

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem nucleo-cytoplasmatischen Transport von STAT1 und dessen Rolle für die Stärke und Spezifität einer Cytokin-Antwort.

Ausgangspunkt dieser Studie war die verblüffende Beobachtung einer Cytokin-induzierten Akkumulation von N-terminal deletierten STAT1-Derivaten im Cytoplasma. Gemäß dem ursprünglichen, etablierten Modell handelt es sich bei den STAT-Proteinen um latente, im Cytoplasma lokalisierte Transkriptionsfaktoren, die erst nach Cytokin-induzierter Tyrosin-Phosphorylierung in den Zellkern translozieren. Mit diesem Modell, das die Präsenz von STAT-Molekülen im Kern unstimulierter Zellen nicht vorsieht, war der beobachtete Phänotyp einer Cytokin-induzierten „Kern-frei-Bewegung“ nicht erklärbar. Durch den Nachweis eines konstitutiv nukleären STAT1-Pools in verschiedenen Zelllinien hatte dieses Modell jedoch bereits Risse bekommen (Ram et al., 1996; Chatterjee-Kishore et al., 2000; Meyer et al., 2002a). Unterstützt wurden die Zweifel an der lehrbuchmäßigen Vorstellung von latenten, cytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren auch durch die Beschreibung einer konstitutiven Genaktivierung durch nicht-Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 (Kumar et al., 1997; Chatterjee-Kishore et al., 2000; Stephanou et al., 2001), welches vermutlich die Präsenz des Proteins im Kern erfordert.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikroinjektions-Experimente mit rekombinantem STAT1 demonstrieren, dass unphosphoryliertes STAT1 entgegen dem etablierten Modell tatsächlich zur Passage der Kernmembran in der Lage ist (Abbildung 9). Bereits 15 Min. nach cytoplasmatischer Mikroinjektion zeigt unphosphoryliertes STAT1 eine panzelluläre Verteilung. Dieser Befund stimmt mit vorausgegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe überein, in denen der konstitutive Kerntransport von endogenem STAT1 in unstimulierten Zellen durch Antikörper-Mikroinjektion sichtbar gemacht wurde (Meyer et al., 2002b). Im Widerspruch zu der ursprünglichen Vorstellung findet demzufolge bereits in unstimulierten Zellen ein konstitutiver Kernimport von unphosphoryliertem STAT1 mit hohen Translokationsraten statt.

Weiterhin wird in der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass der N-Terminus auf den konstitutiven Kernimport von unphosphoryliertem STAT1 keinen Einfluss hat (Abbildung 9). Dagegen ist der N-Terminus für die Interaktion von STAT1 mit dem Importrezeptor Importin  $\alpha 5$  und somit für den Kernimport des Tyrosin<sup>701</sup>-phosphorylierten Moleküls erforderlich (Abbildung 10; Abbildung 11). Der Kernimport von STAT1 verläuft folglich über zwei getrennte Wege: Wäh-

rend Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1 auf die Bildung eines Transportkomplexes mit Importin  $\alpha 5$  und Importin  $\beta$  angewiesen ist (Sekimoto et al., 1996, 1997) und somit der Expression des N-Terminus bedarf, ist der Kernimport des unphosphorylierten Proteins hiervon unabhängig. Zu dem gleichen Ergebnis führt auch die Mutation eines Importsignals, das sich in der DNA-Bindedomäne von STAT1 befindet. Auch diese Mutation unterbindet selektiv den Kernimport von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 und die Induktion Interferon-abhängiger Gene, während der Kerntransport von unphosphoryliertem STAT1 und die konstitutive Genexpression nicht betroffen sind (Meyer et al., 2002b).

In Unkenntnis dieser zwei Wege konnte keine Einigkeit über die Bedeutung des N-Terminus für den Kernimport von STAT1 erzielt werden (Shuai et al., 1996; Strehlow und Schindler, 1998; Haspel und Darnell, 1999). Aus den hier vorgestellten Ergebnissen geht nun aber klar hervor, dass der N-Terminus ausschließlich für den Kernimport von Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 erforderlich ist und auf den konstitutiven Kerntransport des unphosphorylierten Proteins keinen Einfluss hat.

Ebenso wie das Importsignal aus der DNA-Bindedomäne von STAT1 (Meyer et al., 2002b) stellt auch der N-Terminus kein autonomes, übertragbares Kernlokalisierungssignal dar (Meissner, 2004), sondern funktioniert nur im Kontext des Tyrosin-phosphorylierten Dimers. Es gibt bislang keine Daten darüber, ob auch die Amino-Termini anderer STAT-Proteine für die Bildung eines Transportkomplexes mit Importin  $\alpha$  und  $\beta$  notwendig sind. Eine Deletion des N-Terminus führt jedoch auch bei STAT5b zum Verlust der Kernakkumulation nach Cytokin-Stimulation, während die nukleäre Präsenz des Proteins in unstimulierten Zellen nicht betroffen ist (Zeng et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass auch für STAT5b zwei unabhängige Importwege existieren, von denen nur der Import des Tyrosin-phosphorylierten Moleküls einer intakten N-Domäne bedarf. Da die Amino-Termini verschiedener STAT-Proteine, trotz großer Sequenz-Homologien, unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen scheinen, kann jedoch nicht vorausgesagt werden, ob die für STAT1 erzielten Ergebnisse ohne weiteres auch auf andere STAT-Proteine übertragbar sind. So ist im Gegensatz zu STAT1, STAT3 und STAT5 (Wang et al., 2000; Zhang et al., 2000; Zeng et al., 2002; Meyer et al., 2004) der N-Terminus von STAT4 für die Bindung an den Cytokin-Rezeptor und die nachfolgende Tyrosin-Phosphorylierung erforderlich (Murphy et al., 2000).

Wie am Verhalten von N-terminal verkürzten STAT1-Derivaten demonstriert wurde, findet in unstimulierten Zellen nicht nur ein konstitutiver Kernimport, sondern auch ein konstitutiver Ex-

port statt. Mit einem linearen Signalweg, der vom Cytoplasma in den Zellkern führt und dort endet ist das Phänomen einer „Kern-frei-Bewegung“ nicht kompatibel. Geht man jedoch von einem Signalzyklus aus, der durch einen kontinuierlichen nucleo-cytoplasmatischen Austausch geprägt ist, so sollte, wenn der Kernimport unterbunden oder verlangsamt wird, der fortlaufende Export zu einer Akkumulation des pendelnden Proteins im Cytoplasma führen. Genau dies wird nach Cytokin-Stimulation N-terminal deletierter STAT1-Derivate beobachtet (4.1).

Zunächst verhindert eine Deletion des N-Terminus den Import des Tyrosin<sup>701</sup>-phosphorylierten Moleküls. Da der N-Terminus auch für die Inaktivierung des Proteins erforderlich ist (Abbildung 8), reichert sich nach Cytokin-Stimulation phosphoryliertes Protein irreversibel an und die Menge an unphosphoryliertem STAT1, das für einen konstitutiven Import zur Verfügung steht, nimmt ab. Der Import versiegt und der fortlaufende Export resultiert in der Akkumulation des Proteins im Cytoplasma. Innerhalb von 80 Min. verringert sich die nukleäre Konzentration des zu Beginn der Messung nahezu panzellulär verteilten STAT1 $\Delta$ N um die Hälfte (Abbildung 14). Es handelt sich hierbei also um einen Prozess, der quantitative Mengen des zellulären STAT1-Pools betrifft. Die Rate der „Kern-frei-Bewegung“ entspricht dabei allerdings nicht der tatsächlichen Exportrate, sondern wird durch den, wenn auch sukzessiv abnehmenden Import des unphosphorylierten Moleküls verringert.

Eine Reihe von Experimenten bestätigen den konstitutiven Export von STAT1 in unstimulierten Zellen. So führt die cytoplasmatische Immobilisierung von GFP-markiertem STAT1 $\alpha$  durch Injektion eines GFP-spezifischen Antikörpers zu einer cytoplasmatischen Akkumulation des pendelnden Proteins innerhalb von einer Stunde (Abbildung 15). Und auch die Mikroinjektion von rekombinantem STAT1 in den Zellkern ruhender Zellen resultiert innerhalb von zwei Stunden in einer panzellulären Verteilung (Abbildung 15; Marg et al., 2004).

Die Exportraten, die in diesen Experimenten mit GFP-markierten oder rekombinanten Proteinen bestimmt wurden, erscheinen aber relativ niedrig. Endogenes STAT1 erreicht dagegen bereits 15 Min. nach cytoplasmatischer Antikörper-Mikroinjektion eine maximale Akkumulation im Cytoplasma (Marg et al., 2004). Für diese Diskrepanz gibt es mehrere Ursachen. Zum einen ist die Rate der cytoplasmatischen Akkumulation von N-terminal verkürzten STAT1-Derivaten durch den entgegen wirkenden Import langsamer als die tatsächliche Exportrate. Zum anderen wird der konstitutive Kerntransport von unphosphoryliertem STAT1 durch GFP-Fusion beeinträchtigt (persönliche Mitteilung von Dr. T. Meyer, Manuskript in Vorbereitung; Bhattacharya

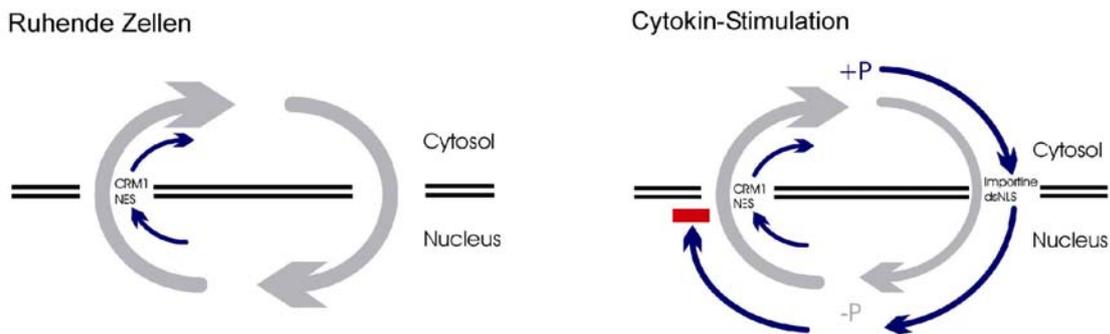
und Schindler, 2002). Dies ist, wie in der Arbeit von Meyer gezeigt werden wird, auch der Grund dafür, dass der konstitutive nucleo-cytoplasmatische Transport von STAT1, der bislang ausschließlich mit GFP-markierten Derivaten untersucht worden ist, lange Zeit übersehen oder unterschätzt wurde (Lillemeier et al., 2001; Köster et al., 2005). Auch der Export von rekombinantem, aus Insektenzellen aufgereinigtem Protein ist gegenüber dem Export von endogenem STAT1 verzögert (Marg et al., 2004). Fehlende posttranslationale Modifikationen könnten hierfür eine Ursache sein.

Wie aus dieser Arbeit klar hervorgeht, trifft die in der Literatur allgemein vertretene Meinung, dass es sich bei den STAT-Proteinen um strikt cytoplasmatische Proteine handelt, die erst nach Aktivierung in den Zellkern translozieren, für STAT1 somit nicht zu. Vielmehr findet bereits in ruhenden Zellen ein schneller und quantitativer Austausch zwischen cytoplasmatischem und nukleärem Kompartiment statt. Kürzlich konnte von uns demonstriert werden, dass dieser konstitutive Kerntransport unabhängig von Transportfaktoren und Energie ist und über eine direkte Interaktion mit Proteinen des Kernporenkomplexes erfolgt (Marg et al., 2004). Zusätzlich zum Transportfaktor-unabhängigen Transport ist auch der Exportrezeptor CRM1 am Export von STAT1 beteiligt. Ein CRM1-abhängiger Export wurde schon vor einiger Zeit für STAT1 beschrieben. Zunächst wurde jedoch angenommen, dass dieser ausschließlich an der Aufhebung der Cytokin-induzierten Kernakkumulation beteiligt ist (Begitt et al., 2000; McBride et al., 2000). Erst jetzt konnte gezeigt werden, dass es sich auch hierbei um einen konstitutiven Prozess handelt, der bereits in unstimulierten Zellen aktiv ist (Marg et al., 2004). Die in dieser Arbeit beschriebene Beobachtung einer durch CRM1-Inhibition verzögerten „Kern-frei-Bewegung“ bestätigt dies (Abbildung 19).

Wie die Mikroinjektions-Experimente mit rekombinantem STAT1 $\Delta$ N offenbaren, unterbindet eine Tyrosin-Phosphorylierung die Transportfaktor-unabhängige Kernporenpassage des Proteins. Im Gegensatz zum unphosphorylierten Molekül ist Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 $\Delta$ N nicht mehr in der Lage, das injizierte nukleäre oder cytoplasmatische Kompartiment zu verlassen (Abbildung 10). Dies zeigt, dass, in starkem Gegensatz zum ursprünglichen Modell, ausschließlich unphosphoryliertes STAT1 über die uneingeschränkte Fähigkeit zum Kernim- und export verfügt. Der Kernimport von STAT1 ist nach Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung auf die Interaktion mit dem Importrezeptor Importin  $\alpha$ 5 angewiesen (und bedarf daher der N-Domäne). Ein Exportme-

chanismus für Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertes STAT1 existiert dagegen nicht und STAT1 verbleibt bis zu seiner Dephosphorylierung im Kern (Meyer et al., 2003).

Diese Ergebnisse, die mit dem ursprünglichen Modell nicht mehr in Einklang zu bringen sind, haben uns veranlasst, ein revidiertes Modell aufzustellen, das die STAT-Aktivierung als einen dynamischen Signalzyklus beschreibt, der auf konstitutiven und induzierten Transportprozessen beruht (Abbildung 38; Vinkemeier, 2004).



**Abbildung 38: Modell des nucleo-cytoplasmatischen Transports von STAT1 in unstimulierten Zellen und während einer Interferon-Stimulation.**

Der Transportfaktor-unabhängige Transport ist durch graue, der Transportfaktor-abhängige durch blaue Pfeile gekennzeichnet. Der rote Balken symbolisiert den Exportblock für Tyrosin-phosphoryliertes STAT1. (+P) bezeichnet Tyrosin-Phosphorylierung und Dimerisierung, (-P) Dephosphorylierung (aus Vinkemeier, 2004).

Wie dieses Modell impliziert, ist ein kontinuierlicher nucleo-cytoplasmatische Austausch funktionell bedeutsam, um die Dauer der Transkriptionsfaktoraktivität im Kern mit dem Aktivierungszustand der membranständigen Rezeptoren im Cytoplasma zu koppeln. Durch eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte dieses Konzept experimentell bestätigt werden (Meyer et al., 2003). Die vorliegende Arbeit demonstriert nun erstmals, dass dem nucleo-cytoplasmatischen Transport darüber hinaus noch eine zusätzliche Funktion zukommt. Über die Regulation der Transportrate kann das Signal, das vom Rezeptor ausgeht, moduliert werden. Wie unsere Daten enthüllen, spielt der Kernexport eine kritische Rolle für die Aktivierung der beiden Spleißvarianten STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$ , die sich, bei gleicher Affinität zum Rezeptor-Kinase-Komplex, stark in der Amplitude ihrer Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung sowie der Signaldauer unterscheiden.

Das unterschiedliche Exportverhalten von STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$  konnte in mehreren Experimenten demonstriert werden (4.2). Während rekombinantes STAT1 $\alpha$  bereits zwei Stunden nach nukleärer Mikroinjektion eine panzelluläre Verteilung erreicht, ist STAT1 $\beta$  zu dieser Zeit noch

ausschließlich nukleär und zeigt eine panzelluläre Verteilung erst nach weiteren zwei Stunden (Abbildung 16; Marg et al., 2004). Auch die cytoplasmatische Akkumulation nach Cytokin-Stimulation erfolgt bei einem N-terminal verkürzten Derivat von STAT1 $\alpha$  (STAT1 $\Delta$ N) innerhalb von 50 Min., während das entsprechende Derivat von STAT1 $\beta$  (STAT1tc) hierfür 160 Min. benötigt (Abbildung 13). In Einklang mit unserem Modell wird eine Regulation der Exportrate in unstimulierten und stimulierten Zellen beobachtet (4.2) und wirkt sich dementsprechend sowohl auf die Ruheverteilung von STAT1 als auch auf die Dauer der Kernakkumulation aus. So zeigt STAT1 $\beta$  in unstimulierten Zellen eine stärkere nukleäre Präsenz als STAT1 $\alpha$  (Abbildung 28A, B; Abbildung 34B, D: keine Stimulation) und kehrt nach Cytokin-Stimulation deutlich langsamer in den Ausgangszustand vor Stimulation zurück (Abbildung 34D, E). Wie aus Western-Blot-Experimenten klar hervorgeht, ist die verlängerte Kernakkumulationsphase von STAT1 $\beta$  auf eine verlängerte Kernretention unphosphorylierter Moleküle zurückzuführen (Abbildung 34C).

In vielen Fällen hat eine verlängerte Aufenthaltsdauer im Kern einen positiven Einfluss auf die Funktionen eines Transkriptionsfaktors (Poon und Jans, 2005). Nicht so bei STAT1. Hier führt die Inhibition der Exportrate zu einer Reduktion der spezifischen Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung und damit verbunden zur Abnahme der Transkriptionsleistung (Kapitel 4.4; Begitt et al., 2000). Exportiert wird in diesem Fall jedoch ausschließlich das inaktive Molekül (Abbildung 10; Meyer et al., 2003), das ins Cytoplasma zurückkehren muss, um rephosphoryliert zu werden. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die Halbwertszeit der Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT-Proteinen nur wenige Minuten beträgt (Abbildung 24; Haspel et al., 1996; Haspel und Darnell, 1999; Lerner et al., 2003; Swameye et al., 2003). Demzufolge findet auch während einer Kernakkumulation ein schneller nucleo-cytoplasmatischer Austausch statt (Meyer et al., 2003). Ein effizienter Export ist daher, wie die vorliegende Arbeit eindrucksvoll belegt, von großer Bedeutung für die konsekutive Tyrosin<sup>701</sup>-Rephosphorylierung und die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Menge transkriptionell aktiver Moleküle. Dies erklärt, warum die Inhibition des Exportrezeptors CRM1 oder die Mutation von Exportsignalen die Transkriptionsaktivität von STAT1 reduziert (Abbildung 37; Begitt et al., 2000). Umgekehrt kann die spezifische Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung und somit die Transkriptionsleistung von STAT1 durch eine Steigerung der Exportrate erhöht werden.

Die Aktivierung der STAT-Proteine ist ein affinitätsgeleiteter Prozess und daher abhängig von den Konzentrationen an unphosphoryliertem, cytoplasmatischem STAT und phosphoryliertem

Rezeptor (Greenlund et al., 1995; Schindler et al., 1995). Wie die vorliegende Arbeit demonstriert, unterscheiden sich STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$  in ihrer Exportkinetik und somit der Konzentration im Cytoplasma. Dies wird besonders deutlich in stimulierten Zellen, wenn durch Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung und den damit verbundenen Kernimport der cytoplasmatische Pool an unphosphoryliertem STAT1 verringert wird. Der Export unphosphorylierter Moleküle aus dem Kern wirkt dem entgegen und die cytoplasmatische STAT1-Konzentration wird wieder erhöht. Dies geschieht allerdings in unterschiedlichem Umfang, und der effizientere Export von STAT1 $\alpha$  im Vergleich zu STAT1 $\beta$  resultiert in einer höheren cytoplasmatischen Verfügbarkeit von STAT1 $\alpha$ . Aus diesem Grund kommt es bei gleicher Affinität zum Rezeptor zu der bevorzugten Aktivierung von STAT1 $\alpha$  (Kapitel 4.4). Werden die Translokationsdifferenzen aufgehoben, so ist auch die Aktivierbarkeit und spezifische Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung der beiden Proteine vergleichbar (Abbildung 23). Über die Regulation der Verfügbarkeit am Rezeptor-Kinase-Komplex bestimmt die Exportrate demzufolge die Cytokin-Sensitivität der beiden Spleißvarianten.

Eine im Vergleich zu STAT1 $\beta$  um den Faktor zwei erhöhte spezifische Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 $\alpha$  wird auch von Murphy und Kollegen in Maus-Makrophagen beobachtet (Gao et al., 2000). Die von den Autoren geäußerte Vermutung einer effektiveren Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung von STAT1 $\alpha$  kann demzufolge durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Wie unsere Arbeit zeigt, ist der Grund für die effektivere Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung ein effizienterer Export.

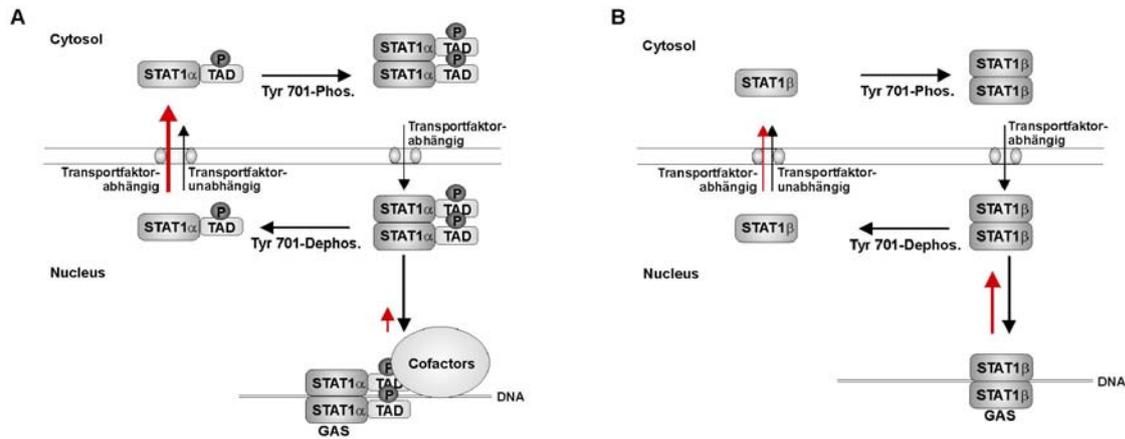
Die Möglichkeit, die STAT1-Aktivierung durch Modulation der subzellulären Verteilung zu regulieren, steht im Einklang mit Daten, die zeigen, dass die Dissoziationskonstante des STAT1/IFN $\gamma$ -Rezeptor-Komplexes (50-140 nm; Greenlund et al., 1995; Schindler et al., 1995) höher ist als die zelluläre STAT1-Konzentration (40 nm für HeLa-Zellen; unveröffentlichte Daten).

Es konnte gezeigt werden, dass über die strukturelle Komplementarität der Tyrosinphosphorylierten Bindestellen am Rezeptor und der SH2-Domänen der STAT-Proteine die selektive Aktivierung einzelner STAT-Proteine ermöglicht und so das Ausmaß und die Spezifität einer Cytokin-Antwort bestimmt wird (Greenlund et al., 1995; Heim et al., 1995; Schindler et al., 1995). Die hier vorgestellten Ergebnisse identifizieren nun den Kernexport als weiteren Mechanismus, der die differentielle Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren kontrolliert und so die Spezifität und Signalstärke einer Cytokin-Antwort reguliert.

Die kritische Bedeutung, die der Export von STAT1 für die Signalstärke einer Cytokin-Antwort hat, wird durch eine noch unveröffentlichte Arbeit aus unserem Labor bestätigt. In einem quantitativen Modell der STAT1-vermittelten IFN $\gamma$ -Antwort wird der Kernexport neben der Konzentration der nukleären Phosphatase als sensitivster Parameter des Systems identifiziert (Meyer et al., in Vorbereitung). Eine Veränderung der Exportrate hat den größten Einfluss auf die Konzentration aktivierter STAT1-Moleküle im Kern. Im Vergleich dazu wirkt sich die Modulation der Importrate weit weniger kritisch aus. Auch die Multi-Sensitivitätsanalyse einer anderen Arbeitsgruppe erkennt die Konzentration von unphosphoryliertem, cytoplasmatischem STAT und damit den Kernexport als Schlüsselregulator für die Signalstärke und Dauer einer Cytokin-Antwort (Zi et al., 2005).

Diese Daten etablieren den konstitutiven nucleo-cytoplasmatischen Transport als wesentlichen Bestandteil der STAT1-vermittelten Cytokin-Antwort und demonstrieren, dass der konstitutive, Signal-unabhängige, nucleo-cytoplasmatische Transport und der Signal-induzierte Kerntransport eng miteinander verwoben sind, um die Expression Cytokin-abhängiger Gene zu regulieren.

Bemerkenswerterweise ist die Domäne, die den Export von STAT1 erleichtert und so die Aktivierbarkeit fördert, die Transaktivierungsdomäne des Proteins. Offenbar erfüllt der C-Terminus von STAT1 zwei synergistische Aufgaben um die Transkriptionsleistung von STAT1 $\alpha$  zu maximieren. Wie aus den in dieser Arbeit gezeigten Photobleichungs-Experimenten hervorgeht, ist im Kern stimulierter Zellen die Mobilität von STAT1 $\alpha$  im Vergleich zu STAT1 $\beta$  oder einer DNA-Bindemutante geringfügig, aber signifikant reduziert (Abbildung 20). Dies könnte auf die Einbindung von STAT1 $\alpha$  in Transkriptionskomplexe zurückzuführen sein, da über den C-Terminus zahlreiche transkriptionelle Kofaktoren rekrutiert werden (Zhang et al. 1996; Zhang et al., 1998; Ouchi et al., 2000; zusammengefasst in Horvath, 2000). Auf der anderen Seite demonstriert diese Arbeit, dass die Expression des C-Terminus den Export von STAT1 fördert und so die Aufenthaltsdauer im Kern minimiert. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne hat demzufolge einen entgegengesetzten Effekt auf die Kernretention von phosphoryliertem und unphosphoryliertem STAT1. Wir schlagen daher folgendes Modell vor (Abbildung 39): Im Kontext des Tyrosin-phosphorylierten Moleküls rekrutiert der C-Terminus transkriptionelle Kofaktoren und fördert so die Retention von STAT1 auf DNA. Nach Tyrosin-Dephosphorylierung erleichtert dieselbe Domäne den Kernexport und erhöht damit die Rate der Rephosphorylierung im Cytoplasma. Beide Funktionen wirken zusammen und steigern die Transkriptionsleistung von STAT1.



**Abbildung 39: Schematisches Modell zur doppelten Funktion der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) und ihrer Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung für die Aktivierbarkeit und Transkriptionsleistung von STAT1.**

(A) Die Expression der TAD und ihre Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung erleichtern den transportfaktor-unabhängigen Export von unphosphoryliertem STAT1 $\alpha$ . Dies erhöht die Verfügbarkeit am Rezeptor-Kinase-Komplex und führt zu einer maximalen Sensitivität von STAT1 $\alpha$  gegenüber extrazellulären Stimuli. Im Kontext des phosphorylierten Moleküls fördern die TAD und eine Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung die Einbindung in Transkriptionskomplexe auf DNA. Beide Funktionen wirken synergistisch und steigern die Transkriptionsleistung von STAT1 $\alpha$ . (B) Der Export der Spleißvariante ohne TAD, STAT1 $\beta$ , ist dem gegenüber reduziert. Dies hat eine im Vergleich zu STAT1 $\alpha$  verlängerte Kernakkumulationsphase und eine verminderte Cytokin-Sensitivität zur Folge. Die Mobilität von phosphoryliertem STAT1 $\beta$  im Kern ist vermutlich aufgrund einer schwächeren Interaktion mit transkriptionellen Kofaktoren erhöht.

Aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne ist STAT1 $\beta$  nicht in der Lage, transkriptionelle Kofaktoren zu rekrutieren und daher, trotz einer mit STAT1 $\alpha$  vergleichbaren DNA-Bindung, unfähig, die Expression IFN $\gamma$ -abhängiger Zielgene und die Etablierung einer antiviralen Antwort auszulösen (Shuai et al., 1993; Bromberg et al., 1996; Horvath und Darnell, 1996; Zakharova et al., 2003). Aus diesem Grund wird angenommen, dass STAT1 $\beta$  als negativer Regulator von STAT1 $\alpha$  wirkt. Die hier demonstrierte niedrige Cytokin-Sensitivität von STAT1 $\beta$  lässt es jedoch unwahrscheinlich erscheinen, dass STAT1 $\beta$  ein negativer Regulator für transkriptionell aktives, Tyrosin-phosphoryliertes STAT1 $\alpha$  ist. Vielmehr ist zu vermuten, dass STAT1 $\beta$  eine Funktion als unphosphoryliertes Protein erfüllt.

Zu diesem Ergebnis kommen auch Holzmann und Kollegen in einer Arbeit, die zeigt, dass STAT1 $\beta$  in einem zehnfachen molaren Überschuss zu STAT1 $\alpha$  vorliegen muss, um eine maximale Inhibition STAT1 $\alpha$ -abhängiger Zielgene zu erreichen (Walter et al., 1997). In den meisten bislang untersuchten Zellen ist die Konzentration von STAT1 $\beta$  jedoch um ein Vielfaches niedri-

ger als die von STAT1 $\alpha$ . Bislang ist nicht bekannt, ob und wie alternatives Spleißen und damit das Verhältnis der beiden Spleißformen zueinander reguliert wird.

Auch den C-terminal verkürzten Derivaten von STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 werden dominant-negative Eigenschaften zugeschrieben (Caldenhoven et al., 1996; Moriggl et al., 1996; Wang et al., 1996;). Experimente mit transgenen Mäusen haben jedoch demonstriert, dass zumindest STAT3 $\beta$  und STAT4 $\beta$  *in vivo* nicht als negative Regulatoren wirken, sondern eigenständige Aufgaben erfüllen (Yoo et al., 2002; Hoey et al., 2003; Maritano et al., 2004).

Wie aus mehreren Experimenten hervorgeht, erleichtert nicht nur die Expression des C-Terminus, sondern auch die Signal-abhängige Phosphorylierung eines konservierten Serinrestes im C-Terminus den Export von STAT1 (Kapitel 4.2). Dementsprechend wird die Dauer der Kernakkumulationsphase nach Cytokin-Stimulation durch die Mutation der Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierungsstelle verlängert (Abbildung 28; Abbildung 29). Die Auswirkungen der Punktmutation sind allerdings schwächer als die Deletion der gesamten Domäne.

Es stellte sich daher die Frage, ob der Einfluss einer durch Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung gesteigerten Exportrate auf die Aktivierbarkeit von STAT1 demonstriert werden kann. Ein Zusammenhang zwischen Serin<sup>727</sup>- und Tyrosin<sup>701</sup>-Phosphorylierung wurde bereits mehrfach untersucht, ohne einen positiven Effekt der Serin-Phosphorylierung auf die Tyrosin-Phosphorylierung aufzeigen zu können (Wen et al., 1995; Wen und Darnell, 1997; Kovarik et al., 2001; Pilz et al., 2003). Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte quantitative Western-Blot-Analyse kann keine statistisch signifikante Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung nach Mutation der Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierungsstelle nachweisen (Abbildung 25). Die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung der Punktmutante liegt zwar in wiederholten Experimenten zu nahezu jedem Zeitpunkt unter der von wildtypischem STAT1 $\alpha$ , der Unterschied ist aber deutlich kleiner als der zwischen STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$ . Die Auswertung von vier unabhängigen Experimenten ergibt nur für zwei der sechs Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied (Abbildung 25). Da für eine quantitative Analyse Western-Blot-Experimente nebeneinander beladen, transferiert, inkubiert und entwickelt werden müssen, ist die Anzahl statistisch miteinander vergleichbarer Experimente begrenzt. Hinzu kommt, dass die Werte der spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung zwischen den vier Experimenten variieren. Drückt man die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung der Punktmutante jedoch in Prozent der vom Wildtyp erreichten Tyrosin-Phosphorylierung aus, so ergeben

die vier Experimente, die der Grafik in Abbildung 25 zu Grunde liegen, eine im Mittel um knapp 30% reduzierte spezifische Tyrosin-Phosphorylierung.

Auch in Reporter-Experimenten gelang es, den Beitrag, den eine erhöhte Exportrate an der durch Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung gesteigerten Transkriptionsleistung hat, herauszuarbeiten. Unter Bedingungen, die eine kontinuierliche Rephosphorylierung im Cytoplasma erfordern, reduziert eine Serin<sup>727</sup>-Mutation die Reporterexpression auf 20% (Abbildung 37B: WT). Spielt der Export dagegen keine Rolle für eine nachhaltige Tyrosin-Phosphorylierung, so ist auch der Effekt einer Serin<sup>727</sup>-Mutation auf die Transkriptionsleistung kleiner. In diesem Kontext behält die Serin<sup>727</sup>-Mutante 36% ihrer ursprünglichen Aktivität (Abbildung 37B: F77). Dies verweist auf eine stimulatorische Rolle der Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung für die Aktivierbarkeit von STAT1.

Ein ähnlicher Versuch wird von Milocco und Kollegen (1999) beschrieben. In diesem Fall wird eine Entkopplung von Tyrosin-Phosphorylierung und Kerntransport durch die Fusion von STAT1 mit der Hormon-induzierbaren Dimerisierungs-Domäne des Östrogenrezeptors erreicht. Auch in diesem Kontext wirkt sich eine Serin-Mutation weniger negativ auf die Reporterexpression aus (Milocco et al., 1999).

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass nicht alle STAT1-Zielgene im gleichen Ausmaß von einer Serin<sup>727</sup>-Mutation betroffen sind (Kovarik et al., 2001; Varinou et al., 2003). Der Grund hierfür könnte zum einen in einer Promotor-spezifischen Anforderung an die Zusammensetzung der Transkriptionsfaktor-Koaktivator-Komplexe liegen. Denkbar wäre auch, dass insbesondere Promotoren mit schwachen STAT1-Bindestellen abhängig von der Konzentration an aktiviertem, Tyrosin<sup>701</sup>-phosphoryliertem STAT1 sind. In diesen Fällen genügen niedrige Stimulations-Intensitäten eventuell nicht aus, um eine ausreichende Promotorbesetzung zu gewährleisten. Eine zusätzliche Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung könnte die STAT1-Aktivierung über einen kritischen Schwellenwert erhöhen. Unter hohen Stimulationsbedingungen wäre der Einfluss einer Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung dagegen vernachlässigbar.

Da die C-Termini der STAT-Proteine untereinander nicht sehr homolog sind, wurde vermutet, dass sie zur Spezifität einer Cytokin-Antwort beitragen (Kisseleva et al., 2002; Goenka et al., 2003). Domänen-Austausch-Experimente konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Zwar unterscheiden sich einzelne C-Termini um ein Vielfaches in der Stärke ihrer Genaktivierung, einen Einfluss auf die Spezifität einer Cytokin-Antwort hat dies aber nicht (Moriggl et al., 1997; Shen und Darnell, 2000). Spezifität verleihen die C-Termini allerdings hinsichtlich der

Kinasen, die ihre Serin-Phosphorylierung katalysieren (Kovarik et al., 2001). Eine Stimulationsabhängige Serin-Phosphorylierung wurde außer für STAT1 auch für STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 beschrieben (zusammengefasst in Decker und Kovarik, 2000). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen es denkbar erscheinen, dass die Serin-Phosphorylierung zusätzlich zu einer gesteigerten Transkriptionsleistung auch die Aktivierbarkeit erhöht und so zu einer bevorzugten Aktivierung bestimmter STAT-Proteine beiträgt. Auf diese Weise würde nicht nur die Genexpression gesteigert, sondern auch das Profil einer Cytokin-Antwort geschärft werden.

Ungeklärt bleibt der Mechanismus, durch den die Expression des C-Terminus sowie die Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung die Exportaktivität steigern. Der C-Terminus von STAT1 enthält weder eine für die Bindung an den Exportrezeptor CRM1 typische, hydrophobe Signalsequenz noch ist seine Exportaktivität auf andere Proteine übertragbar (Abbildung 17; Abbildung 18). Auch die Beobachtung, dass die Translokationsunterschiede zwischen STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$  nach CRM1-Inhibition erhalten bleiben (Abbildung 19), spricht gegen die Beteiligung dieses Exportrezeptors.

Neben CRM1 gibt es noch eine Reihe anderer Exportine. Hierzu gehören CAS, der Exportrezeptor für Importin  $\alpha$  (Kutay et al., 1997) oder die Exportine 4, 6 und 7, für die bislang nur wenige Cargo-Proteine identifiziert wurden (zusammengefasst in Pemberton und Paschel, 2005). Ein relativ gut untersuchter Exportrezeptor, dessen Substrate nach Phosphorylierung verstärkt exportiert werden, ist das Hefe-Homolog von Exportin 4, Msn5p (zusammengefasst in Kaffman und O'Shea, 1999). Außer diesen Exportrezeptoren, die zur Familie der Karyopherine gehören, kennt man noch die Rezeptoren der TAP/NXF-Familie, die für den mRNA-Export verantwortlich sind (zusammengefasst in Lei und Silver, 2002) und Calreticulin, ein Calcium-abhängiges Chaperon, das als Exportrezeptor des Glucocorticoidrezeptors beschrieben wurde (Holaska et al., 2001). Einen Hinweis darauf, dass einer dieser Transportrezeptoren am Export von STAT-Proteinen beteiligt sein könnte, gibt es aber nicht. Einige Proteine, darunter BRCA1 und MCM5, die abhängig von einer Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung mit dem C-Terminus von STAT1 interagieren, fördern auf zum Teil noch unverstandene Weise die Transkriptionsleistung von STAT1 (Zhang et al., 1998; Ouchi et al., 2000). Interessanterweise wurde sowohl für BRCA1 als auch für MCM5 ein nucleocytoplasmatischer Austausch beschrieben (Zhang et al., 1998; Henderson, 2005). Ob eines dieser Proteine den Export von STAT1 fördert, ist aber nicht bekannt.

Eine weitere Möglichkeit, Transportraten zu kontrollieren, ist die regulierte Bindung an nukleäre oder cytoplasmatische Retentionsfaktoren (zusammengefasst in Xu und Massague, 2004; Poon und Jans, 2005). Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass die reduzierte Exportrate von STAT1 $\beta$  auf eine erhöhte Bindung an nukleäre Retentionsfaktoren zurückzuführen ist. Gegen die Hypothese einer verbesserten Affinität zu nukleären Bindungsstellen spricht neben den Photobleichungs-Experimenten (Abbildung 20) auch die Tatsache, dass STAT1 $\beta$  trotz seiner reduzierter Exportgeschwindigkeit nicht im Kern unstimulierter Zellen akkumuliert. Vielmehr scheint sich im Gleichgewichtszustand die Importrate an die langsamere Exportrate anzupassen.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand erscheint es am wahrscheinlichsten, dass der C-Terminus von STAT1 den Transportfaktor-unabhängigen Export von STAT1 beeinflusst. Zu den wenigen bislang identifizierten Proteinen, die aufgrund ihrer Affinität zu Proteinen des Kernporenkomplexes (Nukleoporinen) zu einer direkten Kernporenpassage befähigt sind, gehören neben den Transportrezeptoren der Karyopherin- und TAP/NXF-Familie auch einige Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktoren wie SMAD2, SMAD3, SMAD4, ERK2 und  $\beta$ -Catenin (Adachi et al., 1999; Yokoya et al., 1999; Eleftheriou et al., 2001; Matsubayashi et al., 2001; Whitehurst et al., 2002; Xu et al., 2002; Xu et al., 2003; zusammengefasst in Görlich und Kutay, 1999; Macara, 2001; Bednenko et al., 2003b; Pemberton und Paschel, 2005; Peters, 2005).

Das derzeit am besten charakterisierte Kernporen-translozierende Protein, Importin  $\beta$ , verfügt über zwei Nukleoporin-Bindestellen, die sich an entgegengesetzten Seiten des Moleküls befinden. Gerace und Kollegen konnten kürzlich nachweisen, dass, obwohl die zweite Nukleoporin-Bindestelle nur eine vergleichsweise geringe Affinität zu Nukleoporinen aufweist, beide Domänen für die schnelle Translokation von Importin  $\beta$  durch die Kernpore erforderlich sind (Bednenko et al., 2003a). Interessanterweise wurden auch für TAP/NFX1, NTF2, Exportin-t und  $\beta$ -Catenin jeweils zwei Nukleoporin-Bindestellen beschrieben (Grant et al., 2002; Kuersten et al., 2002; Suh und Gumbiner, 2003; zusammengefasst in Bednenko et al., 2003b).

Wie aus der Arbeit von Marg (2004) hervorgeht, ist im Fall von STAT1 die sogenannte Verbindungsdomäne für eine Transportfaktor-unabhängige Kernporenpassage notwendig. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen es denkbar erscheinen, dass der C-Terminus von STAT1 eine zweite Nukleoporin-Bindestelle darstellt, die für die Kernporenpassage zwar nicht erforderlich ist, die Translokationsrate jedoch erhöht. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung, dass eine Kopplung mit synthetischen Peptiden, die dem C-Terminus von STAT1 entsprechen, die Kern-

permeabilität von GST-GFP-Fusionsproteinen erhöht (Abbildung 18C). In einem Overlay-Assay, in dem die Bindung an die Nukleoporine NUP153 und NUP214 untersucht wurde, konnte jedoch kein Unterschied zwischen STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$  detektiert werden (Abbildung 21). Ob der C-Terminus tatsächlich keinen Einfluss auf die Bindung an die beiden hier eingesetzten Nukleoporin-Fragmente hat oder aber eine eventuell nur schwache Nukleoporin-Affinität im C-Terminus durch die stärkere Bindung einer anderen Domäne überdeckt wird, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht klären. Da sich der Kernporenkomplex aus rund 30 verschiedenen Proteinen zusammensetzt, existieren noch eine Vielzahl anderer potentieller Interaktionspartner, auf deren Bindung der C-Terminus einen Einfluss haben könnte. Um die Frage zu klären, ob der C-Terminus den Transportfaktor-unabhängigen Export von STAT1 beschleunigt, sind daher weitere Experimente erforderlich.

Erstaunlicherweise fördert eine Expression des C-Terminus den Export, nicht aber den Import von STAT1. So bleibt die Deletion des C-Terminus in einem Import-Assay mit Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen ohne Wirkung (Marg et al., 2004). Zusammen mit einigen anderen Befunden (Marg et al., 2004) wirft diese Beobachtung die Frage nach der richtungsspezifität der Kernporentranslokation auf. Es wird allgemein angenommen, dass die direkte Interaktion mit Nukleoporinen die Kernporenpassage in beide Richtungen ermöglicht. Ob aber der Transport in beide Richtungen über dieselben Interaktionspartner verläuft und ob sich die Transportraten in entgegengesetzten Richtungen unterscheiden, ist bisher nicht untersucht. Einige der Nukleoporine befinden sich ausschließlich auf der nukleären (NUP153) oder der cytoplasmatischen (NUP358) Seite des Kernporenkomplexes (Cronshaw et al., 2002), und es gibt Vermutungen, dass die asymmetrische Verteilung dieser Nukleoporine zur Direktionalität von Transportvorgängen beiträgt (zusammengefasst in Bednenko et al., 2003b). So konnte gezeigt werden, dass Importin  $\beta$  mit höherer Affinität an Nukleoporine der nucleoplasmatischen Seite bindet (Ben-Efraim und Gerace, 2001). *In vitro* kann die Transportrichtung von Transportrezeptor-Cargo-Komplexen jedoch durch die Umkehrung des Ran-Gradienten aufgehoben werden (Nachury und Weis, 1999). Im Gegensatz zu Transportrezeptor-Cargo-Komplexen ist die Kernporentranslokation von STAT1 aber unabhängig vom Ran-Gradienten (Marg et al., 2004). Einzel-Molekül-Mikroskopie (Kubitscheck et al., 2004; Peters, 2005) soll in Zukunft angewendet werden, um die Kinetik der Kernporentranslokation von STAT1 zu studieren und um diese Fragen zu beantworten.

Das in dieser Arbeit für STAT1 entwickelte Modell eines dynamischen Signalzyklus, der auf dem Zusammenspiel von Transportfaktor-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen beruht, kann auch auf andere Mitglieder der STAT-Familie übertragen werden. So wurde mittlerweile auch für STAT2, STAT3 und STAT5 ein konstitutiver Kerntransport in unstimulierten Zellen nachgewiesen (Zeng et al., 2002; Bhattacharya und Schindler, 2003; Pranada et al., 2003; Banning und Reich, 2004; Liu et al., 2005), der zumindest bei STAT3 und STAT5 auf einem Transportfaktor-unabhängigen Mechanismus beruht (Marg et al., 2004). Darüber hinaus deuten verschiedene Arbeiten darauf hin, dass die Aufrechterhaltung einer dauerhaften Aktivierung bei allen STAT-Proteinen kontinuierliche Zyklen von Phosphorylierung, Import, Dephosphorylierung, Export und Rephosphorylierung erfordert (Andrews et al., 2002; Swameye et al., 2002; Lerner et al., 2003). So wird beispielsweise auch für STAT5 und STAT6 eine Reduktion der Transkriptionsleistung nach CRM1-Inhibition beschrieben (Andrews et al., 2002; Swameye et al., 2002). Der hier aufgedeckte Mechanismus einer durch Modulation der Exportrate kontrollierten Aktivierbarkeit scheint demzufolge ein generelles Prinzip bei der STAT-vermittelten Cytokin-Antwort zu sein.

Ob die Beschleunigung der Exportrate in allen Fällen über die Expression des C-Terminus reguliert wird, lässt sich jedoch aufgrund der mangelnden Datenlage an dieser Stelle nicht beantworten. Interessanterweise wird aber auch im Fall von STAT3, STAT4, STAT5 und STAT6 die Expression des C-Terminus durch alternatives Spleißen oder eingeschränkte Proteolyse reguliert (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 Hoey und Schindler, 1998; Horvath, 2000; Hendry und John, 2004). Allerdings sind die C-Termini der STAT-Proteine bis auf ein konserviertes LPMSP-Motiv in STAT1, STAT3 und STAT4, an dessen Stelle STAT5 über ein ebenfalls Signal-abhängig phosphorylierbares PSP-Motiv verfügt, untereinander nicht homolog (zusammengefasst in Horvath, 2000; Decker und Kovarik, 2000).

Experimente unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der Export von C-terminal verkürztem STAT3 und STAT5 langsam und mit dem von STAT1 $\beta$  vergleichbar ist. Dies deutet darauf hin, dass auch die C-Termini dieser beiden STAT-Proteine einen Transportfaktor-unabhängigen Export erleichtern können (Marg et al., 2004). Auf der anderen Seite existieren Daten, die gegen einen positiven Einfluss des C-Terminus auf die Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener STAT-Proteine sprechen. So scheinen im Gegensatz zu STAT1 $\beta$  die C-terminal verkürzten Derivate von

STAT3, STAT4 und STAT5 nach Stimulation länger im Kern aktiv zu bleiben (Wang et al., 1996; Schaefer et al., 1997). Als Ursachen hierfür werden eine erhöhte Dimerstabilität, eine verbesserte DNA-Bindung oder ein reduzierter proteasomaler Abbau diskutiert (Moriggl et al., 1996; Park et al., 2000b; Wang et al., 2000; Hoey et al., 2003).

Interessanterweise wurde auch für *Dictyostelium* STATa eine gesteigerte Exportrate nach Signalabhängiger Serin-Phosphorylierung beschrieben (Ginger et al., 2000). Die Exportsequenz, die auch in diesem Fall kein klassisches, übertragbares, Leuzin-reiches Exportsignal darstellt, befindet sich aber im N-Terminus des Proteins (Ginger et al., 2000).

Ein ständiger Austausch zwischen nukleärem und cytoplasmatischem Kompartiment ist nicht nur ein Charakteristikum der STAT-vermittelten Cytokin-Antwort, sondern auch anderer wichtiger Signalzyklen (zusammengefasst in Cartwright und Helin, 2000; Zhu und McKeon, 2000; Brivanlou und Darnell, 2002; Fabbro und Henderson, 2003; Xu und Massague, 2004). Insbesondere zur Signaltransduktion durch SMAD-Proteine und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gibt es zahlreiche Parallelen. So wurden auch für Mitglieder dieser Familien parallel existierende Transportfaktor-abhängige und unabhängige Mechanismen beschrieben (Adachi et al., 1999; Xiao et al., 2000; Kurisaki et al., 2001; Whitehurst et al., 2002; Xu et al., 2002; Reguly und Wrana, 2003; Xu et al., 2003) und die funktionelle Bedeutung eines kontinuierlichen nucleocytoplasmatischen Austausches für die Aufrechterhaltung einer dauerhaften Aktivierung konnte für einige SMAD-Proteine bereits demonstriert werden (Inman et al., 2002). Die kritische Funktion, die dem Export bei der Aktivierung eines Signalüberträgers zukommt, könnte sich demzufolge als eine übergreifendes Regulationsprinzip bei der Weiterleitung extrazellulärer Signale in den Kern erweisen.