

## 1 Einleitung

Für mehrzellige Organismen ist die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen oder Organen unverzichtbar. Nur so ist eine koordinierte Interaktion mit der Umgebung und die Fähigkeit, auf sich ändernde Bedingungen zu reagieren, gewährleistet. Eine Gruppe von Mediatoren, die diese Zell-Zell-Kommunikation vermittelt, sind die Cytokine. Ihre Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche löst eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade aus, die zu einer Änderung des Genexpressionsprofils innerhalb von wenigen Minuten führt. Cytokine spielen eine wichtige Rolle bei Wachstums-, Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen sowie bei der Kontrolle des Immunsystems. Strukturmerkmalen entsprechend können Cytokine in Gruppen zusammengefasst werden. Man unterscheidet zwischen Hämatopoetinen, Interferonen, Cytokinen der TNF-Familie und Chemokinen, chemotaktisch aktiven Cytokinen. Die Familie der Hämatopoetine beinhaltet zahlreiche Interleukine (IL) und Wachstumshormone wie Erythropoietin (EPO), den Leukämieinhibierenden Faktor (LIF) oder Onkostatin M (OSM). Als Interleukine werden, unabhängig von Strukturmerkmalen, Cytokine bezeichnet, die der Kommunikation zwischen Leukocyten dienen (zusammengefasst in Janeway et al., 2005).

Interferone sind Cytokine mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften. Diese Cytokine bilden die erste Abwehr gegen virale Infektionen und spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Überwachung maligner Zellen durch das Immunsystem (Kaplan et al., 1998). Ihre Fähigkeit mit der Virenreplikation in zuvor nicht infizierten Zellen zu „interferieren“ gab den Interferonen ihren Namen (Isaacs und Lindenmann, 1957). Die wichtigsten Vertreter der großen Gruppe strukturell homologer Typ-I-Interferone sind Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) und Interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ). Im Gegensatz dazu ist Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) das einzige Typ-II-Interferon (zusammengefasst in Plataniias, 2005). Die Produktion von Typ-I-Interferonen wird direkt durch Virusinfektion induziert. Während IFN $\alpha$  hauptsächlich von Leukocyten synthetisiert wird, kann IFN $\beta$  von den meisten Zellen produziert werden. Am besten charakterisiert ist die IFN $\beta$ -Synthese in Fibroblasten, die durch doppelsträngige RNA und der daraus resultierenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) induziert wird (zusammengefasst in Goodbourn et al., 2000). Die Transkription des IFN $\gamma$ -Gens erfolgt in T- und natürlichen Killer-Zellen nach Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen (zusammengefasst in Boehm et al., 1997; Frucht et al., 2001).

Interferone tragen auf verschiedene Weise zur Abwehr von Virusinfektionen bei. Sie hemmen die virale Replikation und induzieren die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen sowie von Bestandteilen des intrazellulären Apparates, der für die Beladung von MHC-Molekülen mit Peptiden zuständig ist. Auf diese Weise erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass infizierte Zellen als Ziele für cytotoxische Angriffe durch das Immunsystem erkannt werden. Außerdem hemmen Interferone das Wachstum infizierter Zellen und sensitivieren sie gegenüber apoptotischen Stimuli. Eine wichtige Aufgabe von  $\text{IFN}\gamma$  ist die Aktivierung von Makrophagen, die als Effektor- oder Antigen-präsentierende Zellen wirken. Alle Phasen der angeborenen und adaptiven Immunantwort werden durch Interferone beeinflusst (zusammengefasst in Stark et al., 1998; Goodbourn et al., 2000).

Ihre biologischen Aktivitäten entfalten die Interferone in erster Linie durch die Regulation der Genexpression. Über die Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche aktivieren sie eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die zur Änderung des Expressionsprofils der Zelle führt (Darnell et al., 1994). Alle Typ-I-Interferone binden einen gemeinsamen Rezeptor, der, wie auch der  $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor, aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt ist. Durch gezieltes Ausschalten der Interferon-Rezeptoren in Mäusen konnte die Bedeutung der Interferone für die Immunabwehr bestätigt werden. So sind Mäuse, denen Typ-I- oder Typ-II-Interferonrezeptoren fehlen, nicht in der Lage, eine effiziente Immunantwort nach Infektion mit einer Vielzahl von Viren aufzubauen (zusammengefasst in Goodbourn et al., 2000).

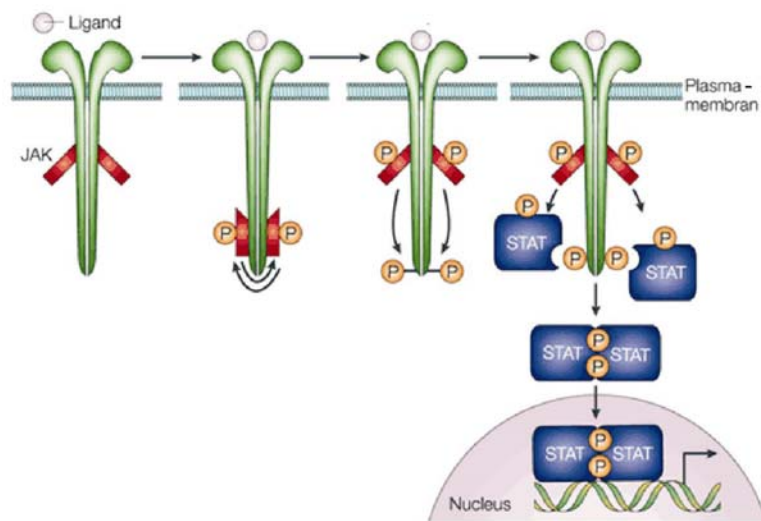
Das Studium der Genregulation durch Interferone führte zur Entdeckung des Jak-STAT-Signaltransduktionsweges (Darnell et al., 1994). Die zentralen Komponenten dieses Signaltransduktionsweges sind die STAT (signal transducers and activators of transcription)-Proteine, deren Name sich von ihrer doppelten Funktion als Signalübermittler und Transkriptionsfaktoren herleitet. Die direkte Signalweiterleitung, ohne Beteiligung weiterer Botenstoffe, ermöglicht eine Genaktivierung binnen weniger Minuten und gewährleistet eine hohe Signalerhaltung und Spezifität.

In Säugern besteht die Familie der STAT-Proteine aus sieben Mitgliedern: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6, die sowohl strukturell als auch funktionell verwandt sind und die Weiterleitung von Cytokin- und Wachstumshormonsignalen in einer Vielzahl von Zellen und Geweben übernehmen. Sie spielen daher eine wichtige Rolle bei so verschiedenen zellulären Prozessen wie der Embryonalentwicklung, der Organogenese, der Regulation von Zellwachstum und Apoptose sowie in der angeborenen und erworbenen Immunität (zusammen-

gefasst in Levy und Darnell, 2002). STAT-Proteine treten in der Evolution ab dem Stadium der Mehrzelligkeit auf und wurden, außer in Säugern, auch in *Dictyostelium*, *Caenorhabditis*, *Anopheles*, *Drosophila* und *Xenopus* beschrieben (zusammengefasst in Kisseleva et al., 2002).

Alle in Säugern vorkommenden STAT-Proteine werden durch die Bindung eines oder mehrerer Cytokine an ihre Transmembranrezeptoren aktiviert. Die Rezeptor-Bindung löst eine Kaskade von Tyrosin-Phosphorylierungs-Reaktionen aus, die von Kinasen der Janusfamilie (Jak) katalysiert werden (zusammengefasst in Levy und Darnell, 2002). In Säugern besteht diese Familie aus vier Mitgliedern: Jak1, Jak2, Jak3 und Tyrosinkinase 2 (Tyk2). Die Janus-Kinasen sind konstitutiv mit den Rezeptoren assoziiert und eine Rezeptor-Oligomerisierung ermöglicht die Aktivierung ihrer intrinsischen Kinaseaktivität durch Transphosphorylierung (zusammengefasst in O'Shea et al., 2002). Die aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren zunächst Tyrosine innerhalb der cytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren, die als Bindestellen für STAT-Proteine und andere Signalmoleküle dienen (Greenlund et al., 1994). Über ihre SH2-Domäne werden die STAT-Proteine nun an den phosphorylierten Rezeptor rekrutiert und ihrerseits von den Janus-Kinasen an einem einzigen Tyrosin phosphoryliert (Shuai et al., 1993). Dies induziert ihre Homo- oder Heterodimerisierung, die über eine wechselseitige Tyrosin-Phosphat-SH2-Domänen-Interaktion vermittelt wird, und ermöglicht die Dissoziation vom Rezeptor (Shuai et al., 1994; Greenlund et al., 1995). Tyrosin-phosphorylierte STAT-Dimere sind hochaffine DNA-Bindeproteine, die im Kern an DNA-Elemente in der Promotorregion ihrer Zielgene binden.

Eine Stimulation mit IFN $\alpha$  induziert vorwiegend die Bildung von Heterodimeren aus STAT1 und STAT2, die zusammen mit dem Protein IRF-9 (interferon regulatory factor 9) einen trimeren Komplex bilden, der als Interferon-stimulierter-Genfaktor 3 (ISGF3) bezeichnet wird. Dieser Komplex aktiviert die Transkription von Genen mit ISR (interferon stimulated response)-Elementen im Promotor. Die Stimulation mit INF $\gamma$  dagegen führt überwiegend zur Bildung von STAT1-Homodimeren, die an sogenannte GAS (gamma activated sites)-Motive binden (Müller et al., 1993; Darnell et al., 1994).



**Abbildung 1: Modell der STAT-Aktivierung**

Die Bindung eines Liganden induziert die Oligomerisierung der Rezeptoren (grün) und führt zu einer Aktivierung der kovalent gebundenen Janus-Kinasen (rot). Die aktivierten Kinasen phosphorylieren zunächst die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors. Über ihre SH2-Domäne binden die STAT-Proteine (blau) an phosphorylierte Tyrosine der Rezeptoren und werden nun ebenfalls Tyrosin-phosphoryliert, dimerisieren und binden im Kern an die Promoterregion ihrer Zielgene (aus Levy und Darnell, 2002).

Spezifität wird bei der Signalweiterleitung, trotz einer Vielzahl verwandter Rezeptoren und Signaltransduktoren, zum einem durch die Affinitäten der STAT-Dimere zu ihren natürlichen DNA-Bindemotiven und zum anderen durch die hochspezifische Interaktion zwischen den Tyrosin-phosphorylierten Bindestellen der Cytokinrezeptoren und der SH2-Domäne der STAT-Proteine gewährleistet (Greenlund et al., 1995; Heim et al., 1995; Schindler et al., 1995; Ehret et al., 2001). Diese hochaffine Interaktion bestimmt nicht nur die Qualität des Signals, sondern auch die Signalstärke. Weitere Faktoren, die Qualität und Quantität eines gegebenen Signals beeinflussen, sind Gewebe- oder Zelltyp-spezifische Expressionsunterschiede sowie die Aktivierung paralleler Signalwege durch die Rezeptoren (zusammengefasst in Levy und Darnell, 2002; Shuai und Liu, 2003).

Die gezielte, zum Teil auch Gewebe-spezifische Inaktivierung einzelner STAT-Gene in Mäusen ermöglichte eine Funktionsanalyse *in vivo* und bestätigte die Zuordnung einzelner STAT-Proteine zu der Signaltransduktion bestimmter Cytokine (zusammengefasst in Kisseleva et al., 2002; Levy und Darnell, 2002; O’Shea et al., 2002). STAT3 und STAT5 werden in allen Geweben exprimiert und durch eine Vielzahl von Cytokinen aktiviert, dementsprechend sind ihre Funktionen sehr divers (Teglund et al., 1998; Akira et al., 2000). Beide Proteine erfüllen wichtige

wachstumsregulierende Funktionen und vor allem STAT3 wird mit zellulärer Transformation und Tumorprogression in Verbindung gebracht (Bowman et al., 2000). STAT5 wird unter anderem durch das Hormon Erythropoietin (EPO) aktiviert, das von bestimmten Leberzellen als Antwort auf Sauerstoffmangel im Gewebe sezerniert wird und die rote Blutzellproduktion anregt (Socolovsky et al., 2001). Die Funktionen von STAT4, STAT6, STAT2 und STAT1 sind dagegen eng mit der Signaltransduktion eines oder weniger Cytokine assoziiert. STAT4 wird ausschließlich in einigen T-Lymphocyten exprimiert und induziert die Differenzierung zu IFN $\gamma$ -produzierenden Th1-Zellen nach Stimulation mit IL-12 (Kaplan et al., 1996a). Die Aktivierung von STAT6 erfolgt durch IL-4, wodurch die Entwicklung und Differenzierung verschiedener Zelltypen ausgelöst wird (Kaplan et al., 1996b; zusammengefasst in Wurster et al., 2000). STAT2 ist, neben STAT1, an der durch Typ-I-Interferon-induzierten, antiviralen Antwort beteiligt (Park et al., 2000a).

Von fundamentaler Bedeutung für die Interferon-induzierte Signaltransduktion ist STAT1. STAT1-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage eine Immunantwort nach einer Infektion mit Viren oder mikrobiellen Pathogenen aufzubauen und schon geringe Dosen, sonst harmloser Krankheitserreger wirken letal (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Gene, die normalerweise durch IFN $\alpha$ - oder IFN $\gamma$ -Stimulation induziert werden, können in STAT1-defizienten Zellen nicht aktiviert werden. Hierzu gehören Transkriptionsfaktoren mit immunmodulatorischer Wirkung wie IRF-1 (interferon regulatory factor 1) oder CIITA (MHC Class II transactivating protein), eine Vielzahl von Chemokinen und deren Rezeptoren wie MIG (monokine induced by IFN $\gamma$ ), MIP (macrophage inflammatory protein), MCP (monocyte chemotactic protein) oder der MCP-Rezeptor, Zellzyklusregulatoren wie der Zellzyklus-Inhibitor p21 oder Proteine der p200-Familie, Proteine die an der Antigen-Präsentation beteiligt sind wie MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle oder TAP-1 (transporter associated with antigen processing), negative Regulatoren der Cytokin-induzierten Signalkaskade wie SOCS-1 und SOCS-3 (suppressors of cytokine signaling) und schließlich Komponenten des Signaltransduktionsweges wie IRF-9 (interferon regulated factor 9) und STAT1 selbst (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996; Der et al., 1998).

Die Transkription einiger Gene wird durch Interferon-Stimulation auch reprimiert. Zu den Produkten dieser Gene gehören beispielsweise Matrix-Metalloproteasen und Zellzyklusregulatoren, wie c-myc, Cyclin D, Cyclin A oder cdc23 (zusammengefasst in Ramana et al., 2000). Insgesamt

verändert sich nach Interferon-Stimulation die Expression von weit über 200 Genen in verschiedenen Zelltypen (Der et al., 1998).

Eine STAT1-abhängige Genexpression kann auch ohne Stimulations-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung erfolgen. Erste Hinweise auf eine konstitutive Geninduktion durch STAT1 lieferten Untersuchungen zur Apoptoseinduktion in STAT1-defizienten Zellen. Die Insensitivität dieser Zellen gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli ist auf eine nur sehr geringe basale Expression der Caspasen 1, 2 und 3 zurückzuführen. Durch die Transfektion von STAT1 auch von STAT1-Mutanten, die nicht Tyrosin phosphoryliert werden, wird die Expression dieser Caspasen wieder hergestellt (Kumar et al., 1997). Mittlerweile kennt man noch einige andere Gene, die konstitutiv durch nicht-Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 induziert oder reprimiert werden. Der Mechanismus der konstitutiven Genregulation durch STAT1 ist jedoch noch nicht verstanden (Chatterjee-Kishore et al., 2000; zusammengefasst in Ramana et al., 2000).

Alle STAT-Proteine haben einen modularen Aufbau aus sechs strukturell und funktionell konservierte Domänen gemeinsam. Kristallstrukturanalysen konnten die, zunächst durch Sequenzvergleiche und Mutationsstudien, gewonnenen Erkenntnisse über die Funktionen dieser Domänen bestätigen und erweitern (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998; Vinkemeier et al., 1998; Soler-Lopez et al., 2004; Mao et al., 2005).

Die Amino-terminale Domäne, die die ersten etwa 130 Aminosäuren umfasst und zwischen verschiedenen STAT-Proteinen stark konserviert ist, bildet eine unabhängig gefaltete Einheit, die proteolytisch vom sogenannten Kernfragment abgespalten werden kann (Vinkemeier et al., 1996). Domänen-Austausch-Experimente konnten zeigen, dass die Amino-Termini verschiedener STAT-Moleküle jedoch keineswegs beliebig auswechselbar sind (Strehlow und Schindler, 1998; Murphy et al., 2000). Über den N-Terminus erfolgt eine Homodimerisierung, die vor allem im Kontext des phosphorylierten Proteins von großer Bedeutung ist und die kooperative DNA-Bindung zweier Dimere an benachbarten GAS-Stellen ermöglicht (Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996; John et al., 1999). Der N-Terminus wird mit der Rekrutierung von Phosphatasen in Verbindung gebracht und N-terminal deletierte STAT1-Derivate sind durch eine nahezu irreversible Tyrosin-Phosphorylierung gekennzeichnet (Shuai et al., 1996; Strehlow und Schindler, 1998; Meyer et al., 2004).

Das STAT „Kernfragment“ besteht aus einem Vier-Helix-Bündel, der DNA-Bindedomäne, einer sogenannten Verbindungs-Domäne und der SH2-Domäne, die unmittelbar von dem zu phospho-

rylierenden Tyrosinrest gefolgt wird (Tyrosin<sup>701</sup> bei STAT1). Die SH2-Domäne ist für die Signalweiterleitung in zweierlei Hinsicht von großer Bedeutung. Zum einen wird über die Affinität dieser Domäne zu phosphorylierten Rezeptor-Bindestellen eine selektive Aktivierung einzelner STAT-Proteine möglich und zum anderen vermittelt diese Domäne die sich anschließende Homo- oder Heterodimerisierung (Shuai et al., 1994; Greenlund et al., 1995; Heim et al., 1995).

Die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine ist abhängig vom Carboxy-Terminus, der mit einer Reihe von transkriptionellen Koaktivatoren interagiert und dessen Struktur bisher nicht aufgeklärt werden konnte. Die Transaktivierungsdomäne ist die am wenigsten konservierte Domäne der STAT-Proteine und ihre Länge variiert zwischen 40 und 200 Aminosäuren (Moriggl et al., 1997; Paulson et al., 1999). Für STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6 existieren verkürzte Isoformen ohne C-Terminus, die durch alternatives Spleißen oder proteolytischen Abbau entstehen (Schindler et al., 1992; Schaefer et al., 1995; Wang et al., 1996; Azam et al., 1997; Chakraborty und Tweardy, 1998; Hoey et al., 2003; Nakajima et al., 2003; zusammengefasst in Horvath, 2000; Hendry und John, 2004). Diese Derivate, die als  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Varianten bezeichnet werden (je nachdem, ob sie aus alternativem Spleißen oder Proteolyse hervorgegangen sind), sind in der Regel transkriptionell nicht aktiv und wirken daher als negative Regulatoren (Shuai et al., 1993; Caldenhoven et al., 1996; Moriggl et al., 1996; Wang et al., 1996; zusammengefasst in Decker und Kovarik, 1999; Bromberg und Darnell, 2000; Horvath, 2000). Die C-Termini von STAT1, STAT3 und STAT4 enthalten ein konserviertes LPMS (Leuzin, Prolin, Methionin, Serin, Prolin)-Motiv, und der C-Terminus von STAT5 ein PSP (Prolin, Serin, Prolin)-Motiv, dessen Serin-Phosphorylierung im Falle von STAT1, STAT3 und STAT4 für eine maximale transkriptionelle Aktivität erforderlich ist (Visconti et al., 2000; zusammengefasst in Decker und Kovarik, 2000; Horvath, 2000).

So reduziert im Fall von STAT1 die Mutation dieses Serinrestes (AS 727) zu Alanin die Transaktivierungsleistung von STAT1 in Reporter-Gen-Versuchen um bis zu 80% (Wen et al., 1995). STAT1-defiziente Zellen, die mit dieser Mutante rekonstituiert wurden, zeigen keine antiproliferativen und antiviralen Antworten nach IFN $\gamma$ -Stimulation (Horvath und Darnell, 1996). Die verminderte Transaktivierungsleistung nach Mutation der Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierungsstelle kann auf eine reduzierte Interaktion von STAT1 mit verschiedenen transkriptionellen Kofaktoren wie CBP/p300, BRCA1 oder MCM5 zurückgeführt werden (Zhang et al., 1998; Ouchi et al., 2000; Varinou et al., 2003; Zakharova et al., 2003; Sun et al., 2005). Alle Stimuli, die zu einer Tyro-

sin<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 führen, induzieren gleichzeitig auch die Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung des Proteins (zusammengefasst in Decker und Kovarik, 2000). Auf der anderen Seite kann eine Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung unabhängig von Interferon-Stimulation und Tyrosin-Phosphorylierung durch zellulären Stress wie UV-Bestrahlung, TNF $\alpha$ - oder LPS-Behandlung erfolgen (Zhu et al., 1997; Kovarik et al., 1998; Kovarik et al., 1999). Eine Vielzahl verschiedener Kinasen und Signalwege wird mit der Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung von STAT1 in Verbindung gebracht (Goh et al., 1999; Kovarik et al., 1999; Uddin et al., 2002; Nguyen et al., 2001; Nair et al., 2002; Deb et al., 2003).

Während STAT1 in unstimulierten Zellen überwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist, führt die Stimulations-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung binnen weniger Minuten zu einer nukleären Akkumulation, die in der Regel über mehrere Stunden andauert (Schindler et al., 1992; Shuai et al., 1993). Voraussetzung für eine Kernakkumulation ist die Tyrosin-Phosphorylierung und konsekutive Dimerisierung des Proteins (Shuai et al., 1992; Darnell et al., 1994; Mowen und David, 1998). Aus diesem Grund wird allgemein angenommen, dass die im Cytoplasma stattfindende Dimerisierung das Signal für die nachfolgende Kerntranslokation darstellt. Wie verschiedene Arbeiten demonstrieren, ist darüber hinaus auch eine intakte DNA-Bindedomäne für die Cytokin-induzierte Kernakkumulation erforderlich (Herrington et al., 1999; McBride et al., 2000; Lillemeier et al., 2001; Melén et al., 2001).

Der Transport über die Kernmembran erfolgt über den Kernporenkomplex, einem Multi-Protein-Komplex, der in die Kernmembran eingebettet ist (Cronshaw et al., 2002). Die Kernporenpassage von Proteinen mit der Masse von STAT1 ist in der Regel abhängig von Transportfaktoren, die den Durchtritt durch die Kernpore vermitteln (zusammengefasst in Allen et al., 2000; Macara, 2001; Suntharalingam und Wentz, 2003). Die meisten Transportrezeptoren gehören zur Familie der Karyopherine und bewältigen entweder Kernimport (Importine) oder Kernexport (Exportine) (zusammengefasst in Wozniak et al., 1998). Die Bindung der zu transportierenden Proteine (die häufig als Cargo (Transportgut) bezeichnet werden) an die Transportrezeptoren erfolgt über kurze, meist wenig konservierte Aminosäuresequenzen, die entsprechend als nukleäre Lokalisations-signale (NLS) oder nukleäre Exportsignale (NES) bezeichnet werden. Die Richtung der Transportvorgänge wird durch die GTPase Ran (ras-related nuclear protein) vorgegeben, da GTP-gebundenes Ran die Dissoziation von Importin-Cargo-Komplexen fördert und die Bildung von Exportin-Cargo-Komplexen stabilisiert. Durch die asymmetrische Verteilung von Nukleotid-



Austauschfaktoren und GTPase-aktivierenden Proteinen herrscht eine hohe Ran-GTP-Konzentration im Zellkern (zusammengefasst in Görlich und Kutay, 1999; Bayliss et al., 2000; Pemberton und Paschal, 2005).

Bereits vor einigen Jahren konnte durch Immunpräzipitations-Experimente demonstriert werden, dass ausschließlich Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 zur Bildung eines Importkomplexes in der Lage ist (Sekimoto et al., 1997). Wie weiterhin gezeigt wurde, erfolgt der Import des Tyrosin-phosphorylierten STAT1-Dimers in einer Ran-abhängigen Weise durch die Importfaktoren Importin  $\beta$  und Importin  $\alpha 5$  (Sekimoto et al., 1996, 1997; Fagerlund et al., 2002). Die Suche nach einem klassischen Kernimportsignal für STAT-Proteine blieb aber lange Zeit erfolglos. Dies hat Vermutungen unterstützt, dass Importsignale im Rezeptor oder im Liganden für den Kernimport von aktiviertem STAT verantwortlich sind (Johnson et al., 1998; Subramaniam et al., 2000; Bild et al., 2002). Wie jedoch demonstriert werden konnte, sind derartige Mechanismen nicht erforderlich, da die Kerntranslokation und nukleäre Akkumulation von phosphoryliertem STAT1 ohne Rezeptoraktivierung stattfinden kann (Meyer et al., 2003). Darüber hinaus erfolgt die Bewegung von STAT1 im Cyto- oder Nucleoplasma über freie Diffusion und ist unabhängig von cytoskeletalen Strukturen (Lillemeier et al., 2001), wie sie für einen Transport in Endocytose-Vesikeln notwendig wären.

Während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit konnte von uns und anderen ein Kernlokalisierungssignal in der DNA-Bindedomäne (AS 407-413) von STAT1 identifiziert werden, dessen Mutation die Interaktion mit dem Importrezeptor Importin  $\alpha 5$  und den Kerntransport von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 unterbindet (Fagerlund et al., 2002; McBride et al., 2002; Meyer et al., 2002b). Dieses ungewöhnliche Importsignal funktioniert nur im Kontext des Tyrosin-phosphorylierten STAT1-Dimers und ist nicht auf andere Proteine übertragbar (Meyer et al., 2002b).

Zusätzlich zu dem Kernlokalisierungssignal der DNA-Bindedomäne wird auch der N-Terminus von STAT1 mit Kernimport in Verbindung gebracht. So konnten Strehlow und Schindler (1998) zeigen, dass N-terminale STAT1-Mutanten nach Cytokin-Stimulation nicht im Kern akkumulieren. Wie inzwischen bekannt ist, ist für den Aufbau einer Kernakkumulation neben dem Kernimport auch die Retention des Proteins im Kern erforderlich (McBride et al., 2000; Meyer et al., 2003). Der Mechanismus, über den der N-Terminus zur Kernakkumulation beiträgt, konnte bislang aber noch nicht aufgeklärt werden. Gegen einen Importdefekt von N-terminal-trunkierten

STAT1-Derivaten spricht der Nachweis quantitativer Mengen dieser Derivate im Kern stimulierter Zellen (Haspel und Darnell, 1999).

Die Dauer der Kernakkumulationsphase von STAT1 wird in erster Linie durch die Aktivität von nukleären Phosphatasen begrenzt (Haspel et al., 1996; Haspel und Darnell, 1999). Obwohl anfänglich diskutiert, scheint proteasomaler Abbau von aktiviertem STAT1 (Kim und Maniatis, 1996) bei der Signaltermination dagegen keine Rolle zu spielen. So ist STAT1 mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden relativ stabil (Lee et al., 1997; Haspel et al., 1996; Andrews et al., 2002), während die Halbwertszeit der Tyrosin-Phosphorylierung nur wenige Minuten beträgt (Haspel und Darnell, 1999; Swameye et al., 2003; Lerner et al., 2003).

Die Beteiligung des Exportrezeptors CRM1 am Export von STAT1 konnte durch CRM1-Inhibition und die *in-vitro*-Bindung von rekombinantem STAT1 an CRM1 demonstriert werden (Begitt et al., 2000; McBride et al., 2000). Dementsprechend wurden drei Leuzin-reiche Sequenzen, die für die Bindung an CRM1 typisch sind, im Vier-Helix-Bündel und der DNA-Bindedomäne von STAT1 identifiziert (Begitt et al., 2000; McBride et al., 2000; Mowen und David, 2000). Da eine Inhibition des Exportrezeptors CRM1 den Export von STAT1 nicht vollständig unterbinden kann, müssen aber noch weitere Mechanismen für den Transport von STAT1 aus dem Kern existieren (Begitt et al., 2000).

Es gibt Befunde, die mit der allgemein akzeptierten Vorstellung von latenten, im Cytoplasma lokalisierten Transkriptionsfaktoren, die erst nach Stimulations-induzierter Tyrosin-Phosphorylierung in den Zellkern translozieren, nicht mehr bruchlos zu vereinbaren sind. So erfolgt eine STAT1-abhängige, konstitutive Genexpression unabhängig von Cytokin-Stimulation und Tyrosin-Phosphorylierung (Kumar et al., 1997; Chatterjee-Kishore et al., 2000; Ramana et al., 2000) und Zelltyp-spezifische Mengen von unphosphoryliertem STAT1 und STAT3 konnten im Zellkern aller untersuchten Zellen bereits vor Cytokin-Stimulation nachgewiesen werden (Ram et al., 1996; Chatterjee-Kishore et al., 2000; Meyer et al., 2002a).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Kerntransport von STAT1 und dessen Rolle für die Cytokin-induzierte Genexpression. Es werden STAT1-Mutanten charakterisiert, deren Kernimport durch Cytokin-Stimulation unterbunden wird, während, wie gezeigt werden kann, in unstimulierten Zellen ein konstitutiver Kerntransport ungehindert stattfindet. Die unterschiedlichen Translokationseigenschaften von Tyrosin-phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1 werden ausgenutzt, um einen Assay zu etablieren, der es erstmals ermöglicht den Kernexport von

STAT1 in Cytokin-stimulierten Zellen zu analysieren. Hierbei zeigt sich, dass über die Expression der alternativ gespleißten Transaktivierungsdomäne und ihrer Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung der Kernexport von STAT1 reguliert wird. Wie gezeigt werden kann, kontrolliert der Export die Aktivierbarkeit der beiden Spleißvarianten STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$ , die sich stark im Ausmaß ihrer Tyrosin-Phosphorylierung unterscheiden. Der Kernexport von STAT-Transkriptionsfaktoren spielt demzufolge eine wichtige stimulatorische Rolle bei der Cytokin-induzierten Genexpression. Zusammen mit anderen Studien unserer Arbeitsgruppe haben die hier vorgestellten Ergebnisse zu einem neuen Modell der STAT-Aktivierung geführt, das in dieser Arbeit diskutiert werden wird.