. Die Gele wurden in eine Gelkammer mit SDS-Laufpuffer aufgebaut. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, 2 min. bei 95°C erhitzt, 3 min. bei 20000g zentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 150-180 V durchgeführt.

2.2.3.7 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden über Nacht in Coomassie-Färbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue) inkubiert. Sie wurden mit Entfärbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) entfärbt. Danach wurden die Gele gewässert und auf einem Whatmannpapier im Geltrockner getrocknet.

2.2.3.8 Detektion von ³⁵S-markierten Proteinen in Polyacrylamid-Gelen (Fluorographie)

Für die fluorographische Detektion wurden die Gele für 1 Stunde in Enlight (Energene, Regensburg) inkubiert und anschließend auf einem Geltrockner getrocknet. Die Gele wurden über Nacht in Gegenwart einer Verstärkerfolie bei -80°C auf Röntgenfilmen (Fuji, Düsseldorf) exponiert.

2.2.3.9 Western-Blot und Immunodetektion

Der Western-Blot dient dem Transfer von Proteinen aus SDS-PAGE auf Membrane (Towbin et al., 1979). Auf der Membran können Proteine dann über spezifische Antikörper detektiert werden. Für den Western-Blot wurde ein Semi-Trockenblotgerät (QWL) der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet. Der Transfer erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem mit 5 mA/cm² über einen Zeitraum von 1 h. Es wurden PVDF-Membrane und Gel-Blottingpapiere von Schleicher und Schüll (Dassel) verwendet. Der Blot wurde von unten nach oben wie folgt aufgebaut: Kathode / 2 in AP1 getränkte Papiere / 3 in AP2 getränkte Papiere / Membran / Gel / 4 in KP getränkte Papiere / Kathode.

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung freier Proteinbindestellen für 1 h in TBS/T mit 3 % (w/v) Magermilch (=Blockierlösung) inkubiert. Danach wurde für 2 h mit dem jeweiligen Antikörper (in Blockierlösung) inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wurde durch 3-maliges Waschen (3x 5 min.) mit TBS/T entfernt. Der gebundene Primärantikörper wurde mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (in Blockierlösung) für 1 Stunde inkubiert. Nach 3-maligem Waschen (s. o.) erfolgte die Detektion mithilfe von Nova-Reagenz (Energene, Regensburg). Nova enthält ein Substrat der Peroxidase, welches unter Lichtemission umgesetzt wird. Die Signale wurden mit Röntgenfilmen detektiert.

2.2.3.10 GST-Fusionsproteine: Präparation von Rohlysaten

Mithilfe von GST-Fusions-Vektoren (pGEX, Amersham Biosciences, Freiburg) können fremde Polypeptide in *E. coli* als Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) von *Schistosoma japonicum* hergestellt werden. Dieses Vektorsystem ermöglicht eine induzierbare Expression sowie die affinitätschromatographische Aufreinigung des nativen Fusionsproteins über immobilisiertes Glutathion. Der entsprechende GST-Vektor wurde in den Bakterienstamm BL21-DE3-LysS transformiert. Eine Vorkultur von 5 ml LB-Medium mit Antibiotika wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am anderen Morgen wurden 250 ml frisches Medium mit der Vorkultur beimpft und bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0.6 weiter kultiviert. Die Expression der GST-Proteine wurde durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 0.5 mM) induziert. Nach ca. 1-2 Stunden wurden die Bakterien pelletiert (3000 g, 15 min.) und in 3.75 ml Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) Triton-X100), der mit 1mM DTT und Proteaseinhibitor komplettiert wurde, aufgenommen. Die Bakterien wurden durch dreimaliges Frieren (flüssiger Stickstoff) und Tauen (37°C, Wasserbad) lysiert. Die DNA wurde durch Ultraschall-Behandlung (Branson Sonifier 250, G. Heinemann Schwäbisch Gmünd) geschert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 20000g (30 min., 4°C) geklärt. Der Überstand (=Rohlysate) wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.11 CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)-Assay

Mithilfe des CDNB-Assay wird die Menge an GST in einer Lösung (z. B. Rohlysate) bestimmt. 1-2 µl der Lösung wurden auf einer Mikrotiter-Platte mit 100 µl Reaktionspuffer (10 mM Phosphatpuffer, pH 6.5, 1 mM Glutathion, 1 mM CDNB) gemischt.

In einem ELISA-Reader (Spectro Max340, MWG, Biotech) wurde über die Absorption bei 340 nm über einen Zeitraum von 7 min (1 Meßwert pro Minute) die Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} ermittelt. v_{\max} ist direkt proportional zur Enzymmenge und ist daher ein Maß für den Gehalt von GST.

2.2.3.12 GST-Fusionsproteine: Aufreinigung und Dialyse

Für die Herstellung von gereinigten Fusionsproteinen wurden zunächst Rohlysate wie in Abschnitt 2.2.3.10 beschrieben, hergestellt. Abweichend davon wurde ein Volumen von 10 ml Lysepuffer für ein Bakterienpellet aus 200 ml Kultur eingesetzt. Das geklärte Lysat wurde mit 300 μ l äquilibrierter Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit 10 ml Lysepuffer entfernt. Danach wurde dreimal mit detergenzfreiem Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol) gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden schließlich mit Elutionspuffer eluiert (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 20 mM Glutathion). Die einzelnen Fraktionen wurden über CDNB-Assay auf ihren GST-Gehalt hin analysiert. Die Fraktionen mit höchstem GST-Gehalt wurden gesammelt und gegen 1xPBS oder 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 dialysiert.

2.2.3.13 Poly-Histidin-Fusionsproteine: Präparation von Rohlysaten, Aufreinigung und Dialyse

Für die Herstellung von Polyhistidin-Fusionsproteinen wurde das pET-Vektorsystem von Novogene verwendet. Die Fusions-Konstrukte wurden in *E. coli* exprimiert und die Fusionsproteine über ein Polyhistidin-Anhang aufgereinigt. Der Vektor enthält einen T7-Promotor vor der für das Fusionsprotein kodierenden Region. Die cDNA der T7-Polymerase ist im Genom der BL21-DE3-Lys kodiert und deren Expression wird durch einen Tac-Promotor reguliert, d. h. nach Induktion mit IPTG wird zunächst die T7-Polymerase gebildet, welche dann wiederum das entsprechende Gen im pET-Vektor transkribiert.

Der jeweilige pET-Vektor wurde in BL21-DE3-Lys transformiert. Die Kultur der Bakterien, die Induktion der Expression und die Lyse erfolgte wie unter Punkt 2.2.3.10 beschrieben. Abweichend davon wurden die Bakterien zusätzlich unter Chloramphenicol gehalten und eine Übertagkultur eingesetzt. Das geklärte Lysat wurde mit 300 μ l äquilibrierter Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) bei 4°C inkubiert. Es wurde 3 mal mit je 10 ml Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM Imidazol) gewaschen.

Danach wurde 3 mal mit dem Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM Imidazol) gewaschen. Anschließend wurde durch Zugabe von Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden gesammelt und gegen Dialysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0) dialysiert.

2.2.3.14 Proteininteraktionsstudien (GST-Pulldown-Experimente)

Mithilfe von GST-Pulldown-Experimenten wurde die *in vitro*-Interaktion von Proteinen untersucht. Dabei wurde der eine Partner als GST-Fusionsprotein vorgelegt, während das zweite Protein ein *in vitro*-translatiertes, radioaktiv markiertes oder ein bakteriell exprimiertes, gereinigtes Poly-Histidin-Fusionsprotein darstellte. Die Reaktion wurde wie in (Litterst und Pfitzner 2001) beschrieben, durchgeführt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl 2xSDS-Probenpuffer eluiert. 3/4 des Ansatzes wurde über SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Der restliche Ansatz wurde nach SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt.

2.2.3.15 Immunpräzipitation

Mithilfe der Immunpräzipitation (IP) wurden Protein-Komplexe in Zellen analysiert. Das Zellextrakt wurde zunächst zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine mit ProteinA/G-Sepharose (Pierce, via KMF, St. Augustin) inkubiert. Nach 1 Stunde wurde die Sepharose durch Zentrifugation (20000g, 5 min., 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde mit Antikörper (je 2-5 µg) versetzt. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotator bei 4°C für 3 Stunden oder über Nacht. Danach wurden 25 µl ProteinA/G-Sepharose zugegeben. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation wurde die Sepharose pelletiert (500 g, 1 min. 4°C), 3 mal mit NETN2-Puffer gewaschen und mit 30 µl 2xSDS-Probenpuffer (Roth) versetzt. Die Proben wurden über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.2.3.16 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Die doppelsträngige, radioaktiv markierte Probe (ca. 3 fMol mit 20000cpm), wurde mit 5-8 µg WCE-Zellextrakt (Abschnitt 2.2.3.2) für 30 min. bei RT in Reaktionspuffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 % Glycerol, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml Poly(dI/dC)) inkubiert.

Die Nukleoproteinkomplexe wurden auf einem nativen 4%igen TBE-Polyacrylamidgel (0.5X TBE, 2.5 % (v/v) Glycerol) bei 150V aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel getrocknet und über Nacht auf einem Röntgenfilm in Gegenwart einer Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

2.2.3.17 ELISA (Enzyme linked Immunosorbend Assay) und Nachweis der Meerettich-Peroxidase über ortho-Phenylendiamine (OPD)

Der ELISA dient der Detektion von spezifischen Antikörpern, löslichen Antigenen oder Antigenen auf der Zell-Oberfläche. Lösliche Reaktanten werden aus einem Gemisch durch spezifische Bindung an immobilisierte Reaktanten isoliert und detektiert.

Die Antikörper und Streptavidin wurden, wenn nicht anders vermerkt, 1:2000 verdünnt.

Waschpuffer 1	1xPBS, 0.05% (v/v) Tween 20
Waschpuffer 2	1xPBS, 0.1 % (v/v) Tween20
Absättiger 1	1xPBS, 3% (w/v) Trockenmilch, 0.05% (v/v) Tween 20
Absättiger 2	1xPBS, 1% (w/v) BSA, 5% (w/v) Saccharose, 0.05% Natriumazid
Absättiger 3	1xPBS, 2 % (w/v) BSA, 0.1 % (v/v) Tween20
Absättiger 4	1xPBS, 5% (w/v) BSA, 0.1 % (v/v) Tween 20

A Quantifizierung der Affinität der Kaninchen-Antikörper zu STAT6

Um die Affinität der Kaninchen-Antiseren zu STAT6 zu quantifizieren, wurden ELISA-Platten (GST96 well Detection Module, von Amersham Biosciences, Freiburg), die mit GST-AB beschichtet sind, verwendet. Die Antikörper wurden in Absättiger 1 angesetzt.

GST-STAT6-TAD-Rohlysate wurden in Absättiger 1 auf den Platten inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Bindung der Antiseren wurde der Absättiger alleine verwendet.

Nach Entfernen nichtbindender Proteine durch Waschen mit Waschpuffer 1 wurden die Kaninchen-Antiseren für 1 Stunde zu dem immobilisierten GST-STAT6-Fusionsprotein bzw. zu den Kontrollansätzen (1:1000) zugegeben. Nach 3-maligem Waschen wurden spezifisch gebundene Antikörper über Meerettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Hierfür wurde der sekundäre Antikörper für 1 Stunde zugegeben. Nach 5-maligem Waschen wurden die gebundenen Sekundärantikörper detektiert. Der Nachweis der Peroxidase geschah über das Substrat ortho-Phenylendiamine (OPD), welches zu einem Farbstoff umgesetzt wird, wie unter D beschrieben. Es wurden jeweils Dreieransätze angesetzt und ausgewertet.

B Quantifizierung von Eotaxin-3 im Kulturüberstand von 293T-Zellen

Der Detektionsantikörper und Streptavidin wurden in Absättiger 3 angesetzt. Mikrotiterplatten (Costar, Bodenheim) wurden mit 500 ng/Loch polyklonalem Ziegen-Anti-Eotaxin-3-Antikörper in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 3-maliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer 2 entfernt. Die Platten wurden durch Inkubation mit Absättiger 2 bei RT für 3 Stunden abgesättigt.

Nach dreimaligem Waschen (s. o.) wurden 100-300 µl der Zellüberstände in Dreieransätzen in die Löcher pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Wieder wurde 3x gewaschen. Zur Detektion des immobilisierten Eotaxin-3 wurde 25 ng/Loch biotinylierter polyklonaler Ziegen-Anti-Eotaxin-3-Antikörper für 2 Stunden bei RT zugegeben. Nach dreimaligem Waschen wurde Streptavidin-gekoppelte Meerettich-Peroxidase (Jackson-ImmunoResearch Laboratories) zugegeben. Nach 1 Stunde wurde 5 mal gewaschen und wie unter D beschrieben detektiert. Es wurden jeweils Dreieransätze auf den Platten angesetzt. Drei unabhängige Versuchsreihen wurden ausgeführt und ausgewertet.

C Quantifizierung der STAT6-NCoA-1-Interaktion

Der Detektionsantikörper wurden in Absättiger 4 angesetzt.

500 ng von GST-STAT6 (AS 677-847) Fusionsprotein wurde in 1XPBS über Nacht auf Mikrotiter-Platten bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer 2 entfernt. Die Platten wurden durch Inkubation mit Absättiger 4 bei RT für 2 Stunden blockiert. Nach dreimaligem Waschen (s. o.) wurden 250 ng Histidin-NCoA-1(AS 213-462)-Fusionsprotein (in Waschpuffer 2) in die Löcher pipettiert und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Wieder wurde 3x gewaschen. Zur Detektion des immobilisierten NCoA-1 wurde monoklonaler Maus-Anti-Penta-Histidin-Antikörper für 1 Stunde bei RT zugegeben. Nach dreimaligem Waschen wurde Meerettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper zugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde 5 mal gewaschen und wie unter D beschrieben detektiert. Es wurden jeweils Dreieransätze angesetzt und ausgewertet.

Alternativ wurden Ni-NTA-Platten (Qiagen) verwendet, die mit Nitrilotriessigsäure und chelatisch gebundenem Nickelionen beschichtet sind. Diese erlauben die spezifische Kopplung von Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein aus bakteriellen Rohlysaten. Nach Entfernen nicht gebundener Proteine und einem Blockierungsschritt (s. o) wurde mit gereinigtem GST-STAT6-Fusionsprotein (250–500 ng) für 1 Stunde inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen wurde Meerettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-GST-Antikörper (1:10000, in Absättiger 4, Amersham, Pharmacia, Life Science) zugegeben. Danach wurde 5 mal gewaschen und wie unter Abschnitt D beschrieben detektiert. Es wurden jeweils Dreieransätze angesetzt und ausgewertet.

D Nachweis der Meerettich-Peroxidase über ortho-Phenylendiamine (OPD)

100 µl Substratlösung (1 mg/ml OPD (Sigma), 0.05M Phosphat-Citrat-Puffer (Sigma), 0.03% H₂O₂) wurde zugegeben und für 6 min. im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1 N H₂SO₄ gestoppt. Die Differenz der Absorption bei 492 und 620 nm, die direkt proportional zur Peroxidase-Aktivität ist, wurde in dem ELISA-Reader Spectro Max340 (MWG, Biotech) Gerät bestimmt.

3. Ergebnis

3.1 Untersuchung der Beteiligung der p160/SRC-1-Koaktivator-Familie bei der STAT5-vermittelten Genaktivierung

3.1.1 Bedeutung der p160/SRC-1-Koaktivator-Familie für die STAT5-vermittelte Transaktivierung

Es gibt zwei verschiedene STAT5-Gene im Maus-Genom. Die beiden Proteine STAT5a und STAT5b haben eine zu ungefähr 95% identische Aminosäuresequenz (Liu et al., 1995) und unterscheiden sich hauptsächlich in der carboxyterminal gelegenen Transaktivierungsdomäne. Beide Varianten bilden Homo- und Heterodimere und transaktivieren die Prolaktin-induzierte β -Kasein-Expression (Liu et al., 1995). Trotz der Sequenzunterschiede in den Transaktivierungsdomänen werden beide STAT5-Varianten bei der Prolaktin-induzierten Transaktivierung der β -Kasein-Expression durch p300/CBP stimuliert (Pfitzner et al., 1998). P300/CBP assoziiert mit anderen Koaktivatoren, beispielsweise mit Mitgliedern der p160/SRC-Familie (Torchia et al., 1997; Yao et al., 1996). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Funktion diese p160/SRC-Kofaktoren bei der durch STAT5a und STAT5b vermittelten Transaktivierung des β -Kaseingens haben. Hierfür wurden Reporter-gen-Experimente mit einem Luziferasegenkonstrukt, das die Promotorregion des β -Kasein-Gens (-344 bis -1) enthält, durchgeführt (Abb. 3-1). Dieses Promotorfragment enthält zwei Bindungselemente für STAT5. Um zu untersuchen, ob kotransfizierte Koaktivatoren die STAT5a-vermittelte Transaktivierung des β -Kasein-Reporters steigern können, wurden HeLa-Zellen neben dem Reporterplasmid mit Expressionsvektoren für STAT5a, für den Prolaktinrezeptor und für die Koaktivatoren (letztere in verschiedenen Mengen) in Doppelansätzen transient transfiziert. Eine Hälfte der Ansätze wurde jeweils mit Prolaktin stimuliert und die Luziferaseaktivität in den Zellextrakten bestimmt.

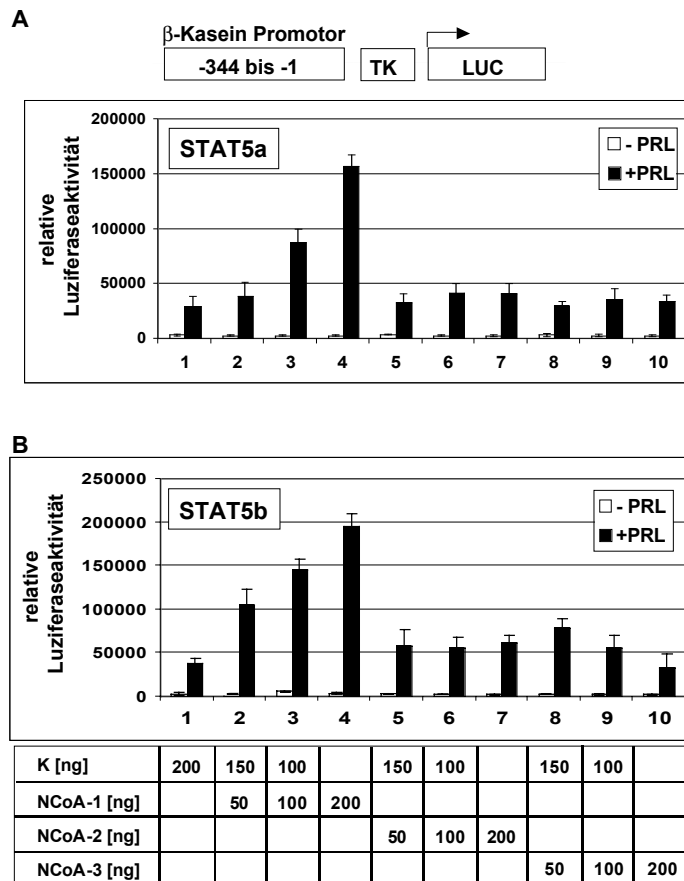


Abb. 3-1 Bedeutung der p160/NCoA-1-Familie für die STAT5-vermittelte Transaktivierung des β -Kasein-Gens

A und B) HeLa-Zellen wurden in Doppelansätzen mit dem β -Kasein-Luziferase-Reporter (1.25 μ g), den Expressionsvektoren für STAT5a oder STAT5b (12.5 ng), dem SV40-LacZ-Vektor (12.5 ng), dem Prolaktinrezeptor (12.5 ng) und den angegebenen Mengen der Expressionsvektoren für NCoA-1, -2 und -3 bzw. dem Kontrollvektor K transfiziert. Die Hälfte der Ansätze wurde mit Prolaktin behandelt. Die relative Luziferaseaktivität in den Zellextrakten wurde wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt.

Bei den Ansätzen ohne exogenes NCoA-1 erhöhte sich die Luziferaseaktivität durch Prolaktinstimulation um einen Faktor 10 im Vergleich zu den Basalwerten ohne Zytokinstimulus (Ansatz 1). Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, in denen gezeigt wurde, daß STAT5 nach Aktivierung durch Prolaktin ein starker Aktivator des β -Kasein-Promotors ist (Gouilleux et al., 1994; Moriggl et al., 1996). Die Kotransfektion steigender Mengen des NCoA-1-Expressionsvektors bewirkte eine graduelle Erhöhung dieser STAT5a-vermittelten Induktion der Luziferase-Expression bis um das Fünffache, die Basalwerte blieben aber unverändert (Ansätze 2-4). Die Kotransfektion der anderen Familienmitglieder NCoA-2 und NCoA-3 hatte dagegen keinen Einfluß auf die STAT5-vermittelte Expression des β -Kasein-Reporters (Ansätze 5-10). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß NCoA-1 als Koaktivator von STAT5a wirken kann, während die anderen Familienmitglieder vermutlich keine Rolle bei der STAT5-vermittelten Transaktivierung spielen.

Wenn HeLa-Zellen im gleichen experimentellen Ansatz mit STAT5b transfiziert wurden, wurde bei Stimulation mit Prolaktin eine 12-fache Erhöhung der Luziferaseaktivität im Vergleich zum Basalwert gemessen (Abb. 3-1B, Ansatz 1). Dies bestätigt die Beobachtung früherer Studien, nämlich daß STAT5a und STAT5b sich im Transaktivierungspotential bezüglich des β -Kasein-Promotors in HeLa-Zellen nicht wesentlich unterscheiden (Pfitzner et al., 1998). Steigende Mengen von NCoA-1-Expressionsvektor erhöhten das Transaktivierungspotential von STAT5b konzentrationsabhängig (Ansätze 2-4), bei der höchsten Menge wurde eine 5-fache Stimulation beobachtet. Dagegen hatte die Koexpression von NCoA-2 einen geringeren Effekt (Ansätze 5-7). Die Kotransfektion von NCoA-3 bewirkte bei der geringsten Konzentration eine 2-fache Erhöhung (Ansatz 8). Höhere Konzentrationen reduzierten die Transaktivierung aber auf den Wert ohne exogenen Koaktivator (Ansätze 9 und 10). Diese Experimente zeigen, daß NCoA-1 bei der Transaktivierung des β -Kasein-Gens für beide STAT5-Varianten als Koaktivator wirkt. NCoA-2 und NCoA-3 scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen, da STAT5a und STAT5b durch die Kotransfektion dieser Koaktivatoren nicht bzw. nur geringfügig gefördert werden.

3.1.2 Rekrutierung von p160/SRC-1-Koaktivatoren durch die Transaktivierungsdomäne von STAT5 in Zellen

Das im oben beschriebenen Reporterplasmid enthaltene Fragment des β -Kasein-Promotors enthält neben zwei GAS-Elementen Bindestellen für andere Transkriptionsfaktoren. Um zu bestätigen, daß der stimulierende Effekt von NCoA-1 lediglich durch eine Koaktivierung von STAT5 zustande kommt, wurde untersucht, ob NCoA-1 als Koaktivator der isolierten STAT5-Transaktivierungsdomäne wirken kann. Die kodierende Region für die heterologe GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-DBD, AS 1-147) wurde an die Sequenz der Transaktivierungsdomäne von STAT5a bzw. STAT5b fusioniert (Abb. 3-2A und B).

Diese GAL4-Konstrukte wurden gemeinsam mit einem Luziferase-Konstrukt, das 3 GAL4-Bindungs-elemente in der Promotorregion enthält, und mit den Expressionsvektoren für die p160/SRC-Koaktivatoren transfiziert (Abb. 3-2). GAL4-DBD alleine besitzt wie bereits beschrieben ein sehr geringes Transaktivierungspotential, die Kotransfektion von p160/SRC-Koaktivatoren zeigte keinen signifikanten Effekt auf diese basale Aktivität von GAL4-DBD (Abb. 3-2A, Ansätze 1 und 4).

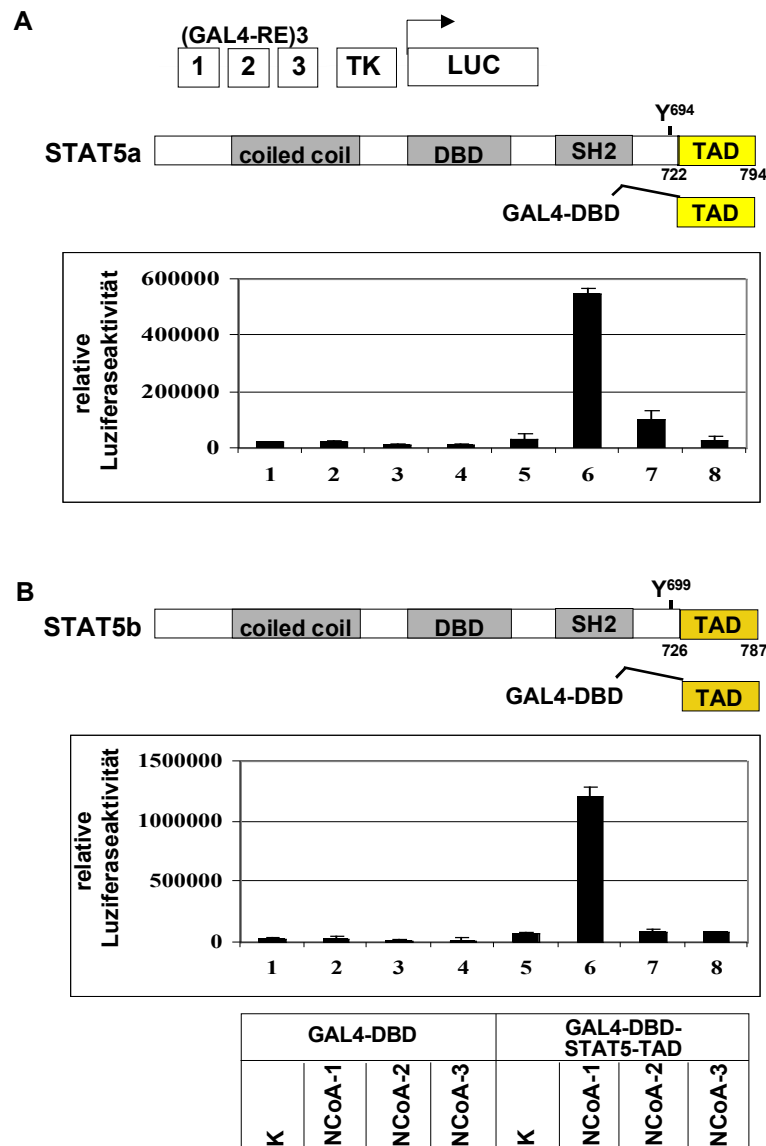


Abb. 3-2 Rekrutierung von NCoA-1 durch die Transaktivierungsdomäne von STAT5a und STAT5b in Zellen

A und B) Schematische Darstellung des Reporterplasmids (GAL4-RE)₃-TK-LUC, der Struktur von STAT5a, von STAT5b und der GAL4-Fusionskonstrukte.

HeLa-Zellen wurden mit dem Reporter (1.25 µg), dem Standardisierungsvektor SV40-LacZ (12.5 ng), Expressionsvektoren für GAL4-DBD, GAL4-DBD-STAT5a-TAD bzw. GAL4-DBD-STAT5b-TAD (25 ng), zusammen mit NCoA-1, NCoA-2, NCoA-3 bzw. dem Kontrollvektor K (400 ng) transfiziert.

Das GAL4-STAT5a-TAD-Fusionskonstrukt erhöhte die Luziferase-Aktivität in den Zelllysaten geringfügig (Ansatz 5). Dies ist im Einklang mit früheren Studien, die zeigen, daß die Transaktivierungsdomäne von STAT5a nur eine schwache Aktivität besitzt, wenn sie an die heterologe GAL4-DBD fusioniert wird (Moriggl et al., 1997). Die Überexpression von NCoA-1 steigerte die Aktivität des GAL4-STAT5a-Fusionskonstrukt 20-fach (Ansatz 6). Im Gegensatz dazu wurde nur eine leicht Erhöhung bei der Überexpression von NCoA-2 (Ansatz 7) bzw. kein Effekt bei NCoA-3 beobachtet (Ansatz 8). Die GAL4-DBD-Fusion mit der transaktivierenden Domäne von STAT5b besitzt ebenso ein relativ schwaches Transaktivierungspotential (3-fach zu GAL4-DBD alleine, Abb. 3-2B, Ansatz 5). Die Überexpression von NCoA-1 stimulierte diese Aktivität um einen Faktor 17 (Ansatz 6). Die Überexpression der beiden anderen Koaktivatoren blieb dagegen ohne Effekt (Ansatz 7 und 8). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß NCoA-1, nicht aber die anderen Familienmitglieder, ein spezifischer Koaktivator der Transaktivierungsdomäne von STAT5 ist. Die beiden Isoformen STAT5a und STAT5b verhalten sich diesbezüglich gleich.

3.1.3 Interaktion von STAT5 und NCoA-1

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, daß NCoA-1 ein Koaktivator für STAT5 ist und von der transaktivierenden Domäne rekrutiert wird. Diese Rekrutierung wird möglicherweise über eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt. Um einen Hinweis auf eine direkte Bindung zu bekommen, wurden GST-Pulldown-Experimente mit bakteriellen GST-Fusionsproteinen durchgeführt. In zahlreichen Interaktionsstudien konnte keine reproduzierbare Bindung nachgewiesen werden. Da die Interaktion durch sekundäre Modifikationen beeinflusst sein kann bzw. auch indirekt erfolgen kann, wurde versucht, einen STAT5-NCoA-1-Komplex mit spezifischen Antikörpern aus Zelllysaten zu präzipitieren (Koimmunpräzipitation). Hierfür wurden verschiedene Anti-STAT5- und Anti-NCoA-1-Antikörper ausgetestet.

Auch dieser Ansatz lieferte ausschließlich negative Ergebnisse. Um das Problem einer möglichen sterischen Behinderung der Interaktion durch einen Antikörper zu umgehen, wurde ein Green-Fluorescent-Protein-(GFP)-STAT5-Fusionskonstrukt eingesetzt, das eine Präzipitation des Fusionsproteins mit einem Anti-GFP-Antiserum erlaubt. Die Fusion mit GFP hat keinen Einfluß auf die STAT5a-vermittelte Transaktivierung des β -Kasein-Reporters (Philipp Schild, Diplomarbeit). 293T-Zellen wurden mit diesem Konstrukt bzw. mit GFP und mit NCoA-1 sowie dem Prolaktinrezeptor transfiziert, mit Prolaktin stimuliert und lysiert (Abb. 3-3A). Mithilfe des Anti-GFP-Antiserums wurden die GFP-Proteine präzipitiert und die Anwesenheit von kopräzipitiertem NCoA-1 im Western-Blot überprüft. Als Kontrolle wurde 1% der Zelllysate parallel analysiert (Abb. 3-3A, Spuren 1, 3, 5, 7). GFP-STAT5a, das in einer großen Menge aus dem Zelllysate präzipitiert wurde (Spur 8), bildete einen Komplex mit NCoA-1 (Spur 4). NCoA-1 war in dem Kontrollansatz mit GFP in einer vergleichbaren Menge vorhanden (vgl. Spuren 1 und 3). Es wurde jedoch nicht durch das Anti-GFP-Antiserum unspezifisch präzipitiert (Spur 2).

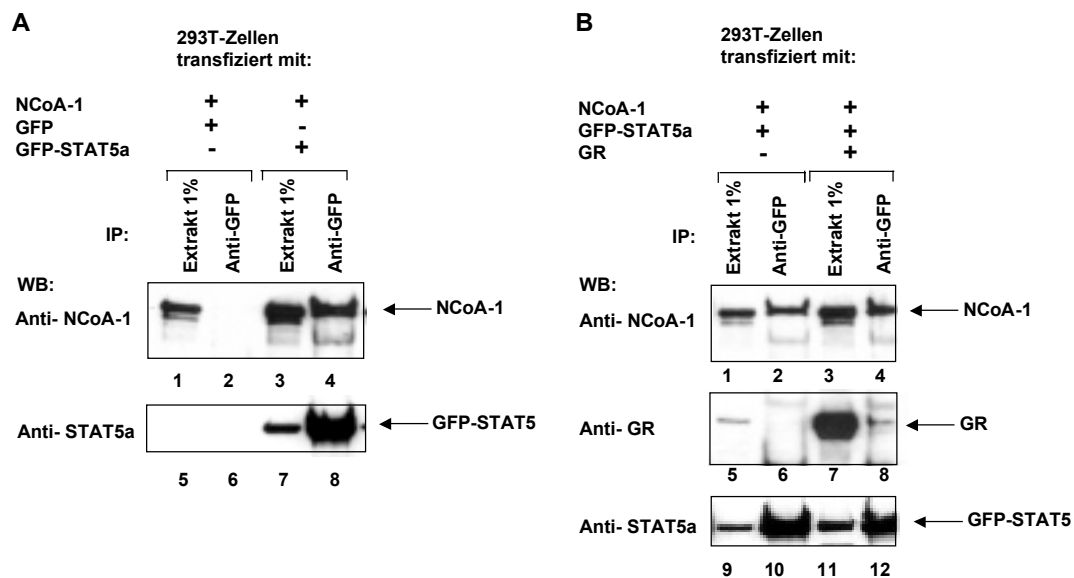


Abb. 3-3 Koimmunpräzipitation von STAT5 und NCoA-1,

A und B: 293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für GFP bzw. GFP-STAT5a (3 μ g), dem Prolaktinrezeptor (0.5 μ g), NCoA-1 (4 μ g) (in B zusätzlich mit GR (3 μ g)) transfiziert. Die Zellen wurden mit Prolaktin (und in B zusätzlich mit Dexamethason) induziert und einer Immunpräzipitation mit Anti-GFP-Antiserum unterzogen. Die präzipitierten Proteine wurden über Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

Das gebundene NCoA-1 scheint im SDS-Gel ein wenig höher zu migrieren (vgl. Spur 3 und 4). Dies könnte darauf hindeuten, daß bevorzugt eine modifizierte, z. B. phosphorylierte Form von NCoA-1 mit STAT5 interagiert. In verschiedenen Studien wurde diskutiert, daß der Synergismus des Glukokortikoid-Rezeptors und STAT5 (Stocklin et al., 1996) möglicherweise in einer gemeinschaftlichen Rekrutierung eines Koaktivators begründet sein könnte. Um zu prüfen, ob der Glukokortikoidrezeptor die Interaktion von STAT5 mit NCoA-1 verstärkt, wurde der Effekt der Kotransfektion des Glukokortikoidrezeptors auf die Koimmunpräzipitation von STAT5 und NCoA-1 analysiert. 293T-Zellen wurden mit GFP-STAT5 und NCoA-1 zusammen mit dem Glukokortikoidrezeptor bzw. einem Kontrollvektor transfiziert. Die Zellen wurden mit Dexamethason und Prolaktin stimuliert und lysiert. STAT5 wurde mit GFP-Antiserum aus den Zelllysaten präzipitiert (Abb. 3-3B, Spur 10, 12). Die Proteine im Präzipitat wurden mit Western-Blot analysiert. NCoA-1 wurde von STAT5 gebunden (Abb. 3-3B, Spur 2, 4) und wie schon vorher beobachtet, migrierte das gebundene Protein etwas höher als das Protein aus dem Zelllysat (vgl. Spur 1 und 2). Auch der Glukokortikoidrezeptor konnte im Präzipitat von STAT5 detektiert werden (Spur 8), wenn der entsprechende Expressionsvektor kotransfiziert wurde. Die Überexpression des Glukokortikoidrezeptors hatte aber keinen signifikanten Effekt auf die Menge von gebundenem NCoA-1 (vgl. Spur 2 und 4). Somit scheint NCoA-1 nicht in den Synergismus von STAT5 und dem Glukokortikoidrezeptor involviert zu sein.

3.1.4 Bedeutung der verschiedenen funktionellen Domänen von NCoA-1 bei der STAT5-vermittelten Transaktivierung

NCoA-1 besitzt verschiedene strukturelle und funktionelle Domänen (Abb. 3-4A). Es sollte untersucht werden, welche dieser Domänen notwendig für die Koaktivator-Funktion bei der STAT5-vermittelten Genexpression sind. Hierfür wurden Deletionskonstrukte von NCoA-1 zum Einsatz gebracht, in denen die verschiedenen funktionellen Domänen deletiert wurden.

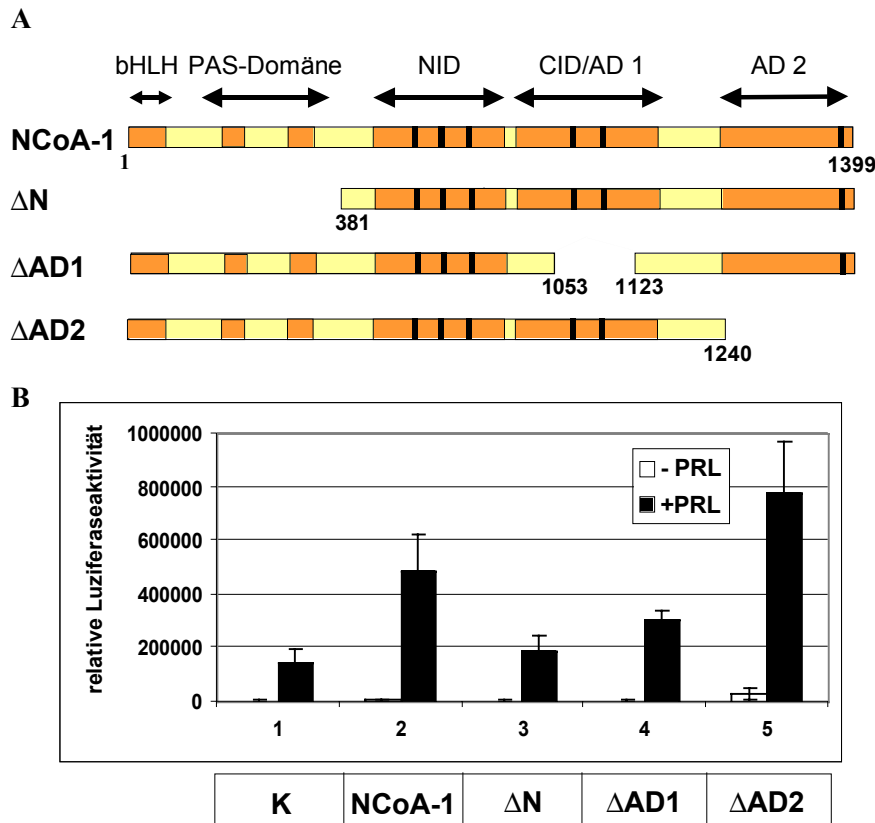


Abb. 3-4 Sowohl die aminoternale Region als auch die AD1-Domäne von NCoA-1 sind notwendig für die Koaktivierung von STAT5

A) Schematische Abbildung der Struktur von NCoA-1 sowie verschiedener Deletionskonstrukte.

B) HeLa-Zellen wurden in Doppelansätzen mit dem β -Kasein-Luziferase-Reporter (1.25 μ g), den Expressionsvektoren für STAT5a (12.5 ng), Prolaktin-Rezeptor (12.5 ng), SV40-LacZ-Vektor (12.5 ng) und verschiedenen NCoA-1-Konstrukten bzw. dem Kontrollvektor K (200 ng) wie angegeben transfiziert. Eine Hälfte der Ansätze wurde wie angegeben mit Prolaktin behandelt.

Konstrukte, in denen die aminoternale PAS-Domäne, die p300/CBP-Interaktionsdomäne Domäne AD1 sowie die carboxyterminal gelegene zweite Transaktivierungsdomäne AD2 fehlt (freundlicherweise von Malcom Parker zur Verfügung gestellt, Übersicht in Abb. 3-4A), wurden eingesetzt. Diese Deletionskonstrukte wurden in Reporterexperimenten auf ihre Fähigkeit, als Koaktivator von STAT5a zu wirken, analysiert. HeLa-Zellen wurden neben diesen NCoA-1-Konstrukten mit STAT5a und dem Reporter kotransfiziert, mit Prolaktin induziert und lysiert (Abb. 3-4B). Wenn die Kontroll-Zellen ohne exogenes NCoA-1 mit Prolaktin stimuliert wurden, wurde wie erwartet eine starke Erhöhung der Luziferaseaktivität in den Zelllysaten beobachtet (Abb. 3-4B, Ansatz 1).

Eine Kotransfektion mit Volllängen-NCoA-1 führte, wie schon in Abb. 3-1 dokumentiert, zu einer mehr als 3-fachen Steigerung der Luziferaseexpression (Ansatz 2). Die NCoA-1-Varianten, bei denen die PAS oder die AD1-Domäne deletiert sind, wiesen eine stark beeinträchtigte Koaktivatorfunktion auf. Die Luziferaseaktivität in diesen Ansätzen (Δ N Ansatz 3 und Δ AD1 Ansatz 4) war wesentlich niedriger als die des Ansatzes 2 mit Volllängen-NCoA-1. Die Kotransfektion von dem Deletionskonstrukt Δ AD2 führte zu einer starken Stimulation der STAT5-vermittelten Transaktivierung, die sogar noch über den Effekt des Volllängen-NCoA-1 hinausging (Ansatz 5). Auch die Basalaktivität in Abwesenheit von Prolaktin wurde signifikant erhöht. Dieses Ergebnis zeigt, daß die aminoternale Domäne und die AD1-Domäne von NCoA-1 wichtig für die Koaktivator-Funktion sind. Die AD2-Domäne wird bei der Koaktivierung von STAT5 nicht benötigt und scheint eine eher inhibitorische Wirkung auf die Koaktivator-Funktion von NCoA-1 zu haben.

Um die Bedeutung der einzelnen funktionellen Domänen von NCoA-1 für STAT5 zu untermauern, wurde ein zweiter experimenteller Ansatz gewählt. Es wurde untersucht, welchen Effekt die Überexpression der isolierten Domänen auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung hat. Wenn die isolierten Domänen in der Zelle im Überschuß vorhanden sind, konkurrieren sie mit dem endogenen NCoA-1 um seine Bindungspartner und blockieren Interaktionen. Daher könnte die Überexpression einer essentiellen Domäne zu einer Hemmung der Transaktivierung von STAT5 führen (s. Abb. 3-5A).

Die isolierten Domänen wurden als Fusion mit einem Hexa-Myc-Anhang exprimiert (s. Abb. 3-5B), um eine Abschätzung der Proteinmengen in Zellextrakten zu ermöglichen. HeLa-Zellen wurden mit diesen Konstrukten und STAT5a, dem Prolaktin-Rezeptor zusammen mit dem β -Kasein-Reporterkonstrukt in Doppelansätzen transfiziert und eine Hälfte der Ansätze mit Prolaktin behandelt. Im Ansatz ohne NCoA-1, der mit Prolaktin induziert wurde, wurde wiederum eine hohe Luziferase-Aktivität gemessen (Abb. 3-5C, Ansatz 1).

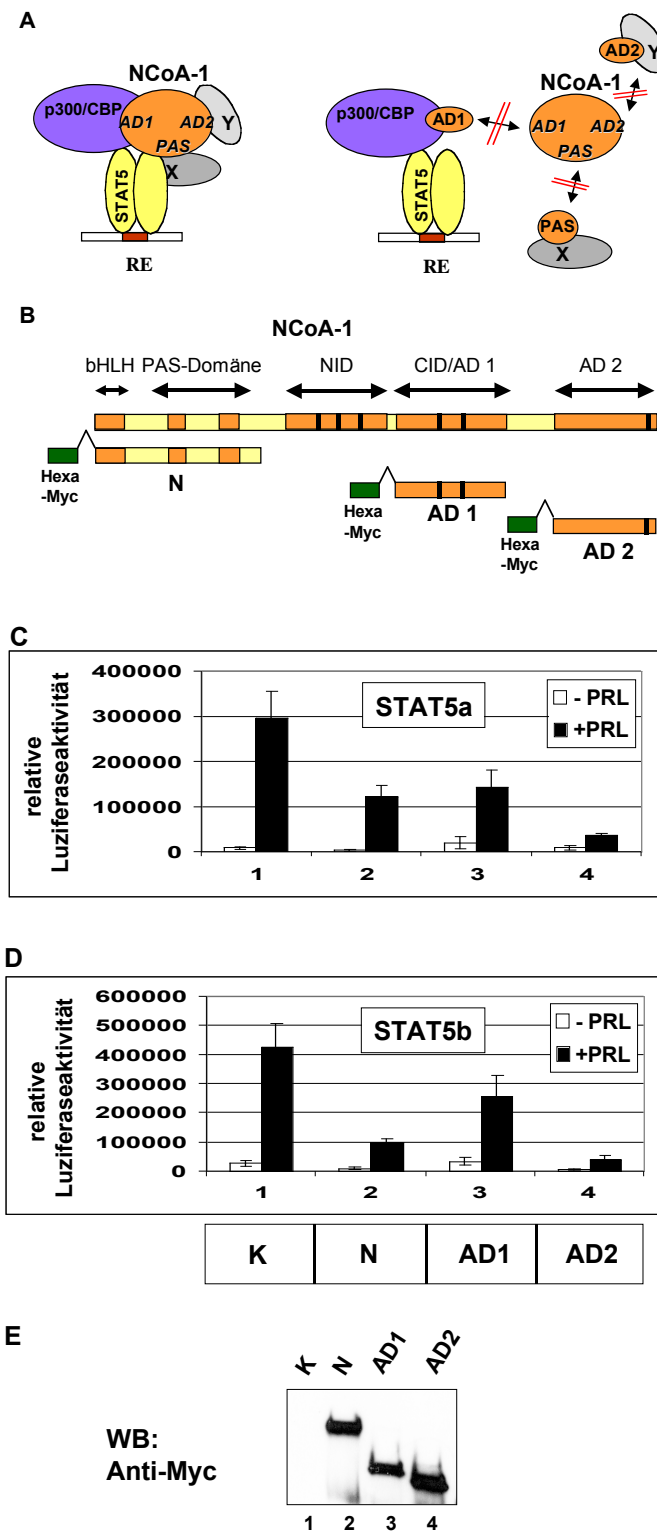


Abb. 3-5 Überexpression der verschiedenen funktionellen Domänen von NCoA-1

A) Modell des Effekts von isolierten Domänen von NCoA-1 auf den Koaktivator-STAT5-Komplex. Die isolierten Domänen PAS, AD1 und AD2 binden an die NCoA-1-Bindungspartner und verhindern deren Interaktion mit dem endogenen NCoA-1. Die Domänen im Volllängen-NCoA-1 sind in kursiv eingezeichnet. X, Y repräsentieren unbekannte Interaktionspartner.

B) Schematische Abbildung der Struktur von NCoA-1 sowie der Hexa-Myc-Fusions-Konstrukte N, AD1, AD2.

C und D) HeLa-Zellen wurden in Doppelansätzen mit dem β -Kasein-Luziferase-Reporter (1.25 μ g), den Expressionsvektoren für STAT5a bzw. STAT5b (12.5 ng), dem Prolaktin-Rezeptor (12.5 ng) und SV40-LacZ-Vektor (12.5 ng) transfiziert. Wie angegeben, wurden die aminoterminalen Domäne (N), die AD1- und AD2-Domäne von NCoA-1 bzw. der Kontrollvektor K kotransfiziert (200 ng). Die Hälfte der Ansätze wurde mit Prolaktin induziert.

E) Ein Aliquot der Zellextrakte von C) wurde über SDS-PAGE und Western-Blot mit einem Anti-Myc-Antikörper analysiert, um die Expression der NCoA-1-Domänen zu überprüfen.

Die Überexpression der aminoterminalen Domäne von AS 1-571 (N), die die bHLH, die PAS- sowie teilweise die S/T-reiche Domäne einschließt, reduzierte die Luziferase-Aktivität um 50%, verglichen mit der Vektor-Kontrolle. Der gleiche Effekt wurde bei Überexpression der AD1-Domäne, welche die Interaktion mit p300/CBP vermittelt, erzielt (Ansatz 3).

Interessanterweise bewirkte aber auch die Überexpression der AD2-Domäne, welche sich von AS 1208-1442 erstreckt, eine sehr starke Reduktion der Luziferaseaktivität (Ansatz 4) verglichen mit der Vektorkontrolle (Ansatz 1). Um die Menge der Domänen in den Extrakten zu überprüfen, wurde ein Western-Blot-Experiment mit einem Anti-Myc-Antikörper durchgeführt (Abb. 3-5E). Die drei Domänen sind in vergleichbaren Mengen vorhanden, so daß die unterschiedlichen Effekte nicht auf Unterschiede in der Expressionsstärke zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die aminoterminal Domäne und die AD1-Domäne eine wichtige Rolle bei der STAT5a-vermittelten Transaktivierung spielen. Die AD2-Domäne, die im Vollängenkonstrukt für die Koaktivierung von STAT5a nicht notwendig ist, wirkt trotzdem als isolierte Domäne inhibitorisch auf die STAT5a-vermittelte Transaktivierung.

Die Untersuchung der STAT5b-vermittelten Transaktivierung ergab ein ähnliches Bild: Die Überexpression der aminoterminalen und der AD1-Domäne hatte auch auf STAT5b einen inhibitorischen Effekt, das Transaktivierungspotential reduzierte sich auf ein Viertel bzw. 50% des Wertes der Vektorkontrolle (Abb. 3-5D, Ansätze 2 und 3). Die AD2-Domäne hatte auch auf die STAT5b-vermittelte Transaktivierung einen stark inhibitorischen Effekt (Ansatz 4). Interessanterweise wurde aber auch der Basalwert von Ansatz 4 stark reduziert.

Diese Experimente bestätigen, das sowohl die aminoterminal als auch die AD1-Domäne eine wichtige Funktion bei der Koaktivierung von STAT5-Proteinen hat. Die AD1-Domäne vermittelt die Interaktion von NCoA-1 mit p300/CBP. Vermutlich benötigt STAT5 für die maximale transkriptionelle Aktivität einen Koaktivator-Komplex aus p300/CBP und NCoA-1. Die Funktion der aminoterminalen Domäne von NCoA-1 könnte in der Rekrutierung von weiteren Effektorproteinen oder in der Vermittlung der Interaktion liegen.

Die AD2-Domäne ist für eine Stimulation der STAT5-vermittelten Transaktivierung nicht erforderlich. Auf der anderen Seite hat die Überexpression dieser Domäne einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung.

3.1.5 Effekt der Überexpression von isolierten AD2-Domänen der p160/SRC-Koaktivatoren auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung

Die carboxyterminale Region der p160-Koaktivatoren besitzt eine schwache HAT-Aktivität und vermittelt die Bindung an weitere Effektorproteine, z. B. Methyltransferasen. Um herauszufinden, welche Funktion der AD2-Domäne für den inhibitorischen Effekt auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung verantwortlich ist, wurden verschiedene carboxyterminale Konstrukte bezüglich ihres inhibitorischen Potentials verglichen:

Das eben verwendete Konstrukt (AS 1208-1442, aus Ratte) und das aminoterminal weiter verkürzte Konstrukt (AS 1258-1442, aus Ratte) bzw. das entsprechende Maus-Konstrukt (AS 1251-1405). Bei den letzten beiden Konstrukten ist die HAT-Domäne (AS 1107-1216, (Spencer et al., 1997)) deletiert. Jedes dieser Konstrukte zeigte den gleichen inhibitorischen Effekt wie das in Abb. 3-5 gezeigte AD2 Konstrukt (Daten nicht gezeigt). Somit scheint der inhibitorische Effekt unabhängig von der HAT-Funktion der AD2-Domäne zu sein.

Um zu untersuchen, ob der inhibitorische Effekt der AD2-Domäne von NCoA-1 auf einer spezifischen Eigenschaft von NCoA-1 beruht oder ob hier ein Merkmal aller p160/SRC-Koaktivatoren vorliegt, wurden die entsprechenden AD2-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 getestet. Mithilfe des Programms DNA-Star (Clustal-Methode) wurden die der kürzesten, hemmend wirkenden Region (Maus NCoA-1, AS 1251-1405) entsprechenden AD2-Sequenzen von NCoA-2 und NCoA-3 bestimmt. Ein Sequenzvergleich zeigt, daß die Sequenzen zueinander um ca. 30% homolog sind (Daten nicht gezeigt). In der kürzeren NCoA-3-Sequenz sind zwei Abschnitte mit einer Länge von 15 und 36 AS nicht vertreten. Die Sequenz der verschiedenen AD2-Domänen wurde mit einer Hexa-Myc-Sequenz fusioniert (s. Abb. 3-6A). In einem Reportergenexperiment mit STAT5a und STAT5b wurde untersucht, welchen Effekt diese AD2-Konstrukte der NCoA-1-Verwandten auf die Transaktivierung des β -Kasein-Reporters haben (Abb. 3-6B).

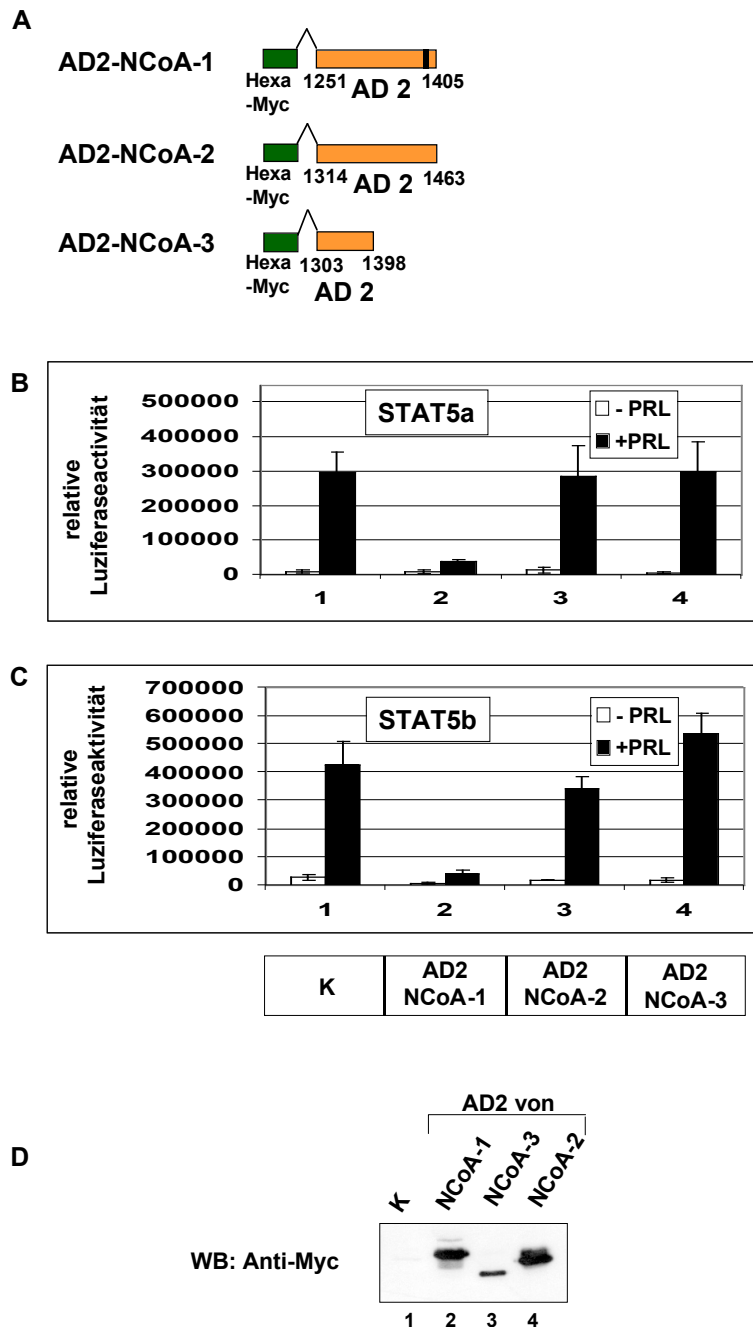


Abb. 3-6A Die AD2-Domäne von NCoA-1, nicht von NCoA-2 oder -3 inhibiert die STAT5-vermittelte Transaktivierung

A) Schematische Darstellung der Hexa-Myc-Fusions-Konstrukte mit den AD2-Domänen von NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3.

C und D) HeLa-Zellen wurden in Doppelansätzen mit dem β -Kasein-Luziferase-Reporter (1.25 μ g), dem Prolaktin-Rezeptor (12.5 ng), den Expressionsvektoren für STAT5a bzw. STAT5b (12.5 ng) und dem SV40-LacZ-Vektor (12.5 ng) transfiziert. Die AD2-Domänen von NCoA-1, NCoA-2 und NCoA-3 bzw. der Kontrollvektor K wurde kotransfiziert (200 ng). Die Hälfte der Ansätze wurde mit Prolaktin induziert.

D) Um die Proteinmenge der AD2-Domänen zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Zellextrakte von B) über SDS-PAGE und Western-Blot mit einem Anti-Myc-Antikörper analysiert.

Wie schon vorher beobachtet, führte die Überexpression der NCoA-1-AD2-Domäne zu einer starken Reduktion der Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Vektorkontrolle. Dies wurde sowohl für STAT5a als auch für STAT5b beobachtet (Abb. 3-6B und C). Dagegen zeigten die AD-2 Domänen der beiden anderen Familienmitgliedern keinen Effekt, auch wenn geringe Schwankungen beobachtet wurden (Abb. 3-6B und C, Ansätze 3, 4).

Um abzusichern, daß die verwendeten Konstrukte gleich stark exprimiert wurden, wurden die Zellysate im Western-Blot analysiert (Abb. 3-6D). Für die AD2-Domäne von NCoA-3 wurde eine geringere Proteinexpression beobachtet (Spur 3). Diese Experimente bestätigen, daß die AD2-Domäne von NCoA-1 einen stark inhibitorischen Effekt auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung ausübt, wenn im Überschuß vorhanden. Die homologen Domänen von NCoA-2 bzw. NCoA-3 zeigen diesen Effekt nicht, allerdings war die AD2-Domäne von NCoA-3 auch in geringeren Mengen vorhanden.

3.2 Untersuchung der Beteiligung der p160/SRC-Koaktivatorfamilie bei der Koaktivierung von STAT6

3.2.1 Bedeutung der p160/SRC-1-Koaktivator-Familie für die STAT6-vermittelte Transaktivierung

STAT6 gehört ebenfalls zur STAT-Familie und ist STAT5 am ähnlichsten. Allerdings ist die Transaktivierungsdomäne wesentlich länger und hat ein stärkeres Potential. STAT6 benötigt für seine Transaktivierungsfunktion den Koaktivator p300/CBP (Gingras et al., 1999). STAT6 bindet an den carboxyterminalen Bereich von CBP, der die Interaktion mit Proteinen der p160/SRC-Familie vermittelt, mit denen p300/CBP einen hochmolekularen Koaktivatorkomplex bildet. Um eine Beteiligung der mit p300/CBP assoziierten Koaktivatoren der p160/SRC-1-Familie an der STAT6-vermittelten Transaktivierung zu untersuchen, wurden Reporter-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde ein Luziferase-Reporter-Konstrukt verwendet, das 3 multimerisierte STAT6-Bindestellen aus dem GL ϵ Promotor der C_H-Gene enthält (Abb. 3-7). HepG2-Zellen, die sich durch IL-4-Zugabe stimulieren lassen, wurden mit dem Luziferase-Reporter und Expressionsvektoren für STAT6 und die verschiedenen Koaktivatoren in Doppelansätzen transfiziert. Nach der Transfektion wurde eine Hälfte der Ansätze mit IL-4 behandelt. Die Induktion mit IL-4 führte zu einer 6-fachen Steigerung der basalen Reporter-Gen-Aktivität (Abb. 3-7A).

Dieser Induktionsfaktor erhöhte sich auf 20, wenn NCoA-1 kotransfiziert wurde. Dagegen zeigte die Kotransfektion von NCoA-2 und NCoA-3 keinen Effekt auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung des Reportergens. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß NCoA-1 ein Koaktivator von STAT6 ist, während hingegen die anderen Familienmitglieder NCoA-2, beziehungsweise NCoA-3, keine Bedeutung bei der STAT6-vermittelten Transaktivierung haben. STAT6 scheint also wie schon bei STAT5a und STAT5b gefunden, präferenziell durch NCoA-1 und nicht durch die anderen Vertreter der Familie koaktiviert zu werden.

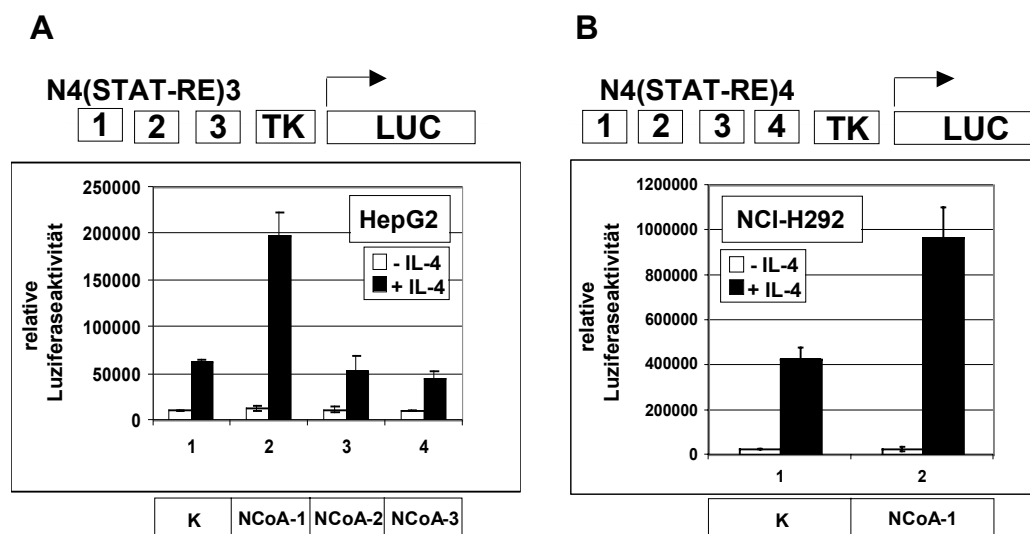


Abb. 3-7 NCoA-1, jedoch nicht NCoA-2 und NCoA-3, erhöht die IL-4-induzierte STAT6-vermittelte Transaktivierung

A) Darstellung des N4(STAT-RE)3-LUC Reporterplasmids.

HepG2-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid (2µg), Expressionsvektoren für STAT6 (25 ng), NCoA-1, NCoA-2, NCoA-3 bzw. mit dem leeren Expressionsvektor K (200 ng) zusammen mit einem SV40-LacZ Expressionsplasmid (25 ng) in Doppelansätzen wie angegeben transfiziert.

B) Darstellung des Reporterplasmids N4 (STAT-RE)4-LUC.

NCI-H292-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid (0.5 µg), SV40-LacZ (100 ng) sowie 100 ng NCoA-1 Expressionsvektor bzw. Kontrollvektor K in Doppelansätzen transfiziert.

A und B) Eine Hälfte der Ansätze wurde wie angegeben mit IL-4 induziert.

Um auszuschließen, daß es sich hierbei um einen Zelltyp-spezifischen Effekt handelt, wurde dieses Experiment in einer anderen Zelllinie wiederholt, die sich aus dem Lungenepithel ableitet, in dem STAT6 eine physiologische Rolle hat. Hierfür wurde ein Reporterkonstrukt mit 4 STAT6-Bindungs-elementen verwendet. NCI-H292-Zellen wurden mit dem Reporter und dem NCoA-1-Expressionsvektor bzw. dem Kontrollvektor in Doppelansätzen transfiziert und eine Hälfte der Ansätze mit IL-4 behandelt.

Endogenes STAT6 induzierte eine 15-fache Erhöhung der Luziferaseaktivität verglichen mit dem Ansatz ohne Zytokinzugabe (Abb. 3-7B, Ansatz 1). Eine Kotransfektion von NCoA-1 resultierte in einer 2.5-fachen Steigerung dieser Induktion.

Die Beobachtung in den HepG2-Zellen, daß NCoA-1 als Koaktivator von STAT6 agiert, konnte also auch in einem zweiten Zelltyp bestätigt werden, sodaß ein Zelltyp-spezifischer Effekt ausgeschlossen werden kann.

3.2.2 Interaktion von STAT6 und p160/SRC-1-Koaktivatoren *in vitro*

Da die Transfektionsexperimente vermuten lassen, daß STAT6 spezifisch NCoA-1, nicht aber die anderen Mitglieder der p160/SRC-Familie rekrutiert, wurde als nächstes untersucht, ob STAT6 und NCoA-1 direkt miteinander interagieren können. Diese Fragestellung wurde mithilfe von GST-Pulldown-Experimenten behandelt. Hierfür wurden GST und ein GST-STAT6-Fusionsprotein, das die transaktivierende Domäne von STAT6 umfaßt, in Bakterien exprimiert, an Glutathion-Sepharose gebunden und gereinigt. Diese immobilisierten GST-Fusionsproteine wurden auf Bindung von radioaktiv markierten, *in vitro* synthetisierten Koaktivatorproteinen getestet (Abb. 3-8).

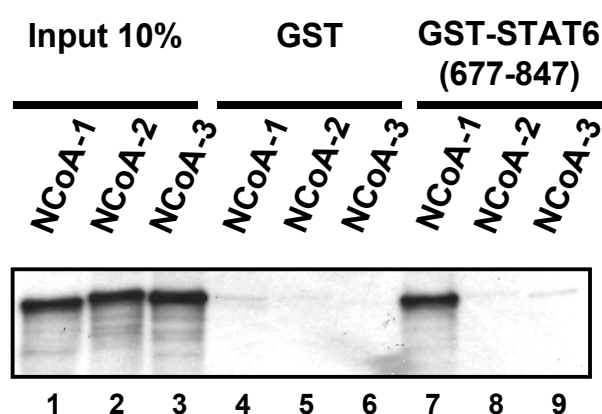


Abb. 3-8 Die Transaktivierungsdomäne von STAT6 interagiert spezifisch mit NCoA-1 *in vitro*

Bakterielles GST oder ein GST-Fusionsprotein mit der Transaktivierungsdomäne von STAT6 wurden mit radioaktiv markiertem NCoA-1, NCoA-2 bzw. NCoA-3 inkubiert. Die Ansätze wurden über SDS-PAGE analysiert (Spuren 4-9). Als Kontrolle wurde ein Aliquot, was 10% des Retikulozytenlysat entspricht, mit aufgetragen (Spuren 1-3).

NCoA-1 zeigte eine starke Bindung an GST-STAT6 (Abb. 3-8, Spur 7), nicht aber an GST alleine (Spur 4).

Dagegen wurde keine spezifische Interaktion zwischen NCoA-2 (Spur 8), bzw. NCoA-3 (Spur 9) und GST-STAT6-TAD detektiert.

Diese Daten bestätigen die besondere Funktion von NCoA-1 gegenüber den anderen p160/SRC-Familienmitgliedern bei der STAT6-vermittelten Transaktivierung. NCoA-1, nicht aber die anderen p160-Koaktivatoren, interagiert mit STAT6 und hat eine Funktion als Koaktivator.

3.2.3 Untersuchung der Wirkung von NCoA-1 auf die STAT6-Transaktivierungsdomäne in Fusion mit einer heterologen DNA-Bindungsdomäne

Die transaktivierende Domäne von STAT6 hat einen modulären Aufbau. Sie besitzt autonome Elemente, die Transaktivierungsfunktion besitzen, wenn sie an die heterologe GAL4-DNA-bindene Domäne fusioniert werden (Lu et al., 1997; Moriggl et al., 1997; Goenka et al., 1999). Im folgenden wurde untersucht, welcher Teil der STAT6-Transaktivierungsdomäne NCoA-1 rekrutiert und ob in einem solchen heterologen System eine Koaktivatorfunktion für die Transaktivierungsdomäne gefunden werden kann. Ein aminoterminaler Abschnitt (AS 677-791) und der übrige carboxyterminale Abschnitt (AS 792-847) wurden als Fusion mit GAL4-DBD (s. Abb. 3-9) in Reportergenexperimenten getestet. Diese GAL4-Konstrukte und ein Luziferase-Reporter, der 3 GAL4-Bindungs-Elemente in der Promotorregion enthält, wurden in HepG2-Zellen transfiziert. Es wurde untersucht, ob das Transaktivierungspotential dieser Fusionskonstrukte durch Kotransfektion von NCoA-1 erhöht wird. Die isolierte GAL4-DBD besaß ein sehr geringes Transaktivierungspotential (Abb. 3-9A, Ansatz 1), was auch bei Kotransfektion von NCoA-1 unverändert blieb (Ansatz 2). Die Transfektion von GAL4-STAT6 (677-791) führte zu einer starken Luziferaseexpression (Ansatz 3). Die Kotransfektion von NCoA-1 führte zu einer leichten Steigerung derselben (Ansatz 4). GAL4-STAT6 (792-847) induzierte nur eine sehr schwache Luziferaseexpression (Ansatz 5), was darauf hinweist, daß diese Domäne im GAL4-Kontext nur ein geringes Transaktivierungspotential besitzt.

Überraschenderweise führte aber die Kotransfektion von NCoA-1 zu einer starken Erhöhung der Transaktivierungsfunktion dieses carboxyterminalen Abschnitts der STAT6-Transaktivierungsdomäne (Ansatz 6). Es wurde nahezu der Wert der aminoterminalen Domäne erreicht. Um zu überprüfen, ob dieser starke Effekt von NCoA-1 auf die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne Zelltyp-spezifisch ist, wurde dieses Experiment in der Vorläufer-B-Zelllinie Ba/F3-IL-4-R wiederholt (Abb. 3-9C). Wiederum zeigte GAL4-DBD alleine eine schwache Luziferase-Expression (Ansatz 1), ebenso bei Kotransfektion von NCoA-1 (Ansatz 2). GAL4-STAT6 (677-791) führte zu einer starken Induktion der Luziferaseexpression (Ansatz 3), aber im Gegensatz zu den Ergebnissen in den HepG2-Zellen konnte diese Induktion nicht durch Kotransfektion von NCoA-1 potenziert werden (Ansatz 4).

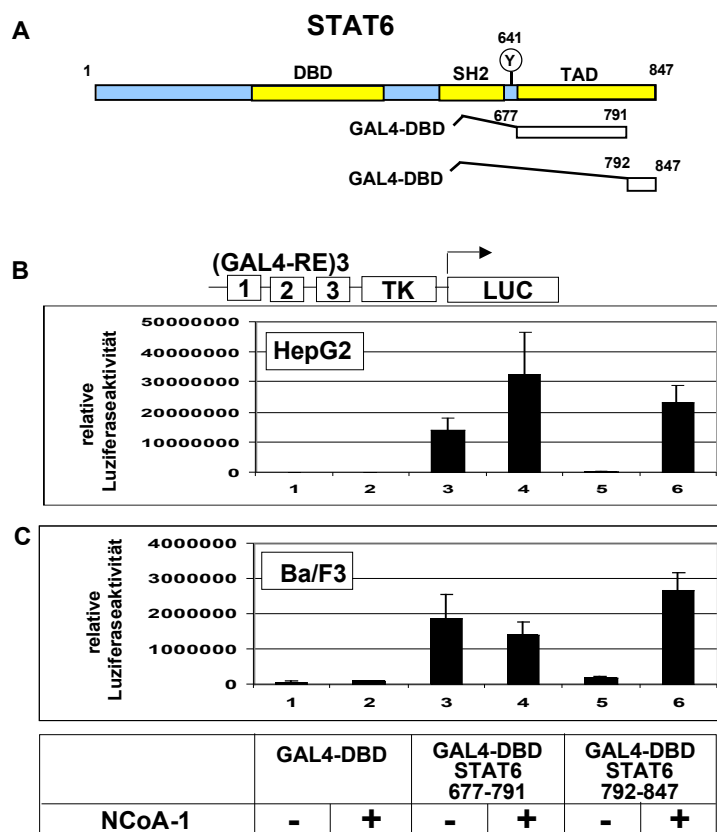


Abb. 3-9 Das Transaktivierungspotential der äußersten C-terminalen Region der STAT6-Transaktivierungsdomäne wird durch NCoA-1 dramatisch gesteigert

A) Darstellung der Struktur des humanen STAT6 und der GAL4-Fusionsproteine.

B) Die Reporterplasmide (GAL4-RE)3TK LUC (2 µg) und SV40-LacZ (25 ng), Expressionsvektoren für GAL4-DBD-Fusionsproteine (50 ng), für NCoA-1 bzw. Kontrollvektor (400 ng) wurden in HepG2-Zellen transfiziert.

C) Ba/F3-IL-4-R-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden (GAL4-RE)3TK LUC (5 µg) und SV40-LacZ (1 µg), sowie Expressionsvektoren für GAL4-DBD-Fusionsproteine (50 ng), für NCoA-1 bzw. den Kontrollvektor (500 ng) transfiziert.

GAL4-STAT6 (792-847) hatte auch in diesen Zellen eine schwache Transaktivierungsaktivität *per se* (Ansatz 5), bei Kotransfektion von NCoA-1 wurde eine drastische Steigerung der Luziferaseexpression beobachtet (Ansatz 6).

Diese Ergebnisse bestätigen, daß NCoA-1 in einem heterologen System als Koaktivator der STAT6-Transaktivierungsdomäne wirken kann. Da der carboxyterminale Abschnitt der Transaktivierungsdomäne ein sehr schwaches autonomes Potential aufweist, aber durch NCoA-1 effektiv koaktiviert wird, wird vermutet, daß NCoA-1 zu eben dieser Domäne rekrutiert wird. NCoA-1 stimuliert aber in geringerem Ausmaße auch die transkriptionelle Aktivität des aminoterminalen Teils der Transaktivierungsdomäne in HepG2-Zellen.

Diese stimulatorische Wirkung könnte eventuell über die Rekrutierung von anderen Koaktivatoren zustande kommen, die mit NCoA-1 einen Komplex bilden.

3.2.4 Vergleich des Transaktivierungspotentials von Vollängen-STAT6 und einer Deletionsmutante

Um die Funktion des carboxyterminalen Abschnitts in der transaktivierenden Domäne von STAT6 zu prüfen, wurde die Aktivität von Vollängen-STAT6 und einer Deletionsmutante verglichen, bei der eben diese Domäne deletiert wurde. Hierzu wurden Reporterexperimente mit dem oben beschriebenen STAT6-abhängigen Reporterkonstrukt durchgeführt. Ba/F3-IL-4R-Zellen wurden mit den STAT6-Expressionsvektoren sowie dem STAT6-Reporterplasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurde der Ansatz geteilt und eine Hälfte der Zellen mit IL-4 induziert. Wie erwartet, führte die IL-4-Behandlung in Zellen, die mit Vollängen-STAT6 transfiziert worden waren, zu einer starken Induktion der Luziferaseexpression (Abb. 3-10, Ansatz 1). Bei Transfektion der Deletionsmutante wurde signifikant weniger Luziferaseaktivität gemessen (Ansatz 2). Nur etwa 40% der Aktivität des Vollängenproteins wurde durch die Mutante erreicht. Dieses Experiment beweist, daß die carboxyterminale Domäne von STAT6 ca. 60% der transkriptionellen Aktivität von STAT6 trägt, auch wenn sie nur ein geringes Transaktivierungspotential als GAL4-Fusion hat.

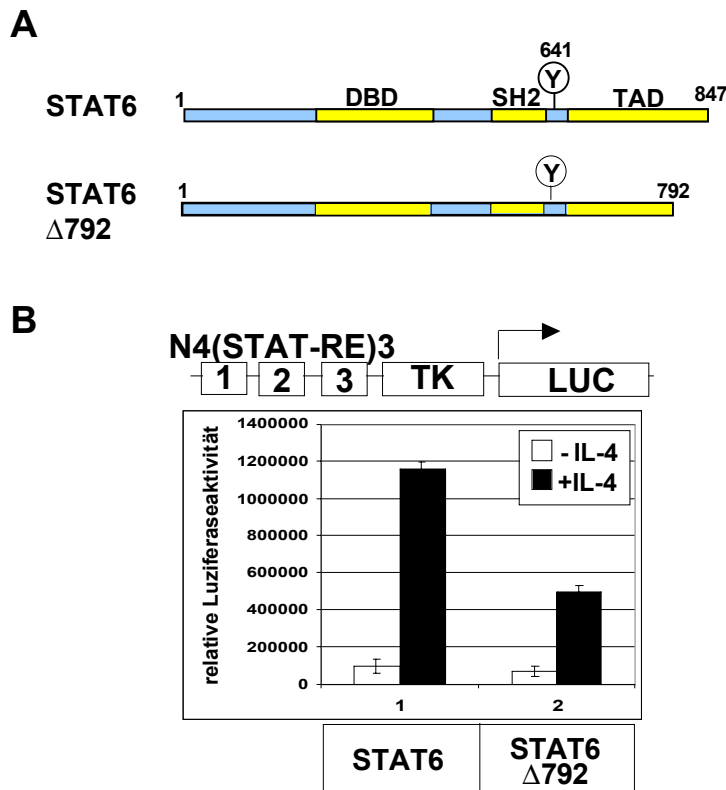


Abb. 3-10 Die äußerste carboxyterminale Region der STAT6-Transaktivierungsdomäne trägt wesentlich zum Transaktivierungspotential von STAT6 bei

A) Schematische Darstellung von Vollängen-STAT6 und einer STAT6-Deletionsmutante.
 B) Ba/F3-IL-4-R-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid N4(STAT-RE)3 LUC (5 μ g), SV40-*LacZ* (1 μ g) sowie Expressionsvektoren für Vollängen-STAT6 bzw. eine verkürzte Variante (200 ng) in Doppelansätzen transfiziert. Die Hälfte der Ansätze wurde wie angegeben mit IL-4 stimuliert.

3.2.5 Koimmunpräzitationsexperimente mit NCoA-1 und STAT6

Die bisherigen Experimente geben einen Hinweis darauf, daß NCoA-1 über die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne von STAT6 rekrutiert wird. Um eine potenzielle Interaktion zwischen NCoA-1 und diesem Abschnitt von STAT6 in Zellen zu untersuchen, wurden Koimmunpräzitations-Experimente durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Vollängen-STAT6 oder für eine Deletionsmutante, der der carboxyterminale Abschnitt fehlt, transfiziert und mit IL-4 stimuliert. Es wurden Gesamtzellextrakte präpariert und Immunpräzitationen mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt (Abb. 3-11). Alle Ansätze wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen NCoA-1 und STAT6 analysiert. Ein Aliquot des Zellextraktes, was 1% des für die Präzipation eingesetzten Materials entspricht, wurde parallel analysiert (Spuren 1, 5, 9 und 11). Die präzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE und Western-Blot mit Anti-NCoA-1 bzw. Anti-STAT6-Antikörpern analysiert.

Mit dem Anti-NCoA-1-Antikörper (Abb. 3-11, Spur 3 und 7), nicht aber mit dem unspezifischen Antikörper (Spur 4 und 8) wurde eine große Menge NCoA-1 präzipitiert. Ungefähr die gleiche Menge NCoA-1 wurde mit dem STAT6-spezifischen Antikörper kopräzipitiert, sofern die Zellen mit Vollängen-STAT6 transfiziert worden waren (Spur 2).

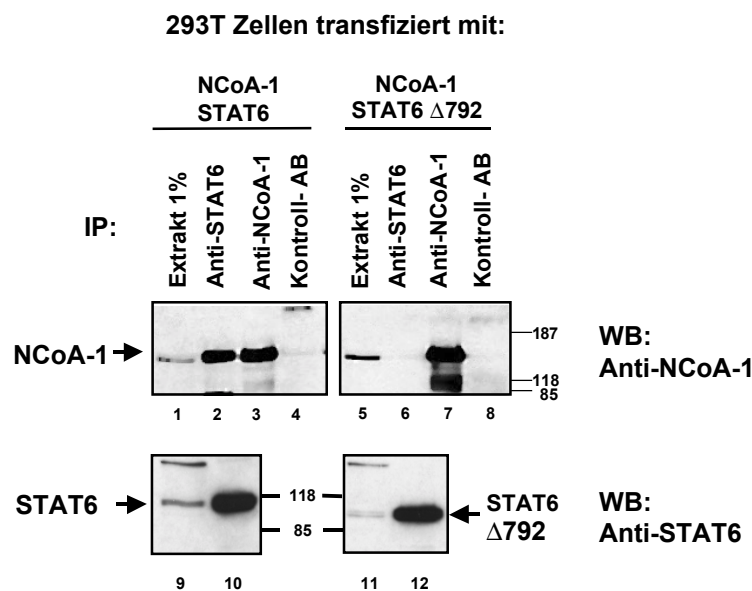


Abb. 3-11 STAT6 und NCoA-1 bilden einen Komplex in Zellen

293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Vollängen-STAT6 bzw. eine verkürzte Variante zusammen mit einem NCoA-1-Expressionsvektor transfiziert und mit IL-4 stimuliert. Es wurden Gesamtzellextrakte präpariert und Immunpräzipitationen mit einem Anti-STAT6-Antikörper, Anti-NCoA-1-Antikörper bzw. einem Kontrollantikörper durchgeführt.

Wenn die Zellen jedoch die verkürzte STAT6-Variante exprimierten, konnte NCoA-1 nicht im Präzipitat des Anti-STAT6-Antikörpers detektiert werden (Spur 6). Die Proteinmenge der beiden STAT6-Varianten, die mit dem Anti-STAT6-Antikörper präzipitiert wurde, war gleich (Spur 10 und 12). Dieses Experiment liefert den Nachweis, daß STAT6 und NCoA-1 in Zellen interagieren und daß diese Interaktion von der extremen carboxyterminalen Region der STAT6-Transaktivierungsdomäne vermittelt wird.

3.2.6 Kartierung der Bindungsstellen für CBP und NCoA-1 innerhalb der Transaktivierungsdomäne von STAT6

Frühere Studien haben gezeigt, daß der Koaktivator p300/CBP, der auch mit NCoA-1 wechselwirkt, in Zellen von der Transaktivierungsdomäne von STAT6 rekrutiert wird.

Dies wirft die Frage auf, ob beide Koaktivatoren NCoA-1 und p300/CBP unabhängig voneinander mit der STAT6-Transaktivierungsdomäne interagieren können. Um dieses Problem zu lösen, wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Sowohl die gesamte Transaktivierungsdomäne von STAT6 (AS 677-847) als auch die Haupttransaktivierungsdomäne (AS 677-791) sowie die extreme carboxyterminale Region (AS 792-847) wurden als Fusionsprotein mit GST hergestellt (Abb. 3-12A). Die GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose gekoppelt und gereinigt. Die Bindungspartner CBP und NCoA-1 wurden in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin *in vitro* translatiert. Wie schon zuvor beobachtet, zeigte NCoA-1 eine starke Bindung an die gesamte STAT6-Transaktivierungsdomäne (Abb. 3-12B, Spur 2). Eine gleich starke Interaktion wurde auch für das Fusionsprotein mit der carboxyterminalen Region (AS 792-847) der Transaktivierungsdomäne beobachtet (Spur 4). Dagegen interagierte das GST-Fusionsprotein mit dem aminoterminalen Bereich der Transaktivierungsdomäne (AS 677-791) nicht mit NCoA-1 (Spur 3). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, daß der Bereich AS 792-847 von STAT6 NCoA-1 rekrutiert.

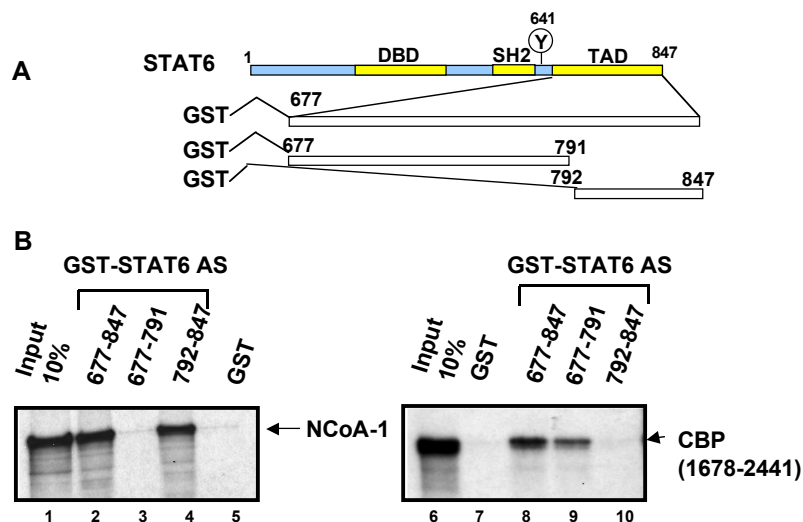


Abb. 3-12 STAT6 rekrutiert NCoA-1 und CBP über verschiedene Regionen seiner Transaktivierungsdomäne

A) Struktur des humanen STAT6 und der GST-Fusionsproteine.

B) GST und die GST-Fusionsproteine wurden mit NCoA-1 und einem CBP-GAL4-Fusionsprotein inkubiert. Gebundenes Material wurde über SDS-PAGE analysiert. Ein Aliquot, das 10% des eingesetzten Retikulozytenlysates entspricht, wurde parallel analysiert (Spur 1 und 6).

Im folgenden wurde analysiert, ob auch CBP mit einer spezifischen Region innerhalb der Transaktivierungsdomäne von STAT6 *in vitro* interagiert. Hierfür wurde ein *in vitro* translatiertes GAL4-Fusionsprotein mit AS 1678-2441 von CBP verwendet, was in Säuger-Zweihybridanalysen als interagierendes Fragment charakterisiert wurde (Gingras et al., 1999). Dieses GAL4-CBP-Fusionsprotein band sowohl an die gesamte STAT6-Transaktivierungsdomäne (Spur 8) als auch an den aminoterminalen Bereich (Spur 9). Dagegen wurde keine Interaktion mit dem extremen Carboxyterminus von STAT6 beobachtet (Spur 10). Aus diesen Versuchen wird geschlossen, daß NCoA-1 und CBP mit verschiedenen Bereichen der STAT6-Transaktivierungsdomäne interagieren, CBP bindet an eine Region zwischen AS 677-791, dagegen bindet NCoA-1 an die extreme carboxyterminale Region zwischen AS 792-847 von STAT6.

3.2.7 Kartierung der STAT6-Bindestelle in NCoA-1

NCoA-1 enthält verschiedene strukturelle und funktionelle Domänen (s. Abb. 3-13A). Um zu untersuchen, welche Domäne von NCoA-1 die Interaktion mit STAT6 vermittelt, wurden verschiedene Fragmente von NCoA-1 in Interaktionsstudien getestet. Hierfür wurde ein GST-Fusionsprotein mit AS 677-847 von STAT6 eingesetzt und die Bindung an verschiedene *in vitro* translatierte, radioaktiv markierte NCoA-1-Fragmente untersucht (Abb. 3-13A). Das gesamte NCoA-1-Protein und ein aminoterminales Fragment von NCoA-1 von AS 1-787 zeigten eine starke Bindung an GST-STAT6 (Abb. 3-13B, Spur 15 bzw. Spur 11), nicht aber an GST (Spur 10 bzw. Spur 6). Die übrigen Fragmente, das sind ein Fragment, das die Bindungsstelle für die nukleären Hormonrezeptoren (NID) enthält (AS 569-805), ein Fragment, das die Bindungsstelle für CBP/p300 (AD1) enthält (AS 804-1032) und ein Fragment mit der carboxyterminalen Transaktivierungsdomäne (AD2) (AS 1208-1442), interagierten nicht mit GST-STAT6 (Spuren 12-14) und auch nicht mit GST (Spuren 7-9). Um die Bindungsstelle weiter einzuengen, wurde der aminoternale Bereich von NCoA-1 in verschiedene Fragmente zerlegt.

Die Verkürzung auf AS 1-571 hatte keinen Einfluß auf die Bindung (Abb. 3-13C, Spur 3). Dieser Bereich wurde in zwei Fragmente zerlegt, und zwar AS 1-361 sowie AS 361-571. Überraschenderweise erhielt man keine Bindung mehr an diese Fragmente (Spuren 6 und 9), was darauf hindeutet, daß die Bindungsstelle zerteilt wurde und in einem Bereich um AS 361 liegt. Daher wurde zunächst vom carboxyterminalen Ende her bis auf die AS 462 verkürzt, was keinen Einfluß auf die Bindung hatte (Abb. 3-13C, Spur 15). Die aminoterminalen Verkürzungen bis AS 100 bzw. 213 hatten ebenso keinen Effekt auf die Menge an gebundenem NCoA-1-Fragment (Spur 12 bzw. Spur 18). Durch eine Verkürzung bis AS 313 ging die Bindung verloren (Spur 21). Die Interaktionsdomäne konnte somit auf einen Bereich von AS 213-462 kartiert werden. Um diese Region noch feiner einzuengen, wurden vom Aminoterminus her bis auf AS 257 verkürzt, vom Carboxyterminus her schrittweise auf AS 441 bzw. 420 (Abb. 3-13D). Diese weiteren Deletionen hatten keinen Einfluß auf die Bindung an GST-STAT6 (Abb. 3-13D, Spuren 12, 13, 14, 15).

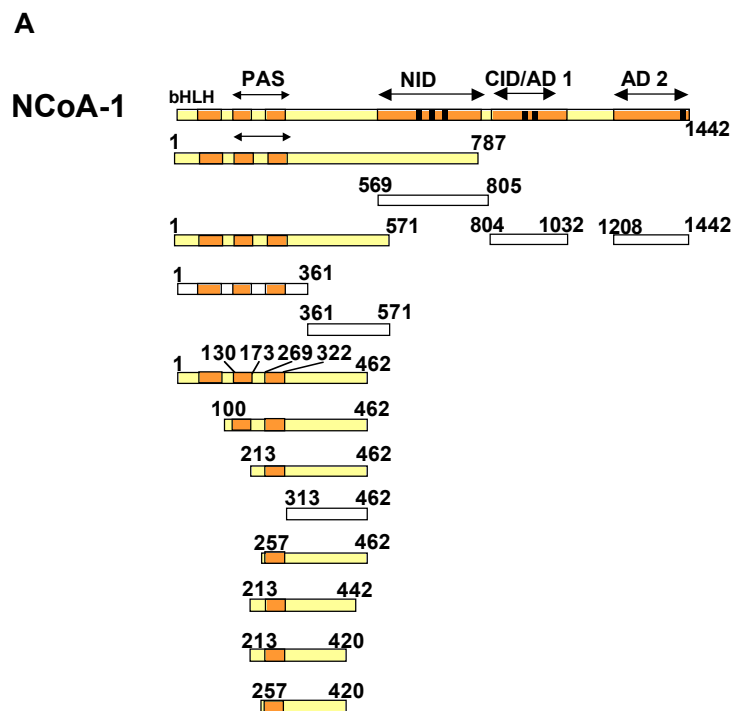


Abb. 3-13 Die aminoterminalen Region von NCoA-1 vermittelt die Interaktion mit STAT6
 A) Schematische Darstellung der NCoA-1-Konstrukte. Volllängen-NCoA-1 und verschiedene Deletionsmutanten sind dargestellt. Bindende Fragmente sind farbige, nicht bindende Fragmente sind weiß dargestellt.

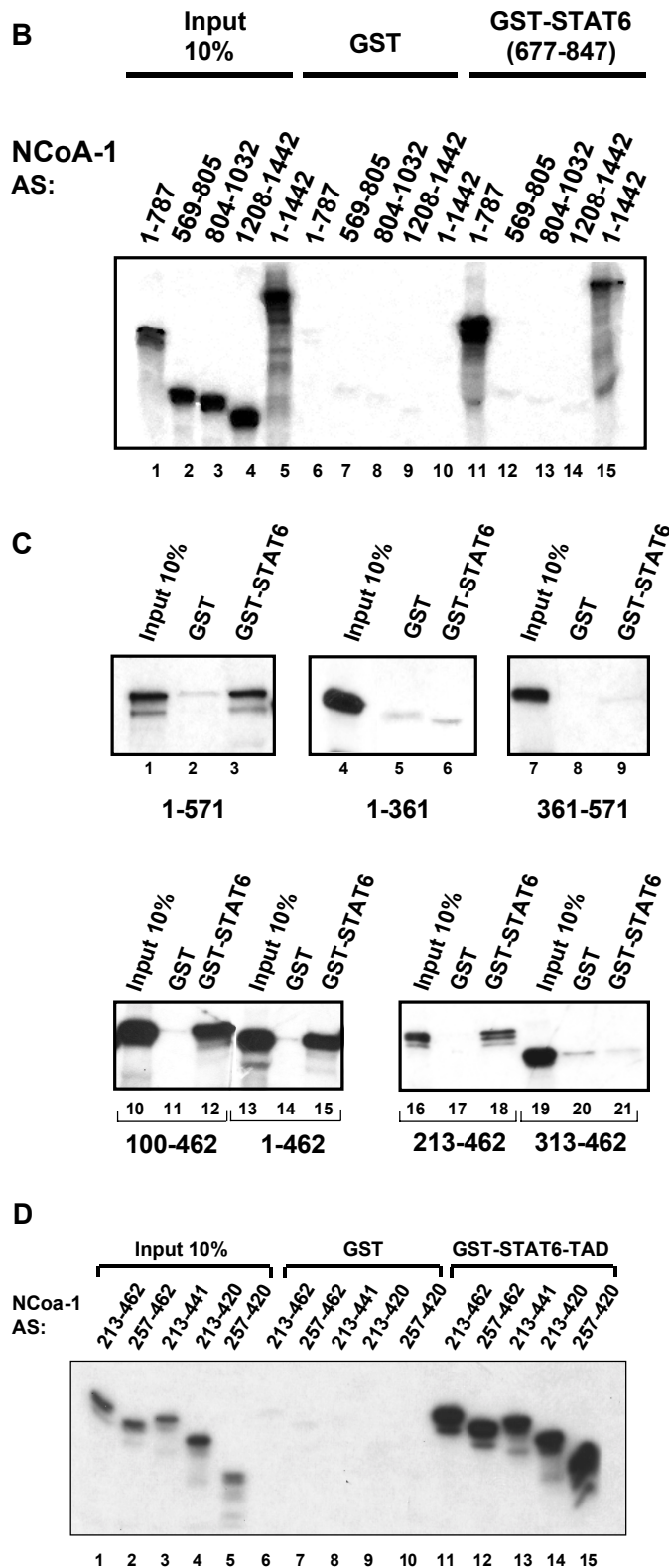


Abb. 3-13 Die aminotermine Region von NCoA-1 vermittelt die Interaktion mit STAT6

B, C, D) GST alleine bzw. ein GST-STAT6-TAD-Fusionsprotein wurde mit radioaktiv markiertem NCoA-1 und einer Serie von NCoA-1-Fragmenten inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Aliquot, das 10 % des für die Bindungsreaktion eingesetzten radioaktiven Materials entspricht, wurde parallel analysiert (Tafel B Spuren 1-5, Tafel C Spuren 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, Tafel D Spuren 1-5). E) Histidin-NCoA-1-Fusionsproteine mit den angegebenen Aminosäuren bzw. ein Histidin-GST-Fusionsprotein wurden mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem STAT6 inkubiert. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE analysiert. 10 % des für die Bindungsreaktion eingesetzten Materials wurde parallel analysiert (Spur 1).

Als Ergebnis dieser Fein-Kartierung wurde also eine Region von 164 Aminosäuren zwischen AS 257 und 420 als Interaktionsdomäne bestimmt. Um die Interaktion zu bestätigen, wurden die NCoA-1-Fragmente als Fusionsprotein mit einem Hexa-Histidin-Schwanz bakteriell exprimiert.

Diese wurden an Ni-NTA-Agarose gekoppelt und auf Interaktion mit *in vitro* translatiertem Gesamt-STAT6-Protein getestet. STAT6 zeigte eine starke Bindung sowohl an das Histidin-Fusionsprotein mit AS 213-462 von NCoA-1 (Abb. 3-13E, Spur 2) als auch an das beiderseits verkürzte Histidin-Fusionsprotein mit AS 257-420 (Spur 3), nicht aber an Histidin-GST (Spur 4). Mithilfe dieser Interaktionsstudien konnte die STAT6-Bindungsstelle auf eine Region von AS 257-420 von NCoA-1 eingegrenzt werden. Diese Region umfaßt die PAS-B-Domäne sowie einen Teil der benachbarten Serin/Threonin-reichen Region. Das reverse Interaktionsexperiment bestätigt zudem, daß die Interaktion zwischen STAT6 und NCoA-1 direkt ist und keiner weiteren vermittelnden Proteine bedarf.

3.2.8 Identifizierung von essentiellen Domänen von NCoA-1 für die Koaktivierung von STAT6

NCoA-1 koaktiviert Transkriptionsfaktoren durch Rekrutierung anderer Koaktivatoren oder Histon-modifizierender Enzyme. Um zu untersuchen, welche funktionellen Domänen von NCoA-1 für die Koaktivierung von STAT6 notwendig sind, wurden verschiedene Deletionskonstrukte von NCoA-1 eingesetzt, in denen die funktionellen Domänen deletiert waren, nämlich die aminoterminal Region, die p300/CBP-Interaktionsdomäne Domäne (CID oder AD1) und die carboxyterminal gelegene zweite Transaktivierungsdomäne (AD2) (von Malcom Parker freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Diese Deletionskonstrukte wurden mit dem Vollängen-NCoA-1-Konstrukt in Bezug auf ihre Koaktivatorfunktion für STAT6 verglichen. Hierfür wurden HepG2-Zellen mit dem STAT6-abhängigen Reporter, STAT6 sowie den verschiedenen NCoA-1-Konstrukten transfiziert und wenn angegeben mit IL-4 stimuliert (Abb. 3-14). Bei Stimulation der Zellen mit IL-4 wurde eine hohe Luziferaseaktivität in Zellextrakten gemessen (Abb. 3-14). Die Kotransfektion von NCoA-1 führte, wie schon zuvor beobachtet, zu einer zusätzlichen 2-fachen Stimulation der Luziferaseaktivität im Vergleich zur Vektorkontrolle.

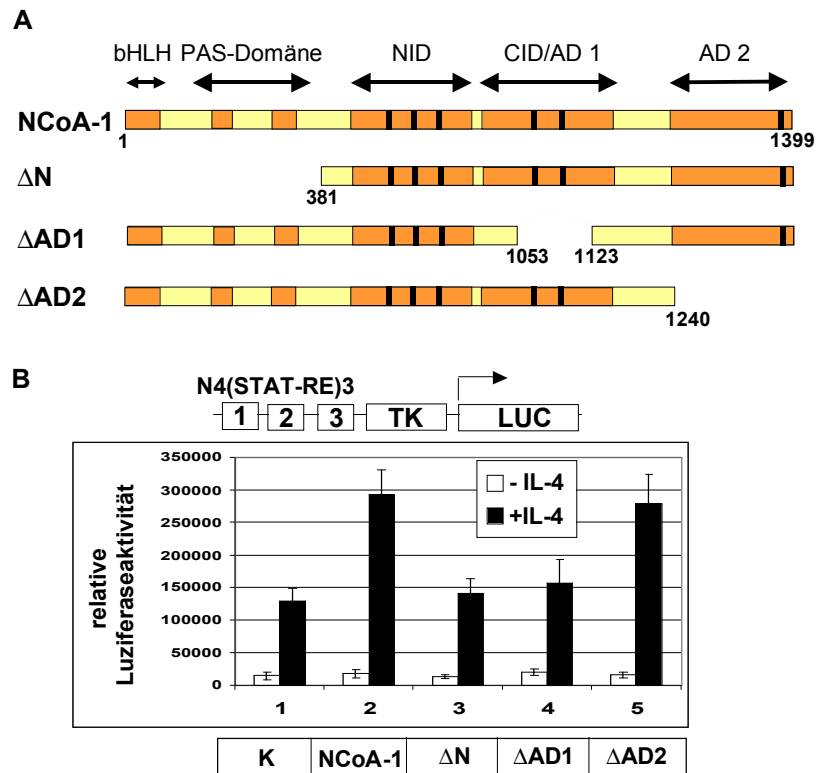


Abb. 3-14 Die aminoterminal Domäne und die AD1-Domäne sind beide wichtig für die Koaktivierung von STAT6

HepG2-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid N4(STAT-RE)3 LUC (2 μ g), einem STAT6-Expressionsvektor (25 ng), sowie verschiedenen NCoA-1-Deletionskonstrukten (Δ N, Δ AD1, Δ AD2) bzw. dem Volllängen-Expressionsvektor oder dem leeren Kontrollvektor (je 200 ng) zusammen mit einem SV40-LacZ Expressionsplasmid (25 ng) als Transfektionskontrolle in Doppelansätzen transfiziert. Eine Hälfte der transfizierten Zellen wurde wie angegeben mit IL-4 stimuliert.

Im Gegensatz dazu konnte die NCoA-1-Mutante, in der die STAT6-Interaktionsdomäne deletiert wurde (Δ N), die STAT6-vermittelte Transaktivierung nicht stimulieren. Ebenso zeigte das NCoA-1 Konstrukt ohne AD1-Domäne (Δ AD1) keine im Vergleich zur Vektorkontrolle erhöhte Luziferaseaktivität. Wenn aber das Δ AD2-Konstrukt transfiziert wurde, in dem die carboxyterminal gelegene Transaktivierungsdomäne fehlt, erhielt man die gleiche Erhöhung der Transaktivierung wie beim Volllängen-NCoA-1. Daher scheint für eine erfolgreiche Koaktivierung von STAT6 die aminoterminal Region und die AD-1-Domäne essentiell zu sein.

Für die Koaktivierungsfunktion von NCoA-1 ist es folglich notwendig ist, daß NCoA-1 erstens mit STAT6 interagiert (über die aminoterminal Region von NCoA-1) und zweitens zusätzliche Faktoren rekrutiert (über die AD1-Domäne).

3.2.9 Effekt der Überexpression der funktionellen Domänen von NCoA-1 auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung

In Abb. 3-14 wurde die Bedeutung der verschiedenen Domänen von NCoA-1 für die Koaktivatorfunktion untersucht. Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurden eben diese funktionellen Domänen überexprimiert und der daraus resultierende Effekt auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung untersucht. Die Überexpression essentieller Domänen sollte erwartungsgemäß zu einer Hemmung der Expression führen, da endogene Koaktivatoren abgefangen und Interaktionen blockiert werden. Ba/F3-IL-4R-Zellen wurden neben dem STAT6-abhängigen Reporter und STAT6 mit drei verschiedenen aminoterminalen NCoA-1-Konstrukten (AS 1-361, AS 1-571, AS 1-787), der Interaktionsdomäne für die nukleären Hormonrezeptoren (NID), der AD1, der AD2 sowie der Vektorkontrolle transfiziert (s. Abb. 3-15A). Die Hälfte der Zellen eines Ansatzes wurde mit IL-4 stimuliert. Die IL-4-Behandlung führte, wie schon zuvor beschrieben, zu einer starken Induktion der Luziferaseexpression des Kontrollansatzes (Abb. 3-15B, Ansatz 1). Bei Überexpression einer kurzen aminoterminalen Region N (1-361), die nicht mit STAT6 interagiert, wurde keine Veränderung der Luziferaseaktivität beobachtet (Abb. 3-15B, Ansatz 2). Dagegen führte die Überexpression sowohl der Region AS 1-571 als auch 1-781 zu einer drastischen Hemmung der STAT6-vermittelten Transaktivierung (Ansätze 3 und 4). Die Überexpression der Konstrukte, die für die übrigen Domänen kodieren und die allesamt in einem anderen Vektor-Typus vorliegen und daher auf die Kontrolle in Ansatz 5 bezogen werden müssen, hatte keinen signifikanten Effekt auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung des Luziferasegens (Ansätze 6-8).

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Hemmung durch die STAT6-Interaktionsdomäne Zelltyp-spezifisch ist, wurde dieser Bereich in zwei weiteren Zelllinien überexprimiert, in denen STAT6 eine physiologische Rolle spielt. Die B-Zelllinie M12.4.1 wurde mit dem STAT6-abhängigen Reporterkonstrukt und Expressionsvektoren für STAT6 und für das NCoA-1-Konstrukt transfiziert (Abb. 3-15C).

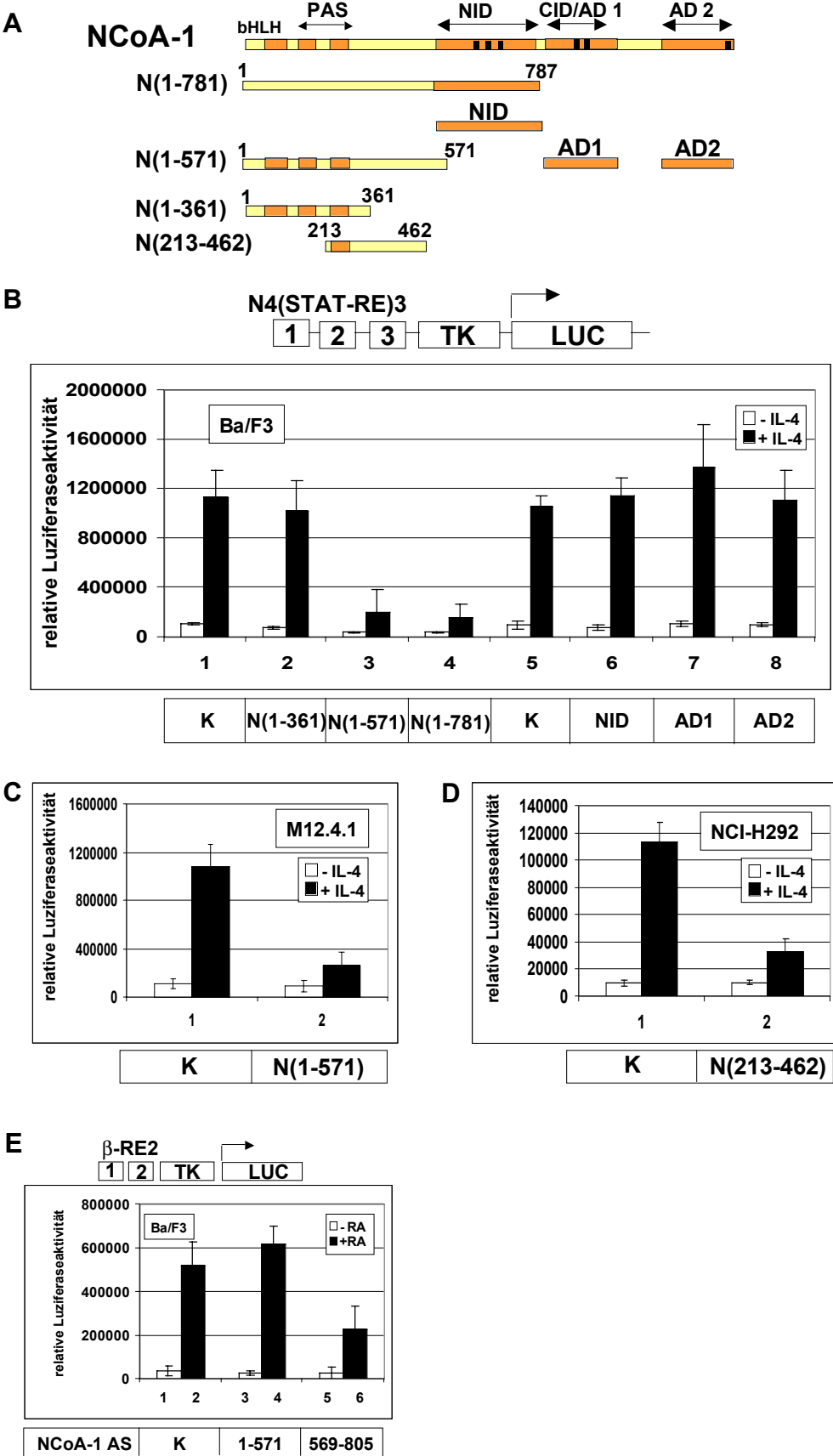


Abb. 3-15 Die aminoterminalen Region von NCoA-1 hat einen dominant negativen Effekt auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung

Abb. 3-15 Die aminoterminalen Region von NCoA-1 hat einen dominant negativen Effekt auf die STAT6-vermittelte Transaktivierung

A) Struktur von NCoA-1 und verschiedenen Fragmenten.

B und C) Ba/F3-IL-4R-Zellen bzw. M12.4.1-Zellen wurden mit 200 ng STAT6-Expressionsvektor, 3 µg der angegebenen NCoA-1-Konstrukte bzw. dem leeren Vektor zusammen mit 5 µg Reporterplasmid N4(STAT-RE)3 LUC und 1 µg SV40-LacZ Expressionsplasmid in Doppelansätzen transfiziert. Eine Hälfte der Ansätze wurde mit IL-4 behandelt.

D) NCI-H292-Zellen wurden mit 0.5 µg Reporterplasmid N4(STAT-RE)4 LUC und 100 ng SV40-LacZ Expressionsplasmid sowie 400 ng des angegebenen NCoA-1-Konstruktes bzw. des leeren Vektors in Doppelansätzen transfiziert. Eine Hälfte der Zellen wurde mit IL-4 behandelt.

E) Ba/F3-IL-4R-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für RAR und RXR (200 ng), dem Reporterplasmid β-RE-2-TK LUC (5 µg), SV40-LacZ und den angegebenen NCoA-1-Konstrukten (3 µg) transfiziert. Eine Hälfte der Zellen wurde mit Retinsäure behandelt.

In der Lungenepithelzelllinie NCI-H292 wurde ein weiter verkürzter Bereich AS 213-462, der *in vitro* mit STAT6 interagiert (s. Abb. 3-13), zusammen mit dem Reporter-Plasmid, das 4 GAS-Elemente enthält, kotransfiziert (Abb. 3-15D). Das NCoA-1 Fragment inhibierte auch in dieser Zelllinie die IL-4-induzierte, durch endogenes STAT6 vermittelte Transaktivierung der Luziferaseexpression.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die aminoterminalen Fragmente von NCoA-1, die mit STAT6 *in vitro* interagieren, wenn sie in Zellen in großen Mengen vorhanden sind, einen stark inhibitorischen Effekt auf die Transaktivierung des STAT6-abhängigen Reportergens ausüben und somit in dominant negativer Weise die Funktion des endogenen NCoA-1 inhibieren.

Um auszuschließen, daß dieser beobachteten Hemmung ein genereller Mechanismus zugrunde liegt, wurde nun der Effekt der Überexpression der Domäne AS 1-571 auf die Hormonrezeptor-vermittelte Genexpression untersucht. Die Funktion des Retinsäure-Rezeptors RAR, der einen Heterodimer mit RXR bildet, ist abhängig von NCoA-1, denn eine Blockierung der Interaktion mit spezifischen Antikörpern, die in der NID-Domäne von NCoA-1 binden, führt zur Inhibition der RAR/RXR-vermittelten Transaktivierung (Torchia et al., 1997). Für diese Experimente wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, das zwei Bindestellen für RAR/RXR aus dem RARβ-Promotor enthält (Abb. 3-15E). Ba/F3-IL-4R-Zellen wurden mit diesem Reporter, Expressionsvektoren für RAR und RXR sowie mit verschiedenen NCoA-1-Konstrukten bzw. der Vektorkontrolle transfiziert.

Nach der Transfektion wurde die Hälfte der Zellen mit dem Liganden Retinsäure behandelt und die Luziferaseaktivität der Zellextrakte gemessen. Die Retinsäure-Behandlung führte zu einer starken Induktion der Luziferaseexpression (Abb. 3-15E, Ansätze 1, 2). Wenn die Domäne AS 1-571 von NCoA-1 überexprimiert wurde, erhielt man die gleiche starke Induktion (Ansätze 3, 4). Dagegen führte die Überexpression der NID-Domäne zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität in Zellextrakten (Ansätze 5, 6). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die Domäne AS 1-571 von NCoA-1 spezifisch die Funktion von STAT6, nicht aber die Funktion der Transkriptionsfaktoren RAR/RXR, die ebenso von NCoA-1 abhängen, inhibiert.

3.2.10 Untersuchung der Interaktion von NCoA-1 und verschiedenen STAT-Proteinen *in vitro*

Die bisherigen Daten zeigten, daß NCoA-1 als spezifischer Koaktivator für STAT6 fungiert und über die transaktivierende Domäne von STAT6 direkt kontaktiert wird. Daher stellte sich die Frage, ob auch andere strukturell verwandte STAT-Proteine mit NCoA-1 unmittelbar wechselwirken. Hierfür wurden zwei GST-Fusionsproteine generiert, die die aminoternale bzw. die carboxyterminale Hälfte von NCoA-1 umfassen (Abb. 3-16) und in GST-Pulldown-Experimenten mit den verschiedenen STAT-Proteinen, die *in vitro* translatiert wurden, eingesetzt. Wie schon vorher beobachtet, interagierte STAT6 mit der aminoternalen Region von NCoA-1 (Abb. 3-16A, Spur 21), während hingegen für die anderen STATs keine spezifische Bindung an diese Region beobachtet wurde. STAT4 band an die carboxyterminale Region von NCoA-1 (Abb. 3-16B Spur 12).

Wie schon in Abschnitt 3.1.3 bemerkt, konnte *in vitro* keine direkte Interaktion zwischen STAT5 und NCoA-1 beobachtet werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die direkte Interaktion mit NCoA-1 eine spezifische Funktion von STAT6 ist.

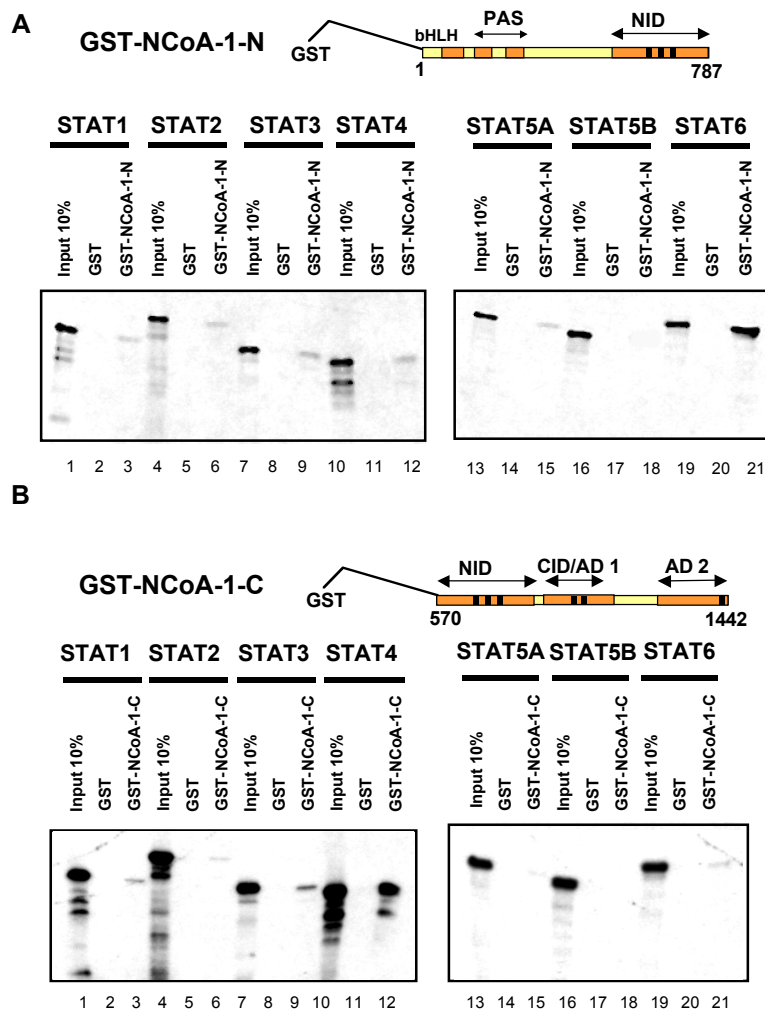


Abb. 3-16 STAT6, jedoch nicht die anderen STAT-Proteine, interagiert mit der aminoterminalen Region von NCoA-1

A und B) GST und ein GST-NCOA-1-Fusionsprotein mit der aminoterminalen (A) bzw. carboxyterminalen (B) Hälfte von NCoA-1 wurden mit den verschiedenen STAT-Proteinen, die in Gegenwart von [³⁵S]-markiertem Methionin *in vitro* translatiert wurden, inkubiert.

Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE analysiert.

Ein Aliquot der radioaktiven Proteine, was 10% des für die Bindungsreaktion verwendeten Materials entspricht, wurde mit aufgetragen (Spuren 1, 4, 7, 10, 13, 16 und 19 in A und B).

3.3 Charakterisierung des LXXLL-Motivs von STAT6 als Bindungsmotiv für die Interaktion mit NCoA-1

3.3.1 Einsatz von Peptiden und Antikörpern zur Identifizierung des NCoA-1-Bindungsmotivs in der STAT6-Transaktivierungsdomäne

In Kapitel 3.2 dieser Arbeit wurde beschrieben, daß NCoA-1 ein Koaktivator von STAT6 darstellt. STAT6 rekrutiert NCoA-1 über seine Transaktivierungsdomäne. Die Bindungsstelle für die Interaktion mit NCoA-1 wurde auf eine carboxyterminale Region von AS 792 bis 847 in STAT6 eingengt. Um innerhalb dieser Region Bindungsmotive zu identifizieren, wurden aus der Sequenz der Bindungsregion 3 Peptide abgeleitet, die die NCoA-1-Bindestelle in der Transaktivierungsdomäne von STAT6 nahezu abdecken (Abb. 3-17A).

In einem GST-Pulldown-Experiment wurde getestet, ob diese Peptide als Kompetitoren der Interaktion von STAT6 und NCoA-1 wirken können. Ein GST-Fusionsprotein mit der transaktivierenden Domäne von STAT6 (GST-STAT6-TAD) bzw. GST alleine wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit radioaktiv markiertem, *in vitro* translatiertem NCoA-1 in Anwesenheit der Peptide inkubiert. Nicht bindende Proteine wurden durch Waschen entfernt und der Ansatz über SDS-PAGE und anschließende Fluorographie analysiert. Wie schon zuvor beobachtet, zeigte NCoA-1 eine starke Bindung an GST-STAT6-TAD (Abb. 3-17B), jedoch nicht an GST. Peptid 1 blockierte die Interaktion von NCoA-1 und STAT6 völlig. Dagegen hatten die Peptide 2 und 3 keinen Einfluß auf die Bindung. Diese Tatsache läßt schlußfolgern, daß Peptid 1 ein essentielles Motiv enthält und daher als Kompetitor der Bindung wirkt. Um die Menge von Peptid 1 zu bestimmen, die für eine wirksame Inhibition notwendig ist, wurden im folgenden verschiedene Konzentrationen von Peptid 1 getestet. Als Bindungspartner wurde ein Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein eingesetzt, das eine aminoternale Region von NCoA-1 umfaßt, sowie ein GST-Fusionsprotein mit der gesamten STAT6-Sequenz (freundlicherweise von Silke Hobbie zur Verfügung gestellt). Das GST-STAT6-Fusionsprotein trägt auch einen Poly-Histidin-Anhang. Daher können beide Bindungspartner in einem Western-Blot-Experiment mit einem Anti-Histidin-Antikörper detektiert werden.

GST und GST-STAT6 wurden mit NCoA-1 (AS 213-462) in An- bzw. Abwesenheit von Peptid 1 inkubiert und die gebundenen Histidin-Fusionsproteine in einem Western-Blot-Experiment detektiert (Abb. 3-17C). NCoA-1 zeigte wiederum eine starke Bindung an GST-STAT6 (Spur 3), nicht aber an GST (Spur 2). Die höchste Konzentration von Peptid 1 (0.28 mM) führte zu einer totalen Inhibition der Interaktion (Spur 4), bei einer 10-fach niedrigeren Konzentration konnte wieder eine geringe Menge gebundenes NCoA-1 detektiert werden (Spur 5). Die niedrigste Peptid-Konzentration (2.8 µM, Spur 6), die einen etwa 50-fachen Überschuß im Vergleich zu der Menge an eingesetztem GST-STAT6 darstellt, hatte bereits eine nachweisbare inhibitorische Wirkung auf die Bindung. Peptid 1 wirkt somit als Kompetitor in einer Konzentrations-abhängigen Weise.

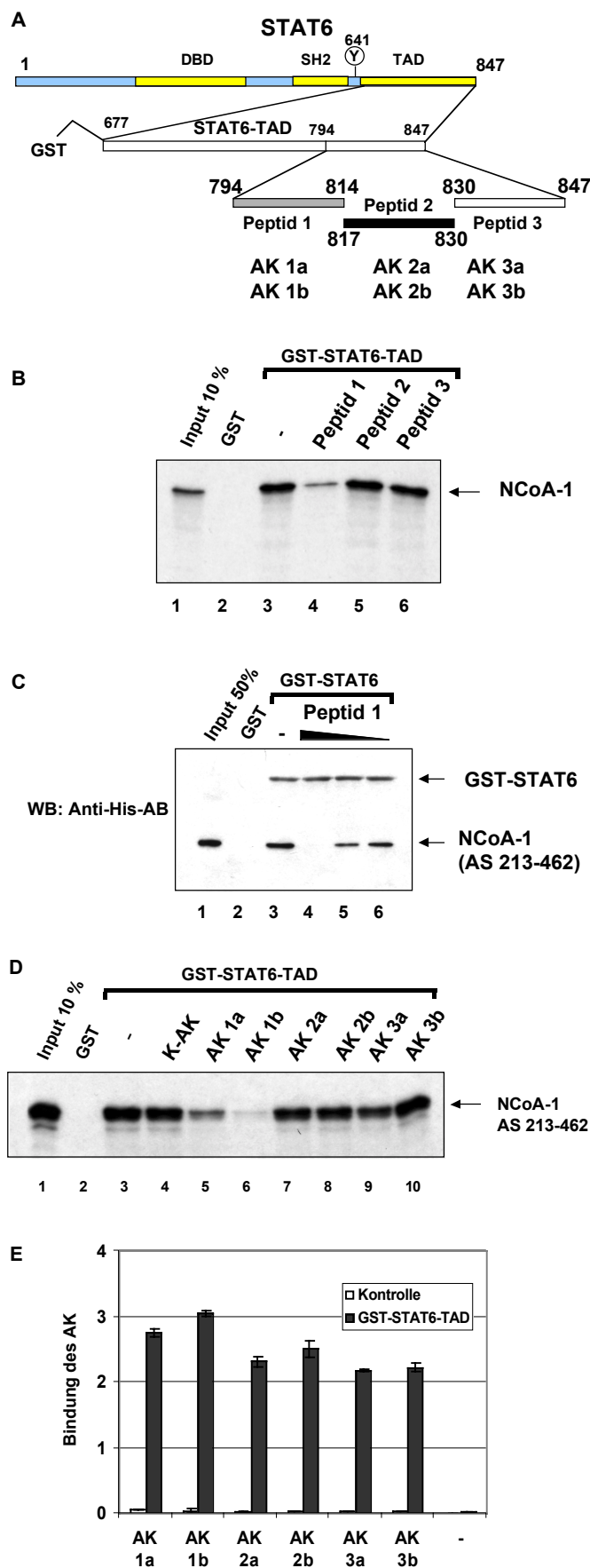


Abb. 3-17 Peptid 1 sowie AK1a und AK1b sind wirksame Inhibitoren der Interaktion von STAT6 und NCoA-1 *in vitro*.

A) Schematische Darstellung der Struktur des humanen STAT6, eines GST-Fusionsproteins, von Peptiden, die von der STAT6-Sequenz abgeleitet wurden und Antikörper, die gegen diese Peptide gerichtet wurden.

B) GST oder GST-STAT6-TAD-Fusionsprotein wurde mit [³⁵S]-markiertem NCoA-1 in Gegenwart von 100 µg Peptiden wie angegeben inkubiert.

C) GST oder Poly-Histidin-GST-STAT6 wurde mit Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein (AS 213-462 von NCoA-1) inkubiert. Die Bindungsreaktion wurde in Gegenwart von 0.28 mM (Spur 4), 28 µM (Spur 5), oder 2.8 µM (Spur 6) Peptid 1 wie angegeben durchgeführt. Der Nachweis des gebundenen NCoA-1 geschah über das His-Tag mit Western-Blot.

D) GST oder ein GST-STAT6-TAD-Fusionsprotein wurde mit [³⁵S]-markiertem Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein (AS 213-462 von NCoA-1) inkubiert. In den Ansätzen, die in den Spuren 4-8 dargestellt sind, wurde die Bindungsreaktion in Anwesenheit von 10 µl Antiserum (AK 1a, AK 1b, AK 2a, AK 2b, AK 3a, AK 3b, oder Kontrollantikörper K-AK) durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Aliquot des radioaktivmarkierten NCoA-1 mit aufgetragen (Spur 1).

E) Die Bindung der Antiseren an GST-STAT6 wurde in einem ELISA-Experiment analysiert. GST-STAT6-TAD-Fusionsprotein wurde auf Mikrotiterplatten, die mit GST-Antikörper beschichtet sind, immobilisiert. Die Kaninchen-Antiseren wurden zugegeben. Spezifisch bindende Antikörper wurden mithilfe von Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert.

Diese Ergebnisse führen zur Vermutung, daß Peptid 1 eine Sequenz in STAT6 repräsentiert, die essentiell für die Interaktion mit NCoA-1 ist. Um zu bestätigen, daß die Region von STAT6, die in Peptid 1 vertreten ist, die Rekrutierung des Koaktivators NCoA-1 vermittelt, wurden Antikörper gegen die verschiedenen Peptide generiert und deren inhibitorisches Potential auf die Bindung von STAT6 und NCoA-1 getestet. Es wurden jeweils 2 Kaninchen pro Peptid immunisiert und deren Seren verwendet. Abermals wurden GST-Pulldown-Experimente mit GST-STAT6-TAD sowie radioaktiv markiertem NCoA-1 (AS 213-462) durchgeführt. Die Bindung von GST-STAT6 und NCoA-1 wurde durch Zugabe eines Kontroll-Kaninchen-Antikörpers nicht gestört (Abb. 3-17D, vergleiche Spur 3 und 4). Die Seren 1a und 1b, die aus der Immunisierung mit Peptid 1 gewonnen wurden, führten zu einer starken Hemmung der STAT6-NCoA-1-Bindung (Spur 5 und 6). Dagegen zeigten die Seren, die der Immunisierung mit den Peptiden 2 und 3 entstammten, keinen signifikanten Effekt auf die Bindung (Spuren 7 bis 10). Jedes der Antiseren hatte eine etwa gleich starke Affinität zu STAT6-TAD, wie in einem ELISA-Experiment gezeigt werden konnte (Abb. 3-17E). Hierfür wurde ein GST-STAT6-TAD-Fusionsprotein an eine Mikrotiterplatte, die mit GST-Antikörper beschichtet war, gekoppelt. Die Antiseren wurden zugegeben und mithilfe eines sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert.

Aus der starken Hemmung der STAT6/NCoA-1-Interaktion durch die Antiseren 1a und 1b wird gefolgert, daß diese Antikörper ein essentielles Interaktionsmotiv von STAT6 besetzen, was in Folge nicht mehr für NCoA-1 zugänglich ist. Diese Experimente zeigen also, daß die Region von STAT6 zwischen AS 794 und 814 ein Proteininteraktionsmotiv birgt, das die Rekrutierung von NCoA-1 vermittelt.

3.3.2 Identifizierung eines Bindungsmotivs in STAT6, das die *in vitro*-Interaktion mit NCoA-1 vermittelt

Die Sequenz des Peptids 1 enthält ein so genanntes LXXLL-Motiv (s. Abb.3-18A). LXXLL-Motive vermitteln Protein-Protein-Interaktionen und wurden ursprünglich in einer Reihe von Koaktivatorproteinen beschrieben (Heery et al., 1997). Um zu testen, ob das LXXLL-Motiv von STAT6 essentiell für die Rekrutierung von NCoA-1 ist, wurde die Sequenz durch Austausch der Leucine an Position 802 und 805 mit Alaninen mutiert (Abb. 3-18A). GST-Fusions-Proteine mit der Region AS 642 bis 847 von STAT6, welche diese Mutationen bzw. die Wildtyp-Sequenz enthielten, wurden in einem GST-Pulldown-Experiment auf Interaktion mit NCoA-1 getestet. Gleiche Mengen der beiden Fusionsproteine bzw. GST alleine wurden mit radioaktivem NCoA-1-Protein (AS 213-462) inkubiert. Wie schon zuvor beschrieben, band das Fusionsprotein mit der Wildtypsequenz von STAT6 an NCoA-1 (Abb. 3-18B, Spur 3). Das Fusionsprotein mit der mutierten Sequenz zeigte dagegen eine stark reduzierte Bindung (Spur 4). Es wurden gleiche Mengen der beiden Fusionsproteine eingesetzt, wie in einem Coomassie-Gel gezeigt (Abb. 3-18C, Spuren 2 und 3). Die beiden Punktmutationen führten zu einem verzögerten Laufverhalten in der SDS-PAGE. Dieses Experiment zeigt deutlich, daß das LXXLL-Motiv von STAT6 essentiell für die Rekrutierung von NCoA-1 *in vitro* ist.

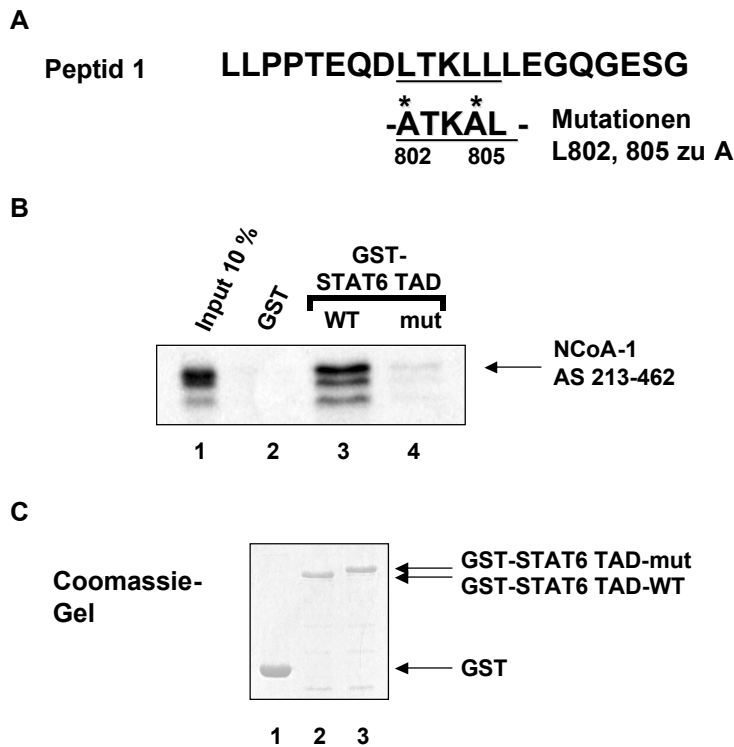


Abb. 3-18 Punktmutationen im LXXLL-Motiv der STAT6-Transaktivierungsdomäne zerstören die Interaktion mit NCoA-1 *in vitro*

A) Darstellung der Sequenz des Peptid 1 und des LXXLL-Motivs. Die Alanin-Mutationen, die in die Sequenz eingeführt wurden, sind mit Sternchen markiert.

B) Die GST-Fusionsproteine wurden mit radioaktivem Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein (AS 213-462 von NCoA-1) inkubiert.

C) Als Kontrolle wurde ein Viertel der Reaktionen separat mit SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie gefärbt.

3.3.3 Bedeutung des LXXLL-Motivs von STAT6 für die Interaktion mit NCoA-1 in Zellen

Um die Funktion des LXXLL-Motivs für die Rekrutierung von NCoA-1 in Zellen zu untersuchen, wurden Fusionskonstrukte aus der kodierenden Region für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (GAL4-DBD) und der Region AS 792-847 mit der Wildtyp bzw. der mutierten Sequenz von STAT6 hergestellt (Abb. 3-19A). In Reporter-Genexperimenten wurde deren Transaktivierungspotential in Abhängigkeit von kotransfiziertem NCoA-1 analysiert. 293T-Zellen wurden transient mit den verschiedenen GAL4-Fusionskonstrukten, einem GAL4-Reporter sowie einem NCoA-1-Expressionsvektor bzw. einem Kontrollvektor transfiziert. Die Expression der GAL4-DBD alleine führte nur zu einer geringen Luziferaseaktivität in Zellextrakten (Abb. 3-19B Ansatz 1), die Kotransfektion von NCoA-1 hatte keinen Effekt (Ansatz 2). Das GAL4-Konstrukt mit der Wildtyp-Sequenz der Region AS 792-847 von STAT6 führte zu einer starken Luziferaseexpression (Ansatz 3). Diese Induktion wurde nochmals 2-fach verstärkt, wenn NCoA-1 kotransfiziert worden war (Ansatz 4).

Das GAL4-Konstrukt mit der mutierten STAT6-Sequenz besaß dagegen nur etwa 20% der Aktivität des Wildtypkonstrukts (vergleiche Ansatz 5 und 3).

Die Kotransfektion von NCoA-1 konnte das schwache Transaktivierungspotential nicht weiter verstärken (Ansatz 6). Das Transaktivierungspotential der GAL4-STAT6-Fusion ist offensichtlich von NCoA-1 abhängig. Die Mutante, die *in vitro* nicht mehr mit NCoA-1 interagieren kann, besitzt daher kaum Transaktivierungsfunktion. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde dieses Experiment in einer zweiten Zelllinie wiederholt. In der Lungenepithel-Zelllinie NCI-H292 hatte das nur die GAL4-DBD enthaltende Konstrukt keine Transaktivierungsfunktion (Abb. 3-19C, Ansätze 1 und 2).

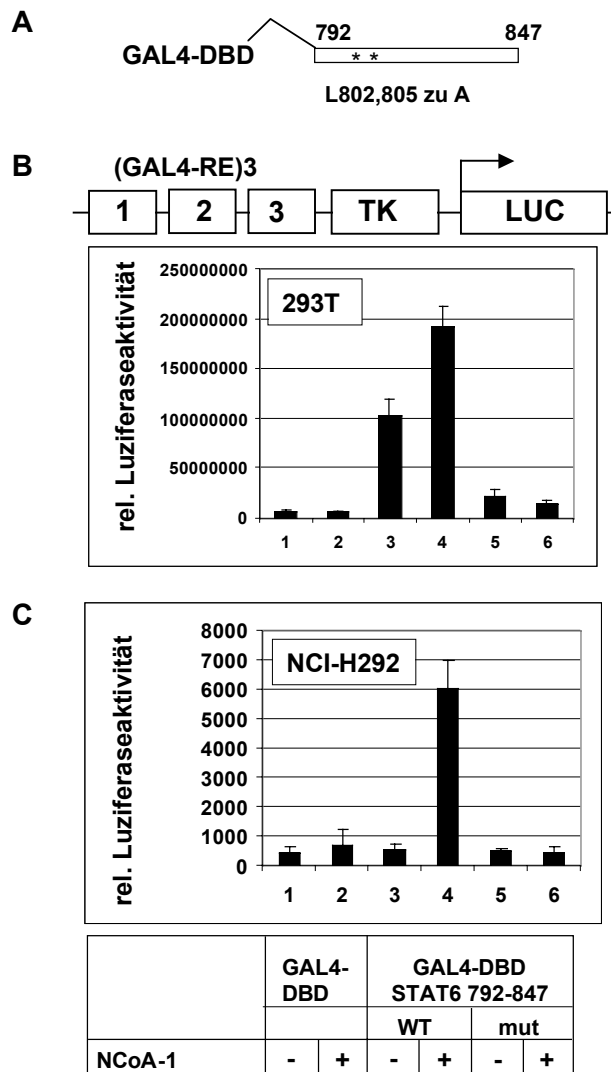


Abb. 3-19 Punktmutationen im LXXLL-Motiv zerstören die Rekrutierung von NCoA-1 in Zellen

A) Schematische Darstellung des GAL4-Fusionsproteins mit AS 792-847 von STAT6. Die Position der Punktmutationen sind mit Sternchen markiert.

B) Schematische Darstellung des Reporterplasmids.

Das Reporterplasmid (GAL4-RE)₃ TK LUC (0.5 µg), Expressionsvektoren für die GAL4-STAT6-Fusionsproteine (25 ng), für NCoA-1 bzw. als Kontrolle der leeren Expressionsvektor (100 ng) wurden zusammen mit SV40-LacZ (50 ng) in 293T-Zellen wie angegeben transfiziert.

C) NCI-H292-Zellen wurden mit 0.5 µg Reporterplasmid (GAL4-RE)₃ TK LUC, 100 ng Expressionsvektoren für die GAL4-STAT6-Fusionsproteine, 200 ng des NCoA-1-Expressionsvektors bzw. als Kontrolle des leeren Expressionsvektors und mit 100 ng SV40-LacZ wie angegeben transfiziert.

Das Wildtyp-GAL4-STAT6-Konstrukt induzierte eine sehr geringe Luziferaseaktivität (Ansatz 3), die Kotransfektion von NCoA-1 führte zu einer drastischen Erhöhung der Luziferaseexpression (Ansatz 4), was wohl darauf zurückzuführen ist, daß NCoA-1 ein limitierender Faktor in dieser Zelllinie darstellt. Das Fusionskonstrukt mit der mutierten STAT6-Sequenz zeigte eine sehr schwache Induktion der Luziferaseaktivität (Ansatz 5), was auch durch Überexpression von NCoA-1 nicht beeinflusst wurde (Ansatz 6). Diese Ergebnisse zeigen, daß das LXXLL Motiv für die Rekrutierung von NCoA-1 und die Vermittlung von Transkriptionsaktivierung verantwortlich ist.

3.3.4 Mutation des LXXLL-Motivs in STAT6

Um die Funktion des LXXLL-Motivs für die IL-4-vermittelte Transaktivierung zu untersuchen, wurde die Mutation L802,805 zu A in die Vollängen-STAT6-Sequenz eingeführt (Abb. 3-20A). Zuerst wurde untersucht, ob die Mutation auch im Kontext des Vollängen-STAT6 die Rekrutierung von NCoA-1 zerstören würde. Da CBP an eine andere Region der STAT6-Transaktivierungsdomäne bindet, wäre es möglich, daß die mutierte Vollängen-STAT6-Variante immer noch indirekt über die Bindung von CBP mit NCoA-1 interagieren könnte. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit den beiden STAT6-Varianten und NCoA-1 durchgeführt. Es wurde eine GFP-Fusion von STAT6 verwendet, die mit einem Anti-GFP-Serum sehr effizient präzipitiert werden kann und eine Interferenz mit endogenem STAT6 ausschließt. 293T-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für Wildtyp-STAT6 und die STAT6-Mutante (L802, 805 zu A) zusammen mit NCoA-1 transfiziert und mit IL-4 induziert. Die beiden STAT6-Varianten wurden mit Anti-GFP-Serum aus den Lysaten präzipitiert. Die Anwesenheit von NCoA-1 in den Proteinkomplexen wurde über Western-Blot überprüft. NCoA-1 wurde durch das Wildtyp-STAT6-Protein gebunden (Abb. 3-20B, Spur 6), jedoch nicht durch die STAT6-Mutante (Spur 8). Beide STAT6-Varianten waren in etwa gleichen Mengen immunpräzipitiert (Spur 2 und 4). Diese Daten zeigen, daß die mutierte STAT6-Variante in Zellen keinen Komplex mit NCoA-1 bilden kann.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Mutation L802, 805 zu A die Aktivierung von STAT6 zu einem aktiven Dimer oder die DNA-Bindung beeinflusst. 293T-Zellen haben kein funktionelles STAT6 (Hoeck und Woisetschlager, 2001; Lu et al., 1997). Um Nebeneffekte auszuschließen, wurden die Untersuchungen in dieser Zelllinie durchgeführt.

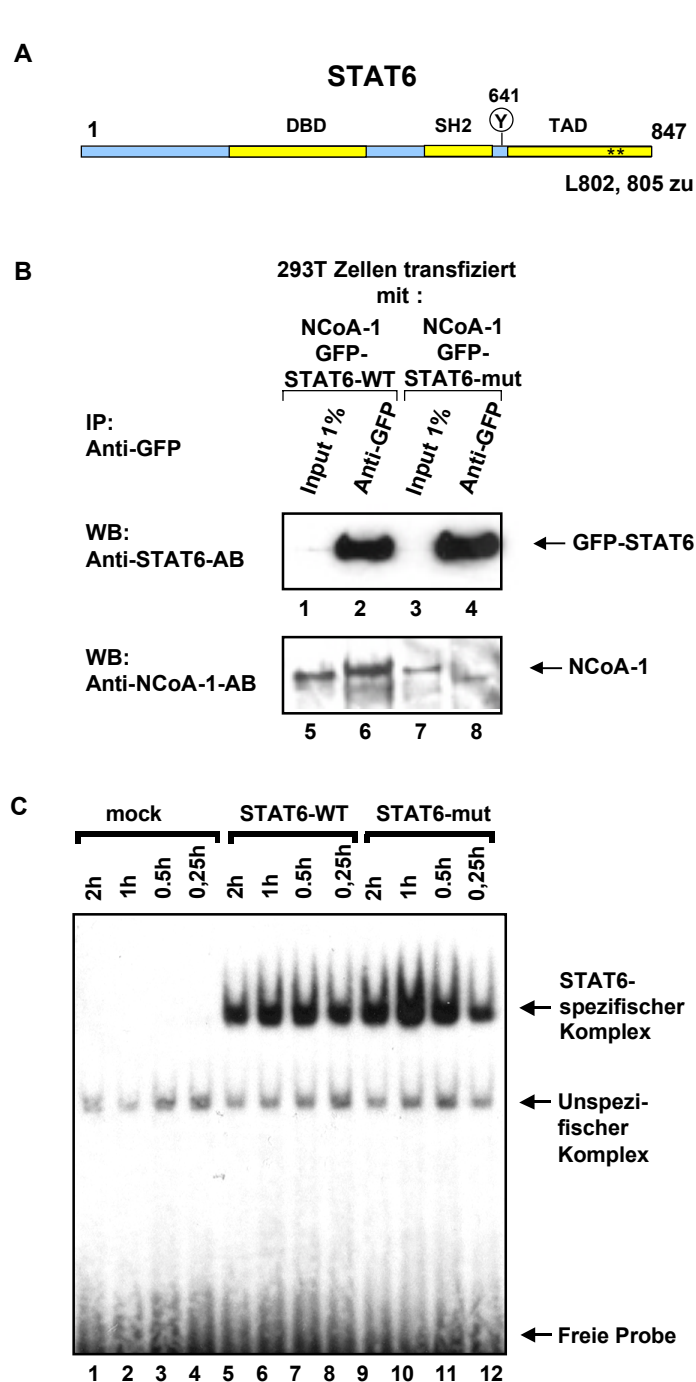


Abb. 3-20 Punktmutationen im LXXLL-Motiv von STAT6 führen zum Verlust der Interaktion mit NCoA-1, haben aber keinen Effekt auf die DNA-Bindung

A) Darstellung der Struktur von STAT6. Die Lage der Punktmutationen sind eingezeichnet.

B) 293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Wildtyp- und mutiertes GFP-STAT6 (3 µg) und NCoA-1 (5µg) transfiziert und mit IL-4 induziert. Die Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit Anti-GFP-Antiserum unterzogen. 1% der Zellextrakte wurden parallel analysiert. Die Proteine wurden im Western-Blot mit Anti-STAT6 und Anti-NCoA-1-Antikörper analysiert.

C) 293T-Zellen wurden mit 2 µg der angegebenen Vektoren transfiziert und für 20 min. mit IL-4 stimuliert. Das Zytokin-haltige Medium wurde entfernt und die Zellen für die angegebenen Zeiträume in frischem Medium inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Zellextrakte mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe mit dem Bereich 117/-97 aus dem GL ε-Promotor inkubiert, der eine STAT6-Bindestelle enthält. Die DNA-Protein-Komplexe wurden über ein PAA-Gel analysiert.

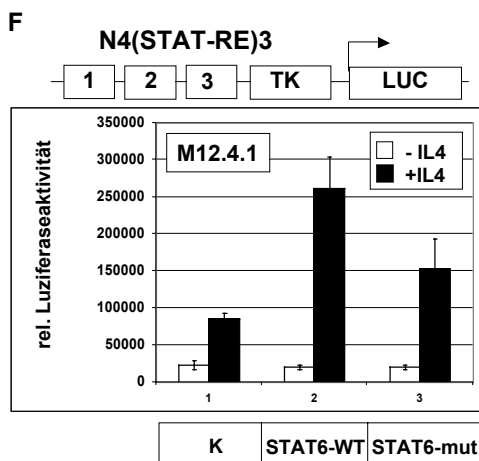
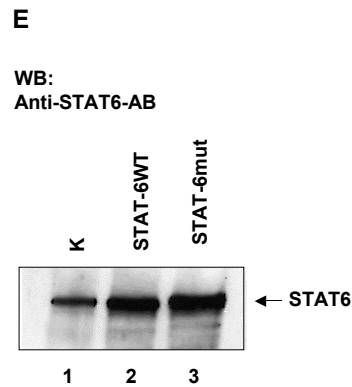
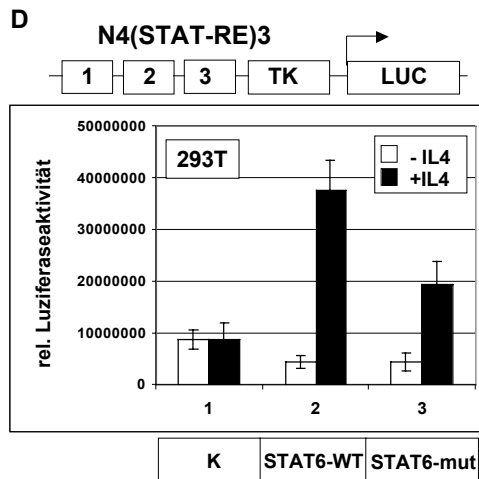


Abb. 3-20 Die Punktmutationen im LXXLL-Motiv von STAT6 verringern das Transaktivierungspotential von STAT6

D) 293T-Zellen wurden mit dem N4(STAT-RE)3 LUC Reporterplasmid (0.36 μ g), den Expressionsvektoren für die beiden STAT6-Varianten bzw. dem Kontrollvektor (100 ng) und SV40-*LacZ*-Vektor (50 ng) in Doppelansätzen wie angegeben transfiziert. Eine Hälfte der Zellen wurde mit Zytokin behandelt.

E) Die Zellen von C wurden über Western-Blot mit STAT6-spezifischem Antikörper analysiert.

F) Die Reporterplasmide N4(STAT-RE)3 LUC (5 μ g) und SV40-*LacZ*-Vektor (1 μ g), sowie Expressionsvektoren für die beiden STAT6-Varianten bzw. der Kontrollvektor (300 ng) wurden in M12.4.1-Zellen wie angegeben transfiziert. Eine Hälfte der Zellen wurde mit Zytokin behandelt.

Die Zellen wurden mit Wildtyp- und mutiertem STAT6 transfiziert und die DNA-Bindung von STAT6 mit Hilfe von EMSA-Analysen in den Extrakten der transfizierten Zellen untersucht. Die Extrakte wurden mit einer DNA-Probe, die ein STAT6-spezifisches GAS-Element aus dem GL ε -Promotor enthält, analysiert. Um die Stabilität der DNA-Bindung zu untersuchen, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion geerntet:

Die Zellen wurden zunächst für 20 min. mit IL-4 stimuliert, dann wurden die Zellen in Zytokin-freiem Medium für die angezeigten Zeiträume weiterkultiviert (Abb. 3-20C).

Die Extrakte von Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, zeigten keinen STAT6-spezifischen Komplex im EMSA-Experiment (Ansätze 1-4).

Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, die beschreiben, daß das endogene STAT6 dieser Zellen nicht in der Lage ist, DNA zu binden. Der Wildtyp als auch die mutierte STAT6-Variante band spezifisch an die DNA-Probe (Ansätze 5-12), der STAT6-Dimer war sogar 2 Stunden nach Zytokinstimulation noch stabil (Ansatz 5 und 9). Wildtyp und Mutante zeigten keinen Unterschied in der Komplex-Bildung. Dies deutet darauf hin, daß die Mutation Leucin 802, 805 zu Alanin keinen Einfluß auf die DNA-Bindung hat. Um das Transaktivierungspotential der mutierten STAT6-Variante zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit den beiden STAT6-Expressionsvektoren und einem STAT6-abhängigen Reporter-Plasmid in Doppelansätzen transfiziert. Eine Hälfte der Ansätze wurde mit IL-4 behandelt und die Luziferaseaktivität in den Zelllysaten bestimmt. Wie erwartet war das endogene STAT6 nicht in der Lage, die Luziferaseexpression zu induzieren (Abb. 3-20D, Ansätze 1 und 2). Die Transfektion mit Wildtyp-STAT6 führte zu einer erhöhten Luziferaseaktivität in den Zellextrakten, wenn die Zellen mit IL-4 stimuliert wurden (Ansatz 4). Dagegen zeigte die mutierte STAT6-Variante nur 50% der Wildtyp-Aktivität (Ansatz 6). In den Zellextrakten waren gleiche Mengen von STAT6-Wildtyp und -Mutante vorhanden, wie in einem Western-Blot bestimmt wurde (Abb. 3-20E, Ansätze 3 und 3). Daher kommt der Unterschied zwischen beiden STAT6-Varianten bezüglich des Transaktivierungspotentials nicht von einem Unterschied in der Expression. Um auszuschließen, daß das unterschiedliche Transaktivierungspotential der beiden STAT6-Varianten auf einem Zelltyp-spezifischen Effekt von 293T-Zellen beruht, wurde das Transaktivierungspotential der STAT6-Mutanten in der B-Zelllinie M12.4.1 untersucht. STAT6 hat eine physiologische Rolle in B-Zellen, es vermittelt die IL-4 induzierte Expression verschiedener Gene, wie $GL\gamma 1$, $GL\epsilon$, CD23, und MHCII. Wenn M12.4.1-Zellen neben dem STAT6-abhängigen Reporter mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, erhielt man eine 3.3-fache Induktion der Luziferaseexpression nach Zytokinstimulation (Abb. 3-20F, Spur 1), was auf endogenes STAT6 zurückzuführen ist. Die Transfektion mit Wildtyp-STAT6 resultierte in einer ca. 11-fache Stimulation der Luziferaseaktivität in den Extrakten (Spur 2). Wurde jedoch die STAT6-Variante mit dem Austausch L 802, 805 zu A transfiziert, erhielt man eine ca. 6-fache Stimulation.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Mutation L 802, 805 zu A die Transaktivierungsfunktion von STAT6 beeinträchtigt. Die Mutante hat nur etwa 50% des Transaktivierungspotentials des Wildtyp-STAT6-Proteins.

Da die Transaktivierung eines Reportergens, das über multimerisierte STAT6-Bindungsstellen getrieben wird, nicht die komplexe Promotorstruktur von in Chromatin vorliegenden endogenen Genen berücksichtigt, sollte im folgenden der Beitrag des STAT6-LXXLL-Motivs für die Transaktivierung eines endogenen Zielgens analysiert werden. 293T-Zellen produzieren Eotaxin-3 in einer IL-4-abhängigen Weise, wenn sie mit funktionellem STAT6 ausgerüstet werden (Hoeck und Woisetschlager, 2001).

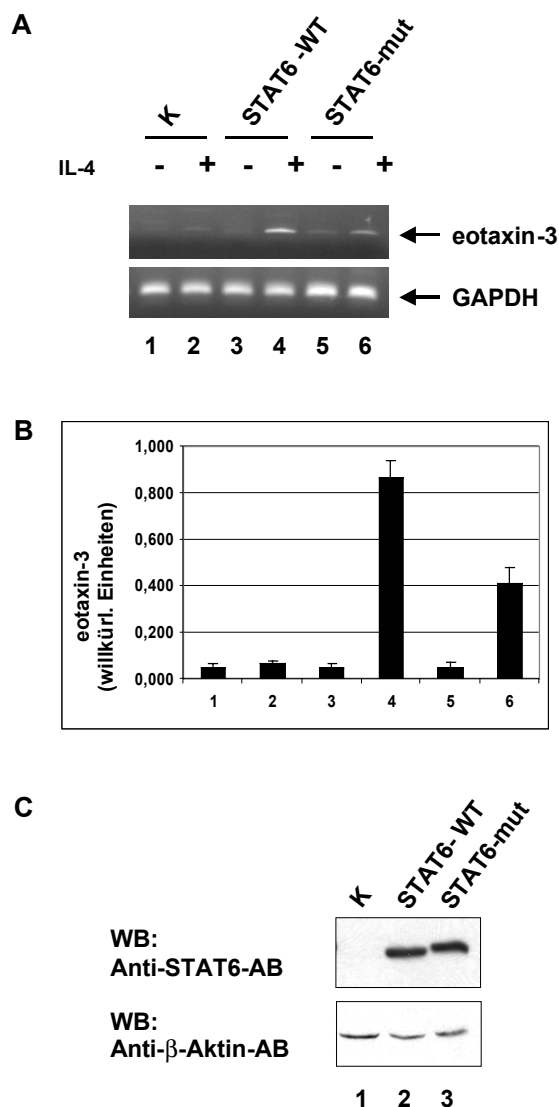


Abb. 3-21 Punktmutationen im LXXLL-Motiv führen zu einer verringerten Expression von Eotaxin-3 in 293T-Zellen

A) 293T-Zellen wurden in Doppelansätzen mit Expressionsvektoren für Wildtyp- oder mutiertes STAT6 bzw. dem leeren Expressionsvektor (2 µg) transfiziert. Die Zellen wurden wie angegeben mit IL-4 (10 ng/ml) induziert oder unbehandelt gelassen. Nach 16 Stunden wurde Gesamt-RNA präpariert und die Menge an Eotaxin-3-bzw. GAPDH-Transkript über RT-PCR bestimmt.

B) 293T-Zellen wurden wie in A beschrieben transfiziert und induziert. Nach 48 Stunden wurde die Menge von sekretiertem Eotaxin-3 in den Zellkulturüberständen in ELISA bestimmt. Menge von Eotaxin-3-Protein ist in einer willkürlichen Einheit angegeben. Die Durchschnittswerte von 3 unabhängigen Experimentreihen mit Standardabweichungen sind dargestellt.

C) Die Zellen von B wurden lysiert und über SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen STAT6 und β-Aktin analysiert.

Dieses Zellsystem erlaubt daher die Bestimmung des Transaktivierungspotentials bezogen auf die Expression eines endogenen Zielgens. 293T-Zellen wurden transient mit Wildtyp-STAT6 oder der STAT6-Mutante in Doppelansätzen transfiziert und eine Hälfte der Ansätze mit Zytokin behandelt. Die Eotaxin-Expression wurde mit RT-PCR auf RNA-Ebene bestimmt (Abb. 3-21). Es wurde Gesamt-RNA präpariert, diese in cDNA umgeschrieben und die Menge an Eotaxin-3-cDNA bzw. als Kontrolle des Haushaltsgens GAPDH über PCR mit spezifischen Primern determiniert. Wie schon eine frühere Studie gezeigt hat (Hoeck und Woisetschlager, 2001), konnte die IL-4-induzierte Eotaxin-3-Expression nur nachgewiesen werden, wenn die Zellen vorher mit STAT6 transfiziert worden waren (Abb. 3-21A, Spur 4). Die Transfektion der STAT6-Variante, in der die Leucine an Position 802, 805 zu Alanin mutiert worden waren, führte ebenso zu einer Expression von Eotaxin-3 nach IL-4-Stimulation. Es wurde eine geringere Menge detektiert (vgl. Spur 4 und 6). Um den Unterschied in der Eotaxin-3-Expression zwischen Wildtyp-STAT6 und Mutante auf Protein-Ebene zu bestätigen und besser quantifizieren zu können, wurden transfizierte 293T-Zellen für 48 Stunden mit IL-4 behandelt und die Menge an sekretiertem Eotaxin-3 in Zellkulturüberständen bestimmt.

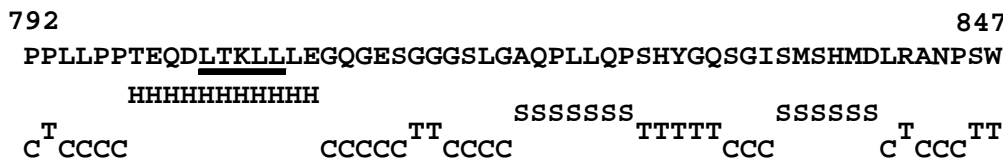
Hierfür wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt: Mikrotiterplatten, die mit Anti-Eotaxin-3-Antikörper beschichtet worden waren, wurden mit den Zellkulturüberständen inkubiert. Das gebundene Eotaxin-3 wurde mit Hilfe eines biotinylierten Anti-Eotaxin-3-Antikörpers sowie Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase detektiert. Im Überstand der Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, konnte Eotaxin-3 nicht detektiert werden, auch wenn die Zellen mit IL-4 stimuliert waren (Abb. 3-21B, Ansatz 1 und 2). Dagegen produzierten die Zellen nach Transfektion mit Wildtyp-STAT6 und Zytokin-Stimulation eine eindeutig nachweisbare Menge Eotaxin-3 (Ansatz 4). Die Transfektion mit der mutierten STAT6-Variante ermöglichte den Zellen die Produktion von Eotaxin-3 nach IL-4-Behandlung, jedoch wurde eine geringere Proteinmenge gemessen. Nur 50% der Wildtyp-Expression wurde erreicht (vgl. Ansätze 4 und 6). Um zu kontrollieren, ob die beiden STAT6-Varianten in gleichen Mengen in den Zellen vorhanden waren, wurden die Zellextrakte in einem Western-Blot-Experiment analysiert.

Wie in Abb. 3-21C gezeigt, wurden beide STAT6-Formen in vergleichbaren Mengen exprimiert. Diese Daten sind konform mit den Ergebnissen der Reporteragen-Experimente. Die STAT6-Variante, bei der das LXXLL-Motiv durch Punktmutationen zerstört ist, weist sowohl in Reporteragenexperimenten als auch bei der Expression des endogenen Zielgens Eotaxin-3 eine stark beeinträchtigte transkriptionelle Aktivität auf. Das LXXLL-Motiv leistet bei der Expression des endogenen Eotaxin-3 einen Beitrag von 50% zum Transaktivierungspotential von STAT6.

3.3.5 Struktureller und funktioneller Vergleich des LXXLL-Motivs von STAT6 mit anderen LXXLL-Motiven

Die funktionelle Charakterisierung des STAT6-LXXLL-Motivs zeigt, daß es ein wichtiges Motiv für die Interaktion mit NCoA-1 darstellt. Daher stellte sich die Frage, ob dieses Motiv strukturell und funktionell verwandt mit den bekannten Motiven ist, die beispielsweise in NCoA-1 vorkommen. Diese Motive bilden eine α -helikale Struktur mit einer durch die Leucine geformten hydrophoben Oberfläche. Um eine Vorstellung von der Struktur zu bekommen, wurde mithilfe des Programms DNASIS eine Strukturvorhersage der Sequenz des Peptid 1 gemacht (Abb. 3-22A). Das LXXLL-Motiv von STAT6 bildet höchstwahrscheinlich ebenfalls eine α -Helix aus. Ein Sequenzvergleich mit den Motiven von NCoA-1 ergab, daß das STAT6-Motiv keine offensichtliche Homologie zu den dem Kern-Motiv benachbarten Sequenzen dieser LXXLL-Motive aufweist (Abb. 3-22B). Um zu überprüfen, ob das STAT6-LXXLL-Motiv sich auch funktionell von den anderen Motiven unterscheidet, wurde untersucht, welchen Einfluss das in Abb. 3-17 beschriebene inhibitorische Peptid 1, das das STAT6-LXXLL-Motiv beinhaltet, auf die Interaktion von NCoA-1 mit nukleären Hormonrezeptoren hat, die ja bekanntlich über LXXLL-Motive von NCoA-1 vermittelt wird (Heery et al., 1997).

A



B

STAT6-MOTIV :	TEQD	<u>LTKLL</u>	LEGQ
NCoA-1 {	(1):	TSHK	<u>LVQLL</u> TFTA
	(2):	RHKI	<u>LHRLI</u> QEGS
	(3):	DHQL	<u>LRILL</u> DKDE
	(4):	ISSQ	<u>LDELL</u> CPPT
	(5):	DEKA	<u>LLEQL</u> VSFL

C

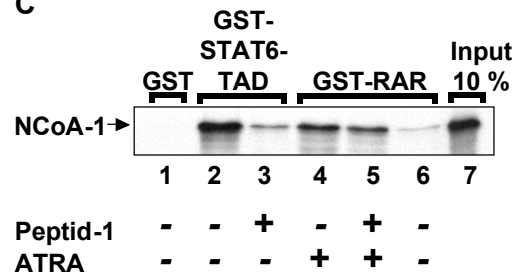


Abb. 3-22 Peptid 1 inhibiert spezifisch die LXXLL-abhängige Interaktion von STAT6 und NCoA-1, während die Interaktion des Retinsäurerezeptors mit NCoA-1 nicht verringert wird

A) Sekundärstruktur der Sequenz des Peptid 1, die ein LXXLL-Motiv enthält (Struktur-Vorhersage mittels DNASIS).

B) Vergleich des STAT6-LXXLL-Motivs mit den 5 Motiven aus NCoA-1. Die Kernsequenz der LXXLL-Motive ist unterstrichen.

C) GST, ein GST-STAT6-TAD- oder ein GST-Retinsäurerezeptor (RAR)-Fusionsprotein wurden mit [³⁵S]-markiertem NCoA-1 inkubiert. Für die Dimerisierung des Retinsäurerezeptors wurde der Ligand (10⁻⁶ M All-trans-Retinsäure, ATRA) zugegeben (Ansätze 4 und 5). In Ansätzen 3 und 5 wurde die Bindungsreaktion in Gegenwart von 20 µg Peptid 1 durchgeführt. Als Kontrolle wurde 10 % des für die Bindungsreaktion eingesetzten radioaktiven Proteins parallel analysiert (Spur 7).

Es wurde ein GST-Pulldown-Experiment mit dem Retinsäurerezeptor (RAR), der an 2 LXXLL-Motive von NCoA-1 bindet (McInerney et al., 1998), durchgeführt. GST-RAR band sehr stark an radioaktiv markiertes *in vitro* translatiertes NCoA-1 in Anwesenheit (Abb. 3-22C, Spur 4) nicht aber in Abwesenheit des Liganden (Spur 6). Peptid 1 hatte keinen Einfluss auf diese Interaktion (Spur 5). Dagegen wurde die Interaktion von GST-STAT6-TAD und NCoA-1 in Anwesenheit von Peptid 1 sehr effizient inhibiert (vgl. Spur 2 und 3). Peptid 1 hatte ebenso keinen Einfluß auf die Interaktion des Östrogen-Rezeptors und NCoA-1 (Daten nicht gezeigt). Daher ist das Peptid 1 ein spezifischer Inhibitor der STAT6-NCoA-1-Interaktion und konkurriert nicht mit den LXXLL-Motiven von NCoA-1, die die Bindung an nukleäre Hormonrezeptoren vermitteln.

Diese Daten zeigen, daß das STAT6-LXXLL-Motiv eine andere Bindungsspezifität als die LXXLL-Motive von NCoA-1 besitzt.

3.4 STAT6-NCoA-1-Interaktion als Angriffspunkt für die Inhibition der STAT6-vermittelten Transaktivierung

3.4.1 Prinzip des Ansatzes: Identifizierung von potenziell inhibitorischen Domänen in Reporterexperimenten

Der IL-4/STAT6-Signalweg hat eine wichtige Funktion bei der Regulation der humoralen Immunabwehr. IL-4 aktiviert verschiedene Programme in Immunzellen und Geweben, z. B. dendritische Zellen, Th2-Zellen, B-Zellen und Lungen-Epithelzellen, die bei der Eliminierung von extrazellulären Parasiten und Bakterien beteiligt sind. Eine erhöhte Menge von IL-4 und der damit einhergehende erhöhte IgE-Spiegel sind ein Charakteristikum allergischer Erkrankungen. Die Unterbrechung des IL-4/STAT6 Signalweiterleitung bietet sich daher als Therapieansatz bei allergischen Erkrankungen an. Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 notwendig für das volle Transaktivierungspotential von STAT6 ist. Daher könnte man diese Interaktion als einen solchen potenziellen Angriffspunkt für die Hemmung des IL-4/STAT6-Signalweges betrachten. Um dieses Konzept zu prüfen, muß geklärt werden, ob eine Hemmung der Interaktion zwischen STAT6 und NCoA-1 in der Zelle zu einer verminderten Expression von STAT6-Zielgenen führt.

Für die Hemmung der Interaktion sollen als Kompetitoren wirkende Moleküle zum Einsatz gebracht werden, und zwar erstens die aminoternale Domäne von NCoA-1, welche mit STAT6 interagiert, und zweitens die carboxyterminale Domäne von STAT6, welche für die Interaktion mit NCoA-1 essentiell ist. Abb. 3-23 zeigt das Prinzip der Strategie: Beide Moleküle sollen durch Konkurrenz um den Bindungspartner die Interaktion zwischen STAT6 und NCoA-1 aufheben.

Für die aminoternale Domäne von NCoA-1 wurde bereits gezeigt, daß sie, sofern im Überschuß in der Zelle vorhanden, die STAT6-vermittelte Transaktivierung eines transient transfizierten Reportergens wirksam inhibiert (Kapitel 3.2.9, Abb. 3-15).

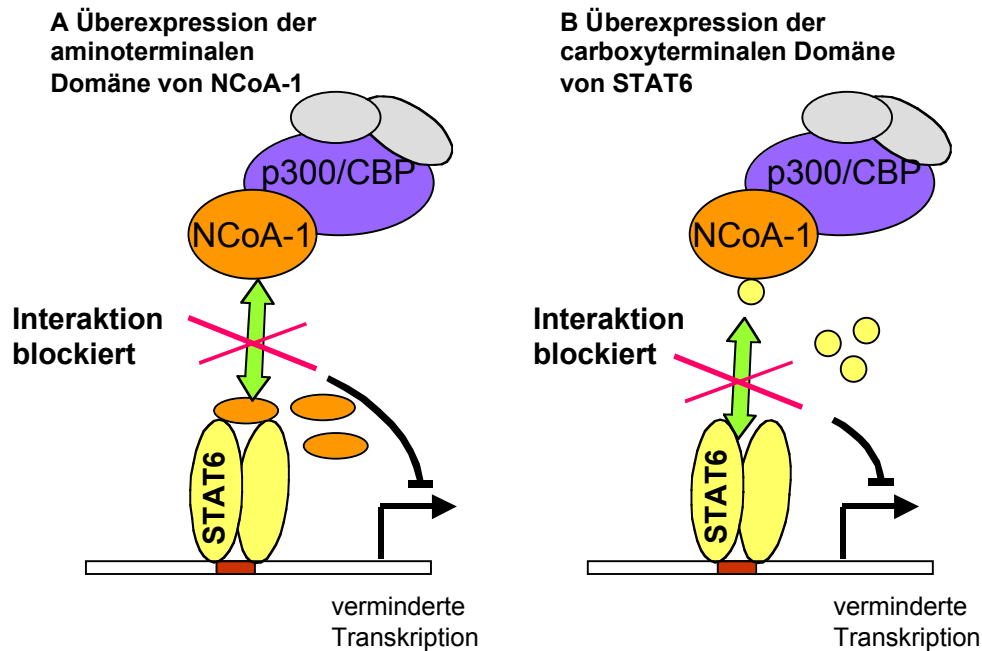


Abb. 3-23 Prinzip des inhibitorischen Ansatzes

Die STAT6/NCOA-1-Interaktion wird durch die Überexpression von den kompetitiv wirkenden Interaktionsdomänen von NCoA-1 (in A) oder STAT6 (in B) blockiert. Die Inhibition der Koaktivatorrekrutierung führt zu einer verminderten Transkription von Zielgenen.

Die carboxyterminale Domäne von STAT6 zwischen AS 794 und 814 (Peptid 1) wurde in Kapitel 3 schon als wirksamer Inhibitor der *in vitro*-Interaktion von STAT6 und NCoA-1 beschrieben. Daher erschien es möglich, daß auch Peptid 1, wenn in der Zelle im Überschuß vorhanden, die STAT6-vermittelte Transaktivierung inhibieren könnte. Das potenziell inhibitorisch wirkende Peptid sollte durch Transfektion in Zellen eingebracht werden.

Aus Gründen der Proteininstabilität wurde ein längerer Bereich von AS 792-847 von STAT6 als Fusion mit einem aminoterminalen Hexa-Myc-Anhang eingesetzt. NCI-H292-Zellen wurden transient mit diesem Konstrukt oder dem leeren Expressionsvektor zusammen mit einem Luziferase-Reporter, der 4 GAS-Elemente enthält, in Doppelansätzen transfiziert (Abb. 3-24). Ein Hälfte der Ansätze wurde mit IL-4 behandelt und die Luziferaseaktivität in Zellextrakten gemessen. Endogenes STAT6 führte zu einer starken Induktion der Luziferaseexpression nach IL-4-Stimulation (Ansatz 1). Bei Überexpression der STAT6-Domäne wurde eine signifikante Reduktion der Luziferaseaktivität auf etwa 60% des Wertes der Kontrolle beobachtet (Ansatz 2).

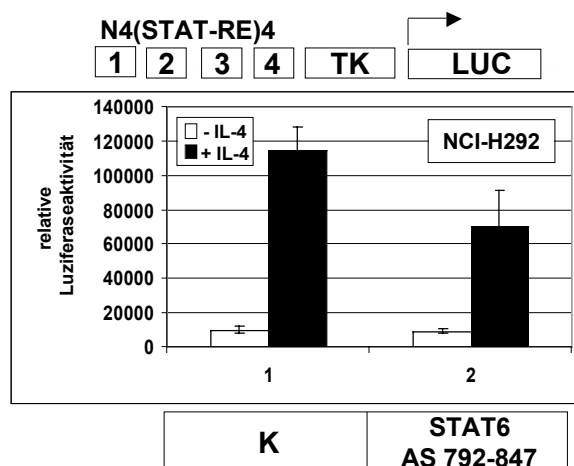


Abb. 3-24 Ein Peptid mit der Sequenz 792-847 von STAT6 inhibiert die STAT6-vermittelte Transaktivierung in Reporterexperimenten.

NCIH-292-Zellen wurden in Doppelansätzen mit 1 µg N4(STAT-RE)4 LUC, 100 ng SV40-LacZ, sowie einem Expressionsvektor für ein Hexa-Myc-Fusionsprotein mit den AS 792-847 von STAT6 bzw. als Kontrolle (K) dem leeren Expressionsvektor (400 ng) transfiziert. Die Hälfte der Ansätze wurden mit IL-4 induziert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, über die Inhibition der STAT6-NCoA-1-Interaktion die STAT6-vermittelte Transaktivierung zu reduzieren.

Die Reporterexperimente mit multimerisierten Bindungsexperimenten imitieren aber nur unzureichend die physiologische Situation am Promotor. Als nächstes wurde daher geprüft, ob endogenes STAT6, was am natürlichen, in Chromatin verpacktem Promotor mit einer Vielzahl von anderen Faktoren in Wechselwirkung tritt, in seiner Transaktivierungsfunktion gehemmt werden kann.

Da verschiedene Promotoren bezüglich der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen und daher an verschiedenen Promotoren auch verschiedene Aktivator-Koaktivator-Komplexe ausgebildet werden, muß für jedes einzelne Gen geprüft werden, ob NCoA-1 in diesem spezifischen Kontext eine Rolle spielt und ob mit den beschriebenen Polypeptiden eine Hemmung erzielt werden kann. Daher wurden zwei STAT6-Zielgene ausgewählt und mit geeigneten Zelllinien Systeme etabliert, um die IL-4-Induktion der endogenen Zielgene detektieren zu können. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Zielgene und die verwendeten Detektionsmethoden:

Zelltyp	Zelllinie	Zielgen	Detektionslevel	Detektionsmethode
B-Zelle	M12.4.1	CD23	Protein	FACS
Lungenepithelzelle	NCI-H292	12/15-Lipoxygenase	RNA	RT-PCR

Tabelle 1 Systeme zur Darstellung der IL-4-regulierten Zielgenexpression

3.4.2 Effekt der Überexpression der STAT6/NCoA-1-Interaktionsdomänen auf die Expression von CD23

STAT6 ist notwendig für die IL-4-regulierte Induktion von CD23 in B-Zellen sowie für die Bildung des ϵ -Transkripts aus dem C_H-Gen der Immunglobuline, was für den Klassen-Wechsel nach IgE obligatorisch ist. CD23 ist der niedrig-affine Rezeptor von IgE und spielt eine Rolle sowohl bei der positiven als auch der negativen Regulation der IgE-Bildung (Corry und Kheradmand, 1999). Es sollte untersucht werden, ob die IL-4-induzierte Synthese von CD23 in M12.4.1-Zellen durch Überexpression der carboxyterminalen Region von STAT6 beeinflusst werden kann.

Für die Überexpression des Hexa-Myc-Fusionsproteins mit AS 792-847 von STAT6 wurde ein bicistronischer retroviraler Expressionsvektor verwendet, der über einen zweiten Promotor gesteuert die Expression von EGFP vermittelt (Pinco(S792-847), bzw. als Kontrolle Pinco, der nur EGFP exprimiert, s. Abb. 3-25A). Mithilfe der Verpackungszelllinie 293GPG wurden Viren hergestellt, die für die Transduktion von M12.4.1-Zellen eingesetzt werden konnten. Nach der Transduktion wurden die Zellen für 24 Stunden mit IL-4 induziert und die Anzahl der Zellen bestimmt, die CD23 an der Oberfläche tragen. Hierfür wurden die Zellen mit einem Phycoerythrin-gekoppelten Anti-CD-23-Antikörper gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Abb. 3-25 zeigt das Ergebnis der FACS-Messung:

Von den Zellen, die mit Pinco transduziert worden waren, exprimierten ca. 79% EGFP (Abb. 3-25C), von den Zellen mit Pinco(S792-847) waren es nur 52% (Abb.3-25C). 73% der Kontroll-Zellen, die nicht transduziert worden waren, exprimierten CD23 nach der Stimulation mit IL-4 (Abb. 3-25B). Von den Zellen, die mit dem Kontrollvektor Pinco transfiziert wurden, exprimierten 80% (Abb. 3-25C) der grün fluoreszierenden Zellen CD23. Dies bedeutet, daß entweder die viralen Plasmidsequenzen oder die EGFP-Expression eine Erhöhung der CD23-Expression bewirkt (von 73% auf 80%). Nahezu den gleichen Wert (78%) wie bei der Kontrolle erhielt man von den Zellen, die das Fusionsprotein mit AS 792-847 von STAT6 exprimierten (Abb. 3-25C). Somit hatte die Überexpression der STAT6-Domäne keinen inhibitorischen Effekt auf die CD23-Expression.

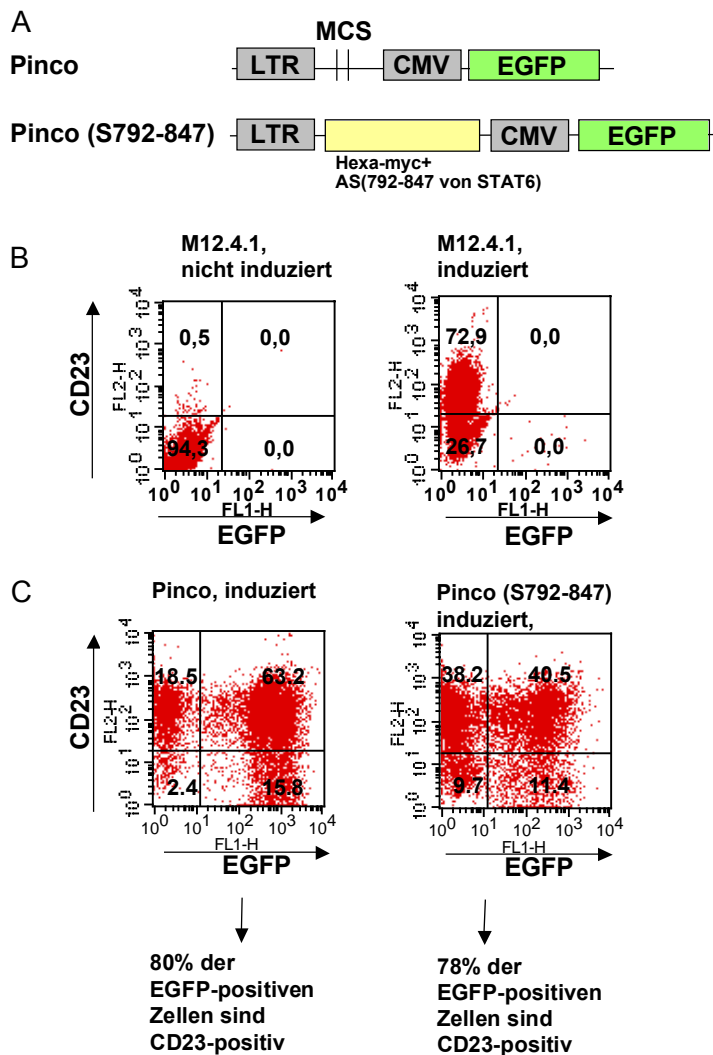


Abb. 3-25 Die IL-4-induzierte Expression von CD23 wird durch Überexpression der carboxy-terminalen Domäne von STAT6 nicht beeinflusst

A) Schematische Darstellung des Pinco und Pinco (S792-847)

B, C) M12.4.1-Zellen wurden mit Pinco bzw. Pinco (S792-847) transduziert. Für die Induktion der CD23-Expression wurden nicht transduzierte und die transduzierten Zellen für 16 Stunden mit IL-4 induziert. CD23 auf der Oberfläche der Zellen wurde mit einem PE-markierten Anti-CD23-Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden durch FACS analysiert. Der prozentuale Anteil der Zellen pro Quadrant ist jeweils angegeben.

B) nicht induzierte (links) und induzierte (rechts) nicht transduzierte M12.4.1

C) Induzierte mit Pinco transduzierte Zellen (links), induzierte mit Pinco (S792-847) transduzierte Zellen, die ein Hexa-Myc-Fusionsprotein mit den AS 792-847 von STAT6 exprimieren (rechts).

Der Effekt der aminoterminalen Region von NCoA-1 wurde über die gleiche Vorgehensweise untersucht. Auch die Überexpression dieser Domäne blieb ohne Effekt auf die IL-4-induzierte CD23-Expression (Daten nicht gezeigt).

Mit diesem Experiment konnte nicht nachgewiesen werden, daß die STAT6/NCoA-1-Interaktion an der IL-4-regulierten Expression von CD23 beteiligt ist. Möglicherweise wurden die potenziell inhibitorischen Domänen von STAT6 und NCoA-1 nicht in ausreichenden Mengen gebildet.

3.4.3 Effekt der Überexpression der aminoterminalen Region von NCoA-1 auf die Expression der 12/15-Lipoxygenase

12/15-Lipoxygenase ist ein Zielgen von STAT6, das in Lungenepithelzellen transkribiert wird, wenn die Zellen mit IL-4 und IL-13 behandelt werden.

Die Lipoxygenase führt zur Bildung von Lipidperoxiden in der Plasmamembran, die die nichtspezifische Immunabwehr erhöhen (Conrad und Lu, 2000).

Es wurde untersucht, ob die Überexpression der aminoterminalen Region von NCoA-1 einen Effekt auf die Transkription der 12/15-Lipoxygenase hat. NCI-H292-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor bzw. dem NCoA-1-Konstrukt in Doppelansätzen transient transfiziert. Die Transfektionseffizienz betrug 50-70%. Eine Hälfte der Ansätze wurde über Nacht mit IL-4 stimuliert. Die Menge an 12/15-Lipoxygenase-Transkript wurde in der Gesamt-RNA über semiquantitative RT-PCR bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde zunächst mit Hexamer-Primern revers transkribiert und die Lipoxygenase-cDNA mit sequenzspezifischen Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert.

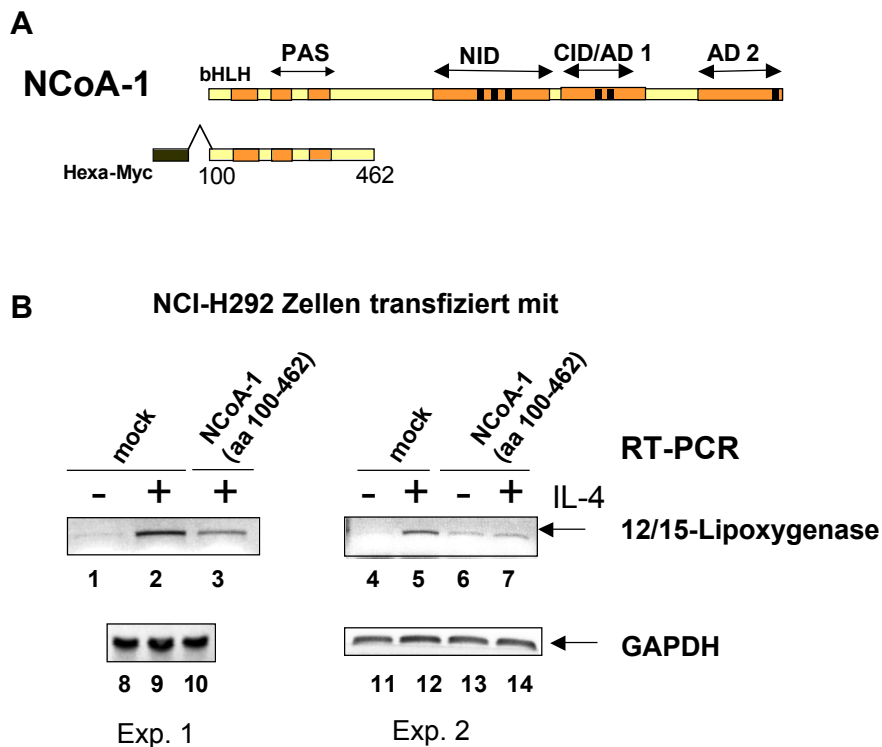


Abb. 3-26 Die Überexpression der aminoterminalen Region von NCoA-1 (AS 100-462) wirkt inhibitorisch auf die IL-4-induzierte Expression der 12/15-Lipoxygenase.

A) Schematische Darstellung der Struktur von NCoA-1 und des Hexa-Myc-Fusionskonstruktes mit dem Bereich AS 100-462 von NCoA-1.

B) NCIH-292-Zellen wurden transient mit einem Hexa-Myc-NCoA-1 Konstrukt, das für die AS 100-462 kodiert bzw. dem leeren Kontrollvektor transfiziert. Nach 16-Sunden-Induktion der Zellen mit IL-4 wurde Gesamt-RNA präpariert. Diese wurde mit Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA der 12/15-Lipoxygenase sowie der GAPDH wurden mit spezifischen Primern amplifiziert. Zwei unabhängige Experimente 1 (Spur 1-3, Spur 8-10) und 2 (Spur 4-7, Spur 11-14) sind dargestellt.

Als Kontrolle wurde die cDNA von GAPDH aus der gleichen cDNA-Präparation amplifiziert. Wie in Abb. 3-26 dargestellt, induziert IL-4 eine starke Lipoxygenase-Expression in den Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren (mock, Spur 2). Die Überexpression der dominant negativen Domäne AS 100-462 von NCoA-1 führte zu einer Reduktion der IL-4-induzierten Lipoxygenase-Expression (Spur 3).

Dies wurde auch in einem zweiten unabhängigen Experiment beobachtet. Wiederum führte die Überexpression der inhibitorischen Domäne zu einer Reduktion der Lipoxygenase-Expression (Spur 7) im Vergleich zur Kontrolle (Spur 5). Diese Unterschiede in der Lipoxygenase-Expression gründeten aber nicht auf Unterschiede in der Qualität oder Menge der RNA bzw. cDNA, da in allen Ansätzen die Menge an amplifiziertem GAPDH-Produkt gleich blieb (Spuren 8-10 und Spuren 11-14). Dieses Experiment zeigt, daß durch Überexpression der NCoA-1-Domäne eine Reduktion der STAT6-vermittelten 12/15-Lipoxygenase-Expression erzielt werden kann und somit der Koaktivator NCoA-1 für die Induktion der 12/15-Lipoxygenase notwendig ist.

3.4.4 Effekt der Überexpression der carboxyterminalen Region von STAT6 auf die Expression der 12/15-Lipoxygenase

Als zweites sollte die carboxyterminalen Region von STAT6 überexprimiert werden. Bei transienter Transfektion dieser Domäne in NCI-H292-Zellen wurde kaum ein Effekt auf die Expression der 12/15-Lipoxygenase beobachtet. Daher wurde das Hexa-Myc-Fusions-Konstrukt mit AS 792-847 von STAT6 stabil in die Zellen eingebracht und stark exprimierende Einzelklone getestet. Hierfür wurde wieder das bicistronische Pinco-Vektorsystem verwendet (s. Abb. 3-27A). Stark exprimierende Klone können hierbei über die EGFP-Fluoreszenz detektiert werden. Es wurde ein EGFP-exprimierender Kontrollklon und mehrere Klone selektiert, die das STAT6-Peptid exprimierten. Die Expressionsstärke des STAT6-Peptids in diesen Klonen wurden im Western-Blot bestimmt (Abb. 3-27B).

Leider wurde nur ein einziger Einzelklon (Klon 1) identifiziert, der das STAT6-Peptid stark exprimierte (Spur 3). Im Vergleich zum endogenen STAT6 wurde dieses Peptid aber nur halb so stark exprimiert. Das Peptid ist wahrscheinlich weniger stabil als das Volllängenprotein. Klon 1 wies eine ähnliche EGFP-Expression auf wie der Kontrollklon (siehe FACS-Messung, Abb. 3-27C). Die Transkription der 12/15-Lipoxygenase wurde nach IL-4-Stimulation in diesem stark exprimierenden Klon und im Kontrollklon über semiquantitative RT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Der EGFP-exprimierende Kontrollklon wies eine deutlich erhöhte Lipoxygenase-Expression im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen auf (Abb. 3-27D, vgl. Spur 2 und Spur 3).

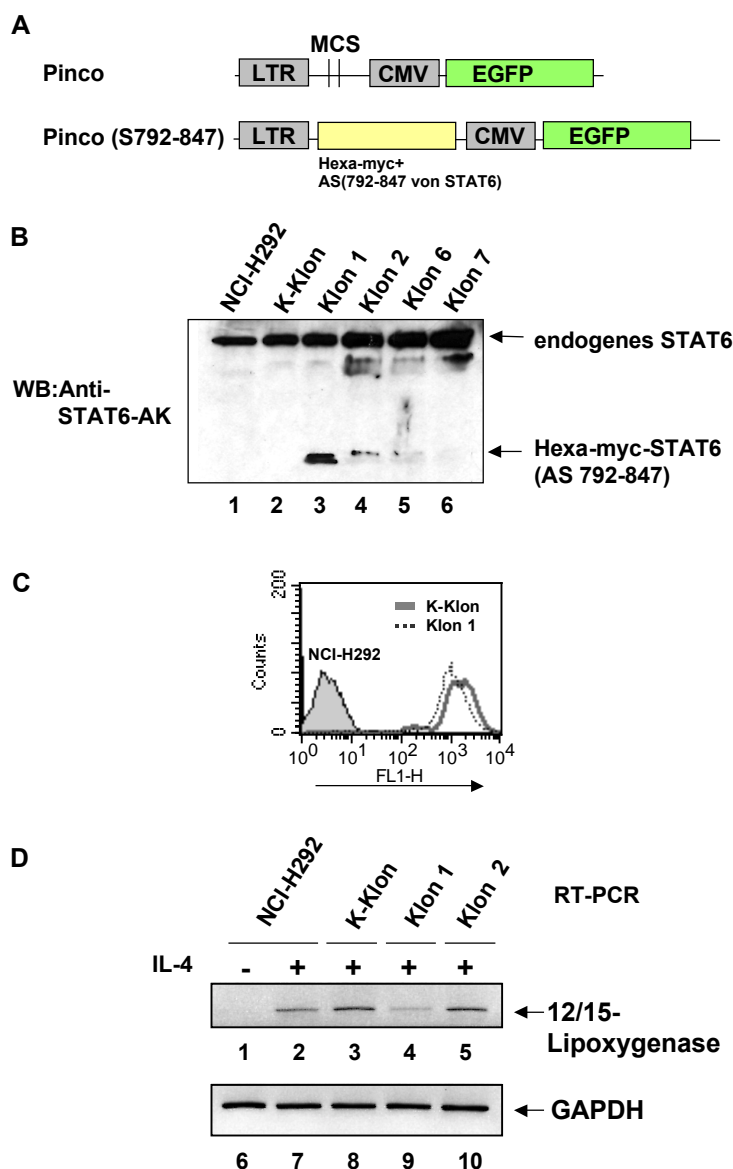


Abb. 3-27 Ein Klon, der die carboxyterminale Region von STAT6 (AS 792-847) exprimiert, weist eine stark verringerte Lipoxygenase-Expression auf.

A) Darstellung von Pinco und Pinco (S792-847).

B) NCI-H292-Zellen wurden mit beiden Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden vereinzelt und ein Klon der Pinco- und mehrere Klone der Pinco (S792-847)-Transfektion selektiert. Das Gesamtprotein der Klone (Spur 2-6) bzw. der nicht transfizierten Zellen (Spur 1) wurden in einem Western-Blot mit Anti-STAT6-Antikörper analysiert.

C) FACS-Analyse. Die durch die EGFP-Proteine resultierende Fluoreszenz der Zellen wurde gemessen.

D) Die Zellen wurden für 16 Stunden mit IL-4 induziert. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und daraus die 12/15-Lipoxygenase (obere Tafel) bzw. GAPDH-cDNA (untere Tafel) spezifisch amplifiziert.

Diese Verstärkung kann zum einen durch die virale DNA, zum anderen durch die EGFP-Expression induziert worden sein. Klon 1 (Spur 4) zeigte eine deutlich verringerte 12/15-Lipoxygenase-Expression im Vergleich zum Kontrollklon (Spur 3) und zu den nichttransfizierten Zellen (Spur 2). Klon 2, der kaum STAT6-Peptid exprimiert, zeigte diesen Effekt nicht (Spur 5).

Obwohl durch die Transfektion mit der viralen DNA eine Erhöhung der Lipoxygenase-Expression induziert wurde, wurde durch die stark hemmende Wirkung des STAT6-Peptids in Klon 1 die Lipoxygenase-Expression gegenüber der Kontrolle reduziert. Dies bedeutet, daß auch das STAT6-Peptid als Inhibitor der STAT6-vermittelten Transaktivierung der 12/15-Lipoxygenase in Zellen wirkt. Somit konnte über zwei verschiedene Ansätze gezeigt werden, daß die Interaktion von NCoA-1 und STAT6 eine Zielstruktur für die Hemmung der STAT6-vermittelten Lipoxygenase-Expression darstellt.

3.4.5 Aufbau eines Test-Systems für die (Hochdurchsatz)-Suche von Substanzen, die die Interaktion von NCoA-1 und STAT6 hemmen

Um niedermolekulare Substanzen identifizieren zu können, die die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 hemmen können und die sich für eine Applikation *in vivo* eignen, sollte ein System aufgebaut werden, in dem die Bindung von STAT6 und NCoA-1 in Gegenwart solcher Substanzen leicht meßbar ist. Hierfür wurde ein ELISA-System entwickelt (Abb. 3-28A): Mikrotiterplatten wurden mit gereinigtem GST-STAT6-TAD-Fusionsprotein beschichtet und nicht gebundenes Protein durch Waschen entfernt. Nicht besetzte Bindungsstellen wurden mit BSA-Blockierungslösung abgesättigt und gereinigtes Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein (AS 213-462) zugegeben. Gebundenes NCoA-1 wurde nun über Maus-Anti-Histidin-Antikörper und Peroxidase-gekoppeltem Anti-Maus-Antikörper detektiert. Abb. 3-28B zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs: NCoA-1 bindet spezifisch an GST-STAT6 Ansatz 1, schwarzer Balken) und nur in geringen Mengen an die Mikrotiterplatten (Ansatz 1, gestreifter Balken).

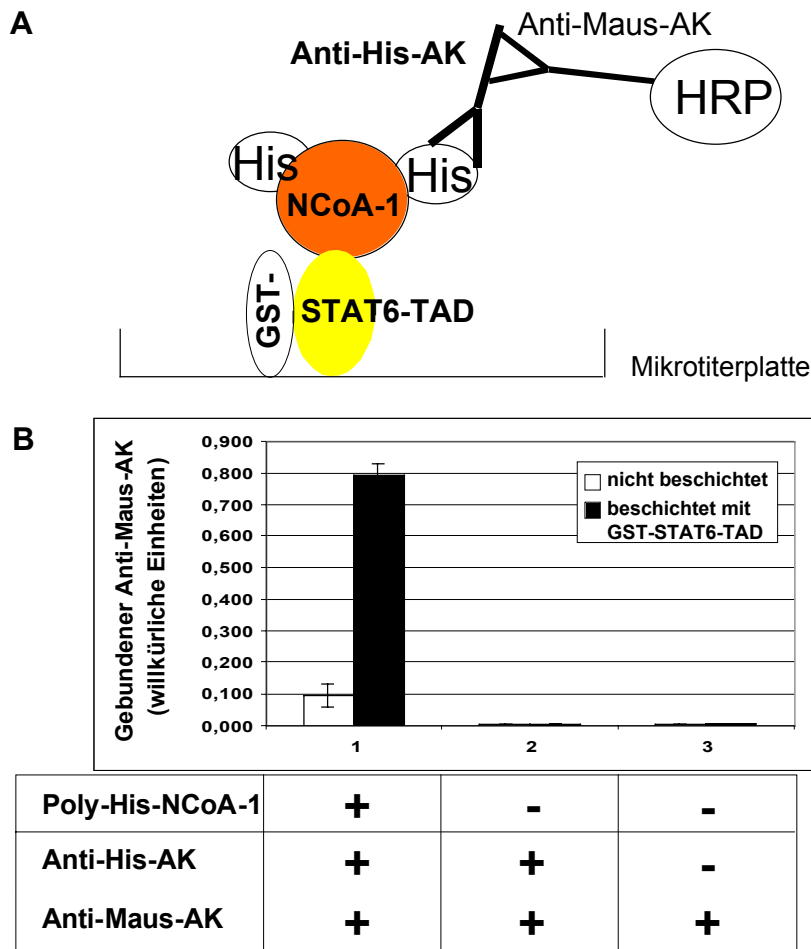


Abb. 3-28
Darstellung der
STAT6-NCoA-1-Interaktion mit einem
ELISA

A) Schematische Darstellung des Bindungs-ELISA aus GST-STAT6 (AS 677-847) und NCoA-1 (AS 213-462)

B) Mikrotiter-Platten wurden wie in der Tabelle angegeben mit 500 ng gereinigtem GST-STAT6-Fusionsprotein beschichtet. 250 ng Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein wurde zugegeben. Gebundenes NCoA-1 wurde über spezifische Antikörper detektiert.

Die verwendeten Antikörper binden nicht unspezifisch an GST-STAT6 oder die Mikrotiterplatte (Ansätze 2 und 3).

Es besteht auch die Möglichkeit, diesen ELISA in umgekehrter Richtung anzuordnen. Das Poly-Histidin-NCoA-1-Fusionsprotein aus bakteriellen Rohlysaten wurde an Ni-NTA-Platten gekoppelt. Gereinigtes GST-STAT6-TAD-Fusionsprotein wurde zugegeben, und spezifisch gebundenes STAT6 über einen Anti-GST-Antikörper detektiert (Abb. 3-29).

Somit wurde ein System etabliert, mit dem die STAT6/NCoA-1-Interaktion in Gegenwart von Hemmstoffen untersucht werden kann und das eine Quantifizierung der relativen Menge von gebundenem Interaktionspartner ermöglicht.

Um dieses System zu testen, wurden die Peptide, die in Kapitel 3.3.1 beschrieben wurden, mit dieser Methode auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Bindung getestet.

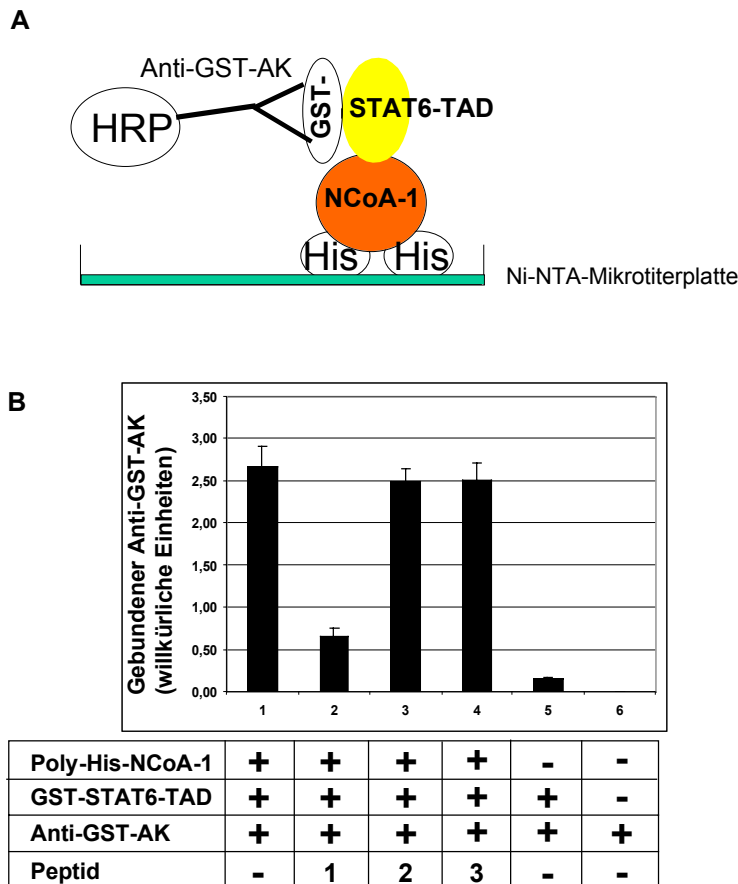


Abb. 3-29 Peptid 1 inhibiert spezifisch die STAT6/NCOA-1-Interaktion in einem ELISA

A) Schematische Darstellung des ELISA

B) Poly-Histidin-NCOA-1 aus bakteriellen Rohlysaten wurde an Ni-NTA-Mikrotiterplatten gebunden. GST-STAT6 (250 ng) wurde in An- und Abwesenheit der Peptide 1-3 (jeweils 20 µg) wie angegeben zugegeben. Gebundenes GST-STAT6 wurde über einen Peroxidase-gekoppelten Anti-GST-Antikörper detektiert.

In diesem Experiment wurde Poly-Histidin-NCOA-1 aus Rohlysaten an Ni-NTA-Platten immobilisiert (Abb. 3-29). Der Bindungspartner GST-STAT6-TAD wurde mit einem Anti-GST-Antikörper detektiert. GST-STAT6 band spezifisch an NCoA-1 (Ansatz 1). Wurde die Bindungsreaktion in Gegenwart von einem Überschuß von Peptid 1 (Ansatz 2) durchgeführt, so wurde die Menge an gebundenem GST-STAT6-Fusionsprotein auf ca. 23% des Kontrollwerts reduziert. Die Peptide 2 (Ansatz 3) und 3 (Ansatz 4) hatten keinen Einfluß auf die Menge an gebundenem GST-STAT6-Fusionsprotein. Weder GST-STAT6-TAD noch der verwendete GST-Antikörper banden unspezifisch an die Platte (Ansatz 5 und 6). Dies bestätigt das Ergebnis der Peptide in GST-Pulldown-Experimenten (Kapitel 3.1).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das beschriebene ELISA-System sich für die Identifizierung von Substanzen, die die Bindung von STAT6 und NCoA-1 inhibieren können, eignet.

4. Diskussion

4. 1 Regulation der Genexpression

Die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus erfordert eine exakte Regulation der Gene in räumlichen und zeitlichen Expressionsmustern. Dabei muß die Aktivität der Gene dynamisch auf die jeweiligen Bedingungen, die durch externe Stimuli, das Entwicklungsstadium und den Metabolismus vorgegeben sind, abgestimmt werden. Nach der gängigen Modellvorstellung schalten diese Signale in der Zelle verschiedene Signaltransduktionskaskaden an, welche schließlich im Zellkern auf der Ebene von Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren zusammenlaufen und durch deren komplexe Wechselwirkungen zu einer auf die jeweiligen Bedingungen feinabgestimmten transkriptionellen Antwort integriert werden (Lemon und Tjian, 2000). Die Untersuchung des Zusammenwirkens von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren ist daher der Schlüssel zum Verständnis der komplexen Regulation der Genexpression.

4.2 Koaktivierung der STAT-Proteine durch p160/SRC-Proteine

Ziel dieser Arbeit ist es, den Mechanismus der Transaktivierung durch STAT5a, STAT5b und STAT6 aufzuklären. Hierfür müssen Koaktivatoren der STAT-Proteine charakterisiert und deren spezifische Wechselwirkungen analysiert werden. Im zweiten Schritt sollen essentielle Interaktionen zwischen STAT-Proteinen und Koaktivatoren definiert werden, die als Zielstruktur zur Hemmung der STAT-Signalwege genutzt werden können. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der p160/SRC-Familie bei der STAT5- und STAT6-vermittelten Transaktivierung ermittelt.

Aufgrund der vorliegenden Experimente wird postuliert, daß NCoA-1 als Koaktivator von STAT5a, STAT5b und STAT6 wirkt.

Eine Untersuchung der Beteiligung dieser Koaktivatorfamilie bei der STAT5-aktivierten Genexpression erschien ursprünglich dadurch begründet, daß Knockout-Mäuse, bei denen die NCoA-1-Gene deletiert sind, einen ähnlichen Phänotyp in der Brustdrüse aufweisen wie Mäuse mit deletierten STAT5-Genen. In jungen Weibchen von STATa und/oder STAT5b-Knockout-Mäusen werden im Vergleich zu Kontrollmäusen weniger Verzweigungen und Endknospen der Milchgänge ausgebildet (Teglund et al., 1998). Stillende Weibchen ohne funktionelle STAT5a-Gene haben post-Partum (12 h nach dem Werfen) wesentlich weniger Alveoli in der Brustdrüse als Kontrollmäuse, außerdem werden weniger Milchproteine gebildet. Auch bei den NCoA-1 *-/-* Mäusen ist die Elongation der Drüsen-Gänge und die Entwicklung der Alveoli gestört. (Xu et al., 1998). Die Störungen in der Morphogenese der Brustdrüsen von NCoA-1 *-/-* Mäusen wurden bisher alleine durch Störungen in der durch Steroidhormone induzierten Gen-Expression begründet, denn NCoA-1 wirkt als Koaktivator der Steroidhormonrezeptoren. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint es möglich, daß auch Defekte in der Funktion von STAT5, die mit dem Fehlen seines Koaktivators NCoA-1 einhergehen, zu dem Phänotyp in der Brustdrüse dieser Mäuse beitragen.

STAT5a und STAT5b haben eine fast identische Proteinsequenz. Die meisten Unterschiede gibt es in der Transaktivierungsdomäne (Liu et al., 1995), in eben der Region, die den Kontakt zu Koaktivatoren herstellt. In dieser Arbeit wurde demonstriert, daß NCoA-1 für beide STAT5-Varianten stimulierend auf die Transaktivierung der β -Kasein-Expression wirkte, während NCoA-2 und NCoA-3 keinen deutlichen Effekt zeigten (Abb. 3-1).

In mehreren Studien wurde beschrieben, daß in der Zelle verschiedene vorgeformte Koaktivatorkomplexe mit unterschiedlicher p160/SRC-Ausstattung vorkommen, die entsprechend den Erfordernissen von den jeweiligen Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden (Korzus et al., 1998; McKenna et al., 1998; Torchia et al., 1997). STAT1 rekrutiert beispielsweise einen Komplex, der NCoA-3 enthält (Korzus et al., 1998), wohingegen STAT3 für die Transaktivierung seiner Zielgene einen Komplex benötigt, in dem NCoA-1 vorhanden ist (Giraud et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden keine Hinweise dafür gefunden, daß STAT5a und STAT5b jeweils unterschiedliche p160/SRC-Koaktivator-Komplexe bevorzugen, obwohl das aufgrund der Sequenzunterschiede in den Transaktivierungsdomänen erwartet wurde. Unterschiede in der Koaktivatorrekrutierung könnten jedoch bei anderen Koaktivator-Familien und anderen STAT5-Ziel-Genen bestehen. Eine Möglichkeit, um Koaktivatoren identifizieren zu können, die nur durch eine STAT5-Variante rekrutiert werden, besteht in der affinitätschromatographischen Analyse von Zellextrakten mit immobilisierten STAT5-Transaktivierungsdomänen. Mit dieser Methode können Proteine, die ein unterschiedliches Bindungsverhalten für die Transaktivierungsdomäne von STAT5a bzw. STAT5b haben, identifiziert werden. Diese Experimente werden gegenwärtig in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

NCoA-1 wirkte sowohl auf dem β -Kasein-Promotor, als auch im GAL4-System als Koaktivator der STAT5-Transaktivierungsdomäne (Abb. 3-1 und 3-2). NCoA-2 und NCoA-3 zeigten diesen Effekt nicht. Es kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden, daß NCoA-2 und NCoA-3 eine Bedeutung bei der STAT5-vermittelten Transaktivierung haben. Denkbar wäre, daß diese beiden Faktoren in HeLa-Zellen nicht limitierend sind und daher eine Kotransfektion keine weitere Stimulation der STAT5-vermittelten Transaktivierung induzieren kann. Die Expressionsstärke der p160/SRC-Gene unterscheidet sich in HeLa-Zellen jedoch nicht wesentlich, die Koaktivatorproteine sind in HeLa-Zellen in vergleichbaren Mengen vorhanden (Torchia et al., 1997). Um absolute Gewissheit über die Bedeutung p160/SRC-Faktoren für die STAT5-vermittelte Transaktivierung zu bekommen, könnten beispielsweise die endogenen Promotor-gebundenen Koaktivatoren mithilfe der Chromatin-Immunpräzipitations-Technik präzipitiert werden. Durch eine anschließende PCR-Reaktion mit spezifischen Primern könnte untersucht werden, ob diese Faktoren tatsächlich an den β -Kasein-Promotor gebunden haben.

NCoA-1 wirkt als Koaktivator der transaktivierenden Domänen von STAT5a, STAT5b und STAT6, denn die transkriptionelle Aktivität von GAL-4-DBD-Fusionsproteinen mit diesen verschiedenen Domänen wurden durch NCoA-1 sehr stark erhöht (Abb. 3-2, Abb. 3-9).

In Übereinstimmung mit verschiedenen Studien wurde beobachtet, daß die komplexer aufgebaute STAT6-Transaktivierungsdomäne eine wesentlich stärkere Aktivität als die Transaktivierungsdomänen von STAT5a und STAT5b im GAL4-System aufweist und daß das Potential der STAT6-Transaktivierungsdomäne abhängig vom Zelltyp variiert, was auf eine Beteiligung von Zelltyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren hindeutet (Moriggl et al., 1997), (Abb. 3-2, 3-9 und nicht gezeigte Daten).

Unabhängige Studien haben postuliert, daß die STAT6-Transaktivierungsdomäne aus verschiedenen autonomen Elementen aufgebaut ist (Lu et al., 1997; Moriggl et al., 1997), z. B. wurden 2 autonome Domänen in den Bereichen AS 677-715 und 753-810 isoliert (Goenka et al., 1999). In dieser Arbeit konnte der molekulare Mechanismus hierfür aufgeklärt werden: es wurde demonstriert, daß diese Bereiche die Interaktionsdomänen für p300/CBP bzw. NCoA-1 enthalten (Abb. 3-12). Die 2. autonome Region, die die Rekrutierung von NCoA-1 vermittelt, hat als Fusion mit GAL4-DBD eine relativ schwache Aktivität. Diese Aktivität wird jedoch sehr stark durch NCoA-1 stimuliert (Abb. 3-9). Ein Vergleich dieser GAL4-Fusion in 293T-Zellen und NCI-H292-Zellen bestätigt, daß das Potential dieser STAT6-Domäne unmittelbar von NCoA-1 abhängt (Abb. 3-19). Dies wird dadurch deutlich, daß in NCI-H292-Zellen, die einen niedrigen NCoA-1-Spiegel haben, die GAL4-STAT6-Fusion im Vergleich zu GAL4-DBD wenig aktiv ist, während sie in 293T-Zellen, die endogen weit mehr NCoA-1 aufweisen, eine größere Aktivität hat (Abb. 3-19 und nicht gezeigte Daten).

Moriggl et al. analysierten die Aktivität der carboxyterminalen STAT6-Transaktivierungs-Domäne (AS 792-847) für die Induktion eines β -Kasein-Luziferase-Reporters im Kontext des STAT5-Moleküls, d.h. ein großer Teil der STAT5-Transaktivierungsdomäne wurde deletiert (STAT5 Δ 750) und mit dem carboxyterminalen Bereichen der STAT6-Transaktivierungsdomäne ersetzt (Moriggl et al., 1997). An dieser Stelle muß noch einmal betont werden, daß STAT5 ein starker Aktivator des β -Kasein-Promotors ist, die STAT5-Variante ohne die transaktivierende Domäne (STAT5 Δ 750) hat dagegen keine transkriptionelle Aktivität.

Interessanterweise ist eine STAT5-Chimäre mit der carboxyterminalen STAT6-Transaktivierungsdomäne (STAT5 Δ 750 + STAT6 AS 792-847) genauso aktiv wie das Wildtyp-STAT5-Protein. Die Domäne 792-847 von STAT6 kann folglich die Funktion der STAT5-Transaktivierungsdomäne bei der β -Kasein-Expression ersetzen. Außerdem wird deutlich, daß die Aktivität der STAT6-Domäne von AS 792-847 stark vom Promotor-Kontext beeinflusst wird, denn im GAL4-System besitzt die Domäne nur eine geringe Aktivität. Die Daten von Moriggl et al. können aufgrund der vorliegenden Experimente ganz neu interpretiert werden: Die Rekrutierung von NCoA-1 an DNA-gebundenes STAT5 reicht für die Initiation der β -Kasein-Expression aus. Aufgrund dieser Ergebnisse wird postuliert, daß die Rekrutierung von NCoA-1 eine wichtige Funktion der STAT5-Transaktivierungsdomäne darstellt.

4.3 Interaktionen

In Koimmunpräzipitationen konnte gezeigt werden, daß STAT5a und NCoA-1 in Zellen einen Komplex bilden (Abb. 3-3). STAT5 interagiert präferentiell mit einer im SDS-Gel höher migrierenden Form von NCoA-1, was auf sekundäre Modifikationen hindeutet. Ob es sich um eine direkte Interaktion handelt, konnte nicht geklärt werden. Beim Einsatz von bakteriellen GST-STAT5-Fusionsproteinen und *in vitro* synthetisiertem NCoA-1-Protein wurde keine Interaktion von STAT5 und NCoA-1 beobachtet (Daten nicht gezeigt), was wiederum für das Erfordernis von Modifikationen sprechen würde.

In der Literatur gibt es mehrere Studien darüber, daß NCoA-1 posttranslational modifiziert wird. Beispielsweise wurden an verschiedenen Stellen des Proteins Serin- und Threonin-Phosphorylierungen gefunden, die teilweise durch MAP-Kinasen katalysiert werden (Rowan et al., 2000). Außerdem wird NCoA-1 durch CBP acetyliert (Chen et al., 1999a). Diese Acetylierung verhindert die Wechselwirkung mit nukleären Hormonrezeptoren. Auch bei STAT5 wurden sekundäre Modifikationen gefunden: Die Serin-Phosphorylierung von AS 779 bei STAT5a und AS 730 bei STAT5b erhöht das Transaktivierungspotential (Park et al., 2001).

Eine neue Studie beschreibt Glycosylierungen von STAT5, die regulatorisch auf die transkriptionelle Aktivität von STAT5 einwirken (Christina Gewinner unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung). Über sekundäre Modifikationen von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren können somit deren Wechselwirkungen reguliert werden.

Prolaktin führt neben dem JAK/STAT-Signalweg auch zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs (Piccoletti et al., 1994). Es besteht also die Möglichkeit, daß der Prolaktin-Stimulus Modifikationen in NCoA-1 oder STAT5 induziert, die für die direkte Interaktion notwendig sind. Dies würde einen neuartigen Regulationsmechanismus des STAT-Signalweges auf der Ebene von Koaktivatoren darstellen. Ob und welche sekundären Modifikationen Voraussetzung für eine Interaktion von NCoA-1 und STAT5 sind, wird momentan überprüft.

In zwei unabhängigen Studien wurde beschrieben, daß eine α -Helix in der STAT5-Transaktivierungsdomäne (As 751-761) einen entscheidenden Beitrag zur transkriptionellen Aktivität leistet (Callus und Mathey-Prevot, 2000; Wang et al., 2000a). Es liegt daher nahe, zu untersuchen, ob eben diese Region in die Rekrutierung von NCoA-1 involviert ist. Diese Möglichkeit soll in weiteren Koimmunpräzipitationsexperimenten durch den Einsatz von STAT5-Deletionsmutanten, bei denen diese Helix fehlt, geprüft werden. Eine andere Erklärung dafür, daß *in vitro* keine Interaktion von STAT5 und NCoA-1 gefunden wurde, besteht darin, daß STAT5 nicht direkt mit NCoA-1 interagiert sondern über den Kontakt zu anderen Koaktivatoren einen Komplex rekrutiert, in dem NCoA-1 enthalten ist.

Im Gegensatz zu STAT5 zeigten die Interaktionsstudien von STAT6 und NCoA-1 eindeutig, daß STAT6 direkt an NCoA-1 bindet, dies wurde *in vitro* und in Zellen demonstriert (Abb. 3-8, 3-11). Für NCoA-2 und NCoA-3 konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 3-8). Dies bestätigt die Annahme, daß NCoA-1 im Gegensatz zu den anderen p160/SRC-Koaktivatoren eine besondere Funktion bei der STAT6-vermittelten Transaktivierung ausübt.

NCoA-1 enthält verschiedene konservierte Domänen, die die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, z. B. den nukleären Hormonrezeptoren vermitteln.

Die Bindungsstelle von STAT6 wurde auf eine aminoternale Region von NCoA-1 zwischen AS 257-420 kartiert, die die PAS-B-Domäne sowie einen Teil der Serin/Threonin (S/T)-reichen Region enthält (Abb. 3-13). Weder die bHLH/PAS-Domäne alleine (AS 1-361), noch die S/T-reiche Region (AS 361-571) zeigten eine Bindung an STAT6. In verschiedenen Studien wurde beschrieben, daß diese Domänen mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren können: Der Bereich AS 1-361 bindet TEF4 und p53 *in vitro* (Belandia und Parker, 2000; Lee et al., 1999), der Bereich AS 361-568 interagiert mit dem Serum-response-Factor (Kim et al., 1998), STAT3 bindet an die Region AS 361-782 von NCoA-1 (Giraud et al., 2002). Für die Interaktion mit STAT6 sind aber beide Bereiche, nämlich die PAS-B-Domäne und die S/T-reiche Region unbedingt notwendig und ausreichend für eine direkte Interaktion, was *in vitro* in GST-Pulldown-Experimenten als auch *in vivo* (in einem Hefe-Zweihybridsystem, Daten nicht gezeigt) beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, daß die Bindung an STAT6 von einer besonderen Proteinoberfläche vermittelt wird, die eben aus Bereichen der beiden genannten Regionen gebildet wird.

In früheren Studien wurde beobachtet, daß Bereiche von Proteinen, die in Lösung eine ungeordnete Struktur haben, bei Bindung von Interaktionspartnern eine geordnete Struktur ausbilden können. Dadurch wird erreicht, daß eine bestimmte Oberfläche mit verschiedenen Proteinen wechselwirken kann (Wright und Dyson, 1999). Möglicherweise bildet die aminoternale Region von NCoA-1 eine solche dynamische Oberfläche, die je nach Interaktionspartner eine bestimmte Struktur ausbilden kann. Um dies zu prüfen, wird momentan in Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe ein Proteinkomplex aus interagierenden Fragmenten von STAT6 (AS 792-847) und NCoA-1 (AS 257-420) kristallisiert und über NMR-Spektroskopie analysiert.

4.4 Mechanismus der Koaktivierung

NCoA-1 besitzt mehrere Bereiche mit Transaktivierungsfunktion, die aminoternale Region, die AD1-Domäne, die die Interaktion mit CBP/p300 vermittelt, und eine C-terminal gelegene AD2-Domäne (Onate et al., 1998).

Der carboxyterminale Bereich hat eine schwache HAT-Aktivität (Spencer et al., 1997) und interagiert mit Methyltransferasen, wie CARM1 und PRMT1 (Chen et al., 1999b; Koh et al., 2001).

Welche dieser Funktionen für die Koaktivierung von STAT5 und STAT6 gebraucht werden, wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen in Reporterexperimenten untersucht. Zum einen wurde die Koaktivierungsfunktion von NCoA-1-Deletionskonstrukten, in denen verschiedene funktionelle Domänen deletiert sind, im Vergleich zum Vollängen-NCoA-1 analysiert. Als zweiter Ansatz wurden die isolierten funktionellen Domänen überexprimiert und der Effekt auf die STAT-vermittelte Transaktivierung bestimmt. Eine essentielle funktionelle Domäne sollte erwartungsgemäß, wenn sie in der Zelle im Überschuß vorhanden ist, einen dominant negativen Effekt auf die Funktion von endogenem NCoA-1 haben, da diese Domäne mit wichtigen Interaktionspartnern konkurriert (Abb. 3-5B).

Beide Ansätze zeigen, daß sowohl die aminoternale Domäne von NCoA-1, als auch die AD1-Domäne essentiell für die Koaktivierung von STAT5 sind (Abb. 3-4, 3-5). Die AD1-Domäne vermittelt die Interaktion von NCoA-1 mit p300/CBP. Interessanterweise liegen die Bindestellen für STAT5 und für NCoA-1 in verschiedenen Bereichen von CBP; STAT5 bindet die Region AS 451-721 (Pfitzner et al., 1998), während NCoA-1 die Region AS 2042-2157 kontaktiert (Yao et al., 1996). Dies bedeutet, daß theoretisch STAT5 und NCoA-1 gleichzeitig mit p300/CBP wechselwirken können.

Frühere Studien postulieren, daß NCoA-1 bei der Koaktivierung der nukleären Hormonrezeptoren den Komplex dieser Transkriptionsfaktoren mit p300/CBP stabilisiert (Sheppard et al., 2001). Daher ist es möglich, daß NCoA-1 analog zu dieser Situation die Wechselwirkung von p300/CBP und STAT5 stabilisiert. Die Funktion der aminoternalen Region von NCoA-1 bei der Koaktivierung von STAT5 könnte in der Rekrutierung von weiteren Effektorproteinen liegen. Die Region AS 1-93 von NCoA-1 besitzt Transaktivierungsfunktion, wenn sie an die heterologe GAL4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert wird und rekrutiert vermutlich Komponenten des Transkriptionsapparats (Onate et al., 1998).

Die aminoternale Domäne könnte auch den direkten Kontakt zu STAT5 herstellen. Diese Möglichkeit wird momentan durch den Einsatz von NCoA-1-Deletionsmutanten in weiteren Bindungsstudien untersucht.

Für die Koaktivierung von STAT6 werden -wie schon bei STAT5 beobachtet- die aminoternale Domäne und die AD1-Domäne von NCoA-1 benötigt (Abb. 3-14 und 3-15). Die Funktion der aminoterminalen Domäne liegt bei STAT6 ganz klar in der Vermittlung der direkten Interaktion (Abb. 3-13). Darüber hinaus könnte die aminoternale Domäne aber auch wie bei STAT5 postuliert, den Kontakt zu weiteren Effektorproteinen herstellen.

Die Funktion der AD1-Domäne bei der Koaktivierung von STAT6 scheint in der Rekrutierung von p300/CBP und/oder anderen AD1-bindenden Proteinen wie p/CAF zu liegen. CBP interagiert direkt mit dem aminoterminalen Bereich der STAT6-Transaktivierungsdomäne (AS 677-792), diese Interaktion ist im Vergleich zur STAT6/NCoA-1-Interaktion nicht sehr stark (Abb. 3-12). NCoA-1 könnte analog zu der Situation bei den nukleären Hormonrezeptoren ebenso stabilisierend auf die Interaktion von STAT6 und CBP wirken.

Es ist aber nicht geklärt, ob STAT6 gleichzeitig mit p300/CBP und NCoA-1 interagieren kann, da die Bindungsstellen für die jeweiligen Interaktionspartner sowohl in STAT6 (Abb. 3-12) als auch in CBP (Gingras et al., 1999; Yao et al., 1996) sehr eng benachbart sind. Daher muß in Betracht gezogen werden, daß NCoA-1 und CBP sequentiell binden, d. h. daß z. B. STAT6 NCoA-1 rekrutiert, welches p300/CBP in die Nähe von STAT6 bringt. P300/CBP könnte dann den Platz von NCoA-1 einnehmen. Um diese Möglichkeit zu prüfen, sind weitere Bindungsstudien von GST-STAT6-Fusionsprotein mit gereinigtem NCoA-1- und CBP-Protein geplant. Es soll untersucht werden, ob steigende Mengen des einen Koaktivators die Bindung des anderen Koaktivators an die STAT6-Transaktivierungsdomäne beeinflussen und umgekehrt.

Bei der Untersuchung der Bedeutung der AD2-Domäne für die STAT5-vermittelte Transaktivierung wurden widersprüchliche Effekte aus den Ansätzen mit dem NCoA-1-Deletionskonstrukt bzw. mit der isolierten AD2-Domäne beobachtet. Das Deletionskonstrukt, dem die AD2-Domäne fehlt, wies das gleiche Koaktivierungspotential auf wie das Vollängen-NCoA-1-Konstrukt (Abb. 3-4). Auf der anderen Seite hatte die Überexpression der isolierten AD2-Domäne von NCoA-1 einen stark inhibitorischen Effekt auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung (Abb. 3-5), was auf eine Beteiligung der Domäne bei der Koaktivierung durch NCoA-1 hinweist.

Dies macht deutlich, daß mit beiden Ansätzen verschiedene Aspekte des Koaktivierungsmechanismus untersucht werden und weist auf die Komplexität des Mechanismus hin. Eine Hemmung durch eine isolierte Domäne impliziert nicht zwangsläufig, daß diese Domäne eine essentielle Funktion hat. Der inhibitorische Effekt der isolierten AD2-Domäne könnte mit einer Blockierung von Methyltransferasen wie z.B. CARM1 und PRMT1 erklärt werden, die potenziell mit NCoA-1 über die AD2-Domäne interagieren (Chen et al., 1999b; Koh et al., 2001). Es gibt erste Hinweise für eine Beteiligung von CARM1 (persönl. Mitteilung, Stefanie Kliem).

In einer früheren Studie wurde gezeigt, daß STAT1 durch PRMT1 an einem bei allen STATs konservierten Arginin methyliert wird und diese Modifikation essentiell für die Funktion von STAT1 ist (Mowen et al., 2001). CARM1 könnte analog zu der Situation bei STAT1 STAT5 methylieren, die Funktion des Enzyms könnte aber auch in der Methylierung von Histon H3 liegen (Ma et al., 2001; Schurter et al., 2001), was ein Kennzeichen von aktivierten Genen ist (Bauer et al., 2002).

Da die vorliegenden Experimente eine NCoA-1-vermittelte Rekrutierung von CARM1 ausschließen (Abb. 3-4), wird CARM1 wahrscheinlich über die Interaktion mit p300/CBP (Xu et al., 2001) in die Nähe von STAT5 gebracht. Die Funktion von CARM1 bei der STAT5-vermittelten Transaktivierung wird momentan im Detail analysiert.

Im carboxyterminalen Bereich weisen die p160/SRC-Faktoren eine Sequenzhomologie von ca. 30% auf (s. Abb. 3-6A). Interessanterweise haben die der AD2-Domäne von NCoA-1 homologen Bereiche von NCoA-2 und NCoA-3 keinen Einfluß auf die STAT5-vermittelte Transaktivierung (Ab. 3-6B,C). Daraus wird geschlossen, daß die Sequenzunterschiede für den unterschiedlichen Effekt der isolierten AD2-Domänen bei der STAT5-vermittelten Transaktivierung verantwortlich sind. Höchstwahrscheinlich können die in der Arbeit verwendeten verkürzten AD2-Domänen von NCoA-2 und NCoA-3 die Methyltransferase CARM1 nicht binden und damit auch nicht inhibieren. Diese Möglichkeit müßte experimentell in weiteren Bindungsstudien geprüft werden.

Die AD2-Domäne von NCoA-1 ist für eine Koaktivierung von STAT5 und STAT6 nicht essentiell (Abb. 3-4 und 3-14).

Daher spielt die HAT-Funktion von NCoA-1 keine Rolle bei der Koaktivierung dieser STAT-Proteine. STAT5 und STAT6 benötigen jedoch die HAT-Funktion von p300/CBP bei der Transaktivierung bestimmter Zielgene (Dominique Marilley, persönl. Mitteilung; Shankaranarayanan, 2001).

4.5 Synergismus von STAT5 und STAT6 mit anderen Transkriptionsfaktoren

Das β -Kasein-Reporter-Konstrukt, das für diese Studie verwendet wurde, enthält neben den beiden STAT5-Bindestellen auch halbe Glukokortikoid-Rezeptor (GR) -Elemente. Zahlreiche Studien bestätigten, daß STAT5 und GR bei der Regulation der β -Kasein-Expression synergistisch wirken (Doppler et al., 2000; Doppler et al., 1989; Doppler et al., 1990; Doppler et al., 2001; Reichardt et al., 2001; Stocklin et al., 1996). Der stimulierende Effekt von GR auf STAT5 wurde teilweise durch eine Stabilisierung der DNA-Bindung sowie eine Verlängerung der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT5 erklärt (Wyszomierski et al., 1999). Darüber hinaus wurde spekuliert, daß Koaktivatoren an der synergistischen Transaktivierung von GR und STAT5 beteiligt sein könnten. GR könnte beispielsweise die Interaktion zwischen STAT5 und NCoA-1 verstärken.

In dieser Arbeit wurden jedoch keine Hinweise auf eine Funktion von NCoA-1 beim Synergismus von STAT5 und GR gefunden (Abb. 3-3), eine Kotransfektion von GR hat keinen steigernden Effekt auf die Komplexbildung von STAT5 und NCoA-1.

Auch in den Promotoren von verschiedenen IL-4-abhängigen Genen, wie $GL\epsilon$, $GL\gamma 1$ und CD23, befinden sich die STAT6-Bindungselemente in enger Nachbarschaft zu Bindungselementen anderer Transkriptionsfaktoren, z. B. CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP β), NF κ B bzw. PU.1. Diese Faktoren können synergistisch wirken (Delphin und Stavnezer, 1995; Lundgren et al., 1994; Mikita et al., 1998; Richards und Katz, 1997; Shen und Stavnezer, 1998; Stutz und Woisetschlager, 1999; Warren und Berton, 1995).

PU.1, die NF κ B-Untereinheit p65 und STAT6 interagieren mit verschiedenen Regionen von CBP (Gerritsen et al., 1997; Gingras et al., 1999; Yamamoto et al., 1999). Die p50-Untereinheit von NF κ B und STAT6 rekrutieren NCoA-1 über verschiedene Kontaktstellen in NCoA-1 (Na et al., 1998, Abb. 3-13). STAT6 und NF κ B interagieren direkt miteinander (Shen und Stavnezer, 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, daß die synergistische Aktivierung von IL-4-abhängigen Zielgenen zusätzlich zu der kooperativen DNA-Bindung der Faktoren, auch ein Ergebnis der gemeinschaftlichen Rekrutierung eines gemeinsamen p300/CBP/NCoA-1-Koaktivorkomplex sein könnte. In diesem Modell agieren p300/CBP und NCoA-1 über ihre vielfältigen Proteininteraktionsflächen als Integratoren verschiedener Signalwege.

4.6 Vergleich der Koaktivierung verschiedener STATs

Die verschiedenen Vertreter der STAT-Familie weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad in Bezug auf Struktur und Funktion auf. Die STAT-Proteine STAT1, STAT2, STAT3, STAT5 und STAT6 werden alle durch p300/CBP koaktiviert, jedoch werden unterschiedliche Bereiche von p300/CBP kontaktiert (Gingras et al., 1999; Paulson et al., 1999; Pfitzner et al., 1998) (s. Abb. 1-2).

Aufgrund der vorliegenden Arbeit und der Ergebnisse von anderen Studien erscheint es sehr wahrscheinlich, daß bei NCoA-1 eine ähnliche Situation vorliegt: NCoA-1 wirkt als Koaktivator von STAT3 (Giraud et al., 2002), STAT5 und STAT6 (Litterst und Pfitzner, 2001). Es gibt jedoch keinen gemeinsamen Mechanismus, was die Rekrutierung durch die STAT-Transaktivierungsdomänen angeht. Von allen STATs ist nur STAT6 in der Lage, als Monomer mit NCoA-1 zu interagieren (Abb. 3-16). Ein Sequenzvergleich der transaktivierenden Domänen der STATs *in silico* ergab, daß die NCoA-1-Interaktionsdomäne von STAT6 in einer Region liegt, die in den anderen STATs keine Entsprechung hat (Daten nicht gezeigt). Das Interaktionsmodul ist somit eine spezifische Eigenschaft von STAT6.

Außerdem kontaktieren STAT3 und STAT6 jeweils unterschiedliche Bereiche von NCoA-1 (Giraud et al., 2002, Abb. 3-13).

Das Erfordernis von unterschiedlichen Kontaktstellen in p300/CBP und NCoA-1 wird dadurch verständlich, daß die einzelnen STAT-Proteine an verschiedenen Promotoren mit jeweils anderen Transkriptionsfaktoren zusammenwirken und vermutlich an jedem Promotor eine bestimmte Kombination von Koaktivatoren für die maximale Koaktivierung gebraucht wird. Nach neueren Modellvorstellungen lagern sich Koaktivatoren zu bestimmten kleineren Komplexen (sogenannten Subkomplexen) zusammen, wie z. B. binäre Komplexe aus p300/CBP und NCoA-1 oder p300/CBP und p/CAF (Kamei et al., 1996; McKenna et al., 1998; Xu et al., 2000), die für die Rekrutierung durch verschiedene Aktivatoren bei den entsprechenden Signalen bereitstehen (McKenna et al., 1999; McKenna und O'Malley, 2002). Die Koordination verschiedener Transkriptionsfaktoren wird demnach durch eine selektive Auswahl der passenden, vorgeformten Koaktivator-Subkomplexe in den jeweiligen Stadien des Transkriptionsinitiationsprozesses vollzogen (Lemon et al., 2001).

Da die transkriptionelle Initiation ein mehrstufiger Prozess ist, bei dem verschiedene Koaktivatorkomplexe sequentiell rekrutiert werden, wäre es interessant zu untersuchen, in welchem Stadium NCoA-1 bei der Aktivierung verschiedener STAT-Zielgene aktiv wird. Mithilfe der Chromatin-Immunpräzipitationstechnik könnte analysiert werden, zu welchen Zeitpunkten nach der Aktivierung des STAT-Signalweges NCoA-1 im Vergleich zu anderen Koaktivatoren wie p300/CBP und CARM1 am jeweiligen Promotor bindet. Diese Experimente werden momentan in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

In Abb. 4-1 ist ein Modell der Koaktivatorkomplexe dargestellt, die bei der Transaktivierung durch STAT5 und STAT6 involviert sind. STAT5 und STAT6 rekrutieren beide über verschiedene Kontaktstellen selektiv einen p300/CBP/NCoA-1-Koaktivator-Komplex. STAT6 bindet direkt an die aminoternale Domäne von NCoA-1 (N). Bei STAT6-Zielgenen unterstützen vermutlich andere, im Promotor benachbart bindende Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B und PU.1 die Rekrutierung der Koaktivatorkomplexe.

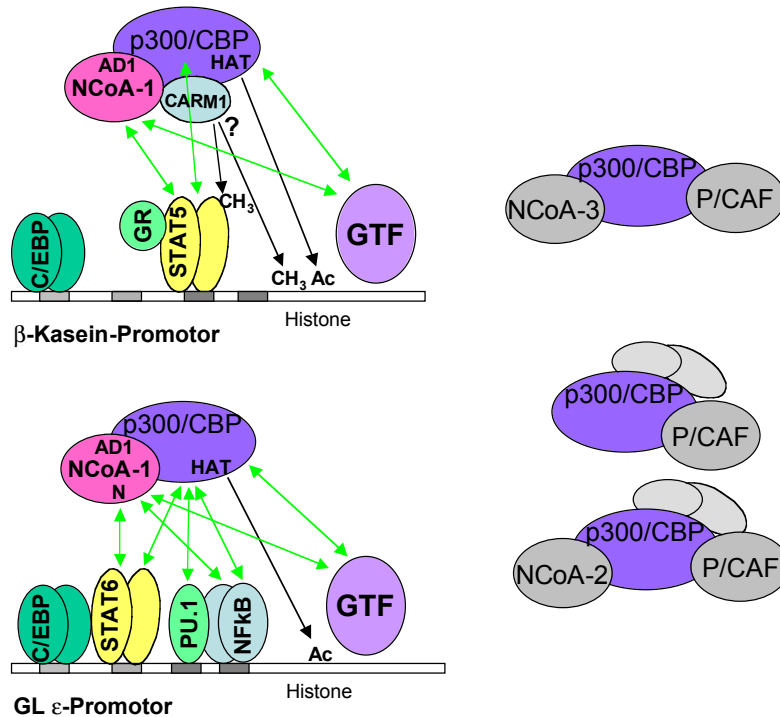


Abb. 4.1 Modell der selektiven Rekrutierung von Subkomplexen.

STAT5 und STAT6 rekrutieren selektiv bestimmte Koaktivator-Komplexe an die Promotoren ihrer Zielgene β -Kasein bzw. GL ϵ . STAT6 interagiert direkt mit der aminoterminalen Domäne von NCoA-1 (N). STAT6 wird bei der Rekrutierung des Koaktivator-Komplexes durch NF κ B und PU.1 unterstützt, welche auch mit p300/CBP und/oder NCoA-1 interagieren können. P300/CBP trägt zur Öffnung der Promotoren bei, indem es Histone acetyliert. STAT5 rekrutiert auch Methyltransferasen an den Promotor, welche Histone oder eventuell auch STAT5 selbst methylieren können. Enzymatische Modifizierungen sind mit schwarzen, Interaktionen mit grünen Pfeilen symbolisiert. GTF, generelle Transkriptionsfaktoren, Ac Acetylierung, CH₃ Methylierung.

Histone in der Promotorregion von STAT5- und STAT6-regulierten Genen werden durch p300/CBP acetyliert (Stefanie Kliem, pers. Mitteilung, Shankaranarayanan et al., 2001), was zur Auflockerung der Chromatinstruktur führt und die Bindung genereller Transkriptionsfaktoren (GTF) ermöglicht. Im Koaktivator-Komplex, der von STAT5 rekrutiert wird, ist vermutlich auch CARM1 assoziiert, das potenziell STAT5 oder Histone methyliert. Darüber hinaus rekrutieren p300/CBP und NCoA-1 aktiv generelle Transkriptionsfaktoren und fördern so die Bildung des Initiationskomplexes.

4.7 Charakterisierung des LXXLL-Motiv in der STAT6-Transaktivierungsdomäne

Der Bereich der STAT6-Transaktivierungsdomäne, der die Bindung von NCoA-1 vermittelt (AS 792-847), enthält ein sogenanntes LXXLL-Motiv (wobei L für Leucin und X für eine beliebige Aminosäure steht). Dieses Proteininteraktionsmotiv wurde ursprünglich bei transkriptionellen Koaktivatoren identifiziert und wurde mittlerweile auch bei anderen Proteinen gefunden, z. B. bei PIASY, CyclinD1, Arylhydrocarbonrezeptor (Ikuta et al., 2002; Liu et al., 2001; Petre et al., 2002). Die LXXLL-Motive von Koaktivatoren vermitteln die Bindung an Liganden-gebundene nukleäre Hormonrezeptoren und sind essentiell für die Koaktivierung der Hormonrezeptoren (Heery et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, daß ein LXXLL-Motiv in der STAT6-Transaktivierungsdomäne essentiell für die direkte Interaktion mit dem Koaktivator NCoA-1 ist. Dies wurde mit verschiedenen Experimenten belegt. Das Peptid 1 (AS 794-814), das das Interaktionsmotiv enthält, hemmt sehr effizient die Bindung von STAT6 und NCoA-1 (Abb. 3-17B). Zum zweiten blockieren Antikörper, die gegen diese Region von STAT6 gerichtet sind, die Bindung an NCoA-1 (Abb. 3-17D). Dagegen haben Antikörper, die gegen einen dem Interaktionsmotiv benachbarten Bereich gerichtet sind, keinen Einfluß auf die Bindung von STAT6 und NCoA-1 (Abb. 3-17D). Schließlich führen Punktmutationen im LXXLL-Motiv (L 802, 805 zu A) zu einem Verlust der Bindung von STAT6 und NCoA-1 *in vitro* (Abb. 3-18).

Das LXXLL-Motiv vermittelt die Rekrutierung von NCoA-1 in Zellen (Abb. 3-20). Es hat eine wichtige Funktion bei der STAT6-vermittelten Transaktivierung sowohl in Reporter-genexperimenten als auch bei der Expression des Zielgens Eotaxin-3, denn eine STAT6-Variante mit einem mutagenisierten LXXLL-Motiv hatte in beiden Fällen ein um 50% niedrigeres Transaktivierungspotential verglichen mit dem Wildtyp-STAT6 (Abb. 3-20C, und 3-21). Somit trägt NCoA-1 zu 50% der transkriptionellen Aktivität von STAT6 bei.

Wie an anderer Stelle bereits ausgeführt, wird vermutet, daß eine wichtige Funktion von NCoA-1 in der Stabilisierung der Wechselwirkungen von STAT6 und dem Koaktivator p300/CBP besteht. Mithilfe der STAT6-Mutante könnte dieses Modell geprüft werden, indem untersucht wird, wie effizient die direkte Rekrutierung von p300/CBP in Zellen tatsächlich ist: Ein Vergleich der Komplexbildung von p300/CBP mit Wildtyp-STAT6 und der STAT6-Mutante in Koimmunpräzipitationen könnte zeigen, welche Rolle NCoA-1 bei der Interaktion von STAT6 und p300/CBP spielt.

4.8 Struktur des LXXLL-Motivs

LXXLL-Motive kommen in verschiedenen Koaktivatoren meist in mehreren Kopien vor. Vertreter der p160/SRC-Koaktivatorfamilie enthalten z. B. drei Motive, die die Interaktion mit nukleären Hormonrezeptoren vermitteln und zwei Motive, die für die Bindung an p300/CBP gebraucht werden. P300/CBP enthalten selbst zwei Motive (Heery et al., 1997).

Alle Motive, die bisher beschrieben wurden, bilden eine α -helikale Struktur mit einer hydrophoben Oberfläche aus, die durch die hydrophoben Leucine gebildet wird. Dennoch sind nicht alle LXXLL-Motive funktionell gleich. Die das Motiv flankierenden Sequenzen bestimmen die Spezifität der Bindung (Chang et al., 1999; Ding et al., 1998).

Das LXXLL-Motiv von STAT6 bildet höchstwahrscheinlich auch eine α -Helix aus, wie eine Struktur-Vorhersage *in silico* ergab (Abb. 3-22A). Ein Sequenzvergleich mit den LXXLL-Motiven von NCoA-1 und CBP zeigt, daß es unter den amino- oder carboxyterminal zu der Kernsequenz gelegenen Aminosäuren keine Ähnlichkeiten gibt (Abb. 3-22B).

In mehreren Studien wurde beschrieben, daß nukleäre Hormonrezeptoren und STAT6 sich sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können (Bertoglio und Leroux, 1988; Biola et al., 2000; Stocklin et al., 1996; Zubiaga et al., 1992). Eine solche Vernetzung der Signalwege könnte auch auf der Ebene von Interaktionen mit Koaktivatoren reguliert sein.

In dieser Arbeit wurden keine Hinweise auf eine Konkurrenz zwischen dem STAT6-LXXLL-Motiv und den Motiven aus nukleären Hormonrezeptoren gefunden, denn das STAT6-Peptid, was ein wirksamer Inhibitor für die Interaktion mit NCoA-1 darstellt, hatte keinen Effekt auf die *in vitro*-Interaktion von NCoA-1 mit dem Retinsäurerezeptor (Abb. 3-22C). Diese Ergebnisse zeigen, daß das STAT6-LXXLL-Motiv wohl eine spezifische Interaktions-Oberfläche ausbildet und wahrscheinlich keine Funktion beim *Crosstalk* mit nukleären Rezeptoren hat. Daher besteht die Möglichkeit, daß die STAT6-NCoA-1-Interaktion mit dem Peptid 1 spezifisch blockiert werden kann, ohne daß dabei andere Interaktionen, die ebenfalls über LXXLL-Motive vermittelt werden, beeinträchtigt werden.

4.9 Hemmung des IL-4/STAT6-Signalweges durch Blockieren der STAT6/NCoA-1-Interaktion in Zellen

Der IL-4/STAT6-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Th2-Zellen und IgE-produzierenden B-Zellen.

Das Gleichgewicht von Th2- und den antagonistischen Th1-Zellen ist sehr genau reguliert. Eine Erhöhung der Produktion von Th2-Zytokinen und IgE führt zu den bekannten Symptomen allergischer Erkrankungen (Pernis and Rothman, 2002). Daher stellt die Interferenz des IL-4/STAT6-Signalwegs eine Möglichkeit für eine Therapie dar.

In der Literatur sind mehrere Strategien beschrieben, um diesen Signalweg zu hemmen: Antagonistische IL-4-Mutanten (Grunewald et al., 1998); IL-4-Rezeptorantagonisten (Tomkinson et al., 2001); intrazelluläre Peptide, die die Bindung von STAT6 an den Rezeptor verhindern (Stolzenberger et al., 2001); Oligonukleotide, die spezifisch die DNA-Bindung von STAT6 an sein Bindungselement inhibieren (Stutz et al., 2001; Wang et al., 2000b). Die Daten dieser Arbeit zeigen, daß eine Hemmung der STAT6/NCoA-1-Interaktion in Zellen zu einer verminderten Expression von STAT6-Zielgenen führen könnte:

Erste Hinweise wurden in Reporterexperimenten gewonnen, indem interagierende Fragmente von STAT6 (AS 792-847) und NCoA-1 (AS 1-571, AS 213-462) überexprimiert wurden, die als Kompetitor für die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 wirken können. Diese Fragmente führten zu einer Reduktion der STAT6-vermittelten Transaktivierung (Abb. 3-15BCD und 3-24). Die Hemmung durch die NCoA-1-Fragmente war spezifisch für STAT6, denn die Funktion des Retinsäurerezeptors wurde dadurch nicht beeinträchtigt (Abb. 3-15E).

Für die Reporterexperimente wurde ein Konstrukt mit einem artifiziellen Promotor, der aus multimerisierten STAT6-Bindeelementen besteht, verwendet. Dieses Konstrukt spiegelt die Situation der natürlichen Promotoren von STAT6-Zielgenen, die aus Bindungselementen verschiedener Transkriptionsfaktoren zusammengesetzt sind, nur teilweise wider. Außerdem ist die genomische DNA in Chromatin verpackt und transkriptionell inaktiv, was einen weiteren regulatorischen Mechanismus der Genexpression darstellt. Daher wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der STAT6-NCoA-1-Interaktion auch bei der Expression endogener Gene untersucht.

Bei dem endogenen Zielgen Eotaxin-3 scheint, wie aus den Studien mit einer STAT6-Mutante hervorging, die STAT6/NCoA-1 Interaktion einen wichtigen Beitrag zur Genexpression zu liefern. Eotaxin-3 ist ein Beispiel für ein STAT6-Zielgen, dessen Hemmung einen therapeutischen Nutzen bei allergischen Erkrankungen hätte (Luster, 2001), denn bei dem sekretierten Eotaxin-3-Protein handelt es sich um einen wichtigen chemischen Lockstoff für Eosinophile (Bandeira-Melo et al., 2001). Die lokale Produktion von Eotaxin-3 in Endzündungsherden und die damit einhergehende Rekrutierung von Eosinophilen ist ein Charakteristikum von atopischen Erkrankungen (Berkman et al., 2001).

Die Transaktivierung des Eotaxin-3-Gens kann alleine durch STAT6 vermittelt werden. Andere STAT6-Zielgene, wie z.B. C ϵ , werden auch durch NF κ B oder durch ein synergistisches Zusammenwirken von STAT6 und NF κ B induziert. Vermutlich variiert die Rolle von NCoA-1 bei der STAT6-vermittelten Transaktivierung je nach dem spezifischen Promotor- und/oder dem zellulären Kontext.

In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch für die Expression der STAT6-aktivierten Gene CD23 und 12/15-Lipoxygenase untersucht, ob eine Hemmung der STAT6/NCoA-1-Interaktion durch die beschriebenen Fragmente (STAT6 AS 792-847, NCoA-1 AS 1-571 bzw. AS 100-462) zu einer Reduktion der Expression führt.

CD23 ist der niedrigaffine Rezeptor für IgE. CD23 wird auf B-Zellen gebildet, wenn sie durch IL-4 und den CD40-Liganden stimuliert werden (Richards and Katz, 1997). CD23 greift sowohl in die positive als auch in die negative Regulation der IgE-Produktion von B-Zellen ein (Kilmon et al., 2001; Yu et al., 1994).

Die Überexpression beider inhibitorischer Domänen (STAT6 AS 792-847, NCoA-1 AS 1-571) hatte keinen Einfluß auf die IL-4-induzierte Synthese von CD23 in der B-Zelllinie M12.4.1 (Abb. 3-25 und nicht gezeigte Daten). Warum kein Effekt beobachtet wurde, kann nur spekulativ diskutiert werden. Es besteht die Möglichkeit, daß die inhibitorischen Polypeptide im Vergleich zu den endogenen Proteinen nicht in ausreichender Menge vorhanden waren, um als Kompetitor wirken zu können. Gerade STAT6 ist in diesen Zellen in einer großen Menge vorhanden.

Auf der anderen Seite ist es auch möglich, daß NCoA-1 bei der Transaktivierung von CD23 keine Rolle spielt. Das STAT6-Element im CD23-Promotor unterscheidet sich vom klassischen GAS-Element anderer STAT6-Zielgene (Richards and Katz, 1997). Das benachbarte C/EBP-Bindungselement ist nicht notwendig für die IL-4 induzierte Expression. Außerdem wurde beschrieben, daß an der Regulation der Expression Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, die spezifisch für bestimmte Differenzierungsstadien von B-Zellen sind (Schubach et al., 1997). Es ist möglich, daß STAT6 auf diesem Promotor mit diesen Transkriptionsfaktoren zusammenwirken muss und daher auch andere Koaktivator Komplexe rekrutiert werden. Die Bedeutung von NCoA-1 für dieses STAT6-Zielgen könnte mithilfe von B-Zellen aus NCoA-1 $-/-$ Mäusen abgeschätzt werden.

Die 12/15-Lipoxygenase katalysiert die oxidative Umsetzung von ungesättigten Fettsäuren. Arachidonsäure wird zu 15-Hydroxyeicosatetraenolsäure (15-HETE) umgesetzt, während Linolsäure zu 13-Hydroxyoktadecadienolsäure metabolisiert wird.

Diese und weitere entstehende Metaboliten führen in Lungenepithelzellen zu Entzündungen der Atemwege. Möglicherweise regulieren sie die Wanderung von Leukozyten in die Lunge, die Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen, die Hyperreaktivität der Atemwege und die Schleimsekretion (Jayawickreme et al., 1999; Profita et al., 1999). Die Hemmung der 12/15-Lipoxygenase hat daher einen therapeutischem Nutzen bei allergischen Erkrankungen.

Die Expression der endogenen 12/15-Lipoxygenase in Lungenepithelzellen wurde sowohl durch die Überexpression der aminoterminalen Domäne von NCoA-1 als auch der carboxyterminalen Domäne von STAT6 signifikant reduziert (Abb. 3-26 und 3-27). Der Effekt der aminoterminalen Domäne AS 100-462 von NCoA-1 scheint wirkungsvoller zu sein, denn schon bei Analyse einer Gesamtpopulation von Zellen, die transient mit dieser Domäne transfiziert wurden, wurde ein Effekt auf die 12/15-Lipoxygenaseexpression beobachtet. Die Expression reduzierte sich auf weniger als ein Viertel des Kontrollwertes (Abb. 3-26). Dagegen erbrachte die transiente Transfektion der STAT6-Domäne keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise hat die Domäne von AS 100-462 neben der Inhibition der STAT6/NCoA-1-Bindung noch weitere Effekte auf potenzielle Effektorproteine, die an die aminoterminalen Domäne von NCoA-1 binden. Dies erklärt den stärkeren Effekt im Vergleich zur STAT6-Domäne, die ja nur die STAT6/NCoA-1-Interaktion blockieren kann.

Eine neuere Studie zur transkriptionellen Regulation der 12/15-Lipoxygenase in Lungenepithelzellen beschreibt, daß Acetylierung von STAT6 und von Histon H3 eine Voraussetzung für die Initiation der 12/15-Lipoxygenase-Transkription sind und dies hauptsächlich durch die HAT-Aktivität von p300/CBP vermittelt wird (Shankaranarayanan et al., 2001). Die vorliegenden Daten legen die Vermutung nahe, daß NCoA-1 bei der Initiation der Lipoxygenase-Expression stabilisierend auf die Interaktion von CBP und STAT6 wirkt.

In dieser Arbeit wurden mehrere Möglichkeiten entwickelt, um die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 in Zellen aufzuheben. Sowohl die Mutagenese des Bindungsmotiv als auch die Überexpression von kompetitiv wirkenden, isolierten interagierenden Domänen inhibiert die Interaktion in Zellen.

Die Hemmung der Interaktion führt zur Inhibition der Expression von mindestens zwei STAT6-Zielgenen (Eotaxin-3 und 12/15-Lipoxygenase), die eine Relevanz bei der Pathogenese von asthmatischen Erkrankungen haben. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß Signalwege nicht nur auf der Ebene von Signaltransduktionskaskaden gehemmt werden können, sondern daß auch die spezifischen Wechselwirkungen von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren einen potenziellen Angriffspunkt darstellen. Somit eröffnet sich eine Vielfalt von neuartigen Möglichkeiten für die therapeutische Interferenz von Signalwegen.

In dieser Arbeit wurden zwei weitere Möglichkeiten aufgezeigt, um die STAT6-NCoA-1-Interaktion zu blockieren, nämlich mithilfe von Antikörpern und Peptiden. In einer früheren Studie wurde beschrieben, daß die kombinatorische Phage-Display-Technik eine Suche von spezifischen LXXLL-Peptiden ermöglicht (Chang et al., 1999; Hall et al., 2000). Hierfür wurde eine Phagen-Bank verwendet, die für LXXLL-Motive kodiert, bei denen die dem Kern-Motiv benachbarten Aminosäuren variabel sind. Mit dieser Methode könnten Peptide identifiziert werden, die die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 noch effizienter inhibieren können. Gleichzeitig können über negative Selektion mit Ligandenbindungsdomänen der nukleären Hormonrezeptoren solche Peptide identifiziert werden, die keine Affinität zu den nukleären Hormonrezeptoren haben.

Die Antikörper und Peptide können über Mikroinjektion oder Proteintransduktion in Zellen eingeschleust und der Effekt auf die Transaktivierung von verschiedenen Zielgenen analysiert werden. Außerdem können anhand der Struktur von inhibitorischen Peptiden im Komplex mit dem Koaktivator niedermolekulare Substanzen entwickelt werden, die die Interaktion von STAT6 und NCoA-1 hemmen.

Bei dem beschriebenen Konzept, daß Signalwege durch Blockierung der Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit ihren Koaktivatoren inhibiert werden können, muß bedacht werden, daß Koaktivatoren wie p300/CBP und NCoA-1 von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie z. B. den nukleären Hormonrezeptoren rekrutiert werden. Eine komplette Inhibition der Koaktivatoren ist daher nicht erwünscht, da sie z. B. im Falle von p300/CBP zu einer embryonalen Lethalität führt (Yao et al., 1998).

Das hier vorgestellte Konzept beruht darauf, daß ausschließlich bestimmte Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren gehemmt werden. Es ist daher für den Erfolg der in dieser Arbeit entworfenen Strategie unbedingt erforderlich, daß lediglich die Funktion von NCoA-1 als Koaktivator von STAT6 ausgeschaltet wird. Mit der zielgerichteten Blockierung des LXXLL-Motivs von STAT6, die zu einer Inhibition der Interaktion von STAT6 und NCoA-1 führt, könnte diesem Anspruch genügegeleistet werden. Dies wurde in zwei Experimenten deutlich: Ein Peptid, das spezifisch die STAT6/NCoA-1-Interaktion hemmt, hat keinen Effekt auf die Interaktion von NCoA-1 mit den nukleären Hormonrezeptoren (Abb. 3-22C). Außerdem kann ein NCoA-1-Fragment, das an das LXXLL-Motiv von STAT6 bindet, die Funktion von STAT6 hemmen, wenn es in Zellen im Überschuß vorhanden ist; es hat aber keinen Einfluß auf die Transaktivierung des Retinsäurerezeptors (Abb. 3-15B und E).

In Zellkulturmodellen können immer nur einzelne Zielgene untersucht werden. Asthmatische Erkrankungen sind aber durch die Interaktionen von verschiedenen Zelltypen geprägt. Dieses Zusammenspiel läßt sich in verschiedenen Tiermodellen für allergische Krankheiten studieren.

Um untersuchen zu können, ob die Hemmung der STAT6/NCoA-1-Interaktion einen positiven Effekt auf allergische Symptome im Tiermodell hat, müßten inhibitorische Substanzen gefunden werden, die sich pharmakologisch eignen. In dieser Arbeit wurde ein Bindungstest entwickelt, der die Hochdurchsatz-Suche von solchen Substanzen ermöglicht. Das Peptid 1 erwies sich als wirksamer Inhibitor in diesem Testsystem.

Neben der Therapie von asthmatischen Erkrankungen könnte die Inhibition der Funktion von STAT6 auch Anwendung in der Tumorthherapie finden:

Hodkin-Lymphom-Zellen benötigen eine endokrine IL-13-Stimulation für das Wachstum. Eine Inhibition des IL-13/STAT6-Signalweges in den Tumor-Zellen könnte daher eventuell die Proliferation der Hodkin-Lymphom-Zellen hemmen (Skinnider et al., 2002). Außerdem wurde in neueren Studien gezeigt, daß STAT6 $-/-$ Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verstärkte anti-Tumor-Immunität gegen verschiedene primäre und metastasierende Tumoren aufweisen (Kacha et al., 2000; Ostrand-Rosenberg et al., 2000).

Diese Studien machen deutlich, daß eine Hemmung der Funktion von STAT6 in Immunzellen möglicherweise die Immunantwort von Tumorzellen verbessern kann.

Diese Arbeit liefert die Basis für die Entwicklung von neuartigen inhibitorischen Molekülen, die den IL-4/STAT6-Signalweg auf der Ebene der transkriptionellen Initiation der Zielgene blockieren und möglicherweise als Therapeutika für asthmatische Erkrankungen und in der Tumorthherapie zum Einsatz gebracht werden können.

5. Zusammenfassung

STAT-Proteine sind latente Transkriptionsfaktoren, die durch Stimulation mit Zytokinen aktiviert werden. STAT5 vermittelt beispielsweise die durch Prolaktin-Stimulation induzierte Bildung von Milchproteinen während der Schwangerschaft. STAT6 wird durch die Zytokine IL-4 und IL-13 aktiviert, die die humorale Immunabwehr regulieren. STAT-Proteine schalten die Transkription ihrer Zielgene an, indem sie bestimmte Koaktivatorkomplexe, die p300/CBP enthalten, an den Promotor rekrutieren.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der NCoA-Koaktivatorfamilie (p160/SRC) für die Transkriptionsaktivierung durch STAT5a, STAT5b und STAT6 untersucht. In transienten Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, daß NCoA-1, jedoch nicht die beiden anderen Vertreter NCoA-2 und NCoA-3, als essentieller Koaktivator dieser STAT-Proteine wirkt. Obwohl NCoA-1 von den Transaktivierungsdomänen der drei STAT-Proteine gleichermaßen rekrutiert wird, wird die Bindung über verschiedene Kontaktstellen vermittelt: STAT5 bildet einen Komplex mit NCoA-1 in Zellen, wobei die Interaktion vermutlich durch sekundäre Modifikationen in NCoA-1 reguliert ist. Dagegen bindet STAT6 direkt an die aminoternale Region von NCoA-1 *in vitro* und *in vivo*. Die Bindungsregion wurde auf einen Bereich von AS 257-420 von NCoA-1 kartiert. Somit wurde eine neue Interaktionsdomäne von NCoA-1 identifiziert. Die Rekrutierung von NCoA-1 wird durch ein LXXLL-Motiv innerhalb der Interaktionsdomäne von STAT6 (AS 792-847) vermittelt, das spezifisch für STAT6 ist. Das LXXLL-Motiv ist essentiell für die Funktion von STAT6, z. B. bei der Expression des endogenen Zielgens Eotaxin-3. Die STAT6/NCoA-1-Interaktion kann kompetitiv durch Peptide bzw. Polypeptide, die von den interagierenden Domänen abgeleitet wurden, und durch spezifische Antikörper inhibiert werden. Diese Inhibitoren haben keinen Effekt auf die Interaktion von nukleären Hormonrezeptoren mit NCoA-1, die ebenfalls durch LXXLL-Motive vermittelt wird. Die Blockierung der STAT6/NCoA-1-Interaktion führt zu einer verminderten Expression des endogenen STAT6-Zielgens Lipoxxygenase.

In dieser Arbeit wurde erstmals demonstriert, daß über die gezielte Blockierung von Kontaktstellen zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren Koaktivatoren endogene Signalwege inhibiert werden können. Somit ergeben sich neuartige Möglichkeiten für die therapeutische Interferenz von Signalwegen, z. B. bei asthmatischen Erkrankungen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AD Aktivierungsdomäne
AK Antikörper
AS Aminosäure
BSA Rinderserumalbumin
CARM1 Cofactor associated arginine (R) methyltransferase 1
CBP CREB binding protein
CD Cluster of differentiation
cDNA Complementary DNA
C/EBP CAAT/enhancer binding protein
CFP Cyano fluorescent protein
CREB cAMP-responsive element binding protein
DBD DNA-Bindungsdomäne
DEPC Diethylpyrocarbonat
DMSO Dimethylsulfoxid
DNA Desoxyribonukleinsäure
DTT Dithiotreithol
E.coli Escherichia coli
EDTA Ethylendiamintetraacetat
(E) GFP (Enhanced) green fluorescent protein
ELISA Enzyme linked immunosorbend assay
EMSA Electromobility shift assay
FACS Fluorescence activated cell sorting
FCS Fötale Kälberserum
g relative Erdbeschleunigung
GAPDH Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GAS γ -interferon activated sites
GH Growth hormone
GL Germline
GR Glukokortikoid-Rezeptor
GST Gluthation S-Transferase
GTF Genereller Transkriptionsfaktor
HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IFN Interferon
Ig Immunglobulin
IL Interleukin

IP Immunpräzipitation
IPTG Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
JAK Janus Kinase
Kb Kilobase
kDa Kilodalton
LB Luria broth
MHC Major histocompatibility complex
MLV Moloney murine leukemia virus
M Mol
MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA Messenger Ribonukleinsäure
NTA-Nitrilotriessigsäure
NMR Nuclear magnetic resonance
NCoA Nuclear receptor coactivator
OD Optische Dichte
PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS Phosphate buffered saline
PCR Polymerasekettenreaktion
PE Phycoerythrin
PRL Prolaktin
PRMT Protein arginine (R) methyltransferase
RE Response element
RNA Ribonukleinsäure
RT Raumtemperatur
SDS Natrium Duodecylsulfat
SH2 SRC-Homology Domain 2
SRC-1 Steroid receptor coactivator 1
STAT Signal transducer and activator of transcription
Tac Synthetischer bakterieller Promotor aus Lac- und Tryptophan-Operon
TAD Transaktivierungsdomäne
TBP TATA binding protein
TBS Tris buffered saline
TEF Transcription enhancer factor
TEMED Tetramethylethylendiamin
TF Transkriptionsfaktor
UV Ultraviolett
WB Western-Blot
WCE Whole cell extract

7. Literatur

Akimoto, T., Numata, F., Tamura, M., Takata, Y., Higashida, N., Takashi, T., Takeda, K., and Akira, S. (1998). Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice. *J Exp Med* **187**, 1537-42.

Akira, S. (1999). Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* **17**, 138-46.

Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**, 965-8.

Bandeira-Melo, C., Herbst, A., and Weller, P. F. (2001). Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 653-7.

Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1995). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *Embo J* **14**, 4758-62.

Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-3.

Bauer, U. M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K., and Kouzarides, T. (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep* **3**, 39-44.

Belandia, B., and Parker, M. G. (2000). Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem* **275**, 30801-5.

Berkman, N., Ohnona, S., Chung, F. K., and Breuer, R. (2001). Eotaxin-3 but not eotaxin gene expression is upregulated in asthmatics 24 hours after allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 682-7.

Bertoglio, J. H., and Leroux, E. (1988). Differential effects of glucocorticoids on the proliferation of a murine helper and a cytolytic T cell clone in response to IL-2 and IL-4. *J Immunol* **141**, 1191-6.

Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D'Andrea, A., and Livingston, D. M. (1996). Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature* **383**, 344-7.

Biola, A., Andreau, K., David, M., Sturm, M., Haake, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2000). The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. *FEBS Lett* **487**, 229-33.

Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243-55.

Brombacher, F. (2000). The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *Bioessays* **22**, 646-56.

Caldenhoven, E., van Dijk, T. B., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., and de Groot, R. P. (1996). STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* **271**, 13221-7.

- Callus, B. A., and Mathey-Prevot, B. (2000). Hydrophobic residues Phe751 and Leu753 are essential for STAT5 transcriptional activity. *J Biol Chem* 275, 16954-62.
- Chang, C., Norris, J. D., Gron, H., Paige, L. A., Hamilton, P. T., Kenan, D. J., Fowlkes, D., and McDonnell, D. P. (1999). Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Biol* 19, 8226-39.
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-80.
- Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R. M. (1999a). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98, 675-86.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., and Stallcup, M. R. (1999b). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-7.
- Chen, D., Huang, S. M., and Stallcup, M. R. (2000). Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300 [In Process Citation]. *J Biol Chem* 275, 40810-6 promoter.
- Conrad, D. J., and Lu, M. (2000). Regulation of human 12/15-lipoxygenase by Stat6-dependent transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 226-34.
- Corry, D. B., and Kheradmand, F. (1999). Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 402, B18-23.
- Corry, D. B. (2002). Emerging immune targets for the therapy of allergic asthma. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 55-64.
- Curiel, R. E., Lahesmaa, R., Subleski, J., Cippitelli, M., Kirken, R. A., Young, H. A., and Ghosh, P. (1997). Identification of a Stat-6-responsive element in the promoter of the human interleukin-4 gene. *Eur J Immunol* 27, 1982-7.
- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J., and Yamamoto, K. R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 12, 3343-56.
- Delphin, S., and Stavnezer, J. (1995). Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/p50. *J Exp Med* 181, 181-92.
- Dilworth, F. J., and Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-54.
- Ding, X. F., Anderson, C. M., Ma, H., Hong, H., Uht, R. M., Kushner, P. J., and Stallcup, M. R. (1998). Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol* 12, 302-13.
- Doppler, W., Groner, B., and Ball, R. K. (1989). Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 104-8.

Doppler, W., Hock, W., Hofer, P., Groner, B., and Ball, R. K. (1990). Prolactin and glucocorticoid hormones control transcription of the beta-casein gene by kinetically distinct mechanisms. *Mol Endocrinol* **4**, 912-9.

Doppler, W., Geymayer, S., and Weirich, H. G. (2000). Synergistic and antagonistic interactions of transcription factors in the regulation of milk protein gene expression. Mechanisms of cross-talk between signalling pathways. *Adv Exp Med Biol* **480**, 139-46.

Doppler, W., Windegger, M., Soratroi, C., Tomasi, J., Lechner, J., Rusconi, S., Cato, A. C., Almlof, T., Liden, J., Okret, S., Gustafsson, J. A., Richard-Foy, H., Starr, D. B., Klocker, H., Edwards, D., and Geymayer, S. (2001). Expression level-dependent contribution of glucocorticoid receptor domains for functional interaction with STAT5. *Mol Cell Biol* **21**, 3266-79.

Foster, P. S. (1999). STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin Exp Allergy* **29**, 12-6.

Gerritsen, M. E., Williams, A. J., Neish, A. S., Moore, S., Shi, Y., and Collins, T. (1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *PNAS* **94**, 2927-32.

Gingras, S., Simard, J., Groner, B., and Pfitzner, E. (1999). p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6. *Nucleic Acids Res* **27**, 2722-9.

Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D. M., and Coqueret, O. (2002). Functional Interaction of STAT3 Transcription Factor with the Coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* **277**, 8004-11.

Goenka, S., Youn, J., Dzurek, L. M., Schindler, U., Yu-Lee, L. Y., and Boothby, M. (1999). Paired Stat6 C-terminal transcription activation domains required both for inhibition of an IFN-responsive promoter and trans-activation. *J Immunol* **163**, 4663-72.

Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., and Groner, B. (1994). Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J* **13**, 4361-9.

Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**, 536-9.

Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* **58**, 14-9.

Grimley, P. M., Dong, F., and Rui, H. (1999). Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev* **10**, 131-57.

Grunewald, S. M., Werthmann, A., Schnarr, B., Klein, C. E., Brocker, E. B., Mohrs, M., Brombacher, F., Sebald, W., and Duschl, A. (1998). An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse: inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. *J Immunol* **160**, 4004-9.

Hall, J. M., Chang, C. Y., and McDonnell, D. P. (2000). Development of peptide antagonists that target estrogen receptor beta-coactivator interactions. *Mol Endocrinol* **14**, 2010-23.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.

- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-6.
- Hoeck, J., and Woisetschlager, M. (2001). Activation of eotaxin-3/ccl26 gene expression in human dermal fibroblasts is mediated by stat6. *J Immunol* 167, 3216-22.
- Hoey und Schindler (1998). STAT structure and function in signalling. *Cur op in Gen Dev* 1998, 8;582-587.
- Horvai, A. E., Xu, L., Korzus, E., Brard, G., Kalafus, D., Mullen, T. M., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1997). Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1074-9.
- Ikuta, T., Watanabe, J., and Kawajiri, K. (2002). Characterization of the LxxLL Motif in the Aryl Hydrocarbon Receptor: Effects on Subcellular Localization and Transcriptional Activity. *J Biochem (Tokyo)* 131, 79-85.
- Jayawickreme, S. P., Gray, T., Nettesheim, P., and Eling, T. (1999). Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 276, L596-603.
- Kacha, A. K., Fallarino, F., Markiewicz, M. A., and Gajewski, T. F. (2000). Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *J Immunol* 165, 6024-8.
- Kagami, S., Nakajima, H., Suto, A., Hirose, K., Suzuki, K., Morita, S., Kato, I., Saito, Y., Kitamura, T., and Iwamoto, I. (2001). Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms. *Blood* 97, 2358-65.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-14.
- Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., and Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-9.
- Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T. P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M., and Yokoyama, K. K. (1998). Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 393, 284-9.
- Kieslinger, M., Woldman, I., Moriggl, R., Hofmann, J., Marine, J. C., Ihle, J. N., Beug, H., and Decker, T. (2000). Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev* 14, 232-44.
- Kilmon, M. A., Ghirlando, R., Strub, M. P., Beavil, R. L., Gould, H. J., and Conrad, D. H. (2001). Regulation of IgE production requires oligomerization of CD23. *J Immunol* 167, 3139-45.
- Kim, H. J., Kim, J. H., and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 interacts with serum response factor and coactivates serum response element-mediated transactivations. *J Biol Chem* 273, 28564-7.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., and Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1-24.
- Koh, S. S., Chen, D., Lee, Y. H., and Stallcup, M. R. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem* 276, 1089-98.

- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-7.
- Kuperman, D., Schofield, B., Wills-Karp, M., and Grusby, M. J. (1998). Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med* 187, 939-48.
- Kurokawa, R., Kalafus, D., Ogliaastro, M. H., Kioussi, C., Xu, L., Torchia, J., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1998). Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. *Science* 279, 700-3.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lee, J. C., Hapel, A. J., and Ihle, J. N. (1982). Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line. *J Immunol* 128, 2393-8.
- Lee, S. K., Kim, H. J., Na, S. Y., Kim, T. S., Choi, H. S., Im, S. Y., and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem* 273, 16651-4.
- Lee, S. K., Kim, H. J., Kim, J. W., and Lee, J. W. (1999). Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Mol Endocrinol* 13, 1924-33.
- Lee, Y. H., Koh, S. S., Zhang, X., Cheng, X., and Stallcup, M. R. (2002). Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* 22, 3621-32.
- Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14, 2551-69.
- Lemon, B., Inouye, C., King, D. S., and Tjian, R. (2001). Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature* 414, 924-8.
- Leo, C. and Chen, J. D., (2000), The SRC-family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, 1-11.
- Linehan, L. A., Warren, W. D., Thompson, P. A., Grusby, M. J., and Berton, M. T. (1998). STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol* 161, 302-10.
- Litterst, C. M., and Pfitzner, E. (2001). Transcriptional Activation by STAT6 Requires the Direct Interaction with NCoA-1. *J Biol Chem* 276, 45713-21.
- Liu, X., Robinson, G. W., Gouilleux, F., Groner, B., and Hennighausen, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8831-5.
- Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J., and Shuai, K. (2001). A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3203-7.
- Lu, B., Reichel, M., Fisher, D. A., Smith, J. F., and Rothman, P. (1997). Identification of a STAT6 domain required for IL-4-induced activation of transcription. *J Immunol* 159, 1255-64.
- Lundgren, M., Larsson, C., Femino, A., Xu, M., Stavnezer, J., and Severinson, E. (1994). Activation of the Ig germ-line gamma 1 promoter. Involvement of C/enhancer-binding protein transcription factors and their possible interaction with an NF-IL-4 site. *J Immunol* 153, 2983-95.

- Luster, A. D. (2001). Antichemokine immunotherapy for allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1, 561-7.
- Ma, H., Baumann, C. T., Li, H., Strahl, B. D., Rice, R., Jelinek, M. A., Aswad, D. W., Allis, C. D., Hager, G. L., and Stallcup, M. R. (2001). Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol* 11, 1981-5.
- Mathew, A., MacLean, J. A., DeHaan, E., Tager, A. M., Green, F. H., and Luster, A. D. (2001). Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 193, 1087-96.
- McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T. M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12, 3357-68.
- McKenna, N. J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11697-702.
- McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 3-12.
- McKenna, N. J., and O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465-74.
- Messner, B., Stutz, A. M., Albrecht, B., Peiritsch, S., and Woisetschlager, M. (1997). Cooperation of binding sites for STAT6 and NF kappa B/rel in the IL-4-induced up-regulation of the human IgE germline promoter. *J Immunol* 159, 3330-7.
- Mikita, T., Kurama, M., and Schindler, U. (1998). Synergistic activation of the germline epsilon promoter mediated by Stat6 and C/EBP beta. *J Immunol* 161, 1822-8.
- Moriggl, R., Gouilleux-Gruart, V., Jahne, R., Berchtold, S., Gartmann, C., Liu, X., Hennighausen, L., Sotiropoulos, A., Groner, B., and Gouilleux, F. (1996). Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol Cell Biol* 16, 5691-700.
- Moriggl, R., Berchtold, S., Friedrich, K., Standke, G. J., Kammer, W., Heim, M., Wissler, M., Stocklin, E., Gouilleux, F., and Groner, B. (1997). Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 17, 3663-78.
- Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., and David, M. (2001). Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell* 104, 731-41.
- Na, S. Y., Lee, S. K., Han, S. J., Choi, H. S., Im, S. Y., and Lee, J. W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem* 273, 10831-4.
- Nakajima, H., Brindle, P. K., Handa, M., and Ihle, J. N. (2001). Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *Embo J* 20, 6836-44.

Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D., and Montminy, M. (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* *90*, 1107-12.

O'Shea, J. J., Gadina, M., and Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* *109 Suppl*, S121-31.

Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* *87*, 953-9.

Onate, S. A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T. E., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., Edwards, D. P., and O'Malley, B. W. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* *273*, 12101-8.

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* *10*, 2657-83.

Ostrand-Rosenberg, S., Grusby, M. J., and Clements, V. K. (2000). Cutting edge: STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma. *J Immunol* *165*, 6015-9.

Park, S. H., Yamashita, H., Rui, H., and Waxman, D. J. (2001). Serine phosphorylation of GH-activated signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) and STAT5b: impact on STAT5 transcriptional activity. *Mol Endocrinol* *15*, 2157-71.

Paulson, M., Pisharody, S., Pan, L., Guadagno, S., Mui, A. L., and Levy, D. E. (1999). Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. *J Biol Chem* *274*, 25343-9.

Pernis, A. B., and Rothman, P. B. (2002). JAK-STAT signaling in asthma. *JCI* *109*, 1279-83.

Petre, C. E., Wetherill, Y. B., Danielsen, M., and Knudsen, K. E. (2002). Cyclin D1: mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity. *JBC* *277*, 2207-15.

Pfizner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., and Groner, B. (1998). p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* *12*, 1582-93.

Piccoletti, R., Maroni, P., Bendinelli, P., and Bernelli-Zazzera, A. (1994). Rapid stimulation of mitogen-activated protein kinase of rat liver by prolactin. *Biochem J* *303*, 429-33.

Profita, M., Vignola, A. M., Sala, A., Mirabella, A., Siena, L., Pace, E., Folco, G., and Bonsignore, G. (1999). Interleukin-4 enhances 15-lipoxygenase activity and incorporation of 15(S)-HETE into cellular phospholipids in cultured pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* *20*, 61-8.

Reichardt, H. M., Horsch, K., Grone, H. J., Kolbus, A., Beug, H., Hynes, N., and Schutz, G. (2001). Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur J Endocrinol* *145*, 519-27.

Reinberg, D., Orphanides, G., Ebright, R., Akoulitchev, S., Carcamo, J., Cho, H., Cortes, P., Drapkin, R., Flores, O., Ha, I., Inostroza, J. A., Kim, S., Kim, T. K., Kumar, P., Lagrange, T., LeRoy, G., Lu, H., Ma, D. M., Maldonado, E., Merino, A., Mermelstein, F., Olave, I., Sheldon, M., Shiekhattar, R., Zawel, L., and et al. (1998). The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *63*, 83-103.

- Richards, M. L., and Katz, D. H. (1997). Analysis of the promoter elements necessary for IL-4 and anti-CD40 antibody induction of murine Fc epsilon RII (CD23): comparison with the germline epsilon promoter. *J Immunol* *158*, 263-72.
- Rowan, B. G., Weigel, N. L., and O'Malley, B. W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* *275*, 4475-83.
- Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., Jr., and Erlich, H. A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* *319*, 537-41.
- Sambrook, J., Fritsch E. F., Maniatis, T. 1998 *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schindler, C. W. (2002). Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* *109*, 1133-7.
- Schnurr, K., Borchert, A., and Kuhn, H. (1999). Inverse regulation of lipid-peroxidizing and hydroperoxyl lipid-reducing enzymes by interleukins 4 and 13. *Faseb J* *13*, 143-54.
- Schubach, W. H., Horvath, G., LeVea, C., and Tierney, J. (1997). Chromatin structure of the lymphocyte Fc epsilon receptor gene (CD23): identification of an upstream transcriptional enhancer. *J Immunol* *158*, 2228-35.
- Schurter, B. T., Koh, S. S., Chen, D., Bunick, G. J., Harp, J. M., Hanson, B. L., Henschen-Edman, A., Mackay, D. R., Stallcup, M. R., and Aswad, D. W. (2001). Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* *40*, 5747-56.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* *103*, 843-52.
- Shang, Y., Myers, M., and Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* *9*, 601-10.
- Shankaranarayanan, P., Chaitidis, P., Kuhn, H., and Nigam, S. (2001). Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem* *276*, 42753-60.
- Shen, C. H., and Stavnezer, J. (1998). Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol Cell Biol* *18*, 3395-404.
- Sheppard, H. M., Harries, J. C., Hussain, S., Bevan, C., and Heery, D. M. (2001). Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1. *Mol Cell Biol* *21*, 39-50.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E., and Ihle, J. N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* *380*, 630-3.
- Skinnider, B. F., Kapp, U., Mak, T. W. (2001). Interleukin 13: A growth factor in Hodgkin lymphoma. *Int. Arch. Allergy Immunol* *126*: 267-276.
- Skinnider, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U., and Mak, T. W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* *99*, 618-26.

- Snow, J. W., Abraham, N., Ma, M. C., Abbey, N. W., Herndier, B., and Goldsmith, M. A. (2002). STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 99, 95-101.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-8.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726-8.
- Stolzenberger, S., Haake, M., and Duschl, A. (2001). Specific inhibition of interleukin-4-dependent Stat6 activation by an intracellularly delivered peptide. *Eur J Biochem* 268, 4809-14.
- Stutz, A. M., and Woisetschlager, M. (1999). Functional synergism of STAT6 with either NF-kappa B or PU.1 to mediate IL-4-induced activation of IgE germline gene transcription. *J Immunol* 163, 4383-91.
- Stutz, A. M., Hoeck, J., Natt, F., Cuenoud, B., and Woisetschlager, M. (2001). Inhibition of interleukin-4- and CD40-induced IgE germline gene promoter activity by 2'-aminoethoxy-modified triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* 276, 11759-65.
- Sutton, B. J., and Gould, H. J. (1993). The human IgE network. *Nature* 366, 421-8.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627-30.
- Takeshita, A., Yen, P. M., Misiti, S., Cardona, G. R., Liu, Y., and Chin, W. W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 137, 3594-7.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J. N. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-50.
- Tomkinson, A., Duez, C., Cieslewicz, G., Pratt, J. C., Joetham, A., Shanafelt, M. C., Gundel, R., and Gelfand, E. W. (2001). A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 166, 5792-800.
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-84.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Wakao, H., Schmitt-Ney, M., and Groner, B. (1992). Mammary gland-specific nuclear factor is present in lactating rodent and bovine mammary tissue and composed of a single polypeptide of 89 kDa. *J Biol Chem* 267, 16365-70.
- Wang, D., Moriggl, R., Stravopodis, D., Carpino, N., Marine, J. C., Teglund, S., Feng, J., and Ihle, J. N. (2000a). A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5. *Embo J* 19, 392-9.
- Wang, L. H., Yang, X. Y., Kirken, R. A., Resau, J. H., and Farrar, W. L. (2000b).

- Targeted disruption of stat6 DNA binding activity by an oligonucleotide decoy blocks IL-4-driven T(H)2 cell response. *Blood* 95, 1249-57.
- Warren, W. D., and Berton, M. T. (1995). Induction of germ-line gamma 1 and epsilon Ig gene expression in murine B cells. IL-4 and the CD40 ligand-CD40 interaction provide distinct but synergistic signals. *J Immunol* 155, 5637-46.
- Worm, M., Krah, J. M., Manz, R. A., and Henz, B. M. (1998). Retinoic acid inhibits CD40 + interleukin-4-mediated IgE production in vitro. *Blood* 92, 1713-20.
- Woychik, N. A., and Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108, 453-63.
- Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293, 321-31.
- Wyszomierski, S. L., Yeh, J., and Rosen, J. M. (1999). Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 13, 330-43.
- Wyszomierski, S. L., and Rosen, J. M. (2001). Cooperative effects of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein-beta) on beta-casein gene transcription are mediated by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 15, 228-40.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* 279, 1922-5.
- Xu, Y., Klein-Hitpass, L., and Bagchi, M. K. (2000). E1A-mediated repression of progesterone receptor-dependent transactivation involves inhibition of the assembly of a multisubunit coactivation complex. *Mol Cell Biol* 20, 2138-46.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B. M., Montminy, M., and Evans, R. M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 294, 2507-11.
- Yamamoto, K., Quelle, F. W., Thierfelder, W. E., Kreider, B. L., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Silvennoinen, O., and Ihle, J. N. (1994). Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *MCB* 14, 4342-9.
- Yamamoto, H., Kihara-Negishi, F., Yamada, T., Hashimoto, Y., and Oikawa, T. (1999). Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene* 18, 1495-501.
- Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., and Livingston, D. M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *PNAS* 93, 10626-31.
- Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93, 361-72.
- Yu, P., Kosco-Vilbois, M., Richards, M., Kohler, G., and Lamers, M. C. (1994). Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369, 753-6.
- Zhu, M., John, S., Berg, M., and Leonard, W. J. (1999). Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell* 96, 121-30.
- Zubiaga, A. M., Munoz, E., and Huber, B. T. (1992). IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid-induced apoptosis. *J Immunol* 149, 107-12.

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

Claudia Monika Litterst
Diplom-Biologin
Falkstr. 106
60487 Frankfurt

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 4.01.1973
Geburtsort: Kürzell (Baden)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische und universitäre Ausbildung:

1979-1983	Grundschule in Meißenheim-Kürzell (Baden)
1983-1992	Gymnasium in Lahr-Schwarzwald (Baden); Abschluß Abitur
1992-1999	Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs- Universität in Freiburg; Abschluß Diplom
1/1997-6/1997	Industrie-Praktikum mit dem Titel „Identifizierung neuer Östrogen-induzierter Gene in Knochenzellen mittels Differential Display“ bei Novartis, Pharma AG, Basel, Dept. Cancer Bone Metabolism in der Arbeitsgruppe von Dr. Dave Farley

12/1997-12/1998	Diplomarbeit mit dem Thema "Untersuchungen zur Interaktion von β -Catenin mit TBP" am Max-Planck-Institut für Immunbiologie Dept. Molekulare Entwicklungsbiologie in Freiburg in der Arbeitsgruppe von Dr. Rolf Kemler unter der Betreuung von Prof. Dr. Alfred Sippel, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
seit 1999	Promotionsarbeit am Georg-Speyer-Haus, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Dr. Edith Pfitzner unter der Betreuung von Prof. Dr. Starzinski-Powitz, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

8.2 Veröffentlichungen

Hecht, A., Litterst, C. M., Huber, O. and Kemler, R. (1999). Functional Characterization of multiple transactivating elements in β -Catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J Biol Chem* 274: 18017-18025.

Litterst C. M. and Pfitzner E. (2001). Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. *J Biol Chem* 276: 45713-45721.

Litterst C. M. and Pfitzner E. (2002). A LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1. *J Biol Chem*, *im Druck*.

Litterst C. M., Marilley D. and Pfitzner E.. NCoA-1 is an essential coactivator of STAT5. *In Vorbereitung*.

8.3 Patente

Inventors: Pfitzner E. and Litterst C. M.

Methods for identifying substances which modulate interleukin 4 signaling

No. 01117097.4-1223

8.4 Veröffentlichte Abstracts

C. Litterst, B. Groner and E. Pfitzner (1999). Investigation of coactivators stimulating STAT5-mediated transactivation. 24th European symposia on hormonal and cell regulation.

Litterst C. M. , Pfitzner E. (2001). Involvement of steroid hormone receptor coactivators in IL-4-induced STAT6-mediated transactivation. Signal transduction 2001, 1-2:144

Marilley D., Litterst C., Pfitzner E. (2001). Involvement of coactivators in the regulation by STAT5 in mammary epithelial cells. Signal transduction 2001, 1-2:144

Litterst C., Marilley D., Gringas S., Groner B. Simard J. Pfitzner E. (2001). Coactivators in the transcriptional regulation by STAT5 und STAT6. Signal transduction 2001 (Suppl.1):70.

C. Litterst, D. Marilley and E. Pfitzner (2001). Investigation of coactivators stimulating STAT5-mediated transactivation. Signal transduction 2001 (Suppl.1):78.

C. M. Litterst and E. Pfitzner (2002). Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. Keystone Symposia 2002. JAKs and STATs: Activation and Biological Impact. Abstract book, p. 62, No. 308.

8.5 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Frau Dr. Edith Pfitzner für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrem Labor durchzuführen. Ich bedanke mich für die intensive Betreuung, insbesondere die stete Diskussionsbereitschaft sowie die aufmunternden Worte in schwierigen Phasen der Arbeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für die Betreuung der Arbeit. Frau PD Dr. Barbara Schnierle danke ich für die Begutachtung der Arbeit. Herrn PD Dr. Andreas Hecht gilt mein besonderer Dank, da er mir die Grundkenntnisse molekularbiologischen Arbeitens beibrachte.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pfitzner, nämlich Frauke, Dominique, Stefanie, Sandra, Daniela, unseren „Nachbarn“ in der Schnierle-Gruppe, insbesondere Sonja Thaler, und den übrigen Kollegen im Georg-Speyer-Haus für die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich meinen Praktikanten Dilek Hasgün, Cornelius Abel, Jürgen Grief, Jörg Mehnert und Martin Wagner danken, die mich jeweils ein kleines Stück des Weges begleiteten und natürlich dem Diplomanden Philipp Schild.

Ich danke Dr. Klaus Lehmen für die große Hilfe bei Computer-Problemen und Margot Landerz für die Sequenzierung meiner Konstrukte.

Ich danke ganz herzlich Frank Eckerdt für seine große Hilfsbereitschaft und für seine sowohl fachliche als auch freundschaftliche Unterstützung, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Außerdem möchte ich allen meinen Freunden außerhalb der Laborwelt danken, die mich auf ihre Weise seelisch unterstützten, besonders Katja, Ute, Thomas, Mr. X, George, Mark, Mando, Mandingo, Romano und David.

Schließlich danke ich meinen Geschwistern und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung weder mein Studium, geschweige denn diese Doktorarbeit möglich gewesen wäre.