

**Die Reduzierung der REDD1 Expression -
eine neue, nicht-kanonische Funktion von STAT3**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctorum rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Nadine Köhler, M. Sc.

geb. am 29.10.1982 in Halberstadt

Gutachter: Prof. Dr. Fred Schaper

Gutachterin: Prof. Dr. Iris Behrmann

eingereicht am: 20.11.2023 verteidigt am:

17.07.2024

Publikationsliste

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Köhler N, Wundrack N, Schulz S, Bartonitz F, Schaper F, Dittrich A. (2023) *Non-canonical STAT3 function reduces REDD1 transcription*. FEBS J. 2023;290:1765–81.
doi:10.1111/febs.16679.

Weitere Veröffentlichungen

Köhler N, Miri N, Dittrich A. (2023) *Quantification of total and phosphorylated STAT3 by calibrated western blotting*. Star Protocols 2023;4:102508
doi: 10.1016/j.xpro.2023.102508

Miri N, **Köhler N**, Dittrich A. (2023) *Quantification of membrane-bound cytokine receptors by calibrated flow cytometry*. STAR Protocols. 2023;4:102511.
doi:10.1016/j.xpro.2023.102511.

Klepsch O, Namer LS, **Köhler N**, Kaempfer R, Dittrich A, Schaper F. (2019) Intragenic regulation of SOCS3 isoforms. Cell Commun. Signal. 2019;17:70.
doi:10.1186/s12964-019-0379-6.

Literaturverzeichnis

Publikationsliste	2
Zusammenfassung	9
Summary	11
Abkürzungsverzeichnis	13
1. Einleitung	18
1.1 Regulation der Genexpression bei Eukaryoten	18
1.1.1 Die STAT Familie.....	19
1.1.2 STAT3	19
1.1.3 Die kanonische STAT3 Aktivierung: Der IL-6-induzierte JAK/STAT Signalweg	22
1.1.4 Nicht-kanonische Funktionen von STAT3	23
1.1.5 STAT1 und STAT3: ähnlich und doch unterschiedlich	24
1.2 Die zelluläre Stressantwort.....	24
1.2.1 Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1).....	24
1.2.1 Regulation der REDD1 Expression	26
1.2.2 REDD1 ist ein Inhibitor des mTOR Signalweges.....	27
1.2.3 STAT3 reduziert die REDD1 Expression	30
2. Zielstellung.....	32
3. Material und Methoden	33
3.1 Chemikalien	33
3.2 Puffer und Lösungen.....	33
3.3 Inhibitoren	33
3.4 Zytokine.....	33
3.5 Plasmide.....	33

3.5.1 Plasmide für die Analyse von Promotoraktivitäten.....	33
3.5.2 Ausgangsplasmide für die Generierung retroviraler Expressionsvektoren...	34
3.5.3 Retrovirale Vektoren für die Generierung stabil transduzierter MEF Zelllinien	34
3.6 Oligonukleotide.....	35
3.6.1 Oligonukleotide für die Klonierung der STAT3 Varianten	35
3.6.2 Oligonukleotide für die Sequenzierungen der pMOWS STAT3 Plasmide.....	35
3.6.3 Oligonukleotide für Expressionsanalysen.....	36
3.6.4 Oligonukleotide für CHIP Analysen	37
3.7 Antikörper	39
3.7.1 Primäre Antikörper	39
3.7.2 Sekundäre Antikörper.....	40
3.8 Restriktionsenzyme.....	41
3.9 Prokaryotische Zellen.....	41
3.9.1 Bakterienstämme.....	41
3.9.2 Nährmedien und Lösungen für die Bakterienkultur.....	41
3.9.3 Langzeitaufbewahrung und Kulturbedingungen	41
3.9.4 Herstellung kompetenter Bakterien.....	41
3.9.5 Transformation von Bakterien und Plasmid-Präparation.....	42
3.10 Eukaryotische Zellen	42
3.10.1 Zelllinien.....	42
3.10.2 Stabil transduzierte Zelllinien	43
3.10.3 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	43
3.10.4 Langzeitaufbewahrung und Kulturbedingungen	44
3.10.5 Stimulation der Zellen.....	45

3.10.6 Liposomale Transfektion.....	45
3.10.7 Virusproduktion in PlatE Zellen	46
3.10.8 Retrovirale Transduktion	46
3.11 Molekularbiologische Methoden.....	46
3.11.1 Klonierung.....	46
3.11.1.1 Amplifikation von Plasmid-DNA mittels Polymerase–Ketten–Reaktion (PCR).....	46
3.11.1.2 Agarose Gelelektrophorese	47
3.11.1.3 Gelextraktion	48
3.11.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	48
3.11.1.5. Restriktionsverdau	48
3.11.1.6. Ligation von DNA Fragmenten.....	49
3.11.1.7 Sequenzierung	49
3.11.2 Reporter-Gen-Assay	49
3.11.2.1 Lyse der transfizierten Zellen.....	50
3.11.2.2 Luciferase-Assay	50
3.11.2.3 β -Galactosidase-Assay.....	50
3.11.3 Reverse Transkription mit anschließender quantitativer real time PCR	51
3.11.3.1 RNA-Isolation	51
3.11.3.2 <i>Complementary</i> DNA (cDNA) Synthese	51
3.11.3.3 qRT-PCR.....	51
3.12 Immunochemische Methoden	52
3.12.1 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	52
3.12.1.1. Herstellen von magnetischen Protein G <i>beads</i> gebunden an Antikörper	52

3.12.1.2 <i>crosslinken</i> von DNA und Proteinen	53
3.12.1.3 Chromatin Präparation und enzymatischer Verdau des Chromatins ...	53
3.12.1.4 Überprüfung der Fragment Größen	54
3.12.1.5 <i>Pre-clearing</i> des Chromatins und Immunopräzipitation	55
3.12.1.6 Waschen der Präzipitate und Elution der DNA	56
3.12.1.7 DNA-Aufreinigung.....	56
3.12.1.8 Quantifizierung der DNA und Datenauswertung	56
3.12.2 Zelllysate	56
3.12.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	57
3.12.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.12.5 Western Blot	59
3.12.6 Immunodetektion von Proteinen	60
3.12.7 Intrazelluläre Durchflußzytometrie	60
3. 12.8 Konfokale Mikroskopie	61
3.13 Statistik	61
4. Ergebnisse.....	62
4.1 IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression spezies-übergreifend in Mensch und Maus.....	62
4.2 IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression unabhängig von der Proteinbiosynthese	64
4.3 STAT3 reduziert die REDD1 Expression	65
4.4 Die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 ist entscheidend für die Reduzierung der REDD1 Expression.....	69
4.5 Die Phosphorylierung von STAT3 an S727 ist nicht erforderlich für die Reduzierung der REDD1 Expression.....	73

4.6 Die Phosphorylierung von STAT3 S727 trägt zur Y705-abhängigen Reduzierung der REDD1 mRNA Expression bei.....	76
4.7 STAT3 bindet an <i>DDIT4</i> Promotor Elemente	78
4.8 Die kanonische DNA-Bindung von STAT3 ist für die Reduzierung der REDD1 Expression nicht notwendig.....	83
4.9 Die N-terminale Domäne von STAT3 ist notwendig für die Reduzierung der REDD1 Expression	86
5.9 Die Reduzierung der REDD1 Expression ist spezifisch für STAT3	88
5. Diskussion	90
5.1 Die Reduzierung der REDD1 Expression durch IL-6 ist konserviert in Mensch und Maus.....	91
5.2 STAT3 hemmt die REDD1 Expression	93
5.3 STAT3 wird an den <i>DDIT4</i> Promotor rekrutiert und reduziert dessen Aktivität ...	93
5.4 Die Bedeutung der DBD und der NTD von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression	96
5.5 Die Bedeutung der Schlüssel-Phosphorylierungsstellen Y705 und S727 von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression	100
5.6 Die Reduzierung der REDD1 Expression ist spezifisch für STAT3	101
5.7 Die physiologischen Konsequenzen einer IL-6-vermittelten Reduzierung der REDD1 Expression	102
6. Ausblick	104
6.1 Welchen Einfluss hat IL-6 auf den Methylierungsstatus des <i>DDIT4</i> Promotors?	104
6.2 Wird DNMT1 an den <i>DDIT4</i> Promotor rekrutiert?	104
6.3 Ist die Bindung von STAT3 an unkonventionelle Konsensus Motive im <i>DDIT4</i> Promotor verantwortlich für die Reduzierung der REDD1 mRNA Expression?.	105

6.4 Benötigt STAT3 weitere Interaktionspartner für die Reduzierung der REDD1 Expression?	105
6.5 Wie trägt die IL-6-induzierte Reduzierung der REDD1 Expression zur Insulinresistenz bei Diabetes bei?	106
7. Literaturverzeichnis.....	107
8. Ehrenerklärung	123

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor STAT3 wird Zytokin-abhängig aktiviert und ist an der Regulation diverser biologischer Prozesse beteiligt. STAT3 agiert in seiner kanonischen Funktion als Aktivator der Transkription und induziert hauptsächlich die Expression von Genen, welche mit der Regulation von Proliferation, Immunität und Inflammation assoziiert sind. Es sind jedoch auch Beispiele beschrieben, in denen STAT3 die Expression von Zielgenen unterdrückt. So reduziert STAT3 die Expression des mTOR-Inhibitors REDD1, indem es die Expression der REDD1 mRNA reduziert. REDD1 spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären, eukaryotischen Stressantwort. REDD1 hemmt die Aktivierung der Proteinkinase mTOR, welche hauptsächlich Zellproliferation, Metabolismus und die zelluläre Homöostase reguliert. Eine transiente, Stress-induzierte Hemmung der mTOR Aktivierung durch REDD1 führt zu einer Senkung der Proliferations- und Stoffwechselrate, wodurch die Zelle Energie einspart, die sie zur Bewältigung der Stresssituation benötigt. Eine fehlregulierte REDD1 Expression korreliert mit einer Fehlregulation von mTOR und hat somit einen wesentlichen Einfluss auf die zelluläre Homöostase.

Derzeit ist wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, welche einer STAT3-abhängigen Unterdrückung der Genexpression zu Grunde liegen. Daher lag der Focus dieser Arbeit in der Aufklärung des STAT3-abhängigen Mechanismus zur Reduzierung der REDD1 Expression.

Diese Arbeit zeigt erstmals eine IL-6-vermittelte Rekrutierung von STAT3 an den Promotor des REDD1-codierenden Gens *DDIT4* und eine STAT3-abhängige Reduzierung der *DDIT4* Promotor Aktivität. Überraschenderweise ist die Bindung von STAT3 an kanonische STAT3 Konsensus Sequenzen für die Reduzierung der REDD1 Expression nicht nötig. Die N-terminale Domäne sowie die Tyrosin-705 Phosphorylierung von STAT3 sind dagegen essentiell für die Reduzierung der REDD1 Expression. Des Weiteren ist die Reduzierung der REDD1 Expression spezifisch für STAT3, da weder die Expression noch die Aktivierung von STAT1 einen Einfluss auf die REDD1 Expression hat.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit einen neuen, nicht-kanonischen STAT3-abhängigen Mechanismus zur Reduzierung der Genexpression. Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern somit das Wissen über die regulatorische Vielfältigkeit von STAT3 über die klassische

Transkriptionsaktivierung von Zytokin-regulierten Zielgenen hinaus zu einer komplexeren Funktion bei der Regulation der Genexpression und dem Zusammenwirken von inflammatorischen und Stress-induzierten Signalwegen.

Die Reduzierung der REDD1-Expression durch die nicht-kanonische STAT3-Funktion könnte zur Entstehung von proliferativen Erkrankungen unter Entzündungs- und Stressbedingungen beitragen und spiegelt möglicherweise eine neue Facette des pathologischen Potenzials von STAT3 wider.

Ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von inflammatorischen und Stress-induzierten Signalkaskaden ermöglicht es, die zugrunde liegenden pathophysiologischen, molekularen Mechanismen bei der Entstehung von proliferativen und Inflammatorischen Krankheiten zu entschlüsseln. Daraus können sich neue potentielle Möglichkeiten für die Entwicklung gezielter Therapieansätze ergeben.

Summary

The transcription factor STAT3 is activated in the context of inflammation after stimulation of cells with cytokines such as IL-6. In its canonical function, STAT3 acts as an activator of transcription and mainly induces the expression of genes associated with the regulation of proliferation and inflammation. However, STAT3 is also able to represses the expression of target genes. For example, STAT3 reduces expression of the mTOR inhibitor REDD1 by reducing the synthesis of REDD1 mRNA. REDD1 plays a key role in the cellular eukaryotic stress response. REDD1 inhibits the protein kinase mTOR, which mainly promotes translation and cell proliferation. Inhibition of mTOR by REDD1 leads to a decrease in translation and metabolic rates, which conserves energy that the cell uses to cope with the stress situation.

To date, little is known about the molecular mechanisms underlying STAT3-dependent repression of gene expression. Therefore, the focus of this work was to elucidate the STAT3-dependent mechanisms for reducing REDD1 expression.

This work demonstrates for the first time IL-6-mediated recruitment of STAT3 to the *DDIT4* promoter and STAT3-dependent reduction of *DDIT4* promoter activity. Interestingly, binding of STAT3 to canonical consensus sequences is not required for the reduction of REDD1 expression. Instead, the N-terminal domain as well as tyrosine 705 phosphorylation of STAT3 are essential for the reduction of REDD1 expression. Furthermore, the reduction of REDD1 expression is specific to STAT3, as neither STAT1 expression nor STAT1 activation has any effect on REDD1 expression.

In summary, this work provides a novel non-canonical STAT3-dependent mechanism for reducing gene expression. Thus, the results of this work expand the knowledge of the regulatory diversity of the transcription factor STAT3 beyond the classical transcriptional activation of cytokine-regulated target genes to a more complex function in the regulation of gene expression and the interaction of inflammatory and stress-induced signaling pathways.

Reduction of REDD1 expression by non-canonical STAT3 function may contribute to the development of proliferative diseases under inflammatory and stress conditions and may reflect a new facet of the pathological potential of STAT3.

Summary

A better understanding of the interplay between inflammatory and stress-induced signaling cascades will allow us to unravel the underlying pathophysiological molecular mechanisms involved in the development of proliferative and inflammatory diseases. This may result in new potential opportunities for the development of targeted therapeutic approaches.

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Homozygoter <i>knock-out</i>
10q22.1	Chromosom 10, langer Arm, Band 22.1
µg, µl, µm	Microgramm, Microliter, Micrometer
A	
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	Protein Kinase B
APRE	Akut-Phase Responsive Elemente
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
B	
bp	Basenpaar
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	
C	Cystein
cAMP	zyklisches (<i>cyclic</i>) Adenosinmonophosphat
CCD	<i>coiled-coiled</i> Domäne
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CDS	<i>coding sequence</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIP-Seq	Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender DNA Sequenzierung
Chr.	Chromosom
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein 9</i>
D	
DBD	DNA-Bindedomäne
DDIT4	<i>DNA Damage Inducible Transcript 4</i>
DEP	<i>Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin</i>
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
Dex	Dexamethason
Dig2	Dexamethason-induziertes Gen 2
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
dN	delta (ohne) N-terminale Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1
DTT	Dithiothieol
E	
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
ELK 1	<i>ETS domain-containing protein</i>
ERK1/2	extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen 1/2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
ETS	<i>Erythroblast Transformation Specific</i>
ETV3	<i>ETS Translocation Variant 3</i>
F	
F	Phenylalanin
FKS	Fetales Kälber Serum
FOXP3	<i>Forkhead box protein 3</i>
Fw	<i>forward</i>
G	
G	Glycin
Gadd45b	<i>growth arrest and DNA damage inducible beta</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
gp80	Glykoprotein 80
gp130	Glykoprotein 130
GR	Glukokortikoid Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
H	
h	Stunde
HAT	Histon-Acetylase
HDAC	Histon-Deacetylase
HepG2	humane Hepatomzelllinie
hg	<i>human genome</i>
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
HNF4	<i>hepatocyte nuclear factor 4</i>
HP1	Heterochromatin Protein 1
Hy-IL-6	Hyper Interleukin 6
I	
I	Isoleucin

Abkürzungsverzeichnis

IFN		Interferon
IgG		Immunglobulin G
I κ B		Inhibitor von NF- κ B
IL-6		Interleukin 6
IL-6R α		Interleukin 6 Rezeptor <i>alpha</i>
iNos		<i>inducible Nitric oxide synthases</i>
IP		Immunopräzipitation
	J	
JAK		Janus Kinase
	K	
kDa		Kilo Dalton
kb		Kilo Basen
	L	
LB		<i>Lysogeni broth</i>
LD		Linker Domäne
LPS		Lipopolysaccharid
	M	
min		Minute
MLST8		<i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
MNase		Micrococcus Nuklease
mRNA		<i>messenger RNA</i>
miRNA		micro RNA
mSIN1		<i>Stress-activated map kinase-interacting protein 1</i>
mTOR		<i>mamalian target of rapamycin</i>
mTORC		<i>mamlian target of rapamycin complex</i>
mut		mutiert
MW		Mittelwert
	N	
N		Asparagin
NF- κ B		<i>Nuclear factor NF-kappa-B</i>
NF- κ B p65		DNA-bindende Untereinheit p65 von NF- κ B
	O	
OCT4		<i>octamer binding transcription factor 4</i>
OD		optische Dichte
Opti-MEM		<i>optimized-Minimal Essential Medium</i>
	P	
p(Y)STAT3		Tyrosyl-phosphoryliertes STAT3
P/S		Penicillin/Streptomycin
PBS		<i>Phosphate buffered Saline</i>

Abkürzungsverzeichnis

PCI	Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PKB	Protein Kinase B
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRAS40	<i>Proline-rich AKT1 substrate 40</i>
Protor	<i>protein observed with rictor</i>
Q	
Q	Glutamin
qPCR	quantitative <i>real time</i> PCR
R	
Raptor	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
REDD1	<i>Regulated in Development and DNA Damage 1 Protein</i>
Rev	reverse
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	reverse Transkription mit anschließender quantitativer <i>real time</i> PCR
S	
s	Sekunde
S	Serin
SBNO2	<i>Strawberry Notch Homolog 2</i>
SDHA	<i>succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SHP1	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
sIL-6R α	löslicher (<i>soluble</i>) Interleukin 6 Rezeptor <i>alpha</i>
SOCS3	<i>Supressor of Cytokine Signaling 3</i>
Src-	zusammengesetztes Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Aktivator of Transcription 3</i>
STD	<i>Standard deviation</i>
T	
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne

Abkürzungsverzeichnis

TF		Transkriptionsfaktor
TNF α		<i>tumour necrosis factor α</i>
TSC1/2		<i>Tuberous sclerosis complex 1/2</i>
TSS		Transkriptionsstartstelle
	U	
U		unit
uSTAT3		unphosphoryliertes STAT3
	V	
VDR		Vitamin D Rezeptor
	W	
WT		Wildtyp
	Y	
Y		Tyrosin

1. Einleitung

1.1 Regulation der Genexpression bei Eukaryoten

Die Aktivierung oder Hemmung der Expression spezifischer Gene als Antwort auf interne oder externe Stimuli ist ein Grundprinzip in der Regulation biologischer Prozesse. Die Regulation der Genexpression bei Eukaryonten ist ein hochkomplexer Prozess, welcher sowohl durch transkriptionelle als auch durch epigenetische Mechanismen streng kontrolliert wird. In eukaryotischen Zellen liegt die genomische DNA gewunden um Histone in Form von Chromatin vor. Die DNA ist in der gewundenen Form nicht zugänglich für DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Polymerasen. Jedoch können Histone und/oder DNA modifiziert werden, um die Transkription zu regulieren. Chromatin-modifizierende Proteine wie beispielsweise Histon-Acetyltransferasen (HAT), Histon-Deacetylasen (HDAC) und Histon-Methyltransferasen (HMT) ändern die Chromatin-Struktur durch epigenetische Modifikationen und ermöglichen damit eine Regulation der Transkription. Die Acetylierung von Histonen korreliert mit einem offenen Chromatinzustand, der den Zugang von Transkriptionsfaktoren an die DNA und somit die Initiation der Genexpression ermöglicht. Histon-Methylierungen finden sich in Promotorbereichen von sowohl aktiv transkribierten als auch reprimierten Genen (zusammengefasst in [1]). DNA-modifizierende Proteine wie DNA-Methyltransferasen (DNMT) ändern die Struktur der DNA und regulieren dadurch die Transkription. Die Methylierung von DNA-Bereichen führt im Allgemeinen zur Hemmung der Genexpression (zusammengefasst in [2]).

Neben Chromatin- bzw. DNA-modifizierenden Proteinen zählen Transkriptionsfaktoren und ihre korrespondierenden co-Faktoren zu den Schlüsselkomponenten der Transkriptionsregulation. Transkriptionsfaktoren besitzen mindestens eine DNA-Bindedomäne (DBD) sowie eine Transaktivierungsdomäne (TAD) und binden an cis-Elemente in der DNA. Allgemein wird zwischen generellen (basalen) und spezifischen Transkriptionsfaktoren unterschieden. Generelle Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Mitglieder der *Transcription Factor II* (TFII) Familie, binden zusammen mit der RNA-Polymerase an die TATA-Box und bilden so den basalen Initiationskomplex. Spezifische Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Vertreter der *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) Familie,

binden dagegen an spezifische DNA Sequenzen (responsive Elemente, (RE)) im Promotor oder in *Enhancer/Silencer* Regionen ihrer Zielgene. Spezifische Transkriptionsfaktoren agieren als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription und rekrutieren Chromatin- und/oder DNA-modifizierende Proteine. Zusätzlich bilden die meisten Transkriptionsfaktoren Komplexe mit co-Aktivatoren bzw. co-Repressoren (zusammengefasst in [3]).

1.1.1 Die STAT Familie

STAT Proteine gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die diverse biologische Prozesse regulieren, einschließlich Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Überleben von Zellen sowie der Immunantwort (zusammengefasst in [4]). Bis dato wurden sieben STAT Familienmitgliedern beschrieben: STAT1 und STAT2 [5], STAT3 [6], STAT4 [7], STAT5A und STAT5B [8] und STAT6 [9]. Sie werden konstitutiv exprimiert und pendeln Stimulus-unabhängig permant zwischen Zytoplasma und Nukleus (zusammengefasst in [10]). Allen STAT Faktoren gemeinsam ist ihre konservierte Domänenstruktur mit einer N-terminalen Domäne (NTD) gefolgt von einer *coiled-coil* Domäne (CCD), einer DNA-Bindedomäne (DBD), einer Linker Domäne (LD), einer *Src homology 2* (SH2) Domäne und einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) (zusammengefasst in [11]). Eine weitere Gemeinsamkeit der STAT Faktoren ist ihre Aktivierung durch die Phosphorylierung eines spezifischen, C-terminalen Tyrosyl-Rests (zusammengefasst in [12]). Die einzelnen STAT Familienmitglieder unterscheiden sich in der Größe der einzelnen Domänen, wobei STAT1 und STAT3 die größten Sequenzhomologien aufweisen. Hervorzuheben ist die zentrale Bedeutung von STAT3 für die Regulation der Genexpression unter (patho)-physiologischen Bedingungen (zusammengefasst in [13]).

1.1.2 STAT3

STAT3 wurde erstmals in den 1990er Jahren beschrieben als DNA-bindendes Protein, welches mit spezifischen Promotorbereichen von Akut-Phase Genen, auch Akut-Phase Responsive Elemente (APRE) genannt, interagiert [6, 14, 15]. Später wurde gezeigt, dass STAT3 an der Regulation sehr vieler weiterer, biologischer Prozesse beteiligt ist. Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender DNA-Sequenzierung (ChIP-Seq) Datensätze der *TFlank* Datenbank zeigen, dass Promotorbereiche von mehr als 15.000 verschiedenen

Genen STAT3 Konsensus-Sequenzen enthalten und somit theoretisch von STAT3 reguliert werden könnten [16]. STAT3 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung, Angiogenese und Immunität sowie bei Entzündungen, Apoptose, Autoimmunerkrankungen, Schlaganfall, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs (zusammengefasst in [17]).

Eine konstitutive STAT3 Aktivierung wurde in verschiedenen Tumoren wie dem Zervixkarzinom [18], Ösophaguskarzinom [19], B-Zell Lymphom [20] und bei Magenkrebs [21] beobachtet und korreliert mit einer geringen Überlebenschance der betroffenen Patienten. Die große biologische Bedeutung von STAT3 wird außerdem durch die Tatsache bestätigt, dass, im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der STAT-Familie, ein STAT3 *knock-out* in Mäusen zu embryonaler Letalität führt [22].

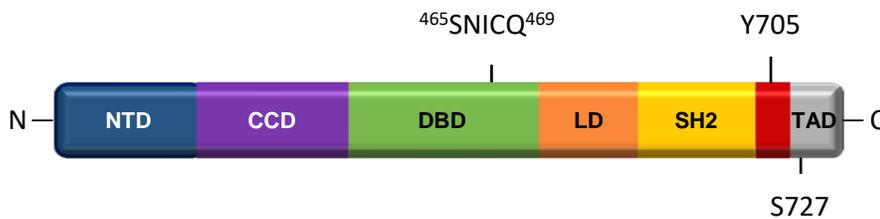


Abb. 1.1: Domänen Struktur von STAT3. NTD = N-terminale Domäne, CCD = coiled-coil Domäne, DBD = DNA-Bindedomäne, LD = Linker Domäne, SH2 = Src homology 2 domain und TAD = C-terminale Transaktivierungsdomäne, Y = Tyrosin, S = Serin, N = Asparagin, I = Isoleucin, C = Cystein, Q = Glutamin

STAT3 besteht wie alle STAT Proteine aus sechs konservierten Domänen (Abb. 1.1). Die NTD vermittelt die Interaktion von STAT3 mit anderen Proteinen. So interagiert die NTD von STAT3 beispielsweise mit Chromatin-modifizierenden Enzymen wie der HAT p300 und HDAC1. Dies führt nicht nur zur Rekrutierung dieser Enzyme an die Promotoren von STAT3 Zielgenen, sondern auch zur Regulierung der Acetylierung von STAT3 selbst [23]. Die Acetylierung von STAT3 stellt folglich neben der Phosphorylierung eine weitere, post-translationelle Modifikation von STAT3 dar. Des Weiteren ist die NTD involviert in die Zytokin-abhängige Kerntranslokation von STAT3 [24]. Außerdem fördert die NTD die Bildung von STAT3 Tetrameren [25, 26]. STAT3 Tetramere haben mehr Kontakt mit der DNA als Dimere und bilden stabilere STAT3:DNA Komplexe. Die Bildung von STAT3 Tetrameren ist beispielsweise essentiell für die vollständige, Zytokin-induzierte Aktivierung des

α2-Macroglobulin Gen Promotors [25]. Interessanterweise ist die NTD für die basale, Zytokin-unabhängige, nukleoplasmatische Translokation von STAT3 nicht nötig [24]. Die CCD ist essentiell für die Rekrutierung und Bindung von STAT3 an aktivierte Zytokin Rezeptoren [27]. Mittels der DBD bindet STAT3 an spezifische, palindromische DNA Konsensus Sequenzen ($TTC_n(2-4)GAA$) im Promotor von STAT3 Zielgenen. STAT3 bindet dabei bevorzugt an APREs mit $n = 3$ Nukleotiden [28]. In seiner kanonischen Funktion agiert STAT3 als Aktivator der Genexpression. Die Bindung von STAT3 an APREs induziert die Transkription von STAT3 Zielgenen. Die DBD von STAT3 bildet in der Tertiärstruktur fünf Schleifen, von denen die $\alpha 5$ -Schleife den engsten Kontakt mit der DNA hat. Die Sequenz $^{465}SNICQ^{469}$ innerhalb der $\alpha 5$ -Schleife ist dabei essentiell für die Bindung von STAT3 an die DNA [29]. Die kurze LD interagiert mit der DBD und mit der SH2 Domäne von STAT3 und unterstützt dadurch sowohl die Bindung von STAT3 an die DNA als auch die transkriptionelle Aktivität von STAT3 [30]. STAT Proteine sind die einzige Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer SH2 Domäne [31]. Die SH2 Domäne von STAT3 interagiert Sequenz-spezifisch mit phosphorylierten Tyrosyl-Motiven auf identischen oder anderen Proteinen. So vermittelt die SH2 Domäne sowohl eine Homodimerisierung von STAT3 als auch die Rekrutierung von STAT3 Monomeren an aktivierte Zytokin Rezeptoren. Das konservierte Tyrosin (Y) 705 befindet sich C-terminal zur SH2 Domäne und ist eine von zwei Schlüsselphosphorylierungsstellen für die Regulation der STAT3 Aktivität. Y705 wird beispielsweise als Antwort auf die Stimulation mit Zytokinen phosphoryliert. Die Tyrosyl-Phosphorylierung von STAT3 führt zur STAT3 Homodimerisierung oder zur Heterodimerisierung von STAT3 und STAT1 (zusammengefasst in [32]). In der C-terminalen TAD von STAT3 befindet sich das konservierte Serin (S) 727, welches als zweite Schlüsselphosphorylierungsstelle für die Regulation der STAT3 Aktivität betrachtet wird. S727 wird unabhängig von Y705 als Antwort auf externe Stimuli phosphoryliert und wird als Verstärker der transkriptionellen Aktivität von STAT3 diskutiert (zusammengefasst in [33]).

1.1.3 Die kanonische STAT3 Aktivierung: Der IL-6-induzierte JAK/STAT Signalweg

STAT3 wird im Allgemeinen als Aktivator der Transkription betrachtet. Die kanonische STAT3 Aktivierung beruht auf der Aktivierung von Zell-Oberflächenrezeptoren durch Zytokine wie beispielsweise Interleukin-6 (IL-6). Der IL-6 Rezeptor (IL-6R) Komplex besteht aus den transmembranen Untereinheiten Glykoprotein 130 (gp130) und gp80 (IL-6R α). Im Gegensatz zu gp130, welches ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression von gp80 auf wenige Zelltypen wie Hepatozyten und Leukozyten beschränkt. Zusätzlich zu seiner membran-ständigen Form kann der IL-6R α durch alternatives Splicing oder durch proteolytische Spaltung auch in löslicher (*soluble*) Form (sIL-6R α) vorkommen [34, 35]. Die durch membran-ständige IL-6R α vermittelte IL-6-Signaltransduktion wird als *classic signalling* bezeichnet und induziert anti-inflammatorische, regenerative Signalantworten, wohingegen die durch sIL-6R α ausgelöste IL-6-Signaltransduktion als *trans-signalling* bezeichnet wird und pro-inflammatorisch wirkt (zusammengefasst in [36]). Je zwei IL-6R α , gp130 und IL-6 Moleküle bilden zusammen den aktiven IL-6 Rezeptorkomplex [37]. gp130 ist konstitutiv mit Janus-Kinasen (JAK) assoziiert [15]. Die Formation des aktiven IL-6 Rezeptorkomplexes bewirkt die Aktivierung und Autophosphorylierung der JAK. Anschließend phosphorylieren die aktivierten JAK Tyrosyl-Reste im cytoplasmatischen Teil des gp130. An die phosphorylierten Tyrosyl-Motive von gp130 werden STAT3 Monomere mittels ihrer SH2 Domäne rekrutiert und anschließend durch die JAK an Y705 phosphoryliert (zusammengefasst in [32]). Y705-phosphorylierte STAT3 Moleküle ((p)Y STAT3) dimerisieren und translozieren in den Zellkern. Dort binden sie an APREs innerhalb der Promotorregion ihrer Zielgene und regulieren so die Genexpression [6]. Ein bekanntes Zielgen von STAT3 ist das *Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)* Gen. Es codiert für den Kinase Inhibitor SOCS3, welcher die gp130-assoziierten JAK inhibiert und somit die Phosphorylierung und anschließende Dimerisierung von STAT3 verhindert. SOCS3 agiert folglich als negativer *Feedback* Regulator der IL-6-vermittelten Signaltransduktion [38]. Die klassische Annahme unphosphorylierter, zytoplasmatischer STAT3 Monomere ist durch die Entdeckung unphosphorylierter STAT3 Dimere erweitert worden [39–41].

1.1.4 Nicht-kanonische Funktionen von STAT3

Neben den bisher beschriebenen kanonischen Funktionen von STAT3 gibt es auch Beispiele für nicht-kanonische Funktionen von STAT3. Obwohl (p)Y STAT3 hauptsächlich als Transaktivator agiert, wird auch (p)Y STAT3 - vermittelte Transrepression beschrieben. So reprimiert (p)Y STAT3 z. B. die Expression hepatischer Gluconeogenese Enzyme [42]. Des Weiteren reprimiert (p)Y STAT3 in Tumorzellen die *SOCS3* Expression durch Rekrutierung von DNMT1 [43]. Zhang *et al.* zeigten, dass (p)Y STAT3 mit DNMT1 und HDAC1 interagiert. Dadurch wird sowohl der Promotor des *PTPN6* Gens, welches für die Phosphatase SHP1 codiert, methyliert als auch Histone im Promotorbereich von *PTPN6* acetyliert, wodurch die Expression von SHP1 epigenetisch reprimiert wird [44]. Ein ähnlicher Mechanismus wurde von Hou *et al.* beschrieben. (p)Y STAT3 vermittelt das epigenetische *silencing* des Gens, welches für das forkhead box P3 (FOXP3) Protein codiert, indem es HDAC5 und DNMT1 rekrutiert [45]. Zusätzlich agiert (p)Y STAT3 als transkriptioneller Repressor von *growth arrest and DNA damage-inducible beta* (*GADD45b*), indem es regulatorische Elemente im *GADD45b* Promotor bindet und somit für andere, aktivierende Transkriptionsfaktoren blockiert [46]. Weiterhin bindet (p)Y STAT3 an den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) und inhibiert dadurch die Transkription des *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) Gens [47].

Neben Beispielen für (p)Y STAT3 – vermittelte Repression der Genexpression gibt es auch Hinweise auf eine transrepressive Funktion von unphosphoryliertem STAT3 (uSTAT3) [48]. In Prostatakrebszellen unterdrückt uSTAT3 NTD-abhängig die Expression von proapoptischen Genen [49]. uSTAT3 interagiert mit NF- κ B und reduziert dadurch die Expression des *tumour necrosis factor α* (TNF α) als Antwort auf bakterielle Endotoxine [50]. Zusätzlich fördert uSTAT3 die Heterochromatin Formierung in Lungenkrebszellen, indem es mit Heterochromatin Protein 1 (HP1) interagiert und dieses dadurch stabilisiert [41]. Zusammengefasst agiert STAT3 sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Genexpression. Während die molekularen Mechanismen der Transaktivierung bereits ausführlich beschrieben sind, sind die Mechanismen der STAT3-vermittelten Repression der Genexpression divers und noch nicht vollständig verstanden.

1.1.5 STAT1 und STAT3: ähnlich und doch unterschiedlich

Innerhalb der STAT-Familie weisen STAT3 und STAT1 die größten Sequenzhomologien auf. Ihre jeweiligen physiologischen Funktionen sind jedoch eher gegensätzlich. STAT3 fördert im Allgemeinen das Überleben und die Proliferation von Zellen, kann Entzündungen entgegenwirken und führt zu Immuntoleranz. Im Gegensatz dazu fördert STAT1 tendenziell die Apoptose, hemmt die Proliferation und begünstigt angeborene oder adaptive Immunreaktionen (zusammengefasst in [51–53]). STAT1 ist ein zentraler Vermittler der Interferon Typ I (IFN- α , IFN- β) und Typ II (IFN- γ) Antwort. Die Stimulation mit IFN führt zur Phosphorylierung von STAT1 am Y701 und nachfolgend zur Translokation von (p)Y STAT1 in den Nukleus und zur Expression von IFN Zielgenen [54]. STAT1 wird auch durch die Stimulation mit IL-6 aktiviert, jedoch in einem geringeren Maß als STAT3 [55]. Im Gegensatz zu einem STAT3 *knock-out* ist ein STAT1 *knock-out* in Mäusen nicht letal. STAT1-defiziente Mäuse zeigen keine Defizite in ihrer Entwicklung, reagieren aber nicht auf IFN- γ und sind anfällig für Infektionen durch mikrobielle Krankheitserreger oder Viren [56, 57].

1.2 Die zelluläre Stressantwort

Eukaryotische Zellen müssen während ihres Lebens auf vielfältige Stresssituationen reagieren. Die Fähigkeit, Stresssignale zu erkennen, weiterzuleiten und adäquat auf sie zu reagieren ist dabei essentiell für die Homöostase und damit für das Leben und Überleben der Zellen. Die zelluläre Stressantwort ist hochkomplex und reicht von der Aktivierung von Signalwegen, die das Überleben der Zellen fördern bis zur Initiierung von Apoptose Signalwegen. Den beteiligten Signalkomponenten gemeinsam ist eine schnelle Induktion sowie eine strenge Regulation der Expression (zusammengefasst in [58]).

1.2.1 Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1)

Ellisen *et al.* entdeckten 2002 mit Hilfe von RNA *microarrays* in primären, humanen Fibroblasten ein mRNA Transkript, welches sowohl durch DNA Schäden als auch während der Embryogenese induziert wird. Sie nannten das dadurch codierte Protein auf Grund ihrer Beobachtungen REDD1 [59]. Shoshani *et al.* identifizierten zeitgleich mittels RNA *microarrays* in Glioblastomzellen von Ratten ein Hypoxie-induziertes mRNA Transkript

und nannten das dadurch codierte Protein RTP801 [60]. Später entdeckten Wang *et al.* in murinen T-Zell Lymphomen nach Stimulation mit dem Cortison-Derivat Dexamethason (Dex) das *dexamethasone-induced gene 2* (Dig2), welches sich als Maus Homolog von REDD1/RTP801 herausstellte [61]. Heute wissen wir, dass REDD1 ein Schlüsselprotein in der eukaryotischen Stressantwort ist. REDD1 wird von dem Gen *DNA-damage-inducible transcript 4* (*DDIT4*) codiert, welches auf Chromosom 10 (10q22.1) lokalisiert ist und eine Länge von 2,1 kb hat [60]. Das codierte Protein hat ein Molekulargewicht von 25 kDa, migriert aber aufgrund von multiplen, C-terminalen Lysin-Resten bei 35 kDa [59]. Die Proteinsequenz von REDD1 ist hochkonserviert in Menschen, Ratten, Krallenfröschen (*Xenopus*) und Fruchtfliegen (*Drosophila*) [59]. Die Struktur von REDD1 beinhaltet 2 antiparallele α Helices und 4 β -Faltblätter, wobei β -Faltblatt 1 bis 3 einen Psi-Loop formen (Abb. 1.2) Diese Struktur ist bisher nur in REDD1 beschrieben [62].

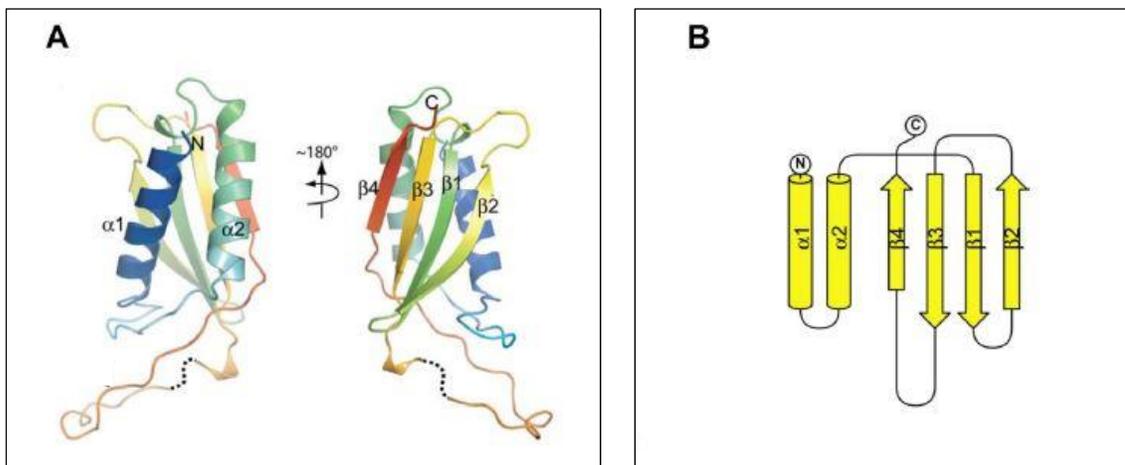


Abb. 1.2: Struktur von REDD1. A) REDD1 besteht aus 2 antiparallelen α Helices und 4 β -Faltblättern. B) β -Faltblatt 1 bis 3 formen einen Psi-Loop (entnommen aus [62]).

Unter physiologischen Bedingungen wird *DDIT4* in den meisten adulten Gewebetypen in geringen Mengen exprimiert, wobei die Expression in Gehirn, Skelettmuskel und Darm am geringsten ist [60]. REDD1 ist im Zytoplasma [59], dem Nukleus [63] und in den Mitochondrien lokalisiert [64]. Zudem transloziert REDD1 unter Stressbedingungen zumindest temporär an die Plasmamembran [65, 66].

Bis dato sind weder funktionelle Domänen noch enzymatische Funktionen von REDD1 bekannt. Jedoch ist REDD1 in die Regulation diverser zellulärer Prozesse involviert. Im Gegensatz zu einem STAT3 *knock-out* ist ein REDD1 *knock-out* nicht letal. Beispielsweise

ist ein REDD1 *knock-out* in Mäusen mit einem reduzierten Glukose Metabolismus assoziiert. Folglich ist REDD1 an der Regulation des Insulin Signalwegs beteiligt [67]. REDD1 ist auch in die Regulation der Immunantwort involviert. In kardialem Gewebe von adipösen Mäusen fördert REDD1 die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen [68]. Weiterhin ist REDD1 an der Aktivierung LPS-induzierter inflammatorischer Signalwege in Makrophagen beteiligt [69]. REDD1 reguliert außerdem die Homöostase mesenchymaler Stammzellen. Gharibi *et al.* beobachteten eine positive Korrelation zwischen der Induktion von *DDIT4* und Pluripotenzgenen wie beispielsweise *OCT4* [70]. Zusätzlich zeigten Horak *et al.*, dass REDD1 die Produktion mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) reduziert [64].

REDD1 ist folglich an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt und stellt möglicherweise einen Knotenpunkt zwischen verschiedenen Signalkaskaden dar.

1.2.1 Regulation der REDD1 Expression

REDD1 ist ein Stress-induziertes Protein. Die Regulation der REDD1 Expression erfolgt auf mehreren Ebenen, von der Induktion der mRNA bis zur Degradation des Proteins. Viele verschiedene Stressoren führen zu einer Erhöhung der REDD1 Expression. Dazu zählen unter anderem Hypoxie [60], oxidativer Stress [59], DNA Schäden [59], Neurotoxine [71], Nährstoffmangel [72], ionisierende Strahlung [59], ROS [73] sowie Hitzeschock und Glucocorticoide [61].

Die Induktion der REDD1 Protein Expression durch Stressoren erfolgt meist auf transkriptioneller Ebene. Bis dato konnten im humanen *DDIT4* Promotor unter anderem Konsensus Sequenzen für die Bindung der Transkriptionsfaktoren *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF 1 α) [60], p53 [59], *ETS domain-containing protein* (ELK1) [63], *CCAAT-enhancer-binding protein* (C/EBP) [63] und *activation transcription factor 4* (ATF4) [73] nachgewiesen werden. Lin *et al.* postulierten außerdem eine NF- κ B Bindestelle im *DDIT4* Promotor [63]. Mc Ghee *et al.* postulierten die Bindung von Glucocorticoid Rezeptoren im *DDIT4* Promotor [74]. Hardee *et al.* lieferten erstmals Hinweise für eine Regulation der *DDIT4* Promotor Aktivität durch STAT3. Sie zeigten mittels genomweiter STAT3 ChIP-Seq Analyse unter anderem eine putative STAT3 Bindestelle im humanen *DDIT4* Promotor [75].

Neben der transkriptionellen Regulation der REDD1 Expression erfolgt auch eine Regulation der Stabilität der REDD1 codierenden mRNA durch miRNAs, was in einer relativ kurzen Halblebenszeit von etwa 5 – 10 min resultiert [76–79]. Die Expression von REDD1 wird auch auf Proteinebene reguliert. Die Halblebenszeit des REDD1 Proteins beträgt ca. 10 – 15 min [80]. Die Ubiquitylierung von REDD1 führt zu einem schnellen Abbau des Proteins im Proteasom [77]. Zusätzlich wurde eine Degradation des REDD1 Proteins durch Caspase 3 beschrieben [81].

Sowohl die REDD1 mRNA als auch das REDD1 Protein zeichnen sich folglich durch eine kurze Halblebenszeit aus. Die geringe Stabilität ermöglicht eine schnelle Regulation der REDD1 Expression. Die Regulation der REDD1 Expression auf Transkriptionsebene ist komplex und muss demzufolge streng reguliert werden.

1.2.2 REDD1 ist ein Inhibitor des mTOR Signalweges

Die einzig bis dato bekannte Funktion von REDD1 ist die indirekte Inhibierung der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase *mamalian target of rapamycin* (mTOR) [82]. mTOR ist essentieller Bestandteil zweier distinkter Protein Komplexe, *mamalian target of rapamycin complex* (mTORC) 1 und 2 (Abb. 1.3).

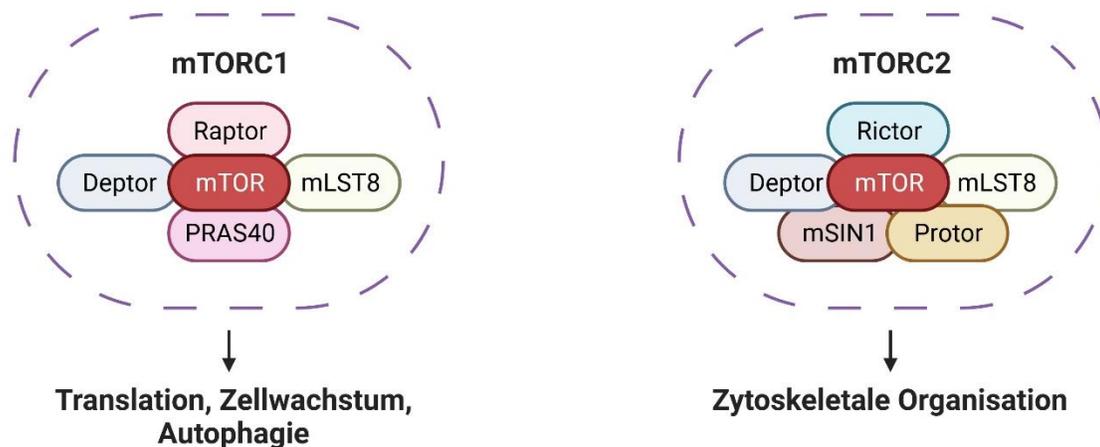


Abb. 1.3 Zusammensetzung von mTORC1 und mTORC2. Beiden Komplexen gemeinsam ist die Kinase mTOR sowie die Unterheit mLST8 und der endogene Regulator Deptor. mTORC2 ist im Gegensatz zu mTORC1 Rapamycin resistent. Abb. erstellt mit Biorender.

Diese Protein Komplexe unterscheiden sich in ihrer Rapamycin Sensitivität, ihrer Zusammensetzung sowie in ihren Substraten. mTORC2 ist vor allem für die Strukturierung des

Zytoskeletts und die Formierung von Zell-Zell Kontakten verantwortlich, indem es Zielproteine phosphoryliert, welche beispielsweise die Ausbildung von Ionenkanälen und *tight junctions* regulieren (zusammengefasst in [83]). mTORC1 reguliert über die Phosphorylierung von Zielproteinen hauptsächlich Translation, Zellwachstum und Autophagie und zeichnet sich somit vor allem durch Proliferations-fördernde Eigenschaften aus. Eine exakte Regulation der mTORC1 Expression ist demnach notwendig, um Zellwachstum und Proliferation zu koordinieren. Eine Hyperaktivierung von mTOR führt zu einer unkontrollierten Proliferation von Zellen und kann in etwa 50 % aller malignen Tumore beobachtet werden (zusammengefasst in [84]). Die Stress-induzierte Inhibition von mTORC1 durch REDD1 führt zu einer Senkung der Stoffwechsel- und Translationsrate. Durch die eingesparte Energie können zelluläre Prozesse zur Bewältigung der Stresssituation stattfinden (zusammengefasst in [85]). Somit hat REDD1 vermutlich auch eine Schlüsselrolle in der Tumor Suppression. Proliferative Erkrankungen wie Brust- und Leberkrebs stehen mit einer Reduktion der REDD1 Expression und der damit verbundenen konstitutiven Aktivierung von mTORC1 in Zusammenhang [86]. Eine Überexpression von REDD1 führt hingegen zu einer permanenten Inhibierung von mTORC1 und ist mit neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson [87] und Alzheimer [88] assoziiert.

Abbildung 1.4 zeigt den kanonischen mTORC1 Signalweg. Der erste Schritt der Zytokinvermittelten Aktivierung von mTORC1 ist die Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB) [89]. Ein Zielprotein von PKB ist der *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC). Der TSC, bestehend aus TSC1 und TSC2, ist ein Repressor von mTORC1, indem er als *GTPase activating protein* (GAP) für die *GTPase Ras homolog enriched in brain* (Rheb) agiert. Die GTP-gebundene Form von Rheb aktiviert mTORC1, indem sie die Kinase Aktivität von mTORC1 stimuliert. Die aktivierte PKB phosphoryliert TSC2, woraufhin der TSC1/2 Komplex zerfällt. Das freigewordene phosphorylierte TSC2 interagiert vermutlich mit Proteinen der 14-3-3 Familie, wodurch die phosphorylierte Form des TSC2 stabilisiert und die Hemmung von mTORC1 durch den TSC verhindert wird [90]. Die PKB-vermittelte Phosphorylierung von TSC2 führt somit zur Inaktivierung des TSC1/2 und in der Folge zur Aktivierung von mTORC1.

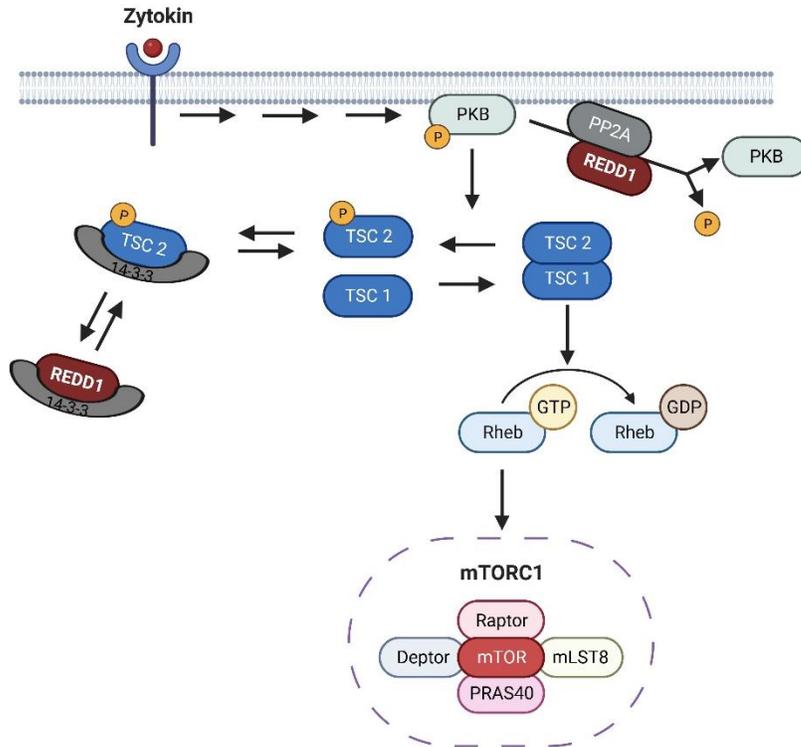


Abb. 1.4 Der mTOR Signalweg und seine Inhibition durch REDD1. Die Aktivierung von mTORC1 verläuft über die Phosphorylierung der PKB. PKB phosphoryliert TSC2, woraufhin der TSC Komplex zerfällt. Dadurch bleibt Rheb in seiner aktiven, GTP-gebundenen Form und aktiviert mTORC1. Proteine der 14-3-3 Familie stabilisieren den phosphorylierten Zustand des TSC2 und wirken dadurch der mTOR Aktivierung entgegen. REDD1 inaktiviert mTORC1 entweder über die Rekrutierung der PP2A oder über die Interaktion mit Proteinen der 14-3-3 Familie. Abb. erstellt mit Biorender.

Der Mechanismus der REDD1-vermittelten mTOR Inhibition ist noch nicht vollständig verstanden. Das Fehlen funktioneller Domänen oder enzymatischer Funktionen in REDD1 erschwert die Aufklärung molekularer Mechanismen zusätzlich. In den letzten Jahren wurden jedoch zwei unterschiedliche Modelle postuliert, die beschreiben, wie REDD1 in den mTOR Signalweg eingreifen könnte.

Ein mögliches Modell beschreibt die Rekrutierung der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) an die PKB durch REDD1. Dies führt zur Dephosphorylierung und Inaktivierung der PKB. TSC1/2 wird somit nicht mehr phosphoryliert und inhibiert mTORC1 [91]. DeYoung *et al.* postulierten ein anderes Modell, in dem REDD1 mit TSC2 um die Interaktion mit Proteinen der 14-3-3 Familie konkurriert. Die phosphorylierte Form des TSC2 wird nicht mehr durch 14-3-3 Proteine stabilisiert und im Zuge dessen dephosphoryliert. Daraufhin bin-

det TSC2 wieder an TSC1 und TSC1/2 inhibiert mTORC1 [65]. Gestützt wird diese Hypothese durch Co-Immunopräzipitationen, die eine Interaktion von REDD1 und 14-3-3 Proteinen bestätigten [92]. Gegen die Hypothese von DeYoung *et al.* spricht jedoch, dass das postulierte 14-3-3-Bindemotiv in REDD1 in verschiedenen Spezies nicht konserviert ist und dass die Psi-Loop Struktur von REDD1 (Abb. 2.2) mit keinen bekannten 14-3-3 Bindemotiven übereinstimmt [62].

Es gibt somit zwei Modelle zur Erklärung der inhibitorischen Funktion von REDD1 im mTOR Signalweg. Zum einen die Rekrutierung der PP2A zur Dephosphorylierung von PKB und zum anderen die Sequestrierung des inhibitorischen Proteins 14-3-3. Beide Modelle führen zur Aktivierung von TSC1/2 und demzufolge zur Hemmung von mTORC1. Über welchen Mechanismus REDD1 den mTOR Signalweg wirklich inhibiert oder ob vielleicht sogar beide Mechanismen abhängig vom zellulären Kontext genutzt werden ist noch nicht abschließend geklärt.

1.2.3 STAT3 reduziert die REDD1 Expression

Pinno *et al.* zeigten, dass IL-6 sowohl die basale als auch die Stress-induzierte REDD1 Expression reduziert [80]. Die Reduzierung der REDD1 Expression ist unabhängig von proteasomaler oder Caspase-vermittelter Degradierung des REDD1 Proteins. Auch wird die Stabilität der REDD1 mRNA nicht beeinflusst. Stattdessen reduziert IL-6 die Transkription der REDD1 mRNA. Die Reduzierung der REDD1 mRNA Expression ist unabhängig vom Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg oder dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg. Stattdessen ist die IL-6-induzierte Regulation der REDD1 mRNA Expression abhängig von der Expression und der Aktivierung von STAT3 [80]. Die von Pinno *et al.* beschriebene STAT3-abhängige Reduzierung der REDD1 mRNA Expression steht interessanterweise im Gegensatz zu der kanonischen Funktion von STAT3 als aktivierender Transkriptionsfaktor. Da genomweite ChIP-Seq Experimente jedoch gezeigt haben, dass STAT3 möglicherweise an den *DDIT4* Promotor bindet [75] und da STAT3 die REDD1 mRNA reduziert [80], liegt die Vermutung nahe, dass die STAT3-vermittelte Reduzierung der REDD1 mRNA Expression eine neue, nicht-kanonische Funktion von STAT3 ist.

Zusammengefasst wird der Transkriptionsfaktor STAT3 im Rahmen von Entzündungen nach Stimulation mit Zytokinen wie z.B. IL-6 aktiviert. Das Stress-induzierte Protein REDD1 reguliert als mTOR-Inhibitor den zellulären Metabolismus und die Proliferation der Zellen. Bei der Reduzierung der REDD1 mRNA Transkription durch STAT3 könnte es sich folglich um eine neue Interaktion von inflammatorischen und Stress-induzierten zellulären Signalwegen handeln. Eine konstitutive STAT3 Aktivierung ist mit der Entstehung verschiedener Tumore assoziiert. Eine fehlregulierte REDD1 Expression steht sowohl mit proliferativen als auch mit neuro-degenerativen Krankheiten in Zusammenhang.

Der molekulare Mechanismus der STAT3-abhängigen Reduzierung der REDD1 mRNA Transkription ist noch unbekannt, seine Aufklärung würde jedoch das bestehende Wissen über STAT3-vermittelte Mechanismen der Genregulation vergrößern. Außerdem würde seine Aufklärung wichtige Einblicke in die Integration von Signalwegen liefern, die durch entzündliche und stress-assoziierte Stimuli aktiviert werden und an der Entwicklung von Krankheiten beteiligt sind.

2. Zielstellung

Das Zytokin IL-6 reduziert STAT3-abhängig sowohl die basale als auch die Stress-induzierte REDD1 mRNA und Protein Expression [80]. Die Reduzierung der REDD1 Expression ist unabhängig von proteasomalem oder Caspase-vermitteltem Abbau des REDD1 Proteins. Auch wird die Stabilität der REDD1 mRNA durch IL-6 nicht beeinflusst. Stattdessen reduziert STAT3 die REDD1 mRNA Expression [80]. Bislang ist der molekulare Mechanismus der STAT3-abhängigen Reduzierung der REDD1 mRNA Expression noch unbekannt. Da genomweite ChIP-Seq Daten einen Hinweis auf ein putatives STAT3 Konsensus Motiv im *DDIT4* Promotor lieferten [75] und STAT3 die REDD1 mRNA Expression reduziert [80], könnte die STAT3-vermittelte Reduzierung der REDD1 mRNA Expression eine neue, nicht-kanonische Funktion von STAT3 widerspiegeln. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch unbekannt. Ziel dieser Arbeit ist es daher folgende Fragen zu beantworten:

- Wird STAT3 an den *DDIT4* Promotor rekrutiert?
- Reguliert STAT3 die Aktivität des *DDIT4* Promotors?
- Welche Funktionen bzw. funktionelle Domänen von STAT3 regulieren die REDD1 Expression?

Die Beantwortung dieser Fragen trägt zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der STAT3-abhängigen Reduzierung des mTOR Inhibitors REDD1 bei und ermöglicht neue Einblicke in die Interaktion inflammatorischer und Stress-induzierter Signalwege sowie in mögliche nicht-kanonische Funktionen von STAT3.

3. Material und Methoden

Material und Methoden sind nach Standardprotokollen des Lehrstuhls für Systembiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg verfasst und entsprechend individuellen experimentellen Änderungen modifiziert.

3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *“pro analysis“* von den angegebenen Firmen bezogen und eingesetzt.

3.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser, welches durch eine Milli-Q®-Wasseraufbereitungsanlage (Merck, Deutschland) gereinigt wurde, hergestellt.

3.3 Inhibitoren

- Cycloheximid (Sigma-Aldrich, USA)

3.4 Zytokine

Zytokin	Beschreibung	Hersteller/Firma
IL-6	rekombinantes, humanes Interleukin 6	Conaris, Deutschland
Hyper-IL-6	IL-6:sIL-6R Fusionsprotein	R&D Systems, USA

3.5 Plasmide

3.5.1 Plasmide für die Analyse von Promotoraktivitäten

Plasmid	Merkmale
pGL3_human SOCS Luc (-511/+929)	Reporterplasmid, welches den Promoterbereich -511 bis +929 des SOCS3 Gens, fusioniert mit der kodierenden Sequenz der Leuchtkäfer-Luziferase trägt, Ampicillin Resistenz (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Schlomo Melmed, CIRM, USA)

pGL3_human REDD1 Luc (-433/+167)	Reporterplasmid, welches den Promoterbereich -726 bis -124 des <i>DDIT4</i> Gens, fusioniert mit der kodierenden Sequenz der Leuchtkäfer-Luziferase trägt, Ampicillin Resistenz (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Leif Ellisen, Harvard Medical School, USA)
pCH110 lacZ	Reporterplasmid, kodiert für β -Galactosidase Gen, Ampicillin Resistenz (Pharmacia, Schweden)

3.5.2 Ausgangsplasmide für die Generierung retroviraler Expressionsvektoren

Die folgenden Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Gerhard Müller-Newen (Universitätsklinik Aachen, Deutschland) zur Verfügung gestellt [24].

Plasmid	Merkmale
pcDNA5spez_STAT3 WT	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von STAT3 WT, Ampicillin Resistenz
pcDNA5spez_STAT3 Y705F	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von STAT3 Y705F, Ampicillin Resistenz
pcDNA5spez_STAT3 S727A	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von STAT3 S727A, Ampicillin Resistenz
pcDNA5spez_STAT3 Y705F/S727A	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von STAT3 Y705F/S727A, Ampicillin Resistenz
pcDNA5spez_STAT3 mutSNICQ	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von STAT3 mutSNICQ, Ampicillin Resistenz
pcDNA5spez_STAT3 dN	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von STAT3 dN, Ampicillin Resistenz

3.5.3 Retrovirale Vektoren für die Generierung stabil transduzierter MEF Zelllinien

Plasmid	Merkmale
pMOWS STAT3 WT	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von STAT3 WT, Ampicillin Resistenz
pMOWS STAT3 Y705F	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von STAT3 Y705F, Ampicillin Resistenz
pMOWS STAT3 S727A	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von STAT3 S727A, Ampicillin Resistenz

pMOWS STAT3	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von STAT3 Y705F/S727A, Ampicillin Resistenz
pMOWS STAT3 mutSNICQ	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von STAT3 mutSNICQ, Ampicillin Resistenz
pMOWS STAT3 dN	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von STAT3 dN, Ampicillin Resistenz

3.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomis (Deutschland) bezogen.

3.6.1 Oligonukleotide für die Klonierung der STAT3 Varianten

Bezeichnung	5' → 3'-Sequenz	Beschreibung
muSTAT3_BamHI_fw	GCG CGG ATC CAT GGC TCA GTG	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation der STAT3 Varianten (siehe 3.5.2) und zum Einfügen einer BamHI Restriktionsschnittstelle im Plasmid
muSTAT3 dN_BamHI_fw	GCG CGG ATC CAT GCA GCA AGG	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation von STAT3 dN und zum Einfügen einer BamHI Restriktionsschnittstelle im Plasmid
muSTAT3_NotI_rev	TAT AGC GGC CGC TTA CAT GGG GGA G	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation der STAT3 Varianten (siehe 3.5.2) mit einer NotI Restriktionsschnittstelle im Plasmid

3.6.2 Oligonukleotide für die Sequenzierungen der pMOWS STAT3 Plasmide

Bezeichnung	5' → 3'-Sequenz	Beschreibung
pMOWS STAT3 P1_fw	CTG CAG AGC AGG TAT CTT GA	<i>Forward</i> Sequenzierprimer zur Sequenzierung der in 3.6.2 gelistet Plasmide ausgehend von Pos. 273 der STAT3 cDNA

pMOWS STAT3 P2_rev	CAT CTG CTG CTT CTC TGT C	<i>Reverse</i> Sequenzierprimer zur Sequenzierung der in 3.6.2 gelistet Plasmide ausgehend von Pos. 435 der STAT3 cDNA
pMOWS STAT3 P3_fw	CTG GAC CTG CTG GGA AAA CT	<i>Forward</i> Sequenzierprimer zur Sequenzierung der in 3.6.2 gelistet Plasmide ausgehend von Pos. 783 der STAT3 cDNA
pMOWS STAT3 P4_fw	TTG TGA TGC CTC CTT GAT CGT	<i>Forward</i> Sequenzierprimer zur Sequenzierung der in 3.6.2 gelistet Plasmide ausgehend von Pos. 1283 der STAT3 cDNA
pMOWS STAT3 P5_fw	CGTC TTC AGC GAG AGC AGC AA	<i>Forward</i> Sequenzierprimer zur Sequenzierung der in 3.6.2 gelistet Plasmide ausgehend von Pos. 1967 der STAT3 cDNA

3.6.3 Oligonukleotide für Expressionsanalysen

Bezeichnung	5' → 3'-Sequenz	Beschreibung
muREDD1_fw	GGG CCG GAG GAA GAC TCC TCA TA	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +317 in muriner REDD1 mRNA (NM_029083.2)
muREDD1_rev	GAA CTC CTG CGC CTG GCA TAC AG	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +535 in muriner REDD1 mRNA (NM_029083.2)
muSDHA_fw	GCT CCT GCC TCT GTG GTT GA	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +467 in muriner SDHA mRNA (NM_023281.1)
muSDHA_rev	AGC AAC ACC GAT GAG CCT G	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +603 in muriner SDHA mRNA (NM_023281.1)
muSOCS3_fw	GCT CCA AAA GCG AGT ACC AGC	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +656 in muriner SOCS3 mRNA (NM_007707.3)

muSOCS3_rev	AGT AGA ATC CGC TCT CCT GCA G	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +722 in muriner SOCS3 mRNA (NM_007707.3)
huREDD1_fw	CCC GAA CTC CCA CCC CAG AT	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +258 in humaner REDD1 mRNA (NM_019058.4)
huREDD1_rev	CCA CTG TTG CTG CTG TCC AG	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +385 in humaner REDD1 mRNA (NM_019058.4)
huSDHaf_fw	TGG GAA CAA GAG GGC ATC TG	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +246 in humaner SDHA mRNA (NM_004168.4)
huSDHA_rev	CAT GAA TTT GAT GCA GTG GTG G	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation der codierenden Sequenz ausgehend von Pos. +3101 in humaner SDHA mRNA (NM_004168.4)

3.6.4 Oligonukleotide für ChIP Analysen

Bezeichnung	5' → 3'-Sequenz	Beschreibung
ChIP-REDD1_P1_fw	TCG ACT GCG AGC TTT CTG GGG	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -195 relativ zur Transkriptionsstartstelle (TSS)
ChIP-REDD1_P1_rev	GCA GCC TAT AAG GAC TAG CGC G	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -15 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P2_fw	CCT GGT CAC GGG CTG TCC C	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -349 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P2_rev	CCC CAG AAA GCT CGC AGT CGA	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches

Material & Methoden

ChIP-REDD1_P3_fw	GCT AAC GTC TGC TCC TGC GCC G	aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -174 relativ zur TSS <i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -494) relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P3_rev	GGGACAGCCCGTGACCAGG	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -330 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P4_fw	GTC TGT GAG TCC GAC TGC TGT G	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -820 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P4_rev	ACT CTA CAG CCC AGG ACA TAG G	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -633 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P5fw	GGT CCT GAT GCA ACC GTC TGG	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -947 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P5_rev	CAG CAG TCG GAC TCA CAG ACC	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -800 relativ zum TSS
ChIP-REDD1_P6_fw	CGA GTC CGT CTC AAC CTC CAC	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -1095 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P6_rev	CCA GAC GGT TGC ATC AGG ACC	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -926 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P7_fw	CAG TGG CCT GAC ATC TCC TGC	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -1283 relativ zur TSS

ChIP-REDD1_P7_rev	GAG GTT GAG ACG GAC TCG ACC	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -1077 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P8_fw	CTC CAT AAG TGG GTC TCC CAC C	<i>Forward Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -1423 relativ zur TSS
ChIP-REDD1_P8_rev	AGG CCA CTG CCC TCC GCA ACC	<i>Reverse Primer</i> zur Amplifikation eines <i>DDIT4</i> Promotorbereiches aus ChIP-DNA, ausgehend von Pos. -1274 relativ zur TSS

3.7 Antikörper

3.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Spezies	Beschreibung (Hersteller)
Erk1/2 (p44/42 MAPK)	Western Blot	Maus	Monoklonaler Antikörper gegen ERK1/2 (#4696 Cell Signaling (CS), USA)
(p)ERK1/2 ((p)p44/42 MAPK-T202/Y204)	Western Blot	Kaninchen	Monoklonaler Antikörper gegen T202-phosphoryliertes und/oder Y204-phosphoryliertes ERK1/2 (#4370 CS)
HSC70	Western Blot	Maus	Monoklonaler Antikörper gegen HSC70 (#7009 Stress-Marq, Kanada);
Normal Rabbit IgG	ChIP	Kaninchen	Polyklonaler, unspezifischer Isotypenkontroll-Antikörper (#2729 CS)
REDD1	Western Blot	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper gegen REDD1, Lot: 51272 (#1063-1-AP, Proteintech, USA)
SOCS3	Western Blot	Kaninchen	Monoklonaler Antikörper gegen SOCS3 (#18391 Immunobiological Laboratories, Japan)
STAT1	Western Blot	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper gegen STAT1 (#9172 CS)

Material & Methoden

(p)STAT1-Y701	Western Blot	Kaninchen	Monoklonaler Antikörper gegen Y701-phosphoryliertes STAT1 (#9167 CS)
STAT3	Western Blot, ChIP, Mikroskopie	Maus	Monoklonaler Antikörper gegen STAT3 (#9139 CS, USA)
(p)STAT3-S727	Western Blot	Kaninchen	Polyklonaler Antikörper gegen S727-phosphoryliertes STAT3 (#9134 CS)
(p)STAT3-Y705	Western Blot	Kaninchen	Monoklonaler Antikörper gegen Tyrosin-phosphoryliertes STAT3 (#9145 CS)
STAT3-PE	FACS	Maus	PE-gekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen STAT3 (#560391 Becton&Dickinson (BD, USA))
(p)STAT3-Y705_PE	FACS	Maus	PE-gekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen Y705-phosphoryliertes STAT3 (#612357 BD)
Tubulin	Western Blot	Maus	Monoklonaler Antikörper gegen Tubulin (#T5168 Sigma-Aldrich)

3.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Reaktivität	Beschreibung (Hersteller)
IRDye® 680RD <i>Goat anti-Mouse</i>	Western Blot	anti-Maus	IRDye®-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen murines IgG (#926-68070 Licor)
IRDye® 800CW <i>Goat anti-Rabbit</i>	Western Blot	anti-Kaninchen	IRDye®-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG (#926-32210, Licor)
F(ab') ₂ <i>Goat anti-Maus IgG (H+L)-RPE</i>	Mikroskopie	anti-Maus	PE-gekoppeltes, polyklonales IgG F(ab') ₂ Fragment gegen murines IgG (#SEC-183807 Dianova, Deutschland)

3.8 Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittstelle	Hersteller
BamHI	G/GATCC	NEB (USA)
NotI	GC/GGCCGC	NEB

3.9 Prokaryotische Zellen

3.9.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Schnittstelle
DH5 α	Kompetener <i>E.coli</i> Stamm zur Amplifikation von Plasmiden

3.9.2 Nährmedien und Lösungen für die Bakterienkultur

Nährmedium/ Lösung	Beschreibung (Hersteller)
LB-Medium	10 % LB-Medium Pulver (Roth, Deutschland) in H ₂ O, autoklaviert
LB-Platten	LB-Medium, 1,5 % Agar Agar, autoklaviert
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O (Roth, Deutschland), steril filtriert

3.9.3 Langzeitaufbewahrung und Kulturbedingungen

Die kompetenten Bakterienstämme wurden zur längerfristigen Aufbewahrung in LB-Medium, versetzt mit 30 % Glycerol, bei -80°C gelagert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium unter Zugabe von Ampicillin (100 μ g/ml Endkonzentration) in einem Schüttelkolben bei 37 °C und 160 rpm (Minitron, Infors HT, Deutschland).

3.9.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung einer Vorkultur wurden zunächst 4 ml LB-Medium mit einem Glycerolstock von *E. coli* DH5 α angeimpft und im Anschluß bei 37 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 250 ml LB Medium mit 100 μ l der Vorkultur angeimpft, bis zu einer OD_{550nm} von 0,6 auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert und anschließend zentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 rpm, Avanti J-E, Beckmann Coulter; Deutschland Rotor: JA-10). Das Pellet wurde in 25 ml einer kalten 50 mM CaCl₂-Lösung (10 Glycerin

enthaltend) resuspendiert und zu 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

3.9.5 Transformation von Bakterien und Plasmid-Präparation

Kompetente DH5α *E.coli* wurden schonend auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakterien wurden mit 1 µl des zu transformierenden Plasmids versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (40 s/42°C, Thermomixer; Eppendorf, Deutschland) erfolgte die Zugabe von 100 µl LB-Medium und eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden die Bakterien auf vorgewärmten LB-Platten, versetzt mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration), ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Mit den gewachsenen Kolonien wurde am nächsten Tag eine 250 ml LB-Flüssigkultur, versetzt mit Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration), angeimpft und über Nacht kultiviert (37°C, 160 rpm). Plasmid-DNA wurde mit dem „*Plasmid DNA Purification Kit*“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert, in Wasser eluiert und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der isolierten Plasmide mit Restriktionsenzymen verdaut und im Agarose Gel analysiert.

3.10 Eukaryotische Zellen

3.10.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium
HepG2	Adhärent wachsende, humane Hepatom Zelllinie (HB-8065, ATCC, USA)	DMEM F12 (10 % fötales Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml))
MEF STAT3 ^{fl/fl}	Adhärent wachsende, murine, embryonale, Fibroblasten Zelllinie von homozygoten Mäusen, in denen das STAT3 Gen zwischen loxP-Sequenzen liegt (zur Verfügung gestellt von Valeria Poli, Universität von Turin, Italien) beschrieben in[93]	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml))

Material & Methoden

MEF STAT3 ^{-/-}	murine, embryonale Fibroblasten Zelllinie von homozygoten STAT3-defizienten Mäusen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Valeria Poli, Universität von Turin, Italien) beschrieben in[93]	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml))
Platinum E (PlatE)	Verpackungszelllinie für die Expression retroviraler Vektoren	DMEM F12 (10 % FKS, 1% Penicilin /Streptomycin)

3.10.2 Stabil transduzierte Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium
MEF STAT3 WT	MEF STAT3 ^{-/-} stabil rekonstituiert mit STAT3 Wildtyp (WT)	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/ml Puromycin)
MEF STAT3 Y705F	MEF STAT3 ^{-/-} stabil rekonstituiert mit STAT3 Y705F	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/ml Puromycin)
MEF STAT3 S727A	MEF STAT3 ^{-/-} stabil rekonstituiert mit STAT3 S727A	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/ml Puromycin)
MEF STAT3 Y705F/S727A	MEF STAT3 ^{-/-} stabil rekonstituiert mit STAT3 Y705F/S727A	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/ml Puromycin)
MEF STAT3 mutSNICQ	MEF STAT3 ^{-/-} stabil rekonstituiert mit STAT3 mutSNICQ	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/ml Puromycin)
MEF STAT3 dN	MEF STAT3 ^{-/-} stabil rekonstituiert mit STAT3 dN	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 µg/ml Puromycin)

3.10.3 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Nährmedium/ Lösung	Beschreibung (Hersteller)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> (Thermo Fischer Scientific, Deutschland)
DMEM/F-12 (Ham)	Gemisch aus <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> und <i>Ham's F12 Medium</i> im Verhältnis 1:1, (Thermo Fischer Scientific)

Opti-MEM	<i>Minimal Essential Medium</i> , optimiert für Transfektionen (Thermo Fischer Scientific)
FKS	Fötales Kälber Serum (Gibco, Thermo Fischer Scientific)
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml (Thermo Fischer Scientific)
Puromycin	5 µg/ml Endkonzentration (Carl Roth, Deutschland)
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA (Thermo Fischer Scientific)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (pH 7,4) 200 mM NaCl 2,5 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
DMSO	Dimethylsulfoxid (Carl Roth)

3.10.4 Langzeitaufbewahrung und Kulturbedingungen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in 10 % DMSO-haltigem FKS bei -150 °C gelagert. Zum Auftauen wurden diese für 1 min im Wasserbad (37°C) erwärmt, in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium suspendiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 233 g, Allegra X-12R, Beckmann Coulter). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen.

Die Zellen wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Die Zellen wurden alle 48 h auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Dafür wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturschalen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA gefolgt von einer 8-minütigen Inkubation bei 37°C. Die Trypsin/EDTA Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 ml Kulturmedium (37°C) gestoppt. HepG2 Zellen bilden beim Zellwachstum Zellagglomerate. Um diese zu lösen wurden die abgelösten HepG2 Zellen mehrfach mit einer Kanüle (0,9 mm x 40 mm) aufgezogen. Die Zellzahl wurde anschließend mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden jeweils $1,5 \cdot 10^6$ Zellen in einem Endvolumen von 10 ml Kulturmedium (37°C) auf eine neue 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Für Experimente wurden die Zellen wie in nachfolgender Übersicht ausgesät:

Experiment	Zellzahl/Schale	Zellkulturschale	Kulturmedium
RNA-Expressionsanalysen	1*10 ⁶	10 cm	10 ml
Reporter Assay	0,35*10 ⁶	6-well	2 ml/well
FACS	0,35*10 ⁶	6-well	2 ml/well
ChIP	1*10 ⁶	10 cm	10 ml
Western Blot	1*10 ⁶	10 cm	10 ml
Konfokale Mikroskopie	0,1*10 ⁶	12-well	1 ml/well

3.10.5 Stimulation der Zellen

Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit zusatzfreiem Kulturmedium (Hungermedium) für 16 h (HepG2 Zellen) bzw. 4 h (MEF Zellen) kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte wie in den Abbildungen beschrieben mit IL-6 (10 ng/ml) bzw. hy-IL-6 (10 ng/ml). Wenn angegeben erfolgte eine 30 minütige Vorbehandlung der Zellen mit Cycloheximid (50 µM).

3.10.6 Liposomale Transfektion

Plasmide wurden mittels liposomaler Transfektion in die Zielzellen übertragen. Als Reagenz diente LipofectaminTM 2000 (Thermo Fischer Scientific). Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf Zellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers in einem Lipofectamin:DNA Verhältnis von 3:1 v/m.

Die Plasmid DNA wurde mit 100 µl Opti-MEM in einem Reaktionsansatz gemischt. Pro 1 µg Plasmid DNA wurden 3 µl Lipofectamin mit 100 µl Opti-MEM in einem zweiten Reaktionsansatz gemischt. Die Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereint und für weitere 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium von den Zielzellen abgenommen und durch Opti-MEM Medium ersetzt. Die Reaktionsansätze wurden mit jeweils 800 µl Opti-MEM Medium versetzt und auf die Zielzellen pipettiert. Nach einer 6-stündigen Inkubation in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C wurde das Opti-MEM Medium durch Kulturmedium ersetzt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C.

3.10.7 Virusproduktion in PlatE Zellen

Zunächst wurden 5×10^5 PlatE Zellen auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen liposomal mit dem jeweiligen retroviralen pMOWS Expressionsvektor (siehe 3.5.3) transient transfiziert. Zur Induktion der Virusproduktion wurden einen Tag nach der Transfektion die Kulturbedingungen geändert und die Zellen in 30 % FSK-haltigem Kulturmedium bei 32° C kultiviert. Nach weiteren 48 h wurde der virushaltige Überstand abgenommen und filtriert (0,2 µm), um PlatE Zellen aus dem Überstand zu entfernen.

3.10.8 Retrovirale Transduktion

Mittels retroviraler Transduktion wurden Zellen generiert, die verschiedene STAT3 Varianten stabil exprimieren. Zunächst wurden 1×10^6 STAT3-defiziente MEF Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Der filtrierte, virushaltige Überstand der PlatE Zellen wurde mit 1,2 µl/ml Polybrene (Millipore, Deutschland) versetzt und auf die MEF Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel auf Kulturmedium. Die Selektion der infizierten Zellen erfolgte mit Puromycin (5 µg/ml). Überlebende Zellen wurden mittels serieller Verdünnung auf einer 96-well Platte vereinzelt, um Einzelzellklone zu erzeugen.

3.11 Molekularbiologische Methoden

3.11.1 Klonierung

Nachfolgend werden die einzelnen Schritte der Generierung der Plasmide erläutert, die die retrovirale Transduktion der STAT3 Varianten in MEF Zellen ermöglichen.

3.11.1.1 Amplifikation von Plasmid-DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Als Ausgangsvektoren dienten pcDNA5spez Plasmide, die die codierenden Sequenzen für die sechs analysierten STAT3 Varianten beinhalten. Mittels PCR wurden die STAT3-codierenden Sequenzen amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und

Notl an den Enden angefügt. Die PCR wurde in einem Thermo Cycler (Eppendorf, Deutschland) durchgeführt

PCR Reaktionskomponenten	PCR Reaktionsansatz
10x PCR-Puffer (EURx)	5 µl
dNTPs [10 nM]	3 µl
Primer [100 pmol]	je 1 µl (siehe 3.6.1)
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl] (EURx)	0,5 µl
Template	30 ng
<i>Wasser</i>	ad 50 ml

PCR-Programm

95°C	30 s	
95°C	15 s	
60°C	1 min	30 x
68° C	1 min/1000 bp	
68° C	5 min	

3.11.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Um die PCR Produkte zu färben, wurden die Gele mit Roti®-GelStain (Roth, Deutschland) nach Angaben des Herstellers versetzt. Die Proben wurden mit 6 x DNA Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Gelkammer (VWR, Deutschland) mit 1x TAE als Laufpuffer. Als Größenstandart dienten „*Gen ruler1 kb DNA-ladder*“ oder „*Gen ruler1 kb DNA-ladder Plus*“ (beide Thermo Fischer Scientific, Deutschland). Die gefärbte DNA wurde mittels UV-Tisch (Intas) detektiert.

Agarose Gel (1,5 %)

1,5 g	Agarose
ad 100 ml	TAE-Puffer

6 x DNA Ladepuffer

2 mM	EDTA
1 mg/ml	Bromphenolblau

60 %	Glycerin
20 mM	Tris/HCl (pH 7,5)

TAE Puffer

1 mM	EDTA
20 mM	Tris-Acetat (pH 8,0)

3.11.1.3 Gelextraktion

Die PCR Produkte wurden mit einem sauberen Skalpell auf einem UV Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem *3 in 1 Basic DNA Kit* (EURx, Polen) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde anschließend in 30 µl Wasser eluiert.

3.11.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte am Nanophotometer (Implen, Deutschland) bei einer OD von 260 nm. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde mit Hilfe der Absorption der DNA bei 280 nm und 230 nm ermittelt. Der Quotient der Absorption 260 nm/280 nm sollte einen Wert von 1,8 bis 2,0 aufweisen. Der Quotient der Absorptionen 260 nm/230 nm sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

3.11.1.5. Restriktionsverdau

Die aus dem Gel aufgereinigte DNA wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI nach Angaben geschnitten. Restriktionsenzyme und Puffer wurden nach Angaben des Herstellers (NEB) eingesetzt. Der retrovirale Leervektor pMOWS wurde ebenfalls mit BamHI und NotI verdaut, um die spätere Ligation von PCR Produkt und Vektor zu ermöglichen.

Ansatz für Restriktionsverdau

jeweils 1 µl	Restriktionsenzym
1 µg	DNA
5 µl	10 x NEB Puffer

Die Reaktionsansätze wurden nach dem Verdau auf ein Agarose Gel aufgetragen, elektro-phoretisch getrennt (3.11.1.2) und schließlich aus dem Gel eluiert (3.11.1.3.).

3.11.1.6. Ligation von DNA Fragmenten

Die aufgereinigten DNA Fragmente wurden anschließend miteinander ligiert. Die Ligation erfolgte mit T4 Ligase (Promega) nach Angaben des Herstellers. Das molare Verhältnis von PCR Fragment zu Vektor betrug drei zu eins. Es wurden 100 ng geschnittener Vektor eingesetzt.

Ligationsansatz

100 ng	geschnittener Vektor
X ng	PCR Produkt
1 µl	Ligase 10X Puffer
1 U	T4 Ligase
ad 10 µl	Nuklease-freies Wasser

Die Ligation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die ligierten Plasmide in kompetente Bakterien transformiert, amplifiziert und abschließend isoliert (siehe 3.9.5).

3.11.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von der Firma Eurofins (Deutschland) ausgeführt. Die verwendeten Sequenzierprimer sind unter 3.6.2 aufgelistet.

3.11.2 Reportergen-Assay

Zur Untersuchung der Promotor Aktivität wurden Reportergen-Assays genutzt. Dafür wurde ein Promotor-Reporter-Konstrukt, welches die *DDIT4* Promotor Sequenz fusioniert an die codierende Sequenz der Leuchtkäfer-Luciferase enthält (pGL3_human REDD1 Luc), transient in MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3^{-/-} Zellen transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen zusätzlich zu den jeweiligen Promotor-Reporter-Konstrukten mit einem Kontrollreporter-Konstrukt transfiziert, was zu einer konstitutiven Expression der β -Galactosidase führt (pCH110 lacZ). Die verwendeten Plasmide sind unter 3.5.1 aufgelistet. MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3^{-/-} Zellen wurden liposomal transfiziert (siehe 3.10.6). Nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von

37°C kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen (siehe 3.10.5). Um intraexperimentelle Schwankungen zu erkennen, wurde jede Stimulation im Triplikat ausgeführt.

3.11.2.1 Lyse der transfizierten Zellen

Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer, welchem 2 % DTT (1M) frisch zugesetzt wurde, lysiert und mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Die Lysate wurden in 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt und zentrifugiert (13,8 g, 15 min, 4°C).

Extraktionspuffer

5 mM	Tris-HCL (pH 7,8)
0,4 mM	EDTA
2 %	Glycerin
0,2 %	Triton-X

3.11.2.2 Luciferase-Assay

Im Anschluss an die Zentrifugation wurden 10 µl des Überstandes sofort in die Vertiefung einer transparenten 96-*well* Platte pipettiert. Direkt vor der Messung der Luciferase Aktivität wurden 20 µl Luciferase Assay Substrat (Promega, USA) hinzugefügt. Bei der nun startenden Reaktion wird Chemilumineszenz emittiert, welche am Luminometer (Tecan infinite M2000 Pro) bei 480 nm gemessen wurde.

3.11.2.3 β-Galactosidase-Assay

Für die Bestimmung der β-Galactosidase Aktivität wurden 100 µl des Überstandes der Lysate mit 500 µl β-Galactosidase Puffer und 100 µl ONPG (1 mg/ml o-Nitrophenylgalactosid) gemischt und bei 37°C inkubiert, bis ein Farbumschlag ins Gelbliche zu erkennen ist. Die Reaktion wurde mit 250 µl Na₂CO₃ gestoppt und die Intensität der Färbung am Photometer (Implen, Deutschland) bei einer OD von 420 nm bestimmt.

Die Aktivität des Reporterenzym wird anschließend auf die Aktivität des β-Galactosidase normiert.

β-Galactosidase Puffer

60 mM	Na ₂ HPO ₄
40 mM	NaH ₂ PO ₄
1 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
3,86 ml/l	β-Mercaptoethanol

3.11.3 Reverse Transkription mit anschließender quantitativer real time PCR

Mittels reverser Transkription mit anschließender quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) wurde die Expression der REDD1, SOCS3 und SDHA mRNA untersucht.

3.11.3.1 RNA-Isolation

Die Zellen wurden mittels *QIAshredder-Kit* (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers lysiert und homogenisiert. Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus diesen Zelllysaten wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und anschließend die Konzentration der RNA durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Die längerfristige Aufbewahrung der RNA erfolgte bei – 80°C.

3.11.3.2 Complementary DNA (cDNA) Synthese

Die Gesamt- RNA wurde mit Hilfe des *Omniscript RT Kits* (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Als Template diente 500 ng RNA. Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 37°C im Thermo Cycler (Eppendorf, Deutschland) mit Hexanukleotid *Random* Primern (Roth, Deutschland).

3.11.3.3 qRT-PCR

Die cDNA wurde mit dem „Maxima SYBR Green qPCR Master Mix“ (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) amplifiziert. Die Reaktionsansätze wurden als Duplikate pipettiert. Die RT-qPCR erfolgte im Rotor-Gene Q (Qiagen, Deutschland). Die Auswertung der Daten richtete sich nach der Methode von Pfaffl *et al.* [94].

RT-qPCR Reaktionskomponenten	RT-qPCR Reaktionsansatz
SYBR Green Master Mix	10 µl
Wasser	7 µl
Primer	Je 0,5 µl (siehe 3.6.3)
DNA (1:10 Verdünnung)	2 µl

qRT-PCR-Programm

95°C	10 min	
<hr/>		
95°C	10 s	
60°C	20 s	40 x
72°C	30 s	
<hr/>		
72°C	1 min 30 s	

3.12 Immunochemische Methoden

3.12.1 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Das ChIP Protokoll von Sikes *et al.* [95] wurde angepasst und nach individuellen Ansprüchen optimiert. Pro IP wurden 25 µg verdautes Chromatin (~1*10⁶ Zellen) eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Schritte auf Eis.

3.12.1.1. Herstellen von magnetischen Protein G *beads* gebunden an Antikörper

Für die Immunopräzipitation (IP) wurden Antikörper (AK) verwendet, welche an magnetische Protein G *beads* (Cell Signaling, USA) gebunden wurden. Dazu wurden 24 h vor Beginn des Experiments 20 µl Protein G *beads*/IP auf einem Magnetständer isoliert und zweimal in 100 µl RipaB gewaschen. Anschließend wurden die Protein G *beads* in 50 µl RipaB Puffer/IP resuspendiert und in sterile 200 µl PCR Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Bindung der Protein G *beads* an die Antikörper (anti-STAT3 AK = 2 µg, anti-IgG AK = 0,5 µg) erfolgte über Nacht bei 4°C in einem Überkopfschüttler. Am folgenden Tag wurden die AK/*bead*-Komplexe zweimal wie oben beschrieben in RipaB Puffer gewaschen und anschließend in 75 µl RipaB Puffer aufgenommen.

RipaB Puffer

10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 %	TritonX-100
0,1 %	SDS
0,1 %	Na-Deoxycholat
50 mg/ml	BSA

Die nachfolgenden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden dem Puffer direkt vor dem Gebrauch frisch zugegeben.

Volumen je 10 ml Puffer	Protease- und Phosphatase-Inhibitoren
100 µl	Na-Vanadat (100 mM)
20 µl	NaF (0,5M)
80 µl	Pefabloc (0,1 M)
2 µl	Aprotinin (25 mg/ml)
10 µl	Leupeptin (5 mg/ml)
3,5 µl	Pepstatin (1,5 mg/ml in Methanol)

3.12.1.2 crosslinken von DNA und Proteinen

HepG2 Zellen wurden wie unter 3.10.4 und 3.10.5 beschrieben kultiviert und stimuliert. Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA gefolgt von einer 8-minütigen Inkubation bei 37°C. Die Aktivität des Trypsins wurde durch die Zugabe von 5 ml Kulturmedium (37°C) gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden mehrfach mit einer Kanüle (0,9 mm x 40 mm) aufgezogen und anschließend in ein 15 ml Falcon überführt. Das *Crosslinken* von Proteinen und DNA erfolgte durch die Zugabe von Formaldehyd (Endkonzentration 1 %) und einer 15-minütigen Inkubation auf einem Schüttler bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 125 mM) und eine 5-minütige Inkubation auf einem Schüttler bei RT gestoppt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (1500 g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem waschen mit eiskaltem PBS gefolgt jeweils von einem Zentrifugationsschritt, wurde das Zellpellet entweder bei -80°C gelagert oder sofort für die Chromatin Präparation weiter verwendet.

3.12.1.3 Chromatin Präparation und enzymatischer Verdau des Chromatins

Die Zellpellets wurden in 500 µl Lysepuffer B resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und währenddessen alle 10 min kurz gevortext. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (2,4 g, 10 min, 4°C) und die so erhaltenen Zellkerne in 100 µl *Micrococcus* Nuklease (MNase) Puffer resuspendiert. Die DNA wurde mit dem Enzym MNase (1000 U) in

einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C und 500 rpm auf dem Thermoschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf; Deutschland) in Fragmente mit einer Größe von etwa 500 bp geschnitten. Die enzymatische Reaktion wurde mit 10 µl EDTA (0,5 M) gestoppt und die DNA-Konzentration wie unter 3.11.1.4 bestimmt. Pro IP wurden 25 µg verdautes Chromatin eingesetzt.

Lysepuffer B

10 mM	Tris-HCL (pH 7,5)
10 mM	NaCl
3 mM	MgCl ₂
0,5 %	NP-40

MNase-Puffer

10 mM	Tris-HCL (pH 7,5)
10 mM	NaCl ₂
3 mM	MgCl ₂
1 mM	CaCl ₂
4 %	NP-40

Die nachfolgenden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden dem Puffer direkt vor dem Gebrauch frisch zugegeben.

Volumen je 10 ml Puffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren

100 µl	Na-Vanadat (100 mM)
20 µl	NaF (0,5M)
80 µl	Pefabloc (0,1 M)
2 µl	Aprotinin (25 mg/ml)
10 µl	Leupeptin (5 mg/ml)
3,5 µl	Pepstatin (1,5 mg/ml in Methanol)

3.12.1.4 Überprüfung der Fragment Größen

Für die Überprüfung der Fragment Größen wurde von dem verdauten Chromatin ein 20 µl Aliquot abgenommen und im Agarosegel analysiert.

Decrosslinken

Das Aliquot des verdauten Chromatins wurde mit 1 U Proteinase K und 4 µl NaCl (5M) auf dem Thermoschüttler inkubiert (1000 rpm, 2 h, 63°C). Anschließend wurde DNase-freies Wasser *ad* 100 µl zugefügt und die DNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) aufgereinigt.

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion von DNA

Das *decrosslinkte* Chromatin wurde zusammen mit 100 µl PCI (PCI im Verhältnis 25:24:1) gemischt, bis eine Emulsion entstand. Die Emulsion wurde zentrifugiert (12.000 g, 5 min, RT). Von den durch die Zentrifugation gebildeten 3 Phasen wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichem Volumen PCI gevortext, bis sich eine Emulsion formte. Die mittlere und die untere Phase wurden verworfen. Die Emulsion wurde erneut zentrifugiert (12000 g, 5 min, RT) und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis in der mittleren Phase kein weißer Ring (= Proteine) mehr zu sehen war (ca. 2-3 Durchgänge). Daraufhin wurde die obere Phase mit dem 2,5-fachen Volumen reinem, eiskaltem Ethanol und 5 µl Glykogen (20 mg/ml) gemischt und bei -20°C ü. N. (optional 1 h/-80°C) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz zentrifugiert (12000 g/20 min/RT) und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70 %, RT) für 3 min invertiert (= waschen) und anschließend zentrifugiert (12.000 g, 20 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Das Pellet wurde unter der Sterilbank für 30 min getrocknet und abschließend in 20 µl DNase-freiem Wasser resuspendiert.

Die Auftrennung der DNA Fragmente im Agarose Gel erfolgte analog zu 3.11.1.2.

3.12.1.5 Pre-clearing des Chromatins und Immunopräzipitation

Um das unspezifische Binden der Protein G *beads* an das Chromatin zu minimieren wurde ein *pre-clearing* Schritt eingeführt. Dafür wurden 15 µl Protein G *beads* auf einem Magnetständer isoliert und mit 25 µg Chromatin (siehe 3.12.1.3) pro IP auf einem Überkopfschüttler (1 h, 4°C) inkubiert. Anschließend wurden die Protein G *beads* mittels Magnetständer isoliert und der Überstand (= *pre-cleared* Chromatin) mit den konjugierten Antikörper/*bead*-Komplexen (siehe 3.12.1.1) auf einem Überkopfschüttler (2 h, 4°C) inkubiert.

3.12.1.6 Waschen der Präzipitate und Elution der DNA

Die Präzipitate wurden auf einem Magnetständer isoliert. Nach dreimaligem Waschen mit je 180 µl RipaB wurden die Protein/DNA-Komplexe mit 100 µl NaHCO₃ (100 mM) für 15 min auf einem Schüttler (max. Frequenz) bei RT von den Protein G *beads* eluiert. Die Eluate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 4 µl NaCl (5 M) versetzt und für 15 min bei 95°C inkubiert. Dieser Schritt löst die DNA-Protein Bindung. Die frei gewordenen Proteine werden durch Zugabe von 1,6 U Proteinase K (Biolabs, Deutschland) für 2 h auf dem Thermoschüttler bei 63°C und 1000 rpm verdaut.

3.12.1.7 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem „GeneMATRIX 3 in 1 Basic DNA Purification Kit“ (Roboklon) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde anschließend in 50 µl DNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.12.1.8 Quantifizierung der DNA und Datenauswertung

Die Analyse der präzipitierten DNA Fragmente erfolgte mittels quantitativer *real time* PCR (qPCR). Die DNA Fragmente wurden verdünnt (1:10) und mit dem „Maxima SYBR Green qPCR Master Mix“ (Thermo Fischer Scientific, Deutschland) nach Angaben des Herstellers amplifiziert. Als Primer dienten die CHIP_REDD1 Primer (siehe 3.6.4) Die Reaktionsansätze wurden als Duplikate durch den QIAgility Roboter (Qiagen, Deutschland) pipetiert. Die qPCR erfolgte im Rotor-Gene Q (Qiagen, Deutschland). Die x-fache Anreicherung von präzipitierten Promotorfragmenten bezogen auf die IgG-Kontrolle wurde berechnet mit der Formel:

$$x - \text{fache Anreicherung} = 2^{-(Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{IgG}})}$$

3.12.2 Zelllysate

MEF Zellen (1 x 10⁶ Zellen/10 cm Zellkulturschalen) wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C über Nacht kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte analog zu 4.10.5. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von kaltem RIPA-Lysepuffer wurden die Zellen mit einem Schaber von der Kulturschale gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis unter mehr-

maligem kräftigen Mischen der Proben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zelltrümmer für 20 min bei 13.000 rpm und 4° C in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und entweder sofort für weitere Analysen verwendet oder bei -20 C gelagert.

RIPA-Lyse Puffer

50 mM	Tris/HCL (pH 7,4)
150 mM	NaCl
0,5 %	NP-40
15 %	Glycerol

Die nachfolgenden Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden dem Puffer direkt vor dem Gebrauch frisch zugegeben.

Volumen je 10 ml Puffer Protease- und Phosphatase-Inhibitoren

100 µl	Na-Vanadat (100 mM)
20 µl	NaF (0,5M)
80 µl	Pefabloc (0,1 M)
2 µl	Aprotinin (25 mg/ml)
10 µl	Leupeptin (5 mg/ml)
3,5 µl	Pepstatin (1,5 mg/ml in Metahnol)

3.12.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen in den Lysaten wurde nach der Methode von Bradford [96] mittels Bradford-Protein-Assay mit Roti Quant (Carl Roth) nach Angaben des Herstellers gemessen. Zunächst wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm eine Eichgerade mit 0,02 - 2 µg/µl BSA erstellt. Zur Messung der Proteinkonzentration wurden 3 µl des Zelllysats mit 997 µl 1x RotiQuant (Roth, Deutschland) verdünnt. Anschließend wurde die Absorption der Lysate bei 595 nm photometrisch gegen reines RotiQuant gemessen und die Proteinkonzentration über die Geradengleichung der Eichgeraden bestimmt.

3.12.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden in einer vertikalen Gelkammer mittels diskontinuierlicher Gel Elektrophorese nach Laemmli [97] aufgetrennt. Je nach gewünschtem Auftrennungsgrad und Größe der Proteine wurden 10 % bis 15 % Trenngelen in Verbindung mit 4 % Sammelgelen benutzt. Das äquivalente Zelllysate-Volumen zu 20 bis 30 µg Protein wurde mit 4 µl Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95° C denaturiert. Die denaturierten Zelllysate wurden anschließend auf das Gel geladen. Zur Größenbestimmung wurde parallel zu den Proben der *Page Ruler Prestained Marker* (Thermo Fischer) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei RT und einer Stromstärke von 25 mA/Gel bis zur gewünschten Auftrennung der Proteine durchgeführt.

Trenngel 10 %

5,9 ml	Wasser
4,9 ml	30 % Acrylamid – Bisacrylamid Lösung (29:1)
3,8 ml	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
75 µl	20 % SDS
15 µl	TEMED
75 µl	20 % APS

Sammelgel

4 ml	Wasser
635 µl	30 % Acrylamid – Bisacrylamid Lösung (29:1)
313 µl	1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
25 µl	20 % SDS
5 µl	TEMED
40 µl	20 % APS

SDS-Laufpuffer

25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
0,1 %	SDS

3.12.5 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zur Detektion mittels Western-Blot-*semidry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Dazu wurden fünf 1,5 mm dicke Filterpapiere (Roth, Deutschland) und die Nitrocellulose Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Nitrocellulose Membran wurde in Anoden-Puffer-II äquilibriert. Nach kurzem Tränken der Filterpapiere mit den unten angegebenen Puffern erfolgte der Aufbau des Blots nach folgendem Schema:

1. Anode
2. Zwei Filterpapiere getränkt in Anoden-Puffer I
3. Ein Filterpapier getränkt in Anoden-Puffer II
4. Nitrocellulose Membran, äquilibriert in Anoden-Puffer II
5. Polyacrylamidgel
6. Zwei Filterpapiere getränkt in Kathoden-Puffer
7. Kathode

Die oben aufgeführten Komponenten wurden luftblasenfrei in einem BIO-RAD Trans-Blot® SD Syte, (BIO-Rad, USA) aufeinandergelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 1,5 mA/cm² Polyacrylamidgel für 60 Minuten.

Anoden-Puffer I (pH 10,4)

0,3 M	Tris-Base
20 %	Methanol

Anoden-Puffer II (pH 10,4)

25 mM	Tris-Base
20 %	Methanol

Kathoden-Puffer (pH 10,4)

40 mM	ϵ -Aminocapronsäure
20 %	Methanol

3.12.6 Immunodetektion von Proteinen

Die auf eine Nitrocellulose Membran transferierten Proteine wurden durch eine Immunodetektion nachgewiesen. Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran für 30 min mit 10 % BSA-Lösung (Serva) in TBS-N blockiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C mit primären Antikörpern (1:1000 in TBS-N) auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in TBS-N erfolgte die Inkubation mit den korrespondierenden Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:7500 in TBS-N) für 1 h bei RT. Die Membran wurde anschließend 3 x mit TBS-N und 2 x mit TBS gewaschen. Die Detektion der gefärbten Proteine erfolgte mit dem Odyssey Gel Dokumentations System (Licor). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Image Studio Light Software (Licor).

TBS-N

20 mM	Tris/HCL (pH 7,6)
140 mM	NaCl
0,1 %	NP-40

3.12.7 Intrazelluläre Durchflußzytometrie

MEF Zellen ($0,35 \times 10^6$ Zellen/6 cm Zellkulturschalen) wurden über Nacht in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 300 µl Trypsin von den Zellkulturschalen abgelöst. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl Paraformaldehyd (4 %) gemischt und bei 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (300 g, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets in 200 µl eiskaltem 90 %igem Methanol resuspendiert und anschließend für 10 min bei -20° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200 µl eiskaltem FACS Puffer gewaschen und mit Fluorophor-gekoppelten primären Antikörpern gegen STAT3 (1:50 in FACS Puffer) oder (p)Y STAT3 (1:200 in FACS Puffer) über Nacht bei 4° C inkubiert. Vor der Analyse wurden die Zellen dreimal in 200 µl FACS Puffer gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl FACS Puffer resuspendiert. Die durchflußzytometrische Analyse wurde mit einem FACS Canto II (BD Biosciences) durchgeführt. Die Daten wurden mit FlowJo (Version: 10.6.1, BD Biosciences) ausgewertet.

FACS Puffer

2 %	BSA
2 mM	EDTA in PBS

3.12.8 Konfokale Mikroskopie

MEF-Zellen ($0,35 \times 10^6$) wurden auf mit Poly-L-Lysin (A-005-C, Sigma-Aldrich) beschichtete Objektgläsern ausgesät und in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und einer Temperatur von 37°C kultiviert. 24 h später wurden die Zellen 2 mal mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 90 % Methanol (15 min, -20 °C) fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte mit PBS^{++T} für 5 min. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 0,05 M NH₄Cl gequenchet und für 1 h mit 1 % BSA/PBS^{++T} blockiert. Die Zellen wurden über Nacht mit dem primären Antikörper gegen STAT3 (1:200 in 0,2 % BSA/PBS^{++T}) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 1 h mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:200 in 0,2 % BSA/PBS^{++T}) inkubiert. Kontrollzellen wurden entweder nicht mit Antikörpern oder nur mit sekundären Antikörpern inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen in PBS getaucht und mit Immu-Mount (#9990412, Thermo Fischer Scientific) auf Objektträgern fixiert. Die Bildgebung erfolgte mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (63 x Objektiv, LSM 700, Zeiss, Jena, Deutschland). PE wurde mit Laserlicht von 555 nm angeregt. Die Emission wurde im Bereich von 560-700 nm mit einer Lochblende von 8,5 au und einer PMT-Spannungsverstärkung von 600 nachgewiesen. Die Bilder wurden mit der Zen-Software (Zeiss, Version: 2010) aufgenommen. Der Skalenbalken entspricht 100 µm.

PBS ⁺⁺		PBS ^{++T}	
1 mM	MgCl ₂ ,	1 mM	MgCl ₂ ,
0,1 mM	CaCl ₂	0,1 mM	CaCl ₂
		0,1%	Triton-X

3.13 Statistik

Die Ergebnisse biologisch-unabhängiger Experimente wurden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Graphpad PRISM (Version 9, Graphpad Software, USA). Statistisch signifikante Unterschiede wurde mittels *one-way* ANOVA bestimmt. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,5

4. Ergebnisse

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist in einer Vielzahl genregulatorischer Prozesse involviert (zusammengefasst in [17]). In seiner kanonischen Funktion als Aktivator der Genexpression induziert STAT3 hauptsächlich die Expression von Akut-Phase Proteinen (APP) während der Immunantwort [98]. Es sind jedoch auch Beispiele beschrieben, in denen STAT3 die Transkription von Zielgenen negativ beeinflusst [44–47]. So reduziert STAT3 die Expression des stress-induzierten mTOR Inhibitors REDD1 [80]. Während die zugrunde liegenden Mechanismen der kanonischen Funktionen von STAT3 wie STAT3 Y705 Phosphorylierung und STAT3 Dimerisierung sehr gut beschrieben sind, sind die molekularen Mechanismen der nicht-kanonischen Funktionen von STAT3 weitestgehend unbekannt. Die Aufklärung des Mechanismus der STAT3-vermittelten Reduktion der REDD1 Expression trägt somit zum Verständnis der nicht-kanonischen Funktion von STAT3 bei und erlaubt neue Einblicke in die Interaktion inflammatorischer und stress-induzierter Signalwege. Im Rahmen dessen ist es wichtig zu verstehen, welche Funktionen bzw. funktionellen Domänen von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression verantwortlich sind. Ob und in welcher Weise die mögliche Bindung von STAT3 an den *DDIT4* Promotor seine Aktivität beeinflusst ist ebenfalls nicht bekannt. Auch wurde bisher noch nicht untersucht, ob auch andere STAT Familienmitglieder die REDD1 Expression beeinflussen. Ziel dieser Arbeit ist daher die Aufklärung des molekularen Mechanismus, welcher der STAT3-vermittelten Reduktion der REDD1 Expression zu Grunde liegt.

4.1 IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression spezies-übergreifend in Mensch und Maus

REDD1 ist ein gering basal exprimiertes Protein, dessen Expression durch verschiedene Stressoren erhöht wird (zusammengefasst in [99]). Die Proteinsequenz von REDD1 ist hochkonserviert in Menschen, Ratten, Krallenfröschen und Fruchtfliegen [59]. Pinno *et al.* zeigten, dass Zytokine der IL-6 Familie die basale REDD1 Expression in humanen Zellen reduzieren, indem sie die Induktion der REDD1 mRNA Expression STAT3-abhängig reduzieren [80]. Es ist jedoch unklar, ob IL-6 einen spezifischen Einfluss auf die Expression der humanen REDD1 mRNA hat oder ob die beobachteten IL-6 Effekte spezies-übergreifend

sind. Um zu untersuchen, ob die IL-6-abhängige Reduktion der basalen REDD1 Transkription spezies-spezifisch ist, wurde der Effekt von IL-6 auf die REDD1 mRNA Expression in humanen und murinen Zellen verglichen. Humane Hepatomazellen (HepG2) und murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden mit IL-6 bzw. Hyper-IL-6 (Hy-IL-6) für 1 h stimuliert. Die IL-6-induzierte Signaltransduktion hängt von der Expression von zwei Rezeptor-Untereinheiten ab, gp130 und entweder dem transmembranen oder dem löslichen IL-6R α (zusammengefasst in [32]). Während alle Zellen mit Ausnahme von Granulozyten gp130 exprimieren ist die Expression von IL-6R α begrenzt auf Hepatozyten, Epithelzellen und Leukozyten (zusammengefasst in [101]). HepG2 Zellen exprimieren folglich den transmembranen IL-6R α und wurden daher mit IL-6 stimuliert (Abb. 4.1 A). MEF Zellen exprimieren, wie die meisten anderen Zelltypen auch, nicht den transmembranen IL-6R α . Somit hängt die IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung in MEF-Zellen von IL-6-induziertem *trans-signalling* durch IL-6:lösliche IL-6R α -Komplexe ab (zusammengefasst in [36]). Daher wurden die MEF Zellen mit dem Fusionsprotein Hyper IL-6 (Hy-IL-6) stimuliert (Abb. 4.1 B). Dabei handelt es sich um einen Komplex aus IL-6 und löslichem IL-6R α , welcher das IL-6-induzierte *trans-signalling* nachahmt [102]. Anschließend wurden die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die relative Quantifizierung der REDD1 mRNA erfolgte mittels qRT-PCR. Die Stimulation mit IL-6 bzw. Hy-IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression sowohl in humanen (Abb. 4.1 A) als auch in murinen Zellen (Abb. 4.1B).

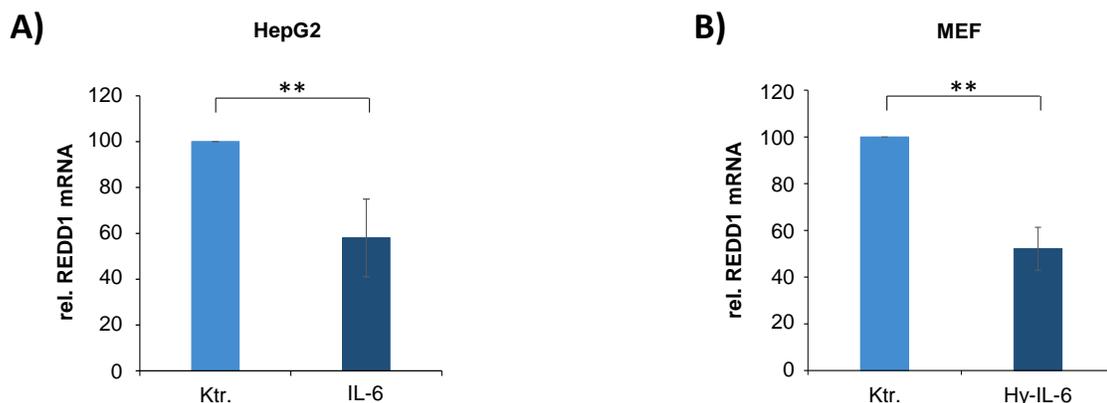


Abb. 4.1: IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression spezies-übergreifend. Humane HepG2 (A) und murine MEF Zellen (B) wurden 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend für 60 min mit 10 ng/ml IL-6 bzw. Hy-IL-6 stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die REDD1 mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Haushaltsgen diente SDHA. Die maximale REDD1 mRNA Expression wurde auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind MW \pm SD aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: T-test mit **p<0,01, *p<0,05. (Abb. A) und B) verändert nach [103]).

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IL-6-induzierte Reduzierung der basalen REDD1 mRNA Expression in Menschen und Mäusen konserviert ist.

4.2 IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression unabhängig von der Proteinbiosynthese

IL-6 aktiviert den JAK/STAT Signalweg (zusammengefasst in [32]). Die IL-6-induzierte Reduzierung der REDD1 Expression ist STAT3-abhängig [80]. STAT3 agiert in seiner kanonischen Funktion als aktivierender Transkriptionsfaktor. Die pharmakologische Inhibierung der IL-6-induzierten STAT3 Aktivierung blockiert die IL-6-vermittelte Reduzierung der REDD1 Expression. Des Weiteren erhöht der transiente *knock-down* von STAT3 durch *small interfering RNA* (siRNA) die basale REDD1 mRNA und REDD1 Protein Expression [80]. Es wäre somit möglich, dass STAT3 die Expression eines REDD1 Repressors induziert. Daher wurde untersucht, ob die IL-6-vermittelte Reduzierung der REDD1 mRNA Expression von der Proteinbiosynthese abhängig ist. Hierzu wurden HepG2 Zellen mit IL-6 für 1 h stimuliert und, wenn angegeben, mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid vorbehandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die relative Quantifizierung der REDD1 mRNA erfolgte mittels qRT-PCR. In HepG2 Zellen, welche nicht mit Cycloheximid behandelt wurden reduziert IL-6 die basale REDD1 mRNA Expression (Fig. 4.2). Die Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid erhöht die basale REDD1 mRNA Expression. Dies deutet darauf hin, dass Proteinbiosynthese für die Begrenzung der basalen REDD1 mRNA Expression nötig ist. IL-6 reduziert die basale REDD1 Transkription auch in Anwesenheit von Cycloheximid und somit bei unterdrückter Proteinbiosynthese (Fig. 4.2). Folglich ist für die IL-6-induzierte Reduzierung der basalen REDD1 mRNA Expression keine Proteinbiosynthese notwendig.

Zusammengefasst induziert STAT3 somit nicht die Expression eines REDD1 Repressors, sondern agiert möglicherweise selbst als Repressor der REDD1 mRNA Expression. Es wäre daher möglich, dass die Reduzierung der REDD1 mRNA Expression eine neue, nicht-kanonische Funktion von STAT3 darstellt.

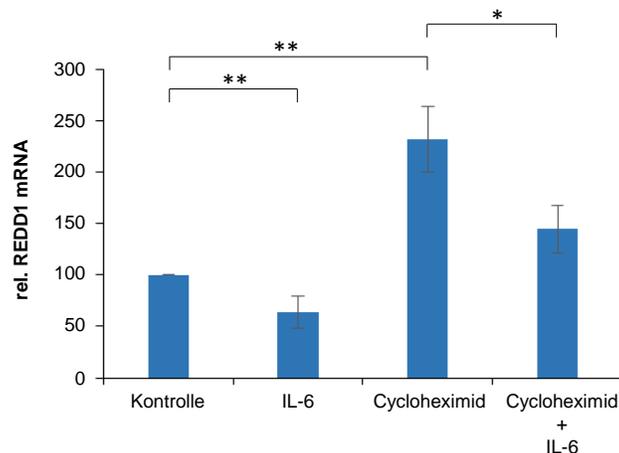


Abb. 4.2: IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression unabhängig von der Proteinbiosynthese. HepG2 Zellen wurden 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend für 60 min mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert \pm 30 minütiger Vorbehandlung mit Cycloheximid (50 μ M). Die REDD1 mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Haushaltsgen diente SDHA. Die basale REDD1 mRNA Expression in unbehandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind MW \pm SD aus n = 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: ANOVA mit $**p < 0,01$, $*p < 0,05$. (Abb. A) und B) verändert nach [103]).

4.3 STAT3 reduziert die REDD1 Expression

STAT3 ist modular aufgebaut und besteht aus sechs verschiedenen Domänen mit unterschiedlichen Funktionen. Es ist noch unbekannt, welche dieser Funktionen für die nicht-kanonische Wirkung von STAT3 notwendig ist. Daher wäre es interessant zu untersuchen, wie sich Mutationen in den STAT3 Domänen auf die Regulation der REDD1 Expression auswirken würden. Da der transiente STAT3 *knock-down* durch siRNA bereits ausreicht, um die basale REDD1 Expression zu erhöhen [80], liegt der Focus dieser Arbeit auf der IL-6-unabhängigen Funktion von STAT3. Der Einsatz von siRNAs bringt neben Vorteilen wie einer schnellen und unkomplizierten transienten Transfektion auch Nachteile mit sich. Zum einen generieren siRNAs keine vollständigen *knock-outs* ihrer Zielgene, sondern nur *knock-downs*. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen an STAT3 Proteinen weiterhin exprimiert werden. Außerdem ist die Transfektion der Zellen mit siRNA transient, was dazu führt, dass die STAT3 Proteinmenge mit fortlaufender Zellteilung wieder ansteigt. Zum anderen stellt eine transiente Transfektion für die Zellen eine temporäre Stresssituation dar. Dies ist problematisch, da REDD1 selbst ein Stress-induziertes Protein ist. Transiente Transfektionen allein erhöhen die REDD1 Expression (Daten nicht gezeigt). Somit wären keine Aussagen über die Effekte der verschiedenen

STAT3 Mutationen auf die REDD1 Expression möglich. Deshalb wurden die Zellen unter Verwendung des pMOWS Systems stabil, retroviral transduziert. Die Selektion der transduzierten Zellen erfolgt über eine Vektor-vermittelte Puromycin-Resistenz [104].

Um die Auswirkungen des transienten STAT3 *knock-downs* in einem stabilen, zellulären System zu bestätigen, wurde die REDD1 Expression in STAT3-gefloxten MEF Zellen (MEF STAT3^{fl/fl}), STAT3-defizienten MEF Zellen (MEF STAT3^{-/-}) und MEF STAT3^{-/-} Zellen, die stabil mit Wildtyp-STAT3 (STAT3 WT) rekonstituiert wurden (MEF STAT3 WT) verglichen. In MEF STAT3^{fl/fl} Zellen sind die STAT3 Exons 12 bis 14 von loxP Seiten flankiert. Das resultierende STAT3-gefloxte Allel ist funktional und geeignet für eine Cre-Rekombinase-vermittelte Deletion [93, 98]. Für die Generierung von STAT3-defizienten MEF Zellen wurden die gefloxten STAT3 Allele in MEF STAT3^{fl/fl} Zellen mittels viraler Transduktion einer Cre-Rekombinase deletiert [93]. MEF STAT3^{fl/fl} Zellen und MEF STAT3^{-/-} Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Valeria Poli zur Verfügung gestellt. Die Rekonstitution von STAT3-defizienten MEF Zellen mit STAT3 WT ist nötig, um mögliche Nebeneffekte bei der Deletion von STAT3 in MEF STAT3^{-/-} Zellen auszuschließen. Für die Erzeugung von MEF STAT3 WT Zellen wurde zunächst die Verpackungszelllinie Platinum_E (PlatE) mit dem retroviralen Expressionsvektor pMOWS_STAT3_WT transient transfiziert. Anschließend wurden STAT3-defiziente MEF Zellen mit dem virushaltigem Überstand der PlatE Zellen retroviral transduziert. Die Selektion der infizierten Zellen erfolgte mit Puromycin-haltigem Selektionsmedium. Überlebende Zellen wurden vereinzelt, um Zellklone zu erzeugen.

Zunächst wurde der STAT3 *knock-out* in den STAT3-defizienten MEF Zellen bestätigt und die STAT3 Protein Expression und die IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung in den verwendeten Zelllinien untersucht. MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT Zellen wurden mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 15 min stimuliert und im Anschluss lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion von STAT3 und Tyrosin 705-phosphoryliertem STAT3. Die Detektion der Phosphorylierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK 1/2) diene als Stimulationskontrolle und die Detektion von Tubulin als Ladekontrolle.

Erwartungsgemäß exprimieren MEF STAT3^{-/-} Zellen im Gegensatz zu MEF STAT3^{fl/fl} Zellen kein STAT3 Protein. Durch die Rekonstitution von MEF STAT3^{-/-} Zellen mit STAT3 WT wurde die STAT3 Expression und die Hy-IL-6-induzierte STAT3 Y705-Phosphorylierung in MEF STAT3 WT Zellen wiederhergestellt (Abb. 4.3 A). Die Zellen können somit als Modellsystem für die Analyse der STAT3-abhängigen Regulation der REDD1 Expression verwendet werden.

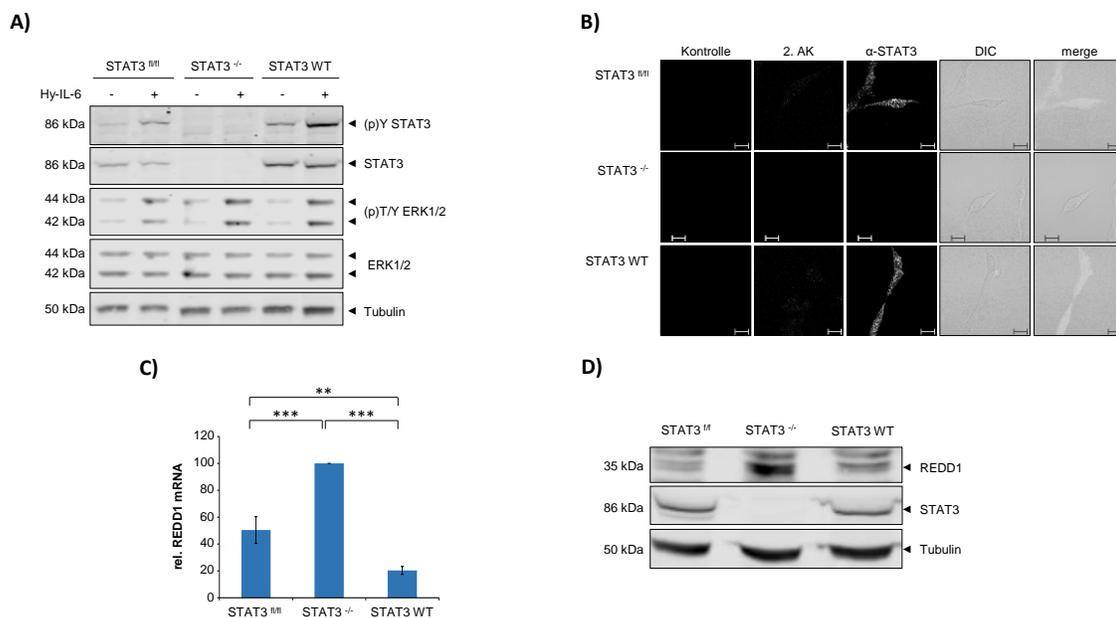


Abb. 4.3: STAT3 reduziert die REDD1 Expression. **A)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 15 min stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)Y STAT3, (p)T/Y ERK 1/2, STAT3, ERK1/2, und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **B)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT Zellen wurden für 24 h auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert, anschließend mit Methanol fixiert und über Nacht mit primären Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die subzelluläre Verteilung von STAT3 wurde mittels Durchlicht und konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Kontrollzellen wurden entweder ungefärbt gelassen (Kontrolle) oder nur mit sekundären Antikörpern (2. AK) angefärbt. Repräsentative Zellen sind dargestellt. Die Skalenbalken entsprechen 10 μm. DIC, differentieller Interferenzkontrast. **C)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die REDD1 mRNA wurde durch qRT-PCR quantifiziert. Als Haushaltsgen diente SDHA. Die maximale REDD1 mRNA Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als MW ± SD aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten angegeben. **D)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen REDD1, STAT3 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis von n = 3 biologisch

unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Statistik: ANOVA mit ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Abb. verändert nach [103])

Damit STAT3 die REDD1 Expression transkriptionell regulieren kann, müsste es im Zellkern lokalisiert sein und mit der DNA interagieren. STAT3 pendelt Zytokin-unabhängig permanent zwischen Zytoplasma und Nukleus [105]. Um zu überprüfen, ob die Rekonstitution der STAT3-defizienten MEF Zellen mit STAT3 WT die Lokalisation von STAT3 im Zellkern beeinflusst, wurde die subzelluläre Verteilung von STAT3 durch Immunocytochemie in Kombination mit konfokaler Mikroskopie in unstimulierten Zellen analysiert (Abb. 4.3 B). MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und über Nacht mit primären Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Kontrollzellen blieben entweder ungefärbt (Kontrolle) oder wurden nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt (2. AK), um ein unspezifisches Binden des 2. AKs zu kontrollieren. Konfokale Mikroskopie Aufnahmen lassen kein unspezifisches Binden des 2. AK erkennen (Abb. 4.3 B). In MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3 WT Zellen ist STAT3 gleichmäßig über Zytoplasma und Zellkern verteilt. In MEF STAT3^{-/-} Zellen ist erwartungsgemäß kein STAT3 Protein nachweisbar. (Abb. 4.3 B). Die Rekonstitution der STAT3-defizienten MEF Zellen mit STAT3 WT beeinflusst somit nicht die Zytokin-unabhängige Lokalisation von STAT3 im Zellkern.

Pinno *et al.* zeigten, dass ein transienter STAT3 *knock-down* die REDD1 mRNA Expression erhöht [80]. Um den Einfluss eines stabilen STAT3 *knock-outs* auf die basale REDD1 Expression zu analysieren, wurde zunächst die Gesamt-RNA von MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression der REDD1 mRNA mittels qRT-PCR analysiert. In STAT3-exprimierenden MEF Zellen wird REDD1 mRNA basal exprimiert (Abb. 4.3 C). Wie schon bei einem transienten STAT3 *knock-down* [80] erhöht auch ein stabiler STAT3 *knock-out* die basale REDD1 mRNA Expression in MEF STAT3^{-/-} Zellen im Vergleich zu MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3 WT Zellen (Abb. 4.3 C). Demzufolge reduziert STAT3 die REDD1 mRNA Expression. Die Ergebnisse von Pinno *et al.* [80] konnten somit auch in dem hier verwendeten Zellsystem

bestätigt werden. Um zu untersuchen, ob die beobachtete STAT3-abhängige Reduzierung der REDD1 mRNA Expression Auswirkungen auf die REDD1 Protein Expression hat, wurden MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 WT Zellen lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE, Western Blot und nachfolgender Immundetektion von REDD1 und STAT3 analysiert. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle. Sowohl in MEF STAT3^{fl/fl} als auch in MEF STAT3 WT Zellen wird REDD1 Protein basal exprimiert. Im Vergleich dazu erhöht der *knock-out* von STAT3 die basale REDD1 Protein Expression in MEF STAT3^{-/-} Zellen (Abb. 4.3 D).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass STAT3 sowohl die REDD1 mRNA als auch die REDD1 Protein Expression reduziert. STAT3 agiert somit als Repressor der REDD1 Expression.

4.4 Die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 ist entscheidend für die Reduzierung der REDD1 Expression

Die kanonische STAT3-Aktivierung beruht auf der Phosphorylierung von Y705 in STAT3 durch JAKs (zusammengefasst in [33]). Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob diese Schlüsselphosphorylierungsstelle zur Verringerung der REDD1 Expression beiträgt. Um dies zu untersuchen wurde die REDD1 Expression in MEF Zellen analysiert, die eine mutierte Form von STAT3 (muSTAT3) exprimieren, welche nicht am Y705 phosphoryliert werden kann (STAT3 Y705F, Abb. 4.4 A). Tyrosin wird an seiner hydrophilen Hydroxylgruppe phosphoryliert. Phenylalanin (F) hat eine ähnliche Struktur wie Tyrosin, besitzt jedoch keine Hydroxylgruppe und ist demzufolge hydrophob. Die Substitution von Tyrosin 705 zu Phenylalanin (Y705F) verhindert die Phosphorylierung von STAT3. Für die Generierung einer STAT3 Y705F-exprimierenden Zelllinie wurde zunächst der eukaryotische Ausgangsvektor pcDNAspez_muSTAT3_Y705F, in dem mittels Mutagenese-PCR STAT3 Y705 durch Phenylalanin ersetzt wurde, in den retroviralen Expressionsvektor pMOWS umklontiert (pMOWS_muSTAT3_Y705F). Für die Virusproduktion wurden PlatE Zellen mit pMOWS_muSTAT3_Y705F transient transfiziert. Anschließend wurden STAT3-defiziente MEF Zellen mit dem virushaltigem

Überstand der PlateE Zellen retroviral transduziert. Die Vereinzelung der transduzierten Zellen erfolgte in Puromycin-haltigem Selektions-medium.

Nach der Vereinzelung der STAT3 Y705F-exprimierenden MEF Zellen (MEF STAT3 Y705F) wurde zunächst mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie untersucht, ob es sich bei den verwendeten MEF STAT3 Y705F Zellen um einen Zellklon handelt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der MEF Zellen wurden diese mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Als Kontrolle dienten ungefärbte MEF STAT3 Y705F Zellen. Um die Spezifität des STAT3 Antikörpers zu verifizieren wurden außerdem gefärbte, STAT3-defiziente MEF Zellen analysiert. Während MEF STAT3^{-/-} Zellen (Abb. 4.4 B, dunkelgraue Fläche) erwartungsgemäß kein STAT3 exprimieren zeigen MEF STAT3 Y705F Zellen (Abb. 4.4 B, hellgraue Fläche) eine deutliche Expression von STAT3. Da im Histogramm der MEF STAT3 Y705F Zellen nur eine Population erkennbar ist handelt es sich jeweils um einen Zellklon (Abb. 4.4 B).

Um auszuschließen, dass die Mutation in STAT3 Y705F einen Einfluss auf die Lokalisation von STAT3 im Nukleus von unstimulierten Zellen hat wurde als nächstes die subzelluläre Lokalisation von STAT3 Y705F bestimmt. MEF STAT3 Y705F Zellen wurden fixiert und permeabilisiert und im Anschluß mit Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Kontrollzellen blieben ungefärbt (Kontrolle) oder wurden nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt (2. AK). Konfokale Mikroskopie Aufnahmen bestätigen das Vorhandensein von STAT3 Y705F im Nukleus und im Zytoplasma. Ein unspezifisches Binden des Sekundärantikörpers wurde nicht beobachtet (Abb. 4.4 C). Folglich hat die Mutation von Tyrosin zu Phenylalanin keinen Einfluss auf die Lokalisation von STAT3 im Zellkern von unstimulierten Zellen.

Ergebnisse

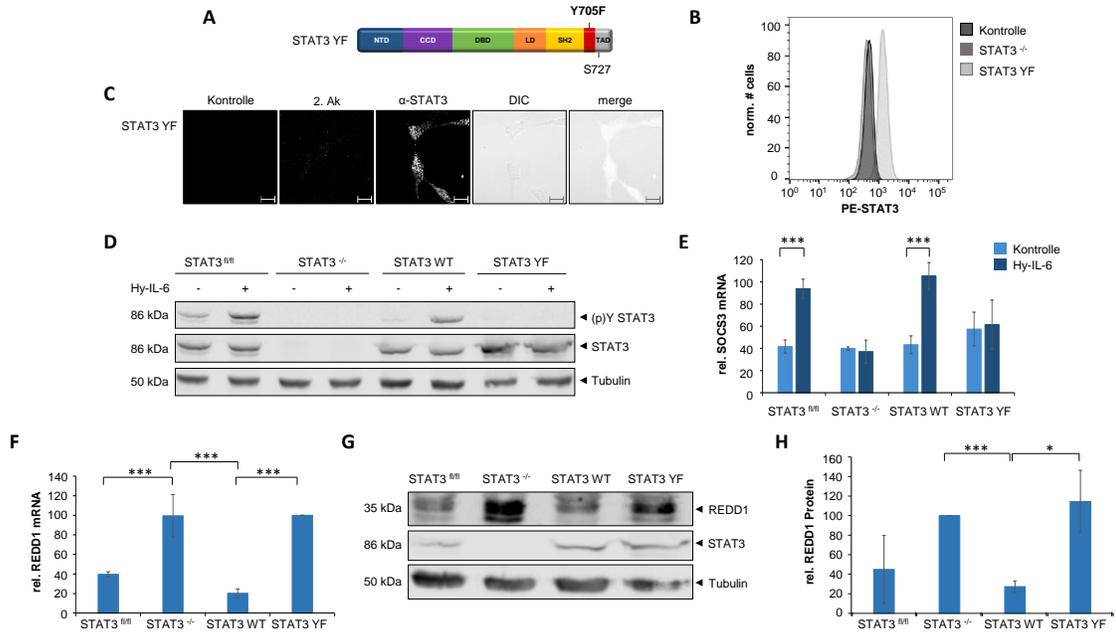


Abb. 4.4: STAT3 Tyrosinphosphorylierung ist nötig für die Reduktion der REDD1 mRNA Expression.

A) Domänenstruktur von STAT3 Y705F. **B)** Die STAT3 Expression in MEF $STAT3^{-/-}$ Zellen und MEF STAT3 Y705F Zellen wurde mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen STAT3 bestimmt. Als Kontrollzellen dienten ungefärbte MEF STAT3 Y705F Zellen sowie gefärbte MEF $STAT3^{-/-}$ Zellen. **C)** MEF STAT3 Y705F Zellen wurden für 24 Stunden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert, anschließend mit Methanol fixiert und über Nacht mit primären Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die subzelluläre Verteilung von STAT3 wurde mittels Durchlicht und konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Kontrollzellen wurden entweder ungefärbt gelassen (Kontrolle) oder mit sekundären Antikörpern (2. AK) angefärbt. Repräsentative Zellen sind dargestellt. Die Skalenbalken entsprechen 10 μ m. DIC, differentieller Interferenzkontrast. **D)** MEF $STAT3^{fl/fl}$, MEF $STAT3^{-/-}$, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 15 min stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen (p)Y STAT3, STAT3, und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis aus $n = 3$ biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **E, F)** MEF $STAT3^{fl/fl}$, MEF $STAT3^{-/-}$, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 60 min stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression der SOCS3 mRNA (**E**) und REDD1 mRNA (**F**) wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die maximale mRNA-Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte aus $n = 3$ biologisch unabhängigen Experimenten \pm SD angegeben. **G)** MEF $STAT3^{fl/fl}$, MEF $STAT3^{-/-}$, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen REDD1, STAT3 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis von $n = 3$ biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **H)** Quantifizierung der relativen REDD1 Protein Expression aus G). Statistik: ANOVA mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Abb. verändert nach [103])

Die Mutation von Tyrosin zu Phenylalanin in STAT3 wurde im Anschluß auf Proteinebene verifiziert. MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F Zellen wurden für 15 min mit Hy-IL-6 stimuliert. Western Blot Analysen zeigen, dass die Hy-IL-6-induzierte STAT3 Y705-Phosphorylierung in MEF STAT3 Y705F Zellen im Gegensatz zu MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3 WT Zellen nicht erfolgt, obwohl STAT3 exprimiert wird (Abb. 4.4 D).

Der negative *Feedback* Inhibitor SOCS3 ist ein kanonisches STAT3 Zielgen [106]. Um zu untersuchen, ob die Mutation in STAT3 einen Einfluss auf die kanonische Funktion von STAT3 als aktivierender Transkriptionsfaktor hat wurde die Expression von SOCS3 mRNA als Indikator für die transkriptionelle Aktivität von STAT3 verwendet. MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F Zellen wurden für 60 min mit Hy-IL-6 stimuliert und die SOCS3 mRNA Expression mittels RT-qPCR analysiert. Hy-IL-6 induziert die Expression von SOCS3 mRNA sowohl in MEF STAT3^{fl/fl} Zellen als auch in MEF STAT3 WT Zellen, jedoch nicht in STAT3-defizienten MEF-Zellen und MEF STAT3 Y705F Zellen (Abb. 4.4 E). Folglich fehlt STAT3 Y705F die kanonische Funktion von STAT3 als aktivierender Transkriptionsfaktor.

Um zu testen, ob die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 entscheidend für die Reduzierung der REDD1 Expression ist wurde zunächst die REDD1 mRNA Expression in MEF STAT3 Y705F Zellen analysiert. Wie zuvor gezeigt (Abb. 4.3 C), ist die basale REDD1 mRNA Expression in STAT3-defizienten Zellen erhöht. Dieser Anstieg wird durch die Rekonstitution dieser Zellen mit STAT3 WT reduziert. Im Gegensatz zu STAT3 WT reduziert STAT3 Y705F die REDD1 mRNA Expression jedoch nicht (Abb. 4.4 F). Die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 ist somit nötig für die Reduzierung der REDD1 mRNA Expression. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die STAT3-abhängige Regulierung der REDD1 mRNA auch in der REDD1 Protein Expression widerspiegelt. Wie bereits zuvor gezeigt (Abb. 4.3 D) ist die REDD1 Protein Expression in STAT3-defizienten MEF Zellen stark erhöht. Die Expression von STAT3 WT, nicht aber von STAT3 Y705F reduziert die REDD1 Protein Expression (Abb. 4.4 G, H). Die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 ist folglich nötig für die Reduzierung der REDD1 Protein Expression.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Y705 Phosphorylierung von STAT3 nicht nur für die kanonische STAT3-abhängige Genexpression essentiell ist, sondern auch für die Hemmung der REDD1 mRNA und REDD1 Protein Expression.

4.5 Die Phosphorylierung von STAT3 an S727 ist nicht erforderlich für die Reduzierung der REDD1 Expression

Zusätzlich zur Phosphorylierung am Y705 wird STAT3 auch an Serin 727 (S727) phosphoryliert. Die S727 Phosphorylierung erfolgt unabhängig von der Y705 Phosphorylierung als Antwort auf externe Stimuli und wird als Modulator der transkriptionellen Aktivität von STAT3 diskutiert (zusammengefasst in [32]). Daher stellt sich die Frage, ob neben Y705 auch diese zweite Schlüsselphosphorylierungsstelle in STAT3 für die Reduzierung der REDD1 mRNA Expression von Bedeutung ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst MEF Zellen generiert, in denen STAT3 S727 zu Alanin (A) mutiert wurde (STAT3 S727A, Abb. 4.5 A). Die Hydroxylgruppe in der Serin-Seitenkette kann phosphoryliert werden. Serin und Alanin haben eine ähnliche Struktur, jedoch besitzt Alanin im Gegensatz zu Serin keine Hydroxylgruppe und kann demzufolge nicht phosphoryliert werden. Die Substitution von S727 zu Alanin verhindert somit die Serin 727 Phosphorylierung von STAT3. Für die Generierung einer STAT3 S727A-exprimierenden Zelllinie wurde zunächst der eukaryotische Ausgangsvektor pcDNAspez_muSTAT3_S727A, in dem mittels Mutagenese-PCR STAT3 S727 durch Alanin ersetzt wurde, in den retroviralen Expressionsvektor pMOWS umkloniert (pMOWS_muSTAT3_S727A). Anschließend wurden PlateE Zellen mit pMOWS_muSTAT3_S727A transient transfiziert, um Viren zu produzieren. Der virus-haltige Überstand der PlateE Zellen wurde mit STAT3-defiziente MEF Zellen mit inkubiert. Die Vereinzelung der transduzierten Zellen erfolgte in Puromycin-haltigem Selektionsmedium.

Um zu verifizieren, dass es sich bei den MEF STAT3 S727A Zellen um einen Zellklon handelt wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrollen dienten ungefärbte MEF STAT3 S727A Zellen und gefärbte STAT3-defiziente Zellen. Im Gegensatz zu MEF STAT3^{-/-} Zellen (Abb. 4.5 B, dunkelgraue Fläche) zeigen MEF STAT3 S727A Zellen (Abb. 4.5 B, hellgraue Fläche) eine deutliche Expression von STAT3. Da die Verteilung der

STAT3 Expression in MEF STAT3 S727A Zellen nur eine distinkte Population zeigt, handelt es sich bei den generierten MEF STAT3 S727A Zellen um einen Zellklon (Abb. 4.5 B).

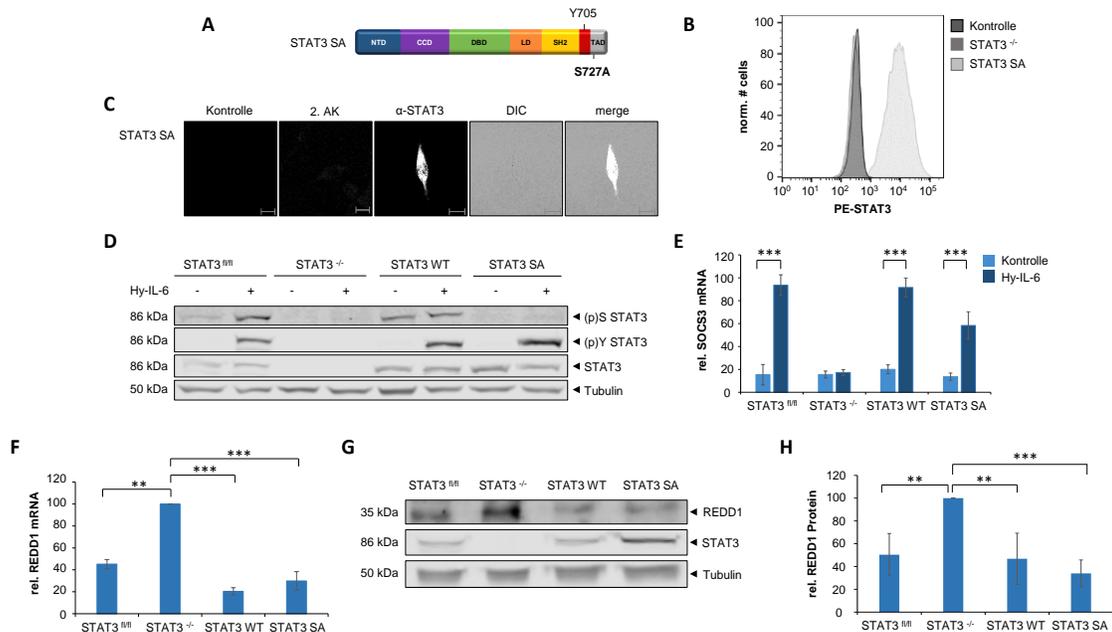


Abb. 4.5: STAT3 Phosphorylierung an Serin727 ist nicht essentiell für die Reduktion der REDD1 Expression

A) Domänenstruktur von STAT3 S727A. **B)** Die STAT3 Expression in MEF STAT3^{-/-} Zellen und MEF STAT3 S727A Zellen wurde mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen STAT3 bestimmt. Als Kontrollzellen dienten ungefärbte MEF STAT3 S727A Zellen sowie gefärbte MEF STAT3^{-/-} Zellen. **C)** MEF STAT3 S727A Zellen wurden für 24 Stunden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert, anschließend mit Methanol fixiert und über Nacht mit primären Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die subzelluläre Verteilung von STAT3 wurde mittels Durchlicht und konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Kontrollzellen wurden entweder ungefärbt gelassen (Kontrolle) oder mit sekundären Antikörpern (2. AK) angefärbt. Repräsentative Zellen sind dargestellt. Die Skalenbalken entsprechen 10 µm. DIC, differentieller Interferenzkontrast. **D)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 S727A Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 15 min stimuliert oder un- behandelt gelassen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen (p)S STAT3, (p)Y STAT3, STAT3, und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **E, F)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 S727A Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 60 Minuten stimuliert oder un- behandelt gelassen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression der SOCS3 mRNA (**E**) und REDD1 mRNA (**F**) wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die maximale mRNA-Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ± SD angegeben. **G)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 S727A Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen REDD1, STAT3 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis von n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

H) Quantifizierung der relativen REDD1 Protein Expression aus G). Statistik: ANOVA mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Abb. verändert nach [103])

Konfokale Mikroskopie Analysen zeigen, dass der 2. AK auch in MEF STAT3 S727A Zellen nicht unspezifisch bindet. Des Weiteren ist STAT3 S727A gleichmäßig im Zytoplasma und im Zellkern verteilt ist (Abb. 4.5 C). Somit hat die Mutation von STAT3 S727 zu Alanin keinen Einfluß auf das Vorhandensein von STAT3 im Zellkern unstimulierter Zellen.

Western Blot Analysen bestätigen, dass die 15 minütige Stimulation der MEF STAT3 S727A Zellen mit Hy-IL-6 erwartungsgemäß keine S727-Phosphorylierung induziert, während die Zytokin-induzierte S727-Phosphorylierung in MEF STAT3^{fl/fl} Zellen und MEF STAT3 WT Zellen offensichtlich ist (Abb. 4.5 D). Die Hy-IL-6-induzierte STAT3 Y705-Phosphorylierung wird hingegen durch die Mutation von S727 zu A727 nicht beeinflusst (Abb. 4.5 D).

Um die transkriptionelle Aktivität von STAT3 S727A zu bestimmen, wurden MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 S727A Zellen für 60 min mit Hy-IL-6 stimuliert und die SOCS3 mRNA Expression mittels qRT-PCR analysiert.

MEF STAT3 S727A Zellen exprimieren, wie auch MEF STAT3^{fl/fl} Zellen und MEF STAT3 WT Zellen, Zytokin-abhängig SOCS3 mRNA (Abb. 4.5 E). Demzufolge ist STAT3-S727A unter den hier gegebenen Bedingungen transkriptorisch aktiv.

Um zu untersuchen, ob die S727 Phosphorylierung von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression erforderlich ist wurde die REDD1 Expression in MEF STAT3 S727A Zellen mittels qRT-PCR und Western Blotting analysiert. Die basale REDD1 mRNA und REDD1 Protein Expression ist in STAT3-defizienten Zellen erhöht. Dieser Anstieg wird durch die Rekonstitution dieser Zellen sowohl mit Wildtyp STAT3 als auch mit STAT3 S727A reduziert (Abb. 4.5 F-H).

Es wird somit deutlich, dass die STAT3 S727-Phosphorylierung, im Gegensatz zu der STAT3 Y705-Phosphorylierung, allein nicht entscheidend ist für die STAT3-vermittelte Reduktion der REDD1 mRNA Expression.

4.6 Die Phosphorylierung von STAT3 S727 trägt zur Y705-abhängigen Reduzierung der REDD1 mRNA Expression bei

STAT3 S727 kann die REDD1 Expression reduzieren (Abb. 4.5 F-H), nicht aber STAT3 Y705F (Abb. 4.4 F-H). Da STAT3 S727 vermutlich eher modulatorisch auf die STAT3-vermittelte Genexpression wirkt stellte sich die Frage, ob und wie eine Doppelmutante von STAT3 Y705 und STAT3 S727 die REDD1 Expression beeinflussen würde. Um dies zu testen, wurden mittels retroviraler Transduktion MEF Zellen generiert, welche STAT3 Y705F/S727A (Abb. 4.6 A) stabil exprimieren (MEF STAT3 Y705/S727A).

Mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen (Abb. 4.6 B, hellgraue Fläche) im Gegensatz zu MEF STAT3^{-/-} Zellen (Abb. 4.6 B, dunkelgraue Fläche) STAT3 exprimieren. Des Weiteren ist in der Verteilung der STAT3 Expression in der MEF STAT3 Y705/S727A Zelllinie nur eine distinkte Population zu erkennen, es handelt sich somit bei den generierten MEF STAT3 S727A Zellen um einen Zellklon (Abb. 4.6 B).

Die subzelluläre Lokalisation von STAT3 Y705F/S727A wurde in konfokalen Mikroskopie Experimenten analysiert. STAT3 Y705F/S727A ist in unstimulierten Zellen sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (Abb. 4.6 C). Die Doppelmutation hat somit wie schon die jeweiligen Einzelmutationen (Abb. 4.4 C und 4.5 C) keinen Einfluß auf die Lokalisation von STAT3 im Zellkern von unstimulierten Zellen.

Anschließend wurden die MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen hinsichtlich der Hy-IL-6-induzierten STAT3 Phosphorylierung charakterisiert. MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen wurden für 15 min mit Hy-IL-6 stimuliert und im Anschluß mittels Western Blotting analysiert. Im Gegensatz zu MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3 WT Zellen wird nach Stimulation mit Hy-IL-6 in MEF STAT3^{-/-} und MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen erwartungsgemäß weder STAT3 Y705 noch STAT3 S727 phosphoryliert (Abb. 4.6 D). Die STAT3 Mutationen wurden somit auf Protein Ebene bestätigt.

Für die Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von STAT3 Y705F/S727A wurden Zellen für 60 min mit Hy-IL-6 stimuliert und die SOCS3 mRNA Expression analysiert. qRT-PCR Analysen zeigen, dass Hy-IL-6 die SOCS3 mRNA Expression in MEF STAT3^{fl/fl} und MEF

STAT3 WT Zellen induziert, jedoch nicht in MEF STAT3^{-/-} Zellen und MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen. (Abb. 4.6 E). Somit ist STAT3 Y705F/S727A nicht transkriptionell aktiv. Um die Frage zu beantworten wie sich die Mutation beider Schlüsselphosphorylierungsstellen in STAT3 auf die Regulierung der REDD1 Expression auswirkt, wurde sowohl die REDD1 mRNA Expression als auch die REDD1 Protein Expression in MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen untersucht. Interessanterweise reduziert STAT3 Y705F/S727A, im Gegensatz zu STAT3 S727A, nicht die Expression der REDD1 mRNA (Abb. 4.6 F). Die REDD1 Protein Expression ist in MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen ebenfalls nicht reduziert, sondern ähnlich hoch wie in MEF STAT3^{-/-} Zellen (Abb. 4.6 G, H).

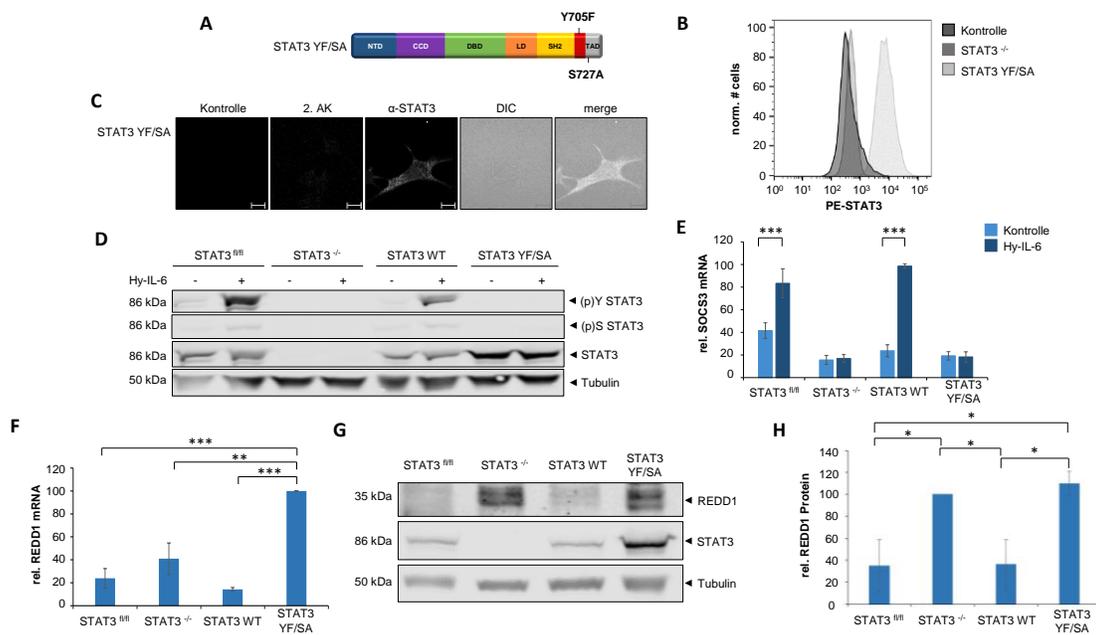


Abb. 4.6: Die Phosphorylierung von STAT3 S727 trägt zur Y705-abhängigen Reduzierung der REDD1 Expression bei. A) Domänenstruktur von STAT3 Y705F/S727A. **B)** Die STAT3 Expression in MEF STAT3^{-/-} Zellen und MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen wurde mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen STAT3 bestimmt. Als Kontrollzellen dienten ungefärbte MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen sowie gefärbte MEF STAT3^{-/-} Zellen. **C)** MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen wurden für 24 Stunden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert, anschließend mit Methanol fixiert und über Nacht mit primären Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die subzelluläre Verteilung von STAT3 wurde mittels Durchlicht und konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Kontrollzellen wurden entweder ungefärbt gelassen (Kontrolle) oder nur mit sekundären Antikörpern (2. AK) angefärbt. Repräsentative Zellen sind dargestellt. Die Skalenbalken entsprechen 10 µm. DIC, differentieller Interferenzkontrast. **D)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 15 min stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen (p)S STAT3, (p)Y STAT3, STAT3, und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives

tatives Ergebnis aus $n = 3$ biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **E, F)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 60 Minuten stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression der SOCS3 mRNA (**E**) und REDD1 mRNA (**F**) wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die maximale mRNA-Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte aus $n = 3$ biologisch unabhängigen Experimenten \pm SD angegeben. **G)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 Y705F/S727A Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen REDD1, STAT3 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis von $n = 3$ biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **H)** Quantifizierung der relativen REDD1 Protein Expression aus G). Statistik: ANOVA mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Abb. verändert nach [103])

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine sekundäre Funktion der S727-Phosphorylierung von STAT3 hin, welche zur Verringerung der REDD1 mRNA Expression beiträgt, wenn die Y705-Phosphorylierung vorhanden ist.

4.7 STAT3 bindet an *DDIT4* Promotor Elemente

In der Promotorsequenz von *DDIT4* wurde eine putative STAT3-Bindestelle mittels ChIP-seq vorhergesagt, jedoch nicht näher charakterisiert [75]. Es wäre somit möglich, dass STAT3 direkt an den *DDIT4* Promotor bindet und so dessen Aktivität reduziert. Eine Möglichkeit den Einfluss der Promoteraktivität auf die Genexpression unabhängig von posttranskriptioneller Regulation wie z. B. mRNA Abbau zu untersuchen bietet der Einsatz von Promotor-Reporterassays.

Um zu untersuchen, ob STAT3 die *DDIT4* Promotoraktivität reduziert, wurden MEF STAT3^{fl/fl} Zellen und STAT3-defiziente MEF Zellen transient mit einem Promotor-Reporter-Konstrukt transfiziert, welches die codierende Sequenz einer Luziferase unter der Kontrolle eines 600 bp (-433/+167 relativ zur TSS) langen *DDIT4* Promotor Fragments trägt [59]. Zur Berücksichtigung der Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze wurden die Zellen zusätzlich mit einem Kontroll-Reporterplasmid transfiziert, welches die codierende Sequenz der β -Galactosidase für unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors trägt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit einem *SOCS3* Promotor-Luciferase-Konstrukt transfiziert.

Wie erwartet, wird die Aktivität des *SOCS3* Promotors in MEF STAT3^{fl/fl} Zellen durch Hy-IL-6 stark erhöht (Abb. 4.7 A). Im Gegensatz dazu wird die *SOCS3* Promotoraktivität in

STAT3-defizienten Zellen durch Hy-IL-6 nicht beeinflusst (Abb. 4.7 B). Interessanterweise reduziert Hy-IL-6 die *DDIT4* Promotoraktivität in MEF *STAT3^{fl/fl}* Zellen (Abb. 4.7 C), während es die *DDIT4* Promotoraktivität in STAT3-defizienten Zellen nicht beeinflusst (Abb. 4.7 D). Dies deutet darauf hin, dass aktiviertes, Y705 phosphoryliertes STAT3 den *DDIT4* Promotor negativ reguliert.

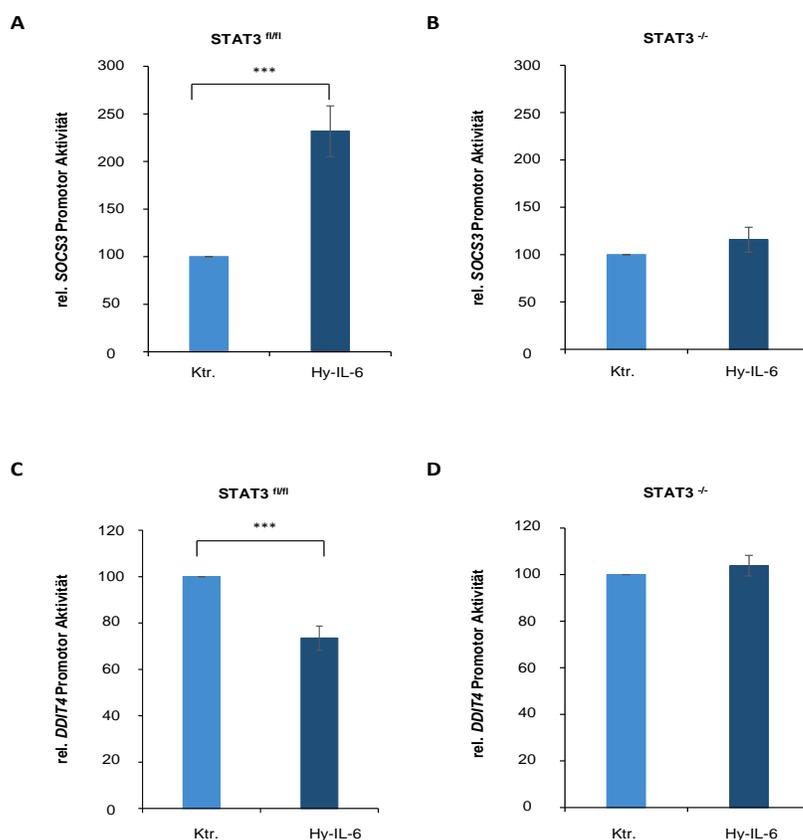


Abb. 4.7: STAT3 reduziert die Aktivität des *DDIT4* Promotors. MEF *STAT3^{fl/fl}* (A, C) und *STAT3^{-/-}* (B, D) Zellen wurden mit *SOCS3* (A, B) oder *DDIT4* (C, D) Promotor-Reporter-Konstrukten und einem β -Galaktosidase-kodierenden Expressionsvektor transfiziert. Die Zellen wurden für 16 h mit Hy-IL-6 (10 ng/ml) behandelt. Die Luziferase-Aktivität wurde auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert. Die maximale Reporteraktivität wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwert von n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten \pm SD angegeben. Statistik: T-test mit ***: p < 0,001

Die Ergebnisse des Reporterassays liefern Hinweise auf eine STAT3-abhängige Reduzierung der *DDIT4* Promotor Aktivität, erlauben jedoch keine Aussagen bezüglich einer möglichen Rekrutierung von STAT3 an den REDD1 Promotor. Darum wurde zunächst der *DDIT4* Promotor näher betrachtet.

STAT3 erkennt die palindromische Konsensus Sequenz TTCnnnGAA [28] (Abb. 4.8 A). REDD1 wird von dem Gen *DDIT4* codiert, welches auf Chromosom 10 lokalisiert ist [60]

Ergebnisse

(Abb. 4.8 C) Der hier analysierte humane *DDIT4* Promotor Bereich erstreckt sich von -1561 bp bis +166 bp [107] relativ zur TSS (Abb. 4.8 C) und ist damit größer als der bereits mittels Reporter-Assays untersuchte *DDIT4* Promotor Bereich. Hardee *et al.* lieferten mittels ChIP-Seq Hinweise für eine putative STAT3 Bindestelle (BS) im humanen *DDIT4* Promotor Bereich von -249 bp bis +81 bp [75]. In diesem Bereich befindet sich eine Sequenz, die zu 83 % mit dem palindromischen STAT3 Bindemotiv übereinstimmt (BS 4: TTCcagAAA, -227/-218, Abb. 4.8 B, C). Mittels Sequenzvergleichen wurden drei zusätzliche Bereiche im *DDIT4* Promotor ähnlich zum STAT3 Konsensus Motiv identifiziert (BS 1 - BS 3). Die putative STAT3 BS 1 (TTCcagAGA, -967/-958) stimmt zu 68 % und die putative STAT3 BS 2 (TCCgcgGGG, -841/-831) stimmt zu 50 % mit der STAT3 Konsensus Sequenz überein. Die putative STAT3 BS 3 (TTCcttGAT, -294/-284) ist zu 83 % mit dem STAT3 Konsensus Motiv identisch (Abb. 4.8 B). Folglich wäre eine direkte Bindung von STAT3 an den *DDIT4* Promotor möglich.

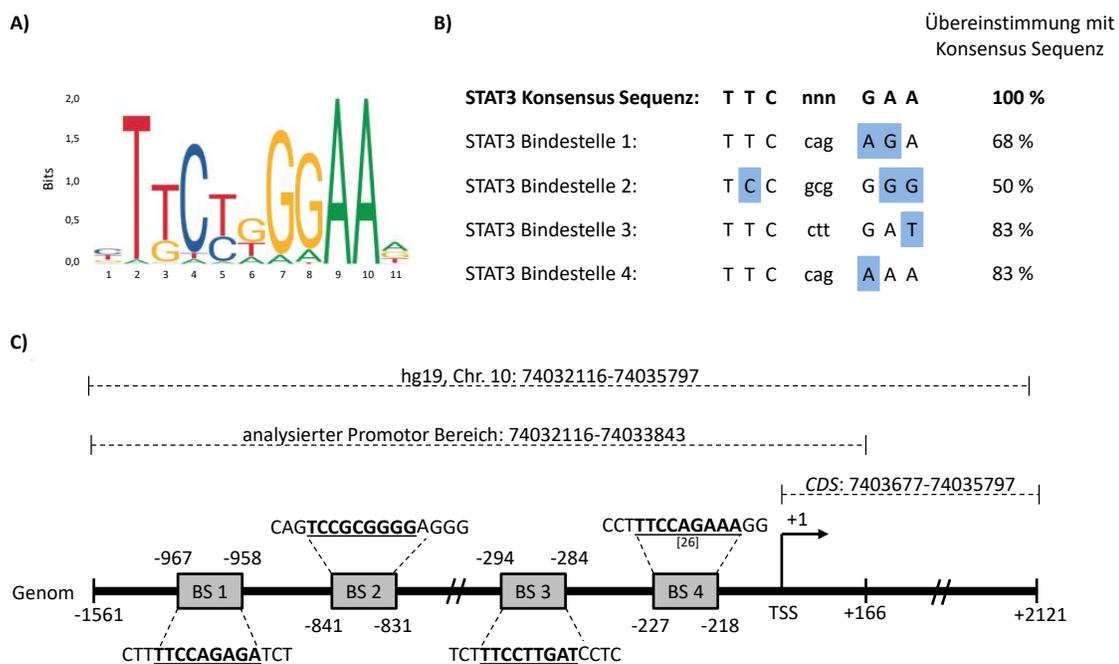


Abb. 4.8: Zusammenfassung der Vorbetrachtungen zum STAT3 ChIP am *DDIT4* Promotor. **A)** Humane STAT3 Konsensus Sequenz laut Jasper Datenbank. Matrix-ID: MAO144.2 [108]. **B)** Sequenzvergleiche der putativen STAT3 Bindestellen BS 1-4 mit der STAT3 Konsensus Sequenz. Von der Konsensus Sequenz abweichende Nukleotide sind blau hervorgehoben. Kleinbuchstaben symbolisieren variable Nukleotide. **C)** Schematische Darstellung von *DDIT4*. Im analysierten *DDIT4* Promotor Bereich (-1561/+166) befinden sich vier putative STAT3 Bindestellen (graue Boxen): BS 1 (-967/-958), BS 2 (-841/-831), BS 3 (-294/-284), BS 4 (-227/-218). Der kodierende Bereich erstreckt sich von +1 bp bis +2121 bp. Zahlen geben die relative Position zur Transkriptionsstartstelle (TSS=+1) an. CDS = kodierender Bereich (*coding Sequenz*).

Die mögliche direkte Bindung von STAT3 an den *DDIT4* Promotor wurde mittels ChIP Analysen untersucht.

Die in der ChIP Analyse mit Antikörpern gegen STAT3 präzipitierten *DDIT4* Promotorfragmente wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Primer zur Amplifikation der *DDIT4* Promotor Bereiche wurden mit dem Computer Programm OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) nach folgenden Regeln *designed* (verändert nach [109]):

1. Vermeidung von Primern mit Potential für die Ausbildung von Haarnadelstrukturen. Ein Minimum von 5 bp wurde für die Ausbildung einer Haarnadelstruktur gesetzt.
2. Vermeidung von Primer Dimeren. Für die Ausbildung von Primer Dimeren wurde ein Minimum von 5 bp gesetzt.
3. Vermeidung einer Differenz von mehr als 5°C zwischen den Schmelztemperaturen der Primer.
4. Die Größe der amplifizierten PCR Produkte liegt zwischen 150 bp und 200 bp.
5. Die Primer sind zwischen 18 bp und 22 bp lang.
6. Die Primer decken den von Salsmann *et al.* [107] definierten *DDIT4* Promotorbereich ab.

Abb. 4.9 A (links) zeigt die schematische Darstellung der qRT-PCR Primer Bindestellen im humanen *DDIT4* Promotor. Zahlen geben die relative Position zur TSS an. Graue Boxen symbolisieren die putativen STAT3 BS 1-4.

Da die STAT3 Y705-Phosphorylierung für die STAT3-abhängige Reduktion der REDD1 mRNA Expression essentiell ist (Abb. 4.4 E), wurden HepG2 Zellen zunächst für 16 h in Hungermedium kultiviert und anschließend für 60 min mit IL-6 stimuliert, um die STAT3 Y705-Phosphorylierung zu induzieren. Die DNA-Proteine Komplexe wurden mit Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Chromatin isoliert. Im Anschluß wurde das isolierte Chromatin enzymatisch in Fragmente von etwa 500 bp verdaut. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Antikörpern gegen STAT3, die an magnetische

beads gekoppelt waren. Als Kontrolle wurde Chromatin mit einem unspezifischen Isotypenkontroll-Antikörper gegen Immunglobulin G (IgG) inkubiert, der ebenfalls an magnetische *beads* gekoppelt war. Die gefällte DNA wurde von den Antikörpern/*bead* Komplexen isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Präzipitation der *DDIT4* Promotorfragmente mit IgG wurde auf 1 gesetzt. Die x-fache Anreicherung wurde berechnet durch: $2^{-(Ct_{sample} - Ct_{IgG})}$.

STAT3 wird an den *DDIT4* Promotor in einer Region zwischen -947 bp und -800 bp und in geringerem Maße in einer Region zwischen -349 bp und -174 bp relativ zur TSS rekrutiert (Abb. 4.9 A). Da IL-6 sowohl die humane (Abb. 4.1 A) als auch die murine (Abb. 4.1 B) REDD1 mRNA Expression reduziert, wurde nach konservierten STAT3-Bindestellen innerhalb des *DDIT4* Promotors bei Mensch und Maus gesucht (Abb. 4.9 B). Die Konsensus-STAT3-Bindemotive in Mensch und Maus sind fast identisch (Abb. 4.9 C). Die Bindestellen 2, 3 und 4, befinden sich innerhalb der durch die STAT3 ChIP angereicherten Regionen des humanen *DDIT4* Promotors und sind im murinen *Ddit4* Promotor konserviert (Abb. 4.9 B). Es muss jedoch betont werden, dass die Sequenzähnlichkeit dieser mutmaßlichen STAT3-Bindestellen mit den Konsensus-STAT3-Bindemotiven nur mäßig ist (Abb. 4.9 B, C). Daher ist es fraglich, ob die Bindung von STAT3 an diese Stellen im *DDIT4* Promotor tatsächlich an der Reduzierung der *DDIT4* Promotoraktivität beteiligt ist.

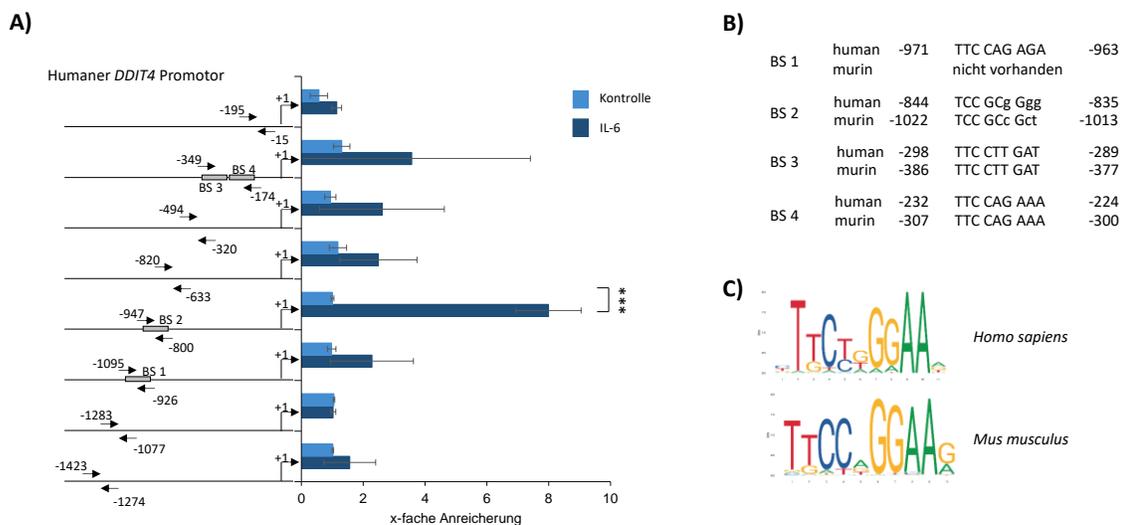


Abb. 4.9: STAT3 wird an den *DDIT4* Promotor rekrutiert. A, links) Schematische Darstellung der qRT-PCR Primer Bindestellen im humanen *DDIT4* Promotor. Zahlen geben die relative Position zur TSS an. Graue Boxen symbolisieren putative STAT3 BS 1-4. **A, rechts)** HepG2 Zellen wurden 16 h in Hungermedium kultiviert und anschließend für 60 min mit 10 ng/ml IL-6 stimuliert. DNA-Proteine Komplexe wurden fixiert

und enzymatisch verdaut. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-STAT3 und anti-IgG Antikörpern, die an magnetische Beads gekoppelt waren. Die gefällte DNA wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die Präzipitation des *DDIT4* Promotors mit IgG wurde auf 1 gesetzt. Die x-fache Anreicherung wurde berechnet durch: $2^{-(Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{IgG}})}$. Die Daten sind als Mittelwert von $n = 3$ biologisch unabhängigen Experimenten \pm SD angegeben. **B)** Abgleich potenzieller STAT3-Bindestellen im humanen (NC_000010.11) und murinen *DDIT4* (NC_000076.7) Promotor. Großbuchstaben zeigen Sequenzhomologien. **C)** Humane und murine STAT3-Konsensus-DNA-Bindungsstellen aus der JASPAR Datenbank [51]. Statistik: ANOVA mit *** $p < 0,001$

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass STAT3 an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird und dessen Aktivität reduziert. Es ist jedoch unklar, ob eine direkte Bindung von STAT3 an kanonische STAT3-Bindungssequenzen stattfindet.

4.8 Die kanonische DNA-Bindung von STAT3 ist für die Reduzierung der REDD1 Expression nicht notwendig

In ChIP Analysen wurde gezeigt, dass STAT3 an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird (Abb. 4.9 A). Die Analyse der STAT3-gebundenen Sequenzen in den erhaltenen ChIP Daten lässt jedoch keine Antwort auf die Fragen zu, ob STAT3 direkt an die DNA bindet oder ob dies über die Interaktion mit Kofaktoren geschieht. Um zu untersuchen, ob die kanonische DNA-Bindung von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression notwendig ist, wurde die REDD1 Expression in MEF Zellen analysiert, welche STAT3 mit einer mutierten DNA-Bindedomäne exprimieren. Dazu wurden mittels retroviraler Transduktion MEF Zellen generiert, die STAT3 mutSNICQ (Abb. 4.10 A) stabil exprimieren (MEF STAT3 mutSNICQ). In STAT3 mutSNICQ wurde die Sequenz ⁴⁵⁶SNICQ⁴⁶⁹ innerhalb der DBD von STAT3 zu ⁴⁵⁶GSSGS⁴⁶⁹ mutiert (Abb. 4.10 A). Die DBD bildet vier Schleifen, von denen die α 5-Schleife im Falle einer direkten DNA Bindung den engsten Kontakt mit der DNA hat. Die Sequenz ⁴⁶⁵SNICQ⁴⁶⁹ innerhalb der α 5-Schleife ist essentiell für die Sequenz-spezifische DNA Bindung von STAT3 [29]. Innerhalb der SNICQ-Sequenz von STAT3 stellen die Seitenkettenreste Serin 465, Asparagin 466 (N466) und Glutamin 469 (Q469) die wichtigsten Kontakte zwischen STAT3 und der DNA dar, von denen die meisten auf Wasserstoffbrückenbindungen basieren. Unter diesen Aminosäuren ist N466 von besonderer Bedeutung und ermöglicht sowohl polare als auch hydrophobe Wechselwirkungen mit der DNA. Um die STAT3-DNA Bindung zu reduzieren wurden N466, Isoleucin 467 (I467) und Q469 zu Serin mutiert um die Seitenketten zu verkürzen und gleichzeitig die polare Eigenschaft

der $\alpha 5$ -Schleife zu erhalten. Außerdem wurden S465 und Cystein 486 (C468) zu Glycin mutiert, um die Kontakte von STAT3 zur DNA weiter zu verringern [24] (Abb. 4.10 A).

Intrazelluläre Durchflusszytometrie Analysen zeigen, dass MEF STAT3 mutSNICQ Zellen STAT3 exprimieren. Die Verteilung der STAT3 Expression in MEF STAT3 mutSNICQ Zellen zeigt nur eine Population. Folglich handelt es sich um einen Zellklon (Abb. 4.10 B, hellgraue Fläche). MEF STAT3^{-/-} Zellen exprimieren erwartungsgemäß kein STAT3 (Abb. 4.10 B, dunkelgraue Fläche).

Konfokale Mikroskopie Aufnahme zeigen, dass STAT3 mutSNICQ gleichmäßig im Zytoplasma und im Nukleus verteilt ist (Abb. 4.10 C). Die Mutation der DNA-Bindedomäne beeinträchtigt somit nicht die Kernlokalisierung von STAT3 in unstimulierten Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse von Martincuks *et al.* [24].

Die Mutation von ⁴⁵⁶SNICQ⁴⁶⁹ in STAT3 blockiert sowohl die Hy-IL-6-induzierte SOCS3 Protein Expression (Abb. 4.10 D) als auch die SOCS3 mRNA Expression (Abb. 4.10 E). Da SOCS3 als negativer *feedback* Inhibitor der Hy-IL-6-induzierten STAT3 Aktivierung agiert ist die STAT3 Y705-Phosphorylierung folglich in MEF STAT3 mutSNICQ-Zellen erhöht im Vergleich zu MEF STAT3^{fl/fl} Zellen (Abb. 4.10 D).

Interessanterweise reduziert STAT3 mutSNICQ, ähnlich wie STAT3 WT, die REDD1 mRNA Expression (Abb 4.10 F). Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von STAT3 an kanonische STAT3-Bindestellen nicht notwendig ist für die Reduzierung der REDD1 mRNA Expression. Die auf mRNA Ebene gemachten Beobachtungen konnten auf Protein Ebene bestätigt werden. STAT3 mutSNICQ reduziert die REDD1 Expression ähnlich wie Wildtyp-STAT3 (Abb. 4.10 H, G).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass STAT3, obwohl es an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird, die Expression von REDD1 unabhängig von der kanonischen Bindung von STAT3 an die DNA reguliert.

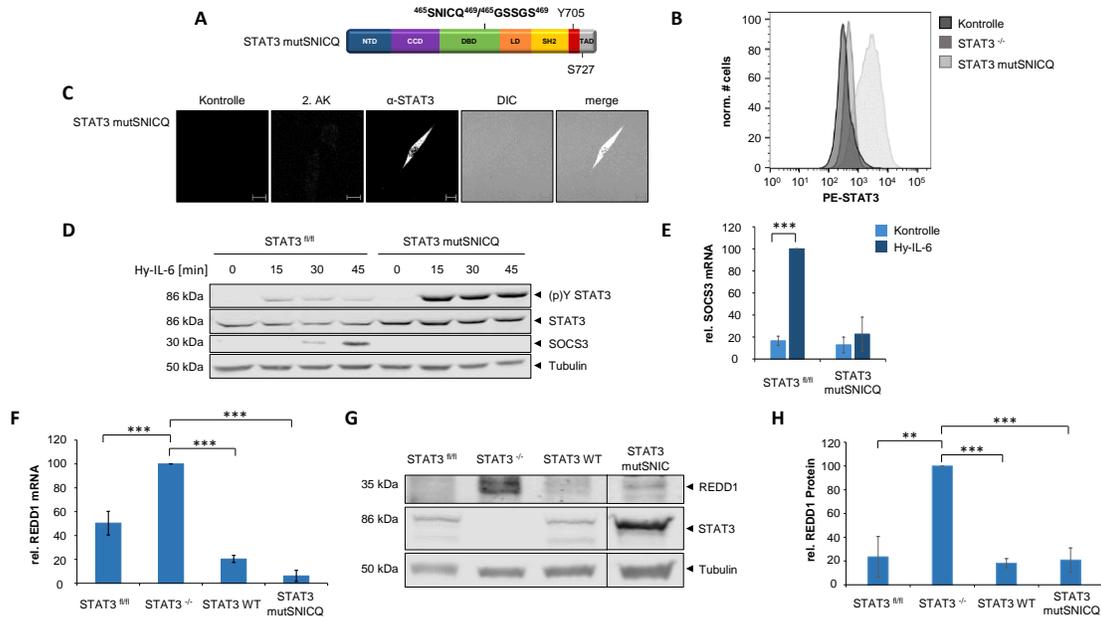


Abb. 4.10: Die DNA Bindedomäne von STAT3 ist nicht notwendig für die Reduktion der REDD1 Expression

A) Domänenstruktur von STAT3 mutSNICQ. **B)** Die STAT3 Expression in MEF STAT3^{-/-} Zellen und MEF STAT3 mutSNICQ Zellen wurde mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen STAT3 bestimmt. Als Kontrollzellen dienten ungefärbte MEF STAT3 mutSNICQ Zellen sowie gefärbte MEF STAT3^{-/-} Zellen. **C)** MEF STAT3 mutSNICQ Zellen wurden für 24 Stunden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert, anschließend mit Methanol fixiert und über Nacht mit primären Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die subzelluläre Verteilung von STAT3 wurde mittels Durchlicht und konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Kontrollzellen wurden entweder ungefärbt gelassen (Kontrolle) oder mit sekundären Antikörpern (2. AK) angefärbt. Repräsentative Zellen sind dargestellt. Die Skalenbalken entsprechen 10 µm. DIC, differentieller Interferenzkontrast. **D)** MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3 mutSNICQ Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen (p)Y-STAT3, STAT3, SOCS3 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladeprotein. Ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **E)** MEF STAT3^{fl/fl} und MEF STAT3 mutSNICQ Zellen wurden mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 60 Minuten stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die RNA wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression der SOCS3 mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die maximale mRNA-Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ± SD angegeben. **F)** Die Gesamt-RNA aus MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 mutSNICQ Zellen wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression der REDD1 mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die maximale mRNA-Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ± SD angegeben. **G)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 mutSNICQ Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen REDD1, STAT3 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladeprotein. Ein repräsentatives Ergebnis von n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Horizontale Balken markieren entfernte Spuren auf dem Blot.

H) Quantifizierung der relativen REDD1 Protein Expression aus G). Statistik: ANOVA mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Abb. verändert nach [103]).

4.9 Die N-terminale Domäne von STAT3 ist notwendig für die Reduzierung der REDD1 Expression

ChIP Analysen zeigen, dass STAT3 an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird (Abb. 4.9 A). Die Bindung von STAT3 an den *DDIT4* Promotor erfolgt dabei höchstwahrscheinlich unabhängig von der kanonischen Bindung an STAT3 Konsensus Sequenzen, da STAT3 mutSNICQ, welches nicht an die DNA binden kann, die REDD1 mRNA und Protein Expression ähnlich wie STAT3 WT reduziert (Abb. 4.10 F - H). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass STAT3 die Reduzierung der REDD1 mRNA über eine indirekte Bindung an andere Transkriptionsfaktoren oder regulatorische Proteine reguliert. Somit könnten Protein-Protein Interaktionen eine essentielle Rolle in der STAT3-vermittelten Reduzierung der REDD1 mRNA Expression spielen. Die NTD von STAT3 ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt, die zur regulatorischen Aktivität von STAT3 beitragen [110]. Um zu testen, ob die NTD von STAT3 zur Verringerung der REDD1 Expression beiträgt, wurden mittels retroviraler Transduktion MEF Zellen erzeugt, die eine verkürzte Form von STAT3 ohne NTD (STAT3 dN, Abb. 4.11 A), stabil exprimieren (MEF STAT3 dN). Nach der Vereinzelung und anschließenden Kultivierung der transduzierten Zellen wurde die Generierung eines Zellklons durchflusszytometrisch bestätigt. Da das Epitop des zuvor für die intrazelluläre Durchflusszytometrie verwendeten Antikörpers gegen STAT3 innerhalb der NTD liegt, wurde die Expression von STAT3 dN durch intrazelluläre Färbung von Y705-phosphoryliertem STAT3 dN in Hy-IL-6 stimulierten Zellen analysiert (Abb. 4.11 B). Die Stimulation mit Hy-IL-6 induziert die Phosphorylierung von STAT3 Y705 in MEF STAT3 dN Zellen (Abb. 4.11 B, hellgraue Fläche), aber nicht in STAT3-defizienten Zellen (Abb. 4.11 B, dunkelgraue Fläche). Die STAT3 Verteilung zeigt in MEF STAT3 dN Zellen nur eine distinkte Population. Folglich handelt es sich um einen Zellklon (Abb. 4.11 B).

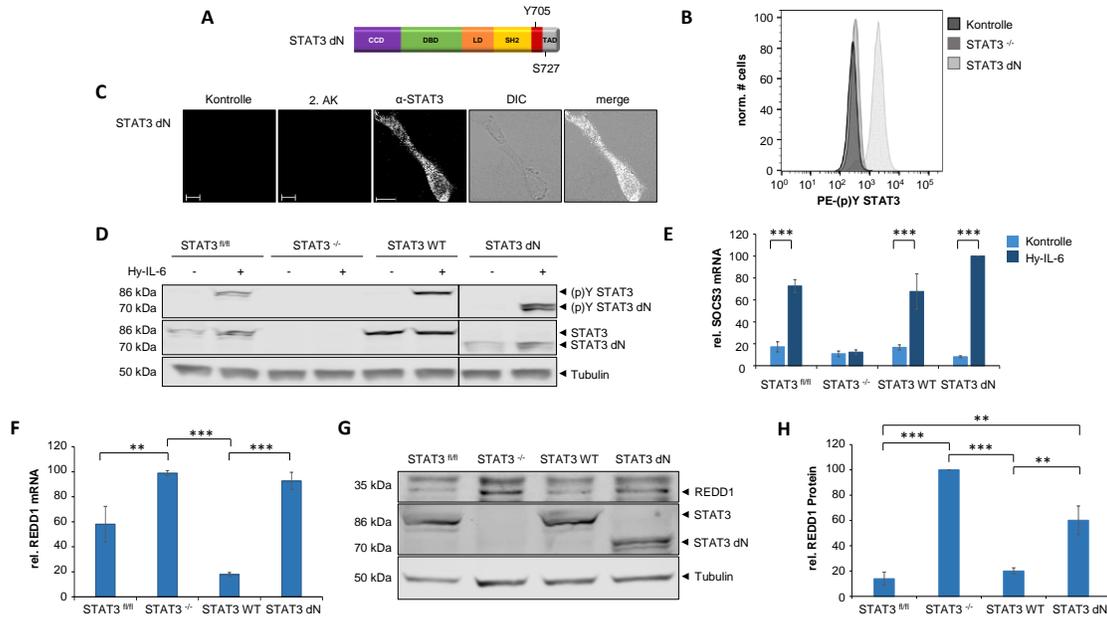


Abb. 4.11: Die NTD von STAT3 ist an der Reduzierung der REDD1 Expression beteiligt. **A)** Domänenstruktur von STAT3 dN. **B)** Die STAT3 Expression in MEF STAT3^{-/-} Zellen und MEF STAT3 dN Zellen wurde mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern gegen STAT3 bestimmt. Als Kontrollzellen dienten ungefärbte MEF STAT3 dN Zellen sowie gefärbte MEF STAT3^{-/-} Zellen. **C)** MEF STAT3 dN Zellen wurden für 24 Stunden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert, anschließend mit Methanol fixiert und über Nacht mit primären Antikörpern gegen STAT3 gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit PE-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Die subzelluläre Verteilung von STAT3 dN wurde mittels Durchlicht und konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Kontrollzellen wurden entweder ungefärbt gelassen (Kontrolle) oder mit sekundären Antikörpern (2. AK) angefärbt. Repräsentative Zellen sind dargestellt. Die Skalenbalken entsprechen 10 µm. DIC, differentieller Interferenzkontrast. **D)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 dN Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 15 min stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen (p)Y STAT3, STAT3, und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Horizontale Balken markieren entfernte Spuren auf dem Blot. **E, F)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 dN Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml Hy-IL-6 für 60 Minuten stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression der SOCS3 mRNA (E) und REDD1 mRNA (F) wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die maximale mRNA-Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ± SD angegeben. **G)** MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT3 WT und MEF STAT3 dN Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen REDD1, STAT3 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis von n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **H)** Quantifizierung der relativen REDD1 Protein Expression aus G). Statistik: ANOVA mit *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. (Abb. verändert nach [103]).

Konfokale Mikroskopie Aufnahmen zeigen, dass STAT3 dN sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist (Abb. 4.11 C). Die Deletion der NTD hat folglich keinen negativen Einfluss auf die Lokalisation von STAT3 im Zellkern unstimulierter Zellen.

Die Expression und Hy-IL-6-induzierte Y705-Phosphorylierung von STAT3 dN wurde zusätzlich durch Western Blotting bestätigt (Abb. 4.11 D). Die Deletion der NTD hat ebenfalls keine Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität von STAT3, da die Hy-IL-6-induzierte SOCS3 mRNA Expression in MEF Zellen, die Wildtyp-STAT3 exprimieren, und in MEF STAT3 dN Zellen ähnlich ist (Abb. 4.11 E).

Obwohl STAT3 dN Zytokin-unabhängig in den Zellkern transloziert (Abb. 4.11 C) reduziert MEF STAT3 dN weder die REDD1 mRNA Expression (Abb. 4.11 F) noch die REDD1 Protein Expression (Abb. 4.11 G, H). Die hier gezeigten Daten unterstützen somit die Vermutung, dass Protein-Protein-Interaktionen, die von der NTD von STAT3 abhängen, an der STAT3-vermittelten Reduktion der REDD1-Expression beteiligt sind.

Die bisher präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Phosphorylierung von STAT3 am Y705 sowie die N-terminale Domäne von STAT3 essentiell sind für die Reduzierung der REDD1 Expression. Interessanterweise ist die kanonische DNA Bindung von STAT3 an STAT3 Konsensus Motive nicht nötig, um die REDD1 Expression zu reduzieren.

5.9 Die Reduzierung der REDD1 Expression ist spezifisch für STAT3

STAT3 und STAT1 weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und binden, sobald sie an konservierten Tyrosylresten (STAT3: Y705, STAT1: Y701) phosphoryliert sind, an ähnliche DNA Bereiche (zusammengefaßt in [53]). Das wirft die Frage auf, ob die Reduzierung der REDD1 Expression spezifisch für STAT3 ist oder ob auch STAT1 die REDD1 mRNA und Protein Expression verringert. Um dies zu beantworten wurden zunächst MEF STAT1^{fl/fl} Zellen und STAT1-defiziente MEF Zellen für 15 min mit IFN- γ , einem starken Aktivator von STAT1 [54], stimuliert. Western Blot Analysen bestätigten den STAT1 *knock-out* und das Fehlen der IFN- γ -induzierten Y701-Phosphorylierung in STAT1-defizienten MEF Zellen (Abb. 4.12 A). Die REDD1 Protein Expression wird weder durch den STAT1 *knock-out* noch durch die Aktivierung von STAT1 durch IFN- γ beeinflusst (Abb. 4.12 A, B). Dies lässt vermuten, dass STAT1 die REDD1 Protein Expression nicht reguliert. Obwohl STAT3 und

STAT1 eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, haben sie unterschiedliche und zum Teil gegensätzliche Funktionen (zusammengefasst in [51]). Um zu untersuchen, ob STAT1 und STAT3 die REDD1 mRNA Expression unterschiedlich regulieren wurde im nächsten Schritt die Expression der REDD1 mRNA in MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT1^{fl/fl} und MEF STAT1^{-/-} Zellen verglichen. Während die REDD1 mRNA Expression in STAT3-defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen stark erhöht ist, hat der *knock-out* von STAT1 keinen Einfluss auf die REDD1 mRNA Expression (Abb. 4.12 C). Dies zeigt, dass die Verringerung der REDD1 mRNA Expression und der REDD1 Protein Expression spezifisch für STAT3 ist, obwohl STAT1 und STAT3 sich strukturell sehr ähnlich sind.

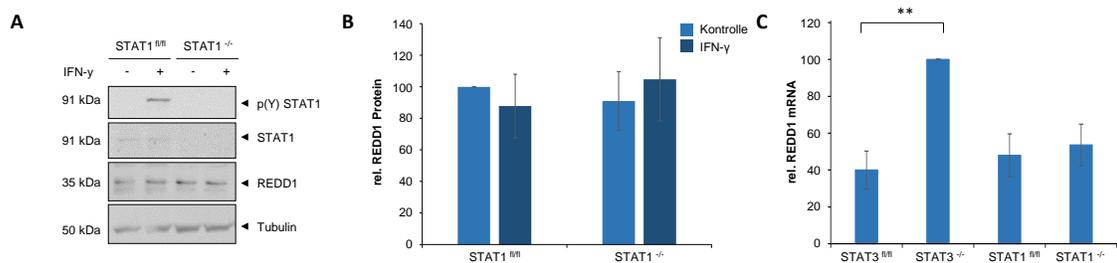


Abb.4.12: STAT1 reduziert die REDD1 Expression nicht. **A)** MEF STAT1^{fl/fl} und MEF STAT1^{-/-} Zellen wurden für 4 h in Hungermedium kultiviert und anschließend mit 10 ng/ml IFN-γ für 15 min stimuliert oder un- behandelt gelassen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immun- detektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen (p)Y STAT1 und STAT1, REDD1 und Tubulin. Die Färbung von Tubulin dient als Ladekontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ist dargestellt. **B)** Quantifizierung der relativen REDD1 Protein Expression aus A). **C)** Gesamt-RNA aus MEF STAT3^{fl/fl}, MEF STAT3^{-/-}, MEF STAT1^{fl/fl} und MEF STAT1^{-/-} Zellen wurde isoliert, in cDNA transkribiert und mittels qRT-PCR quantifiziert. Die maximale mRNA-Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die Daten sind als Mittelwert von n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten ± SD angegeben. Statistik: ANOVA mit **: p < 0.01

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die STAT3-abhängige Reduzierung der REDD1 mRNA Expression eine neue, nicht-kanonische Funktion der STAT-Faktoren ist, die spe- zifisch für STAT3 ist. Die transkriptionelle Reprimierung von REDD1 erweitert die Funkti- onen der STAT Proteine über die klassische, transkriptionelle Aktivierung von Zytokin- Zielgenen hinaus auf eine komplexere Funktion bei der Modulation der Genexpression in der Immunantwort und bei zellulärem Stress.

5. Diskussion

STAT3 wird gemeinhin als wichtigster Transkriptionsfaktor für die Vermittlung der Effekte des Inflammation-assoziierten Zytokins IL-6 betrachtet und agiert in seiner kanonischen Funktion als Aktivator der Transkription. Es sind jedoch auch Beispiele beschrieben, in denen STAT3 die Expression von Zielgenen reduziert. So zeigten Pinno *et al.*, dass Zytokine der IL-6 Familie die Expression des mTOR-Inhibitors REDD1 reduzieren. Die beobachtete Regulation beruht auf einer STAT3-abhängigen Reduzierung der REDD1 mRNA Synthese [80]. REDD1 ist ein gering basal exprimiertes Protein, dessen Expression durch verschiedene Stressoren stark erhöht wird. REDD1 agiert als negativer Regulator der Proteinkinase mTOR, welche hauptsächlich in proliferative, zelluläre Prozesse involviert ist. Eine fehlregulierte REDD1 Expression kann daher die Entstehung von Krankheiten begünstigen. Eine Überexpression von REDD1 führt zu einer Inhibierung der mTOR Aktivität und ist folglich mit der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen assoziiert, wohingegen eine reduzierte REDD1 Expression mit einer konstitutiven mTOR Aktivierung und der daraus resultierenden Entstehung von proliferativen Krankheiten in Zusammenhang steht (zusammengefasst in [111]).

Die STAT3-abhängige Reduzierung der REDD1 mRNA Synthese steht im Gegensatz zu der bekannten kanonischen Funktion von STAT3, die Expression von STAT3-Zielgenen zu induzieren. Bisher gab es keine mechanistischen Erkenntnisse, wie STAT3 die REDD1 Expression reduziert. Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über den molekularen Mechanismus der STAT3-abhängigen Regulation der REDD1 Expression und ermöglicht ein tieferes Verständnis für das Zusammenspiel von inflammatorischen und Stress-induzierten Signalwegen.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass STAT3 IL-6-abhängig an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird und die Aktivität des *DDIT4* Promotors reduziert. Überraschenderweise ist die Bindung von STAT3 an kanonische STAT3-Konsensus Motive für die Reduzierung der REDD1 Expression nicht nötig. Stattdessen hängt die Reduzierung der REDD1 Expression von der N-terminalen Domäne sowie der Tyrosin 705 Phosphorylierung von STAT3 ab. Weiterhin scheint die Reduzierung der REDD1 Expression spezifisch für STAT3

zu sein, da unter den hier gesetzten Bedingungen weder die Expression noch die Aktivierung von STAT1 einen Einfluß auf die REDD1 Expression hat.

5.1 Die Reduzierung der REDD1 Expression durch IL-6 ist konserviert in Mensch und Maus

Die Proteinsequenz von REDD1 ist unter anderem in Menschen und Mäusen hochkonserviert [59]. Sequenzvergleiche des humanen und murinen *DDIT4* Promotors zeigen einen Promotorbereich, der in beiden Spezies zu 81 % überein stimmt (Abb. 5.1).

```

human  -349  GTCACGGGCTGTCCCCTCCTCCAGCAATGCAACCCCTATAATAAACAAGTCTTCCCTTGAT
          |||
murin   -438  GTCACGGGCGTCCCCTCCCAGCAACGCGCCCTATAATAAACAAGTCTTCCCTTGAT

human   -289  CCTCCCCTGCCGAGCGCCCTCGGGGACCTGGCAGCTGC----AGCCGCCGCGGATCC
          |||
murin   -378  CCTCCCCTACCGCGAGCGCCCTCAGGACCTGGCAGCTGCTGAAAGCCGCTCGGATCC

human   -233  -----TTCCAGAAAGGGGCGTGGC-G--G-T--GG-GTC-----GGGGTTCGA
          |||
murin   -318  CTTCCCTTGATTTCCAGAAAGGGGTGTGGCCGAAAGCTAAGGCGAGGGGAGAGGGGTTCGG

human   -195  CTGCGAGCTTCTGCGGCTCAATGGAGGCGGGGCCCGCCGCTGTCACCGGGCAGGAGAG
          |||
murin   -258  CCGGGAGCGTTCTGCGGCTCCGTGGGGGCGGGCCAGGCCGCTGTCACCGAGCAGGAGAG

human   -135  AACGTTGCTTACGTGCGCCCGGAGTCCATTGGCCAAAGGCGGGCCACACTCCCAGGCTGG
          |||
murin   -198  AACGTTGCGAACGTGCGCCCGGTGCCTATTGGCTGAGGTGGGCCACACTCCCAGGCTCG

human    -75  ATTGGGTCGTGGCG-CA--GAGAAGGCGTGGCCTCGCCGCGCTAGTCCTTATAGGCTGCT
          |||
murin   -138  ATTGGG-C-TG-CGACCTGGAGGGGCGTGGCCTCGCCGGGAGAGCCCTTATAGGCTGCT

human    -18  CCGCGCTGGTGTAGGG--CGCAGCAGGCCAAGGGGGAGGTGCGAGCGTGGACCT-GGGA
          |||
murin   -81  GCTCGTGGTGTCTAGGGATCGCAGCAGG-CAGGGGGAGGTGCGAGAGGTTCCAAGGGA

human    +39  CGGGTCTGGGCGGCTCTCGGTGGTTGGCACGGGTTGCGCACCCATTCAAGCGGCAGGAC
          |||
murin   -22  CAGGTCCGGGCAGCGATCGGGGGTTGGCACCAAGTTCGCTCACCC-TTCGAGAGGCAGAGC

human   -99  GCACTTGTCTTAGCAGTTCGCTGACCGCGCTAGCTGGTGAGTGTCCCTTCTGTGTGTG
          |||
murin   +37  GCTCTGTGCC--GCAATCTTCGCTGACCGCGCTAGCTGGTGAGTGTCCCTCCCAGGTTGTG
  
```

Abb. 5.1: Die *DDIT4* Promotoren von Mensch und Maus weisen Sequenzhomologien auf. Sequenzvergleiche des humanen und murinen *DDIT4* Promotors. Identische Nukleotide sind durch vertikale Balken verbunden. Horizontale Balken symbolisieren *gaps*. Zahlen geben die Position relativ zur TSS an.

Des Weiteren ist REDD1 in Menschen und Mäusen an der Regulation von identischen zellulären Prozessen beteiligt. Stevens *et al.* zeigten, dass REDD1 die Expression von pro-

inflammatorischen Zytokinen fördert, sowohl in Herzen adipöser Mäuse als auch in humanen Kardiomyocyten, welche unter hyperglykämischen und hyperlipidämischen Bedingungen kultiviert wurden [68]. Des Weiteren ist die REDD1 Expression erhöht in Lebergewebe von adipösen Mäusen und Patienten mit Adipositas. Die Deletion von *Ddit4* schützt Mäuse vor einer Adipositas-induzierten Zunahme des Lebergewichts und einer hepatischen Steatose [112]. Zusätzlich ist REDD1 an der Entstehung der Diabetis-induzierten Retinopathie in Menschen und Mäusen beteiligt, indem es den kanonischen, proinflammatorischen NF- κ B Signalweg aufrecht erhält [113]. Die REDD1 Expression ist erhöht sowohl in der Retina von diabetischen Mäusen als auch in humanen Gliazellen der Retina, welche unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Deletion von *DDIT4* fördert die Expression des NF- κ B Inhibitors I κ B und reduziert dadurch die Aktivität des NF- κ B Signalweges [113]. Weiterhin spielt REDD1 eine Schlüsselrolle in der Progression der kutanen Atrophie, der häufigsten unerwünschten Nebenwirkung einer Glukokortikoid Behandlung [114]. Glukokortikoide erhöhen die REDD1 Expression [61]. Der *knock-out* von *Ddit4* schützt die Haut von Mäusen vor den atrophischen Effekten einer Behandlung mit Glukokortikoiden ohne die anti-inflammatorischen Effekte von Glukokortikoiden zu beeinflussen. Darüber hinaus führt der *knock-out* von *DDIT4* zu ähnlichen Konsequenzen in primären humanen Keratinozyten [114]. REDD1 führt folglich ähnliche Funktionen in Menschen und Mäusen aus.

Pinno *et al.* zeigten, dass IL-6 die basale REDD1 mRNA und Protein Expression in humanen Zellen reduziert [80]. Die zuvor beschriebenen Homologien bezüglich Proteinesequenz, Promotorsequenz und Funktion von REDD1 in Mensch und Maus werfen die Frage auf, ob IL-6 einen spezifischen Einfluß auf die REDD1 mRNA Expression in humanen Zellen hat oder ob die von Pinno *et al.* beobachtete Reduzierung der REDD1 mRNA Expression spezies-übergreifend ist.

IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression sowohl in humanen (Abb. 4.1 A) als auch in murinen Zellen (Abb. 4.1 B). Folglich scheint die IL-6-induzierte Reduzierung der REDD1 mRNA Expression spezies-übergreifend in Menschen und Mäusen konserviert zu sein.

Somit kann vermutet werden, dass die REDD1 Expression in Menschen und Mäusen über gleiche bzw. ähnliche Mechanismen reguliert wird. Dies ermöglicht Analysen der REDD1 Regulation in beiden Spezies.

5.2 STAT3 hemmt die REDD1 Expression

IL-6 reduziert die Menge an REDD1 mRNA ohne die Stabilität der REDD1 mRNA zu beeinflussen [80]. Dies deutet darauf hin, dass IL-6 die *DDIT4* Transkription reduziert. Des Weiteren ist die IL-6-induzierte Reduzierung der REDD1 mRNA Expression STAT3-abhängig [80]. IL-6 aktiviert den JAK/STAT Signalweg und damit die Expression von STAT3 Zielgenen [32]. Folglich wäre es möglich, dass STAT3 die Expression eines REDD1 Repressors induziert. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die IL-10-induzierte Regulierung von anti-inflammatorischen Signalwegen mittels der Aktivierung von STAT3 beschrieben [115]. IL-10 induziert die STAT3-abhängige Expression des Repressors ETV3 und des co-Repressors SBNO2 in murinen und humanen Macrophagen. ETV3 und SBNO2 reprimieren den *NF- κ B* Promotor und tragen damit vermutlich zu der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-10 bei [115].

IL-6 reduziert die REDD1 mRNA Expression jedoch auch in Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid (Abb. 4.2). Folglich ist für die STAT3-vermittelte Reduzierung der REDD1 mRNA Expression keine Proteinbiosynthese notwendig. STAT3 induziert somit nicht die Expression eines REDD1 Repressors, sondern agiert vermutlich selbst als Repressor der REDD1 mRNA Expression. Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der STAT3-abhängigen Reduzierung der REDD1 mRNA Expression um eine neue, nicht-kanonische Funktion von STAT3 handelt.

5.3 STAT3 wird an den *DDIT4* Promotor rekrutiert und reduziert dessen Aktivität

Da IL-6 nicht die Transkription eines Repressors der REDD1 Expression induziert (Abb. 4.2) könnte die REDD1 mRNA Expression auf Promotorebene reguliert werden. Eine transkriptionelle Regulation von *DDIT4* wurde bereits in verschiedenen Studien be-

schrieben. Tabelle 5.1 liefert eine Übersicht der in der Literatur beschriebenen Transkriptionsfaktoren, welche die Expression der REDD1 mRNA induzieren (Tab. 5.1). Es wird deutlich, dass gleiche Stimuli verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren. Außerdem ist die Regulation der REDD1 mRNA Expression auf Promotorebene spezie-übergreifend.

Tab 5.1: Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen Transkriptionsfaktoren für die Induktion der REDD1 Expression. TF = Transkriptionsfaktor, ROS = *reactive oxygen species*, ER = Endoplasmatisches Reticulum, LPS = Lipopolysaccharid, GR = Glukokortikoid Rezeptor, VDR = Vitamin D Rezeptor, CREB = *cAMP response element-binding protein*

TF	Stimulus	Zelltyp	Organismus	Quelle
ATF4	ROS, ER Stress	HeLa	Mensch	[73]
C/EBP	Arsen, ROS	Keratinocyten	Mensch	[63]
	ROS, ER Stress	HeLa	Mensch	[73]
CREB	LPS	Macrophagen	Maus	[116]
ELK1	Arsen, ROS	Keratinocyten	Mensch	[63]
GR	Glukokortikoide	skeletale Muskelzellen	Ratte	[74]
HIF1- α	Hypoxie	C6 Glioma Zellen	Ratte	[60]
	Insulin	Adipozyten	Mensch + Maus	[117]
HNF-4	Arsen	Keratinocyten	Mensch	[63]
NF- κ B	Vorhersage laut DNA Sequenz		Mensch	[63]
p53	DNA Schäden	MEF	Maus	[59]
VDR	Vitamin D	Osteoblasten	Mensch	[118]

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass STAT3 IL-6-abhängig an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird (Abb. 4.9. A). Darüber hinaus reduziert IL-6 die *DDIT4* Promotoraktivität in STAT3-exprimierenden Zellen, jedoch nicht in STAT3-defizienten Zellen (Abb. 4.7 C, D). Folglich ist STAT3 für die IL-6-induzierte Reduzierung der *DDIT4* Promotoraktivität zwingend notwendig.

Diese Ergebnisse liefern Hinweise, dass STAT3 die REDD1 mRNA Expression auf Transkriptionsebene reduziert. STAT3 könnte an regulatorische Elemente im *DDIT4* Promotor binden und dadurch die Aktivität des *DDIT4* Promotors reduzieren. Es sind bereits Beispiele beschrieben, in denen STAT3 an den Promotor seiner Zielgene rekrutiert wird und die Promotoraktivität reduziert. So bindet STAT3 in Patienten mit latenter Autoimmun-

Diabetes an den Promotor des Transkriptionsfaktors FOXP3, einem Marker für regulatorische T-Zellen, und reduziert die Promotoraktivität und damit die Anzahl an T-Zellen [45]. Makino *et al.* zeigten, dass STAT3 IL-6-abhängig an den *Smad3* Promotor bindet und dessen Aktivität reduziert, was zu einer Resistenz gegen Chemotherapeutika bei Lungenkrebs führt [119]. Des Weiteren wird STAT3 in der Leber von Mäusen an den Promotor des Stress-induzierten Gens *Gadd45b* rekrutiert und reduziert dadurch die *Gadd45b* Genexpression [46].

Zusammengefasst zeigen die bisher gemachten Beobachtungen, dass STAT3 sowohl die Aktivität eines *DDIT4* Promotor-Reporterplasmids als auch die Expression des endogenen *DDIT4* Gens reduziert.

Einem Promotor-Reporterplasmid fehlt der chromosomale Kontext. Die Ergebnisse der Promotor-Reporterassays lassen daher vermuten, dass weder weit vom TSS entfernte DNA Bereiche noch eine intakte Chromatinstruktur für die STAT3-vermittelte Reduzierung der REDD1 Expression nötig ist. Des Weiteren scheint zumindest ein regulatorisches Element für die Reduktion der REDD1 Expression in dem verwendeten *DDIT4* Promotor-Reporterplasmid enthalten zu sein. Es wäre auch möglich, dass STAT3 andere Transkriptionsfaktoren bindet und inhibiert, welche ansonsten aktivierend auf die REDD1 Expression wirken. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für STAT5 beschrieben [120]. STAT5 bildet einen Komplex mit dem Glukokortikoid Rezeptor (GR). Diese Komplexbildung zwischen STAT5 und dem GR vermindert die Glukokortikoid Antwort eines GRE-haltigen Promotors [120].

STAT3 bindet die palindromische Konsensus Sequenz TTCnnnGAA (Abb. 4.8 A, [5]). Genomweite ChIP-*Sequencing* Daten von Hardee *et al.* lieferten erstmals einen Hinweis für eine putative STAT3 Bindestelle im humanen *DDIT4* Promotor [75], was für eine potentielle Rekrutierung von STAT3 an den *DDIT4* Promotor spricht. ChIP Analysen zeigen eine IL-6-abhängige Rekrutierung von STAT3 an den *DDIT4* Promotor (Abb. 4.9 A). In diesem Promotorbereich befindet sich die putative STAT3 BS 2 (Abb. 4.9 A, B). Es wäre folglich möglich, dass STAT3 direkt an eine kanonische STAT3 Konsensus Sequenz im *DDIT4* Promotor bindet und durch die Rekrutierung von DNA-modifizierenden Proteinen die Promotoraktivität reduziert. Es ist schon länger bekannt, dass STAT3 mit DNMT1 interagiert,

was zu einer Hypermethylierung und nachfolgend zu einer Inaktivierung der Promotoren von STAT3 Zielgenen führt (zusammengefasst in [121]).

Zusammenfassend liefern die Analyse der ChIP Daten sowie die Ergebnisse der Reporterassays drei mögliche Mechanismen für die STAT3-vermittelte Reduzierung der REDD1 mRNA Expression:

1. STAT3 bindet direkt an negativ regulatorische *DDIT4* Promotorelemente oder es bindet und blockiert positiv regulatorische Promotorelemente
2. STAT3 bindet und inhibiert Transkriptionsfaktoren, die aktivierend auf die REDD1 mRNA Expression wirken
3. STAT3 bindet *DDIT4* Promotorelemente und rekrutiert DNA-modifizierende Proteine, welche die Transkription inhibieren

Um die molekularen Mechanismen STAT3-vermittelten Reduzierung der REDD1 mRNA Expression zu verstehen und um die funktionellen Domänen von STAT3 zu benennen, die in der Regulation der REDD1 Expression involviert sind, wurden STAT3-defiziente MEF Zellen mit verschiedenen, mutierten Formen von STAT3 stabil rekonstituiert und die REDD1 Expression in diesen Zellen analysiert.

5.4 Die Bedeutung der DBD und der NTD von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression

STAT3 ist modular aufgebaut und besteht aus sechs distinkten Domänen (Abb. 2.1) (zusammengefasst in [4]). Die DBD innerhalb von STAT3 ist essentiell für die Bindung von STAT3 an die kanonische STAT3 Bindestelle in den Promotoren von STAT3 Zielgenen [28]. Obwohl STAT3 an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird (Abb. 4.9 A), reduziert STAT3 überraschenderweise die REDD1 Expression selbst dann noch, wenn die DBD innerhalb von STAT3 mutiert ist (Abb. 4.10 F-H). Dieses Ergebnis spricht eindeutig gegen eine direkte Bindung von STAT3 an kanonische STAT3 Konsensus Sequenzen im *DDIT4* Promotor. Für die Reduzierung der REDD1 Expression durch STAT3 trotz mutierter DBD wären zwei mögliche Szenarien denkbar. STAT3 könnte die *DDIT4* Promotoraktivität durch indirektes

Binden an den *DDIT4* Promotor, z. B. über aktivierende Transkriptionsfaktoren, reduzieren. Alternativ könnte STAT3 auch an unkonventionelle Bindestellen im *DDIT4* Promotor rekrutiert werden.

Die Expression der REDD1 mRNA wird unter anderem auf Transkriptionsebene reguliert (Tab 5.1). Es wäre folglich möglich, dass STAT3 an aktivierende Transkriptionsfaktoren bindet und dadurch ihre Aktivität inhibiert. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für die STAT3-abhängige Inhibierung der *iNos* Transkription beschrieben [47]. In murinen Nierenzellen, welche mit IL-1 β oder Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert werden, induziert der Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 die Transkription des *iNos* Gens. STAT3, welches durch IL-1 β und LPS ebenfalls aktiviert wird, bindet und folglich inhibiert NF- κ B p65, wodurch die *iNos* Transkription reduziert wird [47]. Gegen die Hypothese einer STAT3-vermittelten Hemmung von Transkriptionsfaktoren, welche die REDD1 mRNA Expression induzieren spricht jedoch die Tatsache, dass viele verschiedene Transkriptionsfaktoren die REDD1 Expression induzieren und STAT3 vermutlich nicht alle binden kann. IL-6 reduziert die REDD1 Expression in HepG2 Zellen, welche mit ionisierender Strahlung, Insulin, dem Topoisomerase-Inhibitor Camptotecin oder dem Glukokortikoid-Derivat Dexamethason gestresst wurden [80]. Folglich reduziert IL-6 die REDD1 Expression unabhängig davon, durch welchen Stimulus die REDD1 Expression induziert wurde. Außerdem erhöht bereits der *knock-out* von STAT3 (Abb. 4.3 C, D) sowie die pharmakologische Inhibierung der Phosphorylierung von STAT3 [80] die basale REDD1 Expression. Es ist also eher unwahrscheinlich, dass die Reduzierung der REDD1 Expression auf eine Interaktion von STAT3 mit anderen, aktivierenden Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist.

Die bisher präsentierten Ergebnisse zeigen, dass eine direkte Bindung von STAT3 an konventionelle Konsensus Motive vermutlich nicht für die STAT3-vermittelte Reduzierung der REDD1 Expression verantwortlich ist. Des Weiteren erscheint es eher unwahrscheinlich, dass STAT3 die *DDIT4* Promotoraktivität über die Bindung und Inhibierung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren reduziert.

Stattdessen könnte STAT3 an unkonventionelle Bindestellen im *DDIT4* Promotor binden und DNA-modifizierende Proteine, wie z. B. DNMT1, an den *DDIT4* Promotor rekrutieren und somit die REDD1 Expression reduzieren. Xu *et al.* zeigten mittels CHIP Analysen in

HepG2 Zellen, dass ca. 20 % der von STAT3 gebundenen DNA Bereiche die nicht-kanonische Konsensus Sequenz AGGnnnAGG enthalten [122]. Überraschenderweise hatte eine Mutation der DBD von STAT3 keinen Einfluss auf die Bindung von STAT3 an AGG-Promotorelemente. Stattdessen beobachteten Xu *et al.*, dass die NTD von STAT3 essentiell für die Bindung an diese nicht-kanonische Konsensus Sequenz [122]. Das *DDIT4* Gen enthält die sich überlappenden Sequenzen AGGccaAGG (+6/+14) und AGGgggAGG (+12/+20) in unmittelbarer Nähe zur TSS (Abb. 5.3 C). Dieser DNA Bereich ist auch in dem für Reporterassays verwendeten *DDIT4* Promotor-Reporter-Konstrukt enthalten. Folglich wäre es möglich, dass STAT3 mittels seiner NTD an diese nicht-konventionellen Konsensus Sequenzen bindet und die REDD Expression reduziert. Zu dieser Vermutung passend ist die NTD von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression essentiell (Abb. 4.11 F-H). Die NTD von STAT3 interagiert mit p300, wodurch die in der NTD lokalisierten Lysin-Reste K49 und K87 acetyliert werden, was wiederum eine stabile STAT3-Dimerbildung unterstützt [23]. p300 acetyliert STAT3 auch an K685 [123]. Lee *et al.* zeigten, dass diese Acetylierung essentiell für die Interaktion von STAT3 mit DNMT1 ist [124]. DNMT1 überträgt Methylgruppen auf Cytosin, wodurch sich Methyl-bindende Proteine an die DNA anlagern und die Bindung der RNA Polymerase II an Promotoren erschwert bzw. verhindert wird. DNA Methylierung tritt verstärkt an CpG-reichen DNA Bereichen auf, auch CpG-Inseln genannt (zusammengefasst in [125]). Der *DDIT4* Promotor enthält zwei CpG-Inseln (Abb. 5.3 A, B). Der *DDIT4* Promotorbereich, welcher die unkonventionellen Konsensus Sequenzen AGGccaAGG und AGGgggAGG enthält, ist in einer dieser CpG-Inseln lokalisiert (Abb. 5.3 B, C). Es sind bereits Beispiele beschrieben, in denen STAT3 die Expression von Zielgenen durch Rekrutierung von DNMT1 reduziert: STAT3 rekrutiert DNMT1 an den *FOXP3* Promotor, was zu einer Hypermethylierung des Promotors und nachfolgend zu einer Inhibierung der *FOXP3* Expression führt [45]. Zhang *et al.* zeigten, dass STAT3 die Rekrutierung von DNMT1 an den *PTPN6* Promotor vermittelt und dadurch die SHP-1 Expression reduziert [44]. Des Weiteren bildet STAT3 in Patienten mit Kaposi's Sarcoma einen Komplex mit DNMT1, welcher an den *CAV1* Promotor bindet und diesen methyliert, wodurch die *CAV1* Expression unterdrückt wird [126].

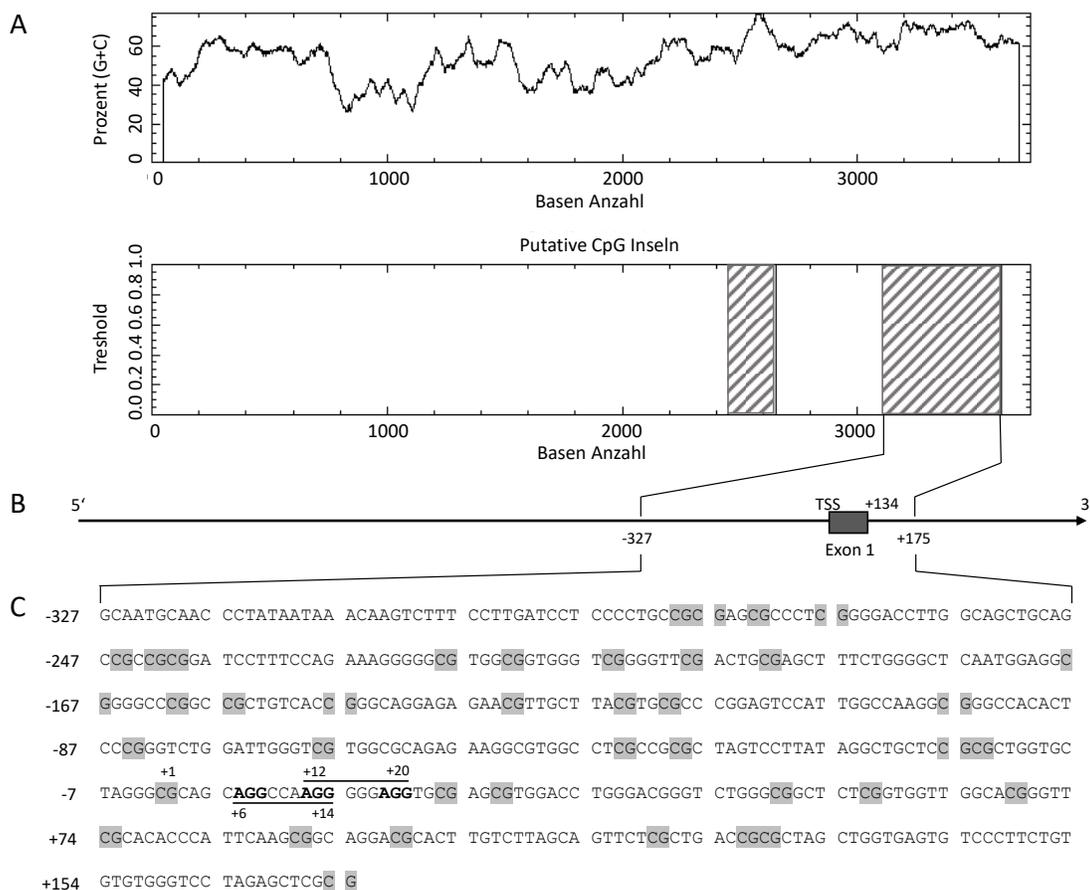


Abb. 5.3 Der humane *DDIT4* Promotor enthält unkonventionelle STAT3 Bindemotive und CpG-Inseln. A) Identifizierung von CpG-Inseln im humanen *DDIT4* Promotor mittels EMBOSS CpGPlot (Einstellungen: beobachtete/erwartete Ratio > 0,6; Prozent (C + G) > 50,0; Länge > 200 bp). Die zwei identifizierten CpG Inseln sind grau schraffiert. **B)** Struktur des analysierten Promotorbereichs. Schwarze Box = Exon 1, TSS = Transkriptionsstartstelle. **C)** Nukleotidsequenz einer CpG-Insel. Unkonventionelle, sich überlappende STAT3 Bindestellen sind unterstrichen. Nicht-variable Nukleotide der unkonventionellen Bindestellen sind fett markiert. Die einzelnen CpG-Stellen sind grau hinterlegt. Zahlen geben die Position relativ zur TSS an.

Zusammenfassend wäre es somit möglich, dass STAT3 mittels seiner NTD an die unkonventionelle Konsensus Sequenz AGGnnnAGG im *DDIT4* Promotor bindet und DNMT1 an die CpG-Insel im *DDIT4* Promotor rekrutiert. DNMT1 könnte daraufhin den *DDIT4* Promotor hypermethylieren, wodurch die Transkription der *REDD1* mRNA inhibiert wird, was letztendlich zu einer Reduzierung der *REDD1* Expression führen würde. Diese Vermutung ist rein hypothetisch und bedarf weiterer Untersuchungen wie beispielsweise einer Bisulfit Sequenzierung des *DDIT4* Promotorbereichs zur Bestimmung des Methylierungsstatus [127].

5.5 Die Bedeutung der Schlüssel-Phosphorylierungsstellen Y705 und S727 von STAT3 für die Reduzierung der REDD1 Expression

Das konservierte Y705 ist eine Schlüssel-Phosphorylierungsstelle für die STAT3 Aktivierung. Die Reduzierung der REDD1 mRNA und Protein Expression hängt maßgeblich von Y705 in STAT3 ab (Abb. 4.4 F-H). Während der kanonischen STAT3 Aktivierung induzieren Zytokine die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 durch Rezeptor-assoziierte JAKs. Y705-phosphorylierte STAT3 Faktoren dimerisieren, translozieren in den Zellkern und binden an regulatorische Elemente im Promotorbereich ihrer Zielgene (zusammengefasst in [32]). Da Phenylalanin nicht phosphoryliert werden kann repräsentiert STAT3 Y705F unphosphoryliertes STAT3. Würde uSTAT3 die REDD1 Expression reduzieren, müsste STAT3 Y705F die REDD1 Expression ebenfalls reduzieren. Dies ist jedoch nicht der Fall (Abb. 4.4 F-H). Obwohl Beispiele für eine transrepressive Wirkung von uSTAT3 beschrieben sind [41, 49, 50], trifft dies nicht auf die hier beschriebene STAT3-abhängige Reduzierung der REDD1 Expression zu. Da der *knock-out* von STAT3 (Abb. 4.3 C, D) sowie die pharmakologische Inhibierung von STAT3 [80] ausreicht, um die REDD1 Expression zu erhöhen, lag der Focus dieser Arbeit auf der Regulation der basalen REDD1 Expression. Es erscheint zunächst widersprüchlich, dass die Phosphorylierungsstelle Y705 in unstimulierten Zellen die basale REDD1 Expression reguliert. Jedoch wird STAT3 Zytokin-unabhängig, gering basal phosphoryliert [128]. In Übereinstimmung mit Dittrich *et al.* konnte auch in dieser Arbeit zumindest teilweise eine Zytokin-unabhängige Phosphorylierung von STAT3 gezeigt werden (Abb. 4.3 A bis 4.6 A). Es wäre folglich möglich, dass die geringe, basale Phosphorylierung von STAT3 Y705 bereits ausreicht, um die REDD1 Expression zu reduzieren.

Die zweite Schlüssel-Phosphorylierungsstelle S727 wird als Modulator der transkriptionellen Aktivität von STAT3 betrachtet. Serin 727-phosphoryliertes STAT3 fördert beispielsweise die Tumorentwicklung in einem Mausmodell für Magenkrebs, indem es die Aktivität der RNA-Polymerase II erhöht [129]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung fördert (p)S STAT3 die Entwicklung von *Helicobacter*-induzierter Gastritis durch Er-

höhung der transkriptionellen Aktivität von STAT3 [130]. Des Weiteren ist (p)S STAT3 erforderlich für die *Toll-like Receptor 4*-induzierte metabolische Reprogrammierung von Immunzellen und der Entwicklung von Entzündungen nach Exposition zu LPS [131]. Zusätzlich scheint die Phosphorylierung von Serin 727 obligatorisch zu sein für die Pathogenese von KRAS-Mutant-induziertem Lungenkrebs [132].

Die Mutation von S727 zu A727 von STAT3 hat jedoch keinen Einfluss auf die Regulation der REDD1 Expression (Abb. 4.5 F-H). Folglich ist Serin 727 nicht an der STAT3-abhängigen Regulation der REDD1 Expression beteiligt.

5.6 Die Reduzierung der REDD1 Expression ist spezifisch für STAT3

Die STAT Proteinfamilie besteht aus sieben Mitgliedern, wobei STAT3 und STAT1 die größten Sequenzhomologien aufweisen. Es wurde außerdem gezeigt, dass STAT3 und STAT1 Heterodimere bilden (zusammengefasst in [12]). Obwohl sich STAT3 und STAT1 sehr ähnlich sind, wird die REDD1 mRNA und REDD1 Protein Expression durch STAT1 nicht reguliert (Abb. 4.12 A-C). Folglich ist die Reduzierung der REDD1 Expression in den hier analysierten STAT Familienmitgliedern spezifisch für STAT3. Dies könnte mit unterschiedlichen Proteinsequenzen der N-terminalen Domänen von STAT1 und STAT3 erklärt werden. Die NTD von STAT3 ist essentiell für die Reduzierung der REDD1 Expression (Abb. 4.11 F-H). Die NTD von STAT1 stimmt jedoch nur zu 54 % mit der NTD von STAT3 überein (Abb. 5.2).

STAT1	1	MSQWFE	LEQLD	SKF	LEQV	HQLY	DSFP	MEI	IRQY	LAQW	LEK	QDWE	HAA	YDV	SF	ATIR	FHDL	60																																										
STAT3	1	MAQWN	LEQLD	TRY	LEQL	HQLY	DSFP	MEI	RQ	FLAP	WIE	SQ	DWAY	AAS	KE	SH	ATLV	FHNL	60																																									
STAT1	61	ISQL	DD	QYS	R	SL	EN	FL	QHN	I	R	K	S	K	R	N	L	Q	DN	FQ	ED	P	V	Q	M	S	M	I	I	Y	N	C	L	K	E	E	R	K	I	L	E	N	A	119																
STAT3	61	IG	E	I	D	Q	Q	Y	S	R	F	L	Q	E	S	N	V	L	Y	Q	H	N	L	R	R	I	K	Q	F	L	Q	S	R	Y	L	E	K	P	M	E	I	A	R	I	V	A	R	C	L	W	E	E	S	R	L	L	Q	T	A	119

Abb. 5.2: Die Proteinsequenzen der N-terminalen Domänen von murinem STAT1 und STAT3. Sequenzvergleiche der murinen STAT1 (NP_001192242.1) und murinen STAT3 (NP_998824.1) NTD Proteinsequenz. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt. Zahlen geben die Position der Aminosäuren an.

Es wäre folglich möglich, dass die Unterschiede in den Proteinsequenzen der N-terminalen Domänen von STAT1 und STAT3 zumindest teilweise für die Spezifität der STAT3-vermittelten Reduzierung der REDD1 Expression verantwortlich sind.

5.7 Die physiologischen Konsequenzen einer IL-6-vermittelten Reduzierung der REDD1 Expression

Die Repression der *DDIT4* Genexpression durch STAT3 stellt eine bis dato unbekannte, nicht-kanonische Funktion von STAT3 dar. Dieser Mechanismus könnte ein Zusammenspiel von inflammatorischen und Stress-induzierten Signalwegen widerspiegeln. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass chronische Entzündungen eine treibende Kraft in der Karzinogenese sind (zusammengefasst in [133]). Bei einer Entzündung wird vermehrt IL-6 ausgeschüttet, was zu einer erhöhten bzw. verlängerten Aktivierung von STAT3 führt. Eine fehlregulierte und/oder persistente Aktivierung von STAT3 ist ein Kennzeichen vieler Tumore und gilt als zentraler proliferativer Faktor in der Karzinogenese (zusammengefasst in [134]). Unter zellulären Stressbedingungen wird die Expression von REDD1 induziert. REDD1 hemmt mTORC1, was zu einer Reduzierung der Translationsrate und der Proliferation führt. Die dadurch eingesparte Energie ermöglicht den Zellen Reparaturmechanismen in Gang zu setzen und die Folgen der Stresssituation zu bewältigen (zusammengefasst in [99]). Treten nun zellulärer Stress und Entzündungsreaktionen gleichzeitig auf, könnte die hier beschriebene Reduzierung der REDD1 Expression durch STAT3 die zelluläre Stressantwort beeinträchtigen und wichtige zelluläre Reparaturmechanismen blockieren. Die Blockade von zellulären Reparaturmechanismen könnte wiederum zur Karzinogenese beitragen, da geschädigte Zellen weiter proliferieren würden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist eine reduzierte REDD1 Expression mit der Entwicklung von Brustkrebs [65] und Leberkrebs [78] assoziiert. Zusätzlich verstärkt eine reduzierte REDD1 Expression die Invasivität von Lungenkrebs [135]. Zu diesen Beobachtungen passt, dass die REDD1 Expression während einer Chemotherapie erhöht ist [136, 137].

Die Reduzierung der REDD1 Expression durch STAT3 könnte folglich zur Entwicklung von proliferativen Erkrankungen unter Entzündungs- und Stressbedingungen beitragen und spiegelt möglicherweise eine neue Facette des onkogenen Potenzials von STAT3 wider.

6. Ausblick

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnissen über die molekularen Mechanismen der STAT3-abhängigen Reduzierung der Expression des mTOR-Inhibitors REDD1 ergeben sich zusätzliche interessante Fragestellungen, die in weiteren Versuchen adressiert werden müssen.

6.1 Welchen Einfluss hat IL-6 auf den Methylierungsstatus des *DDIT4* Promotors?

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IL-6 die Aktivität des *DDIT4* Promotors STAT3-abhängig reduziert (Abb. 4.7 C, D). Eine Reduzierung der Promotoraktivität steht im Allgemeinen im Zusammenhang mit einer Hypermethylierung von CpG-reichen DNA Bereichen durch DNMTs (zusammengefasst in [125]). Es sind mehrere Beispiele beschrieben, in denen STAT3 die Expression von Zielgenen durch Rekrutierung von DNMT1 reduziert [44, 45, 126]. Im *DDIT4* Promotor wurden zwei CpG-Inseln identifiziert (Abb. 5.3). Um Hinweise auf eine IL-6-induzierte epigenetische Regulierung des *DDIT4* Promotors zu liefern sollte der Methylierungsstatus dieser CpG-Inseln vor bzw. nach der Stimulation der Zellen mit IL-6 verglichen werden.

6.2 Wird DNMT1 an den *DDIT4* Promotor rekrutiert?

STAT3 CHIP Analysen haben gezeigt, dass STAT3 IL-6-abhängig an den *DDIT4* Promotor rekrutiert wird (Abb. 4.9 A). Sollte die Analyse des *DDIT4* Promotors eine Hypermethylierung der CpG-Inseln bestätigen müsste im nächsten Schritt die potentielle Rekrutierung von DNMT1 an den *DDIT4* Promotors untersucht werden. Außerdem muss eine potentielle Interaktion von STAT3 und DNMT1 nachgewiesen werden. Um zu bestätigen, dass die REDD1 mRNA Expression durch die Rekrutierung von DNMT1 an den *DDIT4* Promotor reduziert wird muss die REDD1 mRNA Expression in DNMT1 *knock-out* Zellen und DNMT1 exprimierenden Zellen verglichen werden. Sollte DNMT1 an der epigenetischen Regulierung der REDD1 mRNA Expression beteiligt sein müsste die REDD1 mRNA Expres-

sion in DNMT1 *knock-out* Zellen höher sein als in DNMT1 exprimierenden Zellen. Alternativ kann auch der Einfluss einer pharmakologischen Inhibition von DNMT1 auf die REDD1 mRNA Expression untersucht werden.

6.3 Ist die Bindung von STAT3 an unkonventionelle Konsensus Motive im *DDIT4* Promotor verantwortlich für die Reduzierung der REDD1 mRNA Expression?

Für die Reduzierung der REDD1 Expression ist keine Bindung von STAT3 an kanonische STAT3 Konsensus Motive (TTCnnnGAA) nötig (Abb. 4.10 F-H). Jedoch bindet STAT3 auch an die unkonventionelle Konsensus Sequenz AGGnnnAGG [122], welche an zwei Stellen im *DDIT4* Promotor identifiziert wurde (Abb. 5.3 C). Um eine Kausalität zwischen einer möglichen Bindung von STAT3 an diese unkonventionellen Konsensus Sequenzen und der Reduzierung der REDD1 Expression aufzuzeigen müssen im nächsten Schritt die unkonventionellen STAT3 Bindestellen im endogenen *DDIT4* Promotor mutiert werden und im Anschluss der Einfluss der Mutation auf die REDD1 Expression untersucht werden. Sollte STAT3 die REDD1 Expression durch direktes Binden an diese unkonventionellen Bindestellen reduzieren, würde die Mutation dieser Bindestellen in einem Anstieg der REDD1 mRNA Expression ähnlich dem Anstieg in STAT3-defizienten Zellen resultieren.

6.4 Benötigt STAT3 weitere Interaktionspartner für die Reduzierung der REDD1 Expression?

Die N-terminale Domäne von STAT3 vermittelt neben der Bindung von STAT3 an unkonventionelle Bindemotive auch die Interaktion mit STAT-Monomeren, Co-Faktoren und anderen Proteinen [23, 25, 26]. Für die Reduzierung der REDD1 Expression ist die NTD von STAT3 zwingend notwendig (Abb. 4.11 F-H). Es ist daher interessant zu untersuchen, ob STAT3 mit anderen Proteinen interagiert, um die REDD1 Expression zu reduzieren. Mittels Interaktionsassays werden Interaktionspartner von STAT3 WT und von STAT3 Varianten, welche die REDD1 Expression nicht reduzieren (STAT3 dN, STAT3 Y705F), markiert und nachfolgend analysiert.

Es wird erwartet, dass STAT3-Interaktionspartner, welche an der Reduzierung der REDD1 Expression beteiligt sind, nur mit STAT3 WT interagieren. Die aussichtsreichsten Interaktionspartner werden durch weitere Untersuchungen validiert. Um zu bestätigen, dass die identifizierten und validierten STAT3-Interaktionspartner tatsächlich in der Reduzierung der REDD1 Expression involviert sind, sollten *knock-out* Zelllinien für diese Kandidaten generiert und die REDD1 Expression in diesen *knock-out* Zelllinien analysiert werden.

6.5 Wie trägt die IL-6-induzierte Reduzierung der REDD1 Expression zur Insulinresistenz bei Diabetes bei?

In Abwesenheit von Insulin inhibiert mTORC1 die Insulin Signalkaskade. Die Insulin-induzierte Expression von REDD1 verhindert die Aktivierung von mTORC1 und hebt damit die basale Blockade der Insulin Signalkaskade auf. Hypothetisch könnte die IL-6-induzierte Reduzierung der REDD1 Expression, die in einer Reaktivierung von mTORC1 resultiert, zur Blockade der Insulin Signalkaskade führen, was wiederum ein Kennzeichen für Diabetes-induzierte Insulin Resistenz ist. Es wäre daher interessant zu untersuchen, in welchem Ausmaß die IL-6-induzierte Reduzierung der REDD1 Expression zu einer Insulin Resistenz beiträgt. Bisher wurde die Expression des IL-6-Zielgens *SOCS3* für die IL-6-abhängige Insulinresistenz verantwortlich gemacht. Im nächsten Schritt könnte analysiert werden, inwieweit die IL-6-vermittelte Reduzierung des Insulin Signalweges unabhängig von *SOCS3*, aber abhängig von REDD1 ist. Dafür würden die Insulin- und Insulin-plus-IL-6-induzierte Signalkaskade in Wildtyp- und *SOCS3*-defizienten Zellen verglichen werden. Es wäre möglich, dass IL-6 den Insulin Signalweg auch in Abwesenheit von *SOCS3* unterdrückt. Als nächstes könnte exogenes REDD1 in *SOCS3*-defizienten Zellen exprimiert werden. Sollte REDD1 an der Entstehung der IL-6-induzierten Insulinresistenz beteiligt sein, würde die Expression von exogenem REDD1 die mTOR-abhängige, nicht aber die *SOCS3*-abhängige Insulinresistenz blockieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D. Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1283:1–16. doi:10.1007/978-981-15-8104-5_1.
2. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 2001;293:1068–70. doi:10.1126/science.1063852.
3. Weidemüller P, Kholmatov M, Petsalaki E, Zaugg JB. Transcription factors: Bridge between cell signaling and gene regulation. *Proteomics.* 2021;21:e2000034. doi:10.1002/pmic.202000034.
4. Awasthi N, Liongue C, Ward AC. STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer. *J Hematol Oncol.* 2021;14:198. doi:10.1186/s13045-021-01214-y.
5. Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell.* 1994;76:821–8. doi:10.1016/0092-8674(94)90357-3.
6. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 1994;264:95–8. doi:10.1126/science.8140422.
7. Yamamoto K, Quelle FW, Thierfelder WE, Kreider BL, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Silvennoinen O, Ihle JN. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 1994. doi:10.1128/mcb.14.7.4342-4349.1994.
8. Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. 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.* 1995;92:8831–5. doi:10.1073/pnas.92.19.8831.
9. Quelle FW, Shimoda K, Thierfelder W, Fischer C, Kim A, Ruben SM, Cleveland JL, Pierce JH, Keegan AD, Nelms K. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat pro-

- teins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 1995;15:3336–43. doi:10.1128/MCB.15.6.3336.
10. Meyer T, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem*. 2004;271:4606–12. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04423.x.
 11. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst*. 2006;2:536–50. doi:10.1039/b606246f.
 12. Philips RL, Wang Y, Cheon H, Kanno Y, Gadina M, Sartorelli V, Horvath CM, Darnell JE, Stark GR, O'Shea JJ. The JAK-STAT pathway at 30: Much learned, much more to do. *Cell*. 2022;185:3857–76. doi:10.1016/j.cell.2022.09.023.
 13. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:798–809. doi:10.1038/nrc2734.
 14. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*. 1994;77:63–71. doi:10.1016/0092-8674(94)90235-6.
 15. Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*. 1994;263:89–92.
 16. Liska O, Bohár B, Hidas A, Korcsmáros T, Papp B, Fazekas D, Ari E. TFLink: an integrated gateway to access transcription factor-target gene interactions for multiple species. *Database (Oxford)* 2022. doi:10.1093/database/baac083.
 17. Levy DE, Lee C. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002;109:1143–8. doi:10.1172/JCI15650.
 18. Takemoto S, Ushijima K, Kawano K, Yamaguchi T, Terada A, Fujiyoshi N, Nishio S, Tsuda N, Ijichi M, Kakuma T, Kage M, Hori D, Kamura T. Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2009;101:967–72. doi:10.1038/sj.bjc.6605212.

19. You Z, Xu D, Ji J, Guo W, Zhu W, He J. JAK/STAT signal pathway activation promotes progression and survival of human oesophageal squamous cell carcinoma. *Clin Transl Oncol.* 2012;14:143–9. doi:10.1007/s12094-012-0774-6.
20. Huang X, Meng B, Iqbal J, Ding BB, Perry AM, Cao W, Smith LM, Bi C, Jiang C, Greiner TC, Weisenburger DD, Rimsza L, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Campo E, Braziel RM, Gascoyne RD, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Armitage JO, Vose JM, Staudt LM, McKeithan TW, Chan WC, Ye BH, Fu K. Activation of the STAT3 signaling pathway is associated with poor survival in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol.* 2013;31:4520–8. doi:10.1200/JCO.2012.45.6004.
21. Kim D-Y, Cha S-T, Ahn D-H, Kang H-Y, Kwon C-I, Ko K-H, Hwang S-G, Park P-W, Rim K-S, Hong S-P. STAT3 expression in gastric cancer indicates a poor prognosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:646–51. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05671.x.
22. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3801–4.
23. Ray S, Boldogh I, Brasier AR. STAT3 NH2-terminal acetylation is activated by the hepatic acute-phase response and required for IL-6 induction of angiotensinogen. *Gastroenterology.* 2005;129:1616–32. doi:10.1053/j.gastro.2005.07.055.
24. Martincuks A, Fahrenkamp D, Haan S, Herrmann A, Küster A, Müller-Newen G. Dissecting functions of the N-terminal domain and GAS-site recognition in STAT3 nuclear trafficking. *Cell Signal.* 2016;28:810–25. doi:10.1016/j.cellsig.2016.03.011.
25. Zhang X, Darnell JE. Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the alpha 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem.* 2001;276:33576–81. doi:10.1074/jbc.M104978200.
26. Hu T, Yeh JE, Pinello L, Jacob J, Chakravarthy S, Yuan G-C, Chopra R, Frank DA. Impact of the N-Terminal Domain of STAT3 in STAT3-Dependent Transcriptional Activity. *Molecular and Cellular Biology.* 2015;35:3284–300. doi:10.1128/MCB.00060-15.

27. Zhang T, Kee WH, Seow KT, Fung W, Cao X. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7132–9. doi:10.1128/MCB.20.19.7132-7139.2000.
28. Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Darnell JE, Stein RB, Rosen J. Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92:3041–5. doi:10.1073/pnas.92.7.3041.
29. Becker S, Groner B, Müller CW. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature.* 1998;394:145–51. doi:10.1038/28101.
30. Mertens C, Haripal B, Klinge S, Darnell JE. Mutations in the linker domain affect phospho-STAT3 function and suggest targets for interrupting STAT3 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112:14811–6. doi:10.1073/pnas.1515876112.
31. Schindler C, Darnell JE. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:621–51. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.003201.
32. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26:475–87. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.004.
33. Eulendorf R, Dittrich A, Khouri C, Müller PJ, Mütze B, Wolf A, Schaper F. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol.* 2012;91:486–95. doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.010.
34. Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 1993;23:473–80. doi:10.1002/eji.1830230226.
35. Müller-Newen G, Köhne C, Keul R, Hemmann U, Müller-Esterl W, Wijdenes J, Brakenhoff JP, Hart MH, Heinrich PC. Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem.* 1996;236:837–42. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00837.x.

36. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878–88. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
37. Boulanger MJ, Chow D, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*. 2003;300:2101–4. doi:10.1126/science.1083901.
38. Minamoto S, Ikegame K, Ueno K, Narazaki M, Naka T, Yamamoto H, Matsumoto T, Saito H, Hosoe S, Kishimoto T. Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237:79–83. doi:10.1006/bbrc.1997.7080.
39. Novak U, Ji H, Kanagasundaram V, Simpson R, Paradiso L. STAT3 forms stable homodimers in the presence of divalent cations prior to activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247:558–63. doi:10.1006/bbrc.1998.8829.
40. Yue H, Li W, Desnoyer R, Karnik SS. Role of nuclear unphosphorylated STAT3 in angiotensin II type 1 receptor-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2010;85:90–9. doi:10.1093/cvr/cvp285.
41. Dutta P, Zhang L, Zhang H, Peng Q, Montgrain PR, Wang Y, Song Y, Li J, Li WX. Unphosphorylated STAT3 in heterochromatin formation and tumor suppression in lung cancer. *BMC Cancer*. 2020;20:145. doi:10.1186/s12885-020-6649-2.
42. Ramadoss P, Unger-Smith NE, Lam FS, Hollenberg AN. STAT3 targets the regulatory regions of gluconeogenic genes in vivo. *Mol Endocrinol*. 2009;23:827–37. doi:10.1210/me.2008-0264.
43. Huang L, Hu B, Ni J, Wu J, Jiang W, Chen C, Yang L, Zeng Y, Wan R, Hu G, Wang X. Transcriptional repression of SOCS3 mediated by IL-6/STAT3 signaling via DNMT1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:27. doi:10.1186/s13046-016-0301-7.
44. Zhang Q, Wang HY, Marzec M, Raghunath PN, Nagasawa T, Wasik MA. STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:6948–53. doi:10.1073/pnas.0501959102.

45. Hou C, Zhong Y, Wang Z, Ming Z, Huang G, Ouyang L, Li Y, Lu Q, Zhou Z. STAT3-mediated epigenetic silencing of FOXP3 in LADA T cells is regulated through HDAC5 and DNMT1. *Clin Immunol.* 2018;191:116–25. doi:10.1016/j.clim.2017.12.001.
46. Kim J-H, Qu A, Reddy JK, Gao B, Gonzalez FJ. Hepatic oxidative stress activates the Gadd45b gene by way of degradation of the transcriptional repressor STAT3. *Hepatology.* 2014;59:695–704. doi:10.1002/hep.26683.
47. Yu Z, Zhang W, Kone BC. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *Biochem J.* 2002;367:97–105. doi:10.1042/BJ20020588.
48. Timofeeva OA, Chasovskikh S, Lonskaya I, Tarasova NI, Khavrutskii L, Tarasov SG, Zhang X, Korostyshevskiy VR, Cheema A, Zhang L, Dakshanamurthy S, Brown ML, Dritschilo A. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *J Biol Chem.* 2012;287:14192–200. doi:10.1074/jbc.M111.323899.
49. Timofeeva OA, Tarasova NI, Zhang X, Chasovskikh S, Cheema AK, Wang H, Brown ML, Dritschilo A. STAT3 suppresses transcription of proapoptotic genes in cancer cells with the involvement of its N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:1267–72. doi:10.1073/pnas.1211805110.
50. Peña G, Cai B, Liu J, van der Zanden EP, Deitch EA, Jonge WJ de, Ulloa L. Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. *Eur J Immunol.* 2010;40:2580–9. doi:10.1002/eji.201040540.
51. Stephanou A, Latchman DS. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors.* 2005;23:177–82. doi:10.1080/08977190500178745.
52. Regis G, Pensa S, Boselli D, Novelli F, Poli V. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19:351–9. doi:10.1016/j.semcdb.2008.06.004.
53. Avalle L, Pensa S, Regis G, Novelli F, Poli V. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. *JAKSTAT.* 2012;1:65–72. doi:10.4161/jkst.20045.

54. Shuai K, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science*. 1993;261:1744–6. doi:10.1126/science.7690989.
55. Hemmann U, Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Kurapkat G, Grötzinger J, Wollmer A, Zhong Z, Darnell JE, Graeve L, Heinrich PC, Horn F. Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J. Biol. Chem*. 1996;271:12999–3007. doi:10.1074/jbc.271.22.12999.
56. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*. 1996;84:431–42. doi:10.1016/s0092-8674(00)81288-x.
57. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*. 1996;84:443–50. doi:10.1016/s0092-8674(00)81289-1.
58. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010;2010:214074. doi:10.1155/2010/214074.
59. Ellisen LW, Ramsayer KD, Johannessen CM, Yang A, Beppu H, Minda K, Oliner JD, McKeon F, Haber DA. REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2002;10:995–1005. doi:10.1016/s1097-2765(02)00706-2.
60. Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kalinski H, Kamer I, Rozen A, Mor O, Keshet E, Leshkowitz D, Einat P, Skaliter R, Feinstein E. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;22:2283–93. doi:10.1128/MCB.22.7.2283-2293.2002.
61. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, Zhong F, Xu F, Distelhorst CW. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by

- diverse apoptotic signals. *J Biol Chem*. 2003;278:27053–8.
doi:10.1074/jbc.M303723200.
62. Vega-Rubin-de-Celis S, Abdallah Z, Kinch L, Grishin NV, Brugarolas J, Zhang X. Structural analysis and functional implications of the negative mTORC1 regulator REDD1. *Biochemistry*. 2010;49:2491–501. doi:10.1021/bi902135e.
63. Lin L, Stringfield TM, Shi X, Chen Y. Arsenite induces a cell stress-response gene, RTP801, through reactive oxygen species and transcription factors Elk-1 and CCAAT/enhancer-binding protein. *Biochem J*. 2005;392:93–102.
doi:10.1042/BJ20050553.
64. Horak P, Crawford AR, Vadysirisack DD, Nash ZM, DeYoung MP, Sgroi D, Ellisen LW. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:4675–80.
doi:10.1073/pnas.0907705107.
65. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*. 2008;22:239–51. doi:10.1101/gad.1617608.
66. Michel G, Matthes HWD, Hachet-Haas M, El Baghdadi K, Mey J de, Pepperkok R, Simpson JC, Galzi J-L, Lecat S. Plasma membrane translocation of REDD1 governed by GPCRs contributes to mTORC1 activation. *J Cell Sci*. 2014;127:773–87.
doi:10.1242/jcs.136432.
67. Dungan CM, Wright DC, Williamson DL. Lack of REDD1 reduces whole body glucose and insulin tolerance, and impairs skeletal muscle insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453:778–83. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.032.
68. Stevens SA, Gonzalez Aguiar MK, Toro AL, Yerlikaya EI, Sunilkumar S, VanCleave AM, Pflieger J, Bradley EA, Kimball SR, Dennis MD. PERK/ATF4-dependent expression of the stress response protein REDD1 promotes proinflammatory cytokine expression in the heart of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2023;324:E62-E72. doi:10.1152/ajpendo.00238.2022.

69. Pastor F, Dumas K, Barthélémy M-A, Regazzetti C, Druelle N, Peraldi P, Cormont M, Tanti J-F, Giorgetti-Peraldi S. Implication of REDD1 in the activation of inflammatory pathways. *Sci Rep.* 2017;7:7023. doi:10.1038/s41598-017-07182-z.
70. Gharibi B, Ghuman M, Hughes FJ. DDIT4 regulates mesenchymal stem cell fate by mediating between HIF1 α and mTOR signalling. *Sci Rep.* 2016;6:36889. doi:10.1038/srep36889.
71. Kim J-R, Lee S-R, Chung HJ, Kim S, Baek S-H, Kim JH, Kim Y-S. Identification of amyloid beta-peptide responsive genes by cDNA microarray technology: involvement of RTP801 in amyloid beta-peptide toxicity. *Exp Mol Med.* 2003;35:403–11. doi:10.1038/emm.2003.53.
72. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology.* 2005;25:5834–45. doi:10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005.
73. Jin H-O, Seo S-K, Woo S-H, Kim E-S, Lee H-C, Yoo D-H, An S, Choe T-B, Lee S-J, Hong S-I, Rhee C-H, Kim J-I, Park I-C. Activating transcription factor 4 and CCAAT/enhancer-binding protein-beta negatively regulate the mammalian target of rapamycin via Redd1 expression in response to oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Free Radic Biol Med.* 2009;46:1158–67. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.015.
74. McGhee NK, Jefferson LS, Kimball SR. Elevated corticosterone associated with food deprivation upregulates expression in rat skeletal muscle of the mTORC1 repressor, REDD1. *J Nutr.* 2009;139:828–34. doi:10.3945/jn.108.099846.
75. Hardee J, Ouyang Z, Zhang Y, Kundaje A, Lacroute P, Snyder M. STAT3 Targets Suggest Mechanisms of Aggressive Tumorigenesis in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *G3 (Bethesda).* 2013;3:2173–85. doi:10.1534/g3.113.007674.
76. Kimball SR, Do AND, Kutzler L, Cavener DR, Jefferson LS. Rapid turnover of the mTOR complex 1 (mTORC1) repressor REDD1 and activation of mTORC1 signaling following inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 2008;283:3465–75. doi:10.1074/jbc.M706643200.

77. Katiyar S, Liu E, Knutzen CA, Lang ES, Lombardo CR, Sankar S, Toth JI, Petroski MD, Ronai Z, Chiang GG. REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase. *EMBO Rep.* 2009;10:866–72. doi:10.1038/embo.2009.93.
78. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:264–9. doi:10.1073/pnas.0907904107.
79. Hwang-Verslues WW, Chang P-H, Wei P-C, Yang C-Y, Huang C-K, Kuo W-H, Shew J-Y, Chang K-J, Lee EY-HP, Lee W-H. miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1. *Oncogene.* 2011;30:2463–74. doi:10.1038/onc.2010.618.
80. Pinno J, Bongartz H, Klepsch O, Wundrack N, Poli V, Schaper F, Dittrich A. Interleukin-6 influences stress-signalling by reducing the expression of the mTOR-inhibitor REDD1 in a STAT3-dependent manner. *Cell Signal.* 2016;28:907–16. doi:10.1016/j.cellsig.2016.04.004.
81. Puissant A, Fenouille N, Robert G, Jacquelin A, Bassil CF, Colosetti P, Luciano F, Auberger P. A new posttranslational regulation of REDD1/DDIT4 through cleavage by caspase 3 modifies its cellular function. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1349. doi:10.1038/cddis.2014.291.
82. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 2004;18:2893–904. doi:10.1101/gad.1256804.
83. Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: The mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:155–62. doi:10.1038/nrm3757.
84. Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell.* 2014;156:771–85. doi:10.1016/j.cell.2013.11.049.

85. Reiling JH, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene*. 2006;25:6373–83. doi:10.1038/sj.onc.1209889.
86. Leong C-O, Vidnovic N, DeYoung MP, Sgroi D, Ellisen LW. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. *J Clin Invest*. 2007;117:1370–80. doi:10.1172/JCI30866.
87. Romání-Aumedes J, Canal M, Martín-Flores N, Sun X, Pérez-Fernández V, Wewering S, Fernández-Santiago R, Ezquerra M, Pont-Sunyer C, Lafuente A, Alberch J, Luebert H, Tolosa E, Levy OA, Greene LA, Malagelada C. Parkin loss of function contributes to RTP801 elevation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1364. doi:10.1038/cddis.2014.333.
88. Damjanac M, Page G, Ragot S, Laborie G, Gil R, Hugon J, Paccalin M. PKR, a cognitive decline biomarker, can regulate translation via two consecutive molecular targets p53 and Redd1 in lymphocytes of AD patients. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1823–32. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00688.x.
89. Shi Y, Hsu J, Hu L, Gera J, Lichtenstein A. Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6. *J Biol Chem*. 2002;277:15712–20. doi:10.1074/jbc.M200043200.
90. Cai S-L, Tee AR, Short JD, Bergeron JM, Kim J, Shen J, Guo R, Johnson CL, Kiguchi K, Walker CL. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol*. 2006;173:279–89. doi:10.1083/jcb.200507119.
91. Dennis MD, Coleman CS, Berg A, Jefferson LS, Kimball SR. REDD1 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to repress mTORC1 signaling. *Sci Signal*. 2014;7:ra68. doi:10.1126/scisignal.2005103.
92. Favier FB, Costes F, Defour A, Bonnefoy R, Lefai E, Baugé S, Peinnequin A, Benoit H, Freyssenet D. Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1659-66. doi:10.1152/ajpregu.00550.2009.

93. Costa-Pereira AP, Tininini S, Strobl B, Alonzi T, Schlaak JF, Is'harc H, Gesualdo I, Newman SJ, Kerr IM, Poli V. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon- γ -like response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99:8043–7. doi:10.1073/pnas.122236099.
94. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
95. Sikes ML, Bradshaw JM, Ivory WT, Lunsford JL, McMillan RE, Morrison CR. A streamlined method for rapid and sensitive chromatin immunoprecipitation. *J Immunol Methods.* 2009;344:58–63. doi:10.1016/j.jim.2009.03.007.
96. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54. doi:10.1006/abio.1976.9999.
97. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5. doi:10.1038/227680a0.
98. Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. Essential Role of STAT3 in the Control of the Acute-Phase Response as Revealed by Inducible Gene Activation in the Liver. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1621–32. doi:10.1128/MCB.21.5.1621-1632.2001.
99. Britto FA, Dumas K, Giorgetti-Peraldi S, Ollendorff V, Favier FB. Is REDD1 a metabolic double agent? Lessons from physiology and pathology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;319:C807-C824. doi:10.1152/ajpcell.00340.2020.
100. Pinno Jessica. Molekulare Mechanismen der IL-6-induzierten Regulation der REDD1 Expression.
101. Rose-John S, Jenkins BJ, Garbers C, Moll JM, Scheller J. Targeting IL-6 trans-signaling: past, present and future prospects. *Nat Rev Immunol.* 2023:1–16. doi:10.1038/s41577-023-00856-y.
102. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grötzinger J, Rose-John S. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol.* 1997;15:142–5. doi:10.1038/nbt0297-142.

103. Köhler N, Wundrack N, Schulz S, Bartonitz F, Schaper F, Dittrich A. Non-canonical STAT3 function reduces REDD1 transcription. *FEBS J.* 2023;290:1765–81. doi:10.1111/febs.16679.
104. Ketteler R, Glaser S, Sandra O, Martens UM, Klingmüller U. Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.* 2002;9:477–87. doi:10.1038/sj.gt.3301653.
105. Liu L, McBride KM, Reich NC. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:8150–5. doi:10.1073/pnas.0501643102.
106. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature.* 1997;387:917–21. doi:10.1038/43206.
107. Salsman J, Stathakis A, Parker E, Chung D, Anthes LE, Koskowich KL, Lahsae S, Gaston D, Kukurba KR, Smith KS, Chute IC, Leger D, Frost LD, Montgomery SB, Lewis SM, Eskiw C, Dellaire G. PML nuclear bodies contribute to the basal expression of the mTOR inhibitor DDIT4. *Sci Rep.* 2017;7:45038. doi:10.1038/srep45038.
108. JASPER database 2018. STAT3 Konsensus Motiv: MA0144.2. 2017. <http://jaspar.genereg.net/matrix/MA0144.2/>,. Accessed 23 Jan 2018.
109. Ciccone DN, Morshead KB, Oettinger MA. Chromatin Immunoprecipitation in the Analysis of Large Chromatin Domains Across Murine Antigen Receptor Loci. In: Allis CD, Wu C, editors. *Chromatin and chromatin remodeling enzymes: Part B*; Elsevier; 2003. p. 334–348. doi:10.1016/S0076-6879(03)76022-4.
110. Timofeeva OA, Tarasova NI. Alternative ways of modulating JAK-STAT pathway: Looking beyond phosphorylation. *JAKSTAT.* 2012;1:274–84. doi:10.4161/jkst.22313.
111. Kim J-Y, Kwon Y-G, Kim Y-M. The stress-responsive protein REDD1 and its pathophysiological functions. *Exp Mol Med* 2023. doi:10.1038/s12276-023-01056-3.
112. Dumas K, Ayachi C, Gilleron J, Lacas-Gervais S, Pastor F, Favier FB, Peraldi P, Vaillant N, Yvan-Charvet L, Bonnafous S, Patouraux S, Anty R, Tran A, Gual P, Cormont M,

- Tanti J-F, Giorgetti-Peraldi S. REDD1 deficiency protects against nonalcoholic hepatic steatosis induced by high-fat diet. *FASEB J.* 2020;34:5046–60. doi:10.1096/fj.201901799RR.
113. Sunilkumar S, Toro AL, McCurry CM, VanCleave AM, Stevens SA, Miller WP, Kimball SR, Dennis MD. Stress response protein REDD1 promotes diabetes-induced retinal inflammation by sustaining canonical NF- κ B signaling. *J Biol Chem.* 2022;298:102638. doi:10.1016/j.jbc.2022.102638.
114. Baida G, Bhalla P, Kirsanov K, Lesovaya E, Yakubovskaya M, Yuen K, Guo S, Lavker RM, Readhead B, Dudley JT, Budunova I. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol Med.* 2015;7:42–58. doi:10.15252/emmm.201404601.
115. El Kasmi KC, Smith AM, Williams L, Neale G, Panopoulos AD, Watowich SS, Häcker H, Foxwell BMJ, Murray PJ. Cutting edge: A transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway. *J Immunol.* 2007;179:7215–9. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7215.
116. Lee D-K, Kim J-H, Kim W-S, Jeoung D, Lee H, Ha K-S, Won M-H, Kwon Y-G, Kim Y-M. Lipopolysaccharide induction of REDD1 is mediated by two distinct CREB-dependent mechanisms in macrophages. *FEBS Lett.* 2015;589:2859–65. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.004.
117. Regazzetti C, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F, Giorgetti-Peraldi S. Insulin induces REDD1 expression through hypoxia-inducible factor 1 activation in adipocytes. *J Biol Chem.* 2010;285:5157–64. doi:10.1074/jbc.M109.047688.
118. Lisse TS, Liu T, Irmeler M, Beckers J, Chen H, Adams JS, Hewison M. Gene targeting by the vitamin D response element binding protein reveals a role for vitamin D in osteoblast mTOR signaling. *FASEB J.* 2011;25:937–47. doi:10.1096/fj.10-172577.
119. Makino Y, Yoon J-H, Bae E, Kato M, Miyazawa K, Ohira T, Ikeda N, Kuroda M, Mamura M. Repression of Smad3 by Stat3 and c-Ski/SnoN induces gefitinib resistance in lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;484:269–77. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.093.

120. Stöcklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*. 1996;383:726–8. doi:10.1038/383726a0.
121. Thomas NSB. The STAT3-DNMT1 connection. *JAKSTAT*. 2012;1:257–60. doi:10.4161/jkst.22436.
122. Xu L, Ji J-J, Le W, Xu YS, Dou D, Pan J, Jiao Y, Zhong T, Wu D, Wang Y, Wen C, Xie G-Q, Yao F, Zhao H, Fan Y-S, Chin YE. The STAT3 HIES mutation is a gain-of-function mutation that activates genes via AGG-element carrying promoters. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:8898–912. doi:10.1093/nar/gkv911.
123. Wang R, Cherukuri P, Luo J. Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J. Biol. Chem*. 2005;280:11528–34. doi:10.1074/jbc.M413930200.
124. Lee H, Zhang P, Herrmann A, Yang C, Xin H, Wang Z, Hoon DSB, Forman SJ, Jove R, Riggs AD, Yu H. Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109:7765–9. doi:10.1073/pnas.1205132109.
125. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet*. 2022;38:676–707. doi:10.1016/j.tig.2022.03.010.
126. Li W, Wang Q, Qi X, Guo Y, Lu H, Chen Y, Lu Z, Yan Q, Zhu X, Jung JU, Tosato G, Gao S-J, Lu C. Viral interleukin-6 encoded by an oncogenic virus promotes angiogenesis and cellular transformation by enhancing STAT3-mediated epigenetic silencing of caveolin 1. *Oncogene*. 2020;39:4603–18. doi:10.1038/s41388-020-1317-1.
127. Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol*. 2011;791:11–21. doi:10.1007/978-1-61779-316-5_2.
128. Dittrich A, Quaiser T, Khouri C, Görtz D, Mönningmann M, Schaper F. Model-driven experimental analysis of the function of SHP-2 in IL-6-induced Jak/STAT signaling. *Mol Biosyst*. 2012;8:2119–34. doi:10.1039/c2mb05488d.
129. Balic JJ, Garama DJ, Saad MI, Yu L, West AC, West AJ, Livis T, Bhathal PS, Gough DJ, Jenkins BJ. Serine-Phosphorylated STAT3 Promotes Tumorigenesis via Modulation of RNA Polymerase Transcriptional Activity. *Cancer Res*. 2019;79:5272–87. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0974.

130. Balic JJ, Saad MI, Dawson R, West AJ, McLeod L, West AC, D'Costa K, Deswaerte V, Dev A, Sievert W, Gough DJ, Bhathal PS, Ferrero RL, Jenkins BJ. Constitutive STAT3 Serine Phosphorylation Promotes Helicobacter-Mediated Gastric Disease. *Am J Pathol.* 2020;190:1256–70. doi:10.1016/j.ajpath.2020.01.021.
131. Balic JJ, Albargy H, Luu K, Kirby FJ, Jayasekara WSN, Mansell F, Garama DJ, Nardo D de, Baschuk N, Louis C, Humphries F, Fitzgerald K, Latz E, Gough DJ, Mansell A. STAT3 serine phosphorylation is required for TLR4 metabolic reprogramming and IL-1 β expression. *Nat Commun.* 2020;11:3816. doi:10.1038/s41467-020-17669-5.
132. Alhayyani S, McLeod L, West AC, Balic JJ, Hodges C, Yu L, Smith JA, Prodanovic Z, Bozinovski S, Kumar B, Ruwanpura SM, Saad MI, Jenkins BJ. Oncogenic dependency on STAT3 serine phosphorylation in KRAS mutant lung cancer. *Oncogene.* 2022;41:809–23. doi:10.1038/s41388-021-02134-4.
133. Wen Y, Zhu Y, Zhang C, Yang X, Gao Y, Li M, Yang H, Liu T, Tang H. Chronic inflammation, cancer development and immunotherapy. *Front Pharmacol.* 2022;13:1040163. doi:10.3389/fphar.2022.1040163.
134. Yuan J, Zhang F, Niu R. Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. *Sci Rep.* 2015;5:17663. doi:10.1038/srep17663.
135. Jin H-O, Seo S-K, Woo S-H, Kim Y-S, Hong S-E, Yi J-Y, Noh W-C, Kim E-K, Lee J-K, Hong S-I, Choe T-B, Park I-C. Redd1 inhibits the invasiveness of non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407:507–11. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.047.
136. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang V-T, Lemarié A, Tyler BM, Brem H, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Sarry J-E, Skuli N. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One.* 2015;10:e0123721. doi:10.1371/journal.pone.0123721.
137. Kerley-Hamilton JS, Pike AM, Li N, DiRenzo J, Spinella MJ. A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma. *Oncogene.* 2005;24:6090–100. doi:10.1038/sj.onc.1208755.

8. Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, den 20.11.2023

Nadine Köhler