

## 6 Zusammenfassung

Die Bindung extrazellulärer Liganden an Rezeptoren der Zelloberfläche kann binnen weniger Minuten das Genexpressionsprofil einer Zelle grundlegend ändern. Signalüberträger wie die Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT)-Proteine, die die zelluläre Antwort auf zahlreiche Cytokine und Wachstumsfaktoren vermitteln, verbinden dabei die aktivierten Rezeptoren an der Zelloberfläche mit Transkriptionsereignissen im Kern. Wie die vorliegende Arbeit erstmals demonstriert, spielt die nucleo-cytoplasmatische Transportrate von Signalüberträgern eine kritische Rolle bei der Modulation des vom Rezeptor ausgehenden Signals. So kontrolliert der Export über die Verfügbarkeit am Rezeptor-Kinase-Komplex die Aktivierbarkeit von STAT-Transkriptionsfaktoren und reguliert damit die Spezifität und Signalstärke einer Cytokin-Antwort. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der alternativ gespleißten Transaktivierungsdomäne und ihre Signal-abhängige Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung den Export von STAT1 beschleunigen. Mechanistisch scheint diese Regulation unabhängig von nukleären Retentionsfaktoren und dem Exportrezeptor CRM1 zu sein. Die hier vorgestellten Ergebnisse enthüllen eine doppelte Funktion für die C-terminale Transaktivierungsdomäne: Zum einen reduziert die Expression des C-Terminus die intranukleäre Mobilität von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1. Dies erhöht die Retention im Kern und ist vermutlich auf die zu erwartende erhöhte Einbindung von aktiviertem STAT1 $\alpha$  in Transkriptionskomplexen auf DNA zurückzuführen. Zum anderen erleichtert dieselbe Domäne nach Tyrosin-Dephosphorylierung den Kernexport und fördert so die Rephosphorylierung im Cytoplasma. Aus diesem Grund unterscheiden sich die beiden Spleißvarianten STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$  bei gleicher Affinität zum Rezeptor-Kinase-Komplex stark in der Amplitude ihrer Tyrosin-Phosphorylierung und der Dauer des Signals. In Reporterexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Export einen Anteil von etwa 20% an der nach Serin<sup>727</sup>-Phosphorylierung erhöhten Transaktivierungsaktivität von STAT1 hat. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Analyse N-terminal deletierter STAT1-Derivate, die ergab, dass der N-Terminus von STAT1 für die Bindung an den Importrezeptor Importin  $\alpha 5$  und somit den Kernimport des Tyrosin-phosphorylierten Moleküls erforderlich ist. Dagegen wird der Kerntransport von unphosphoryliertem STAT1 von einer Deletion des N-Terminus nicht beeinflusst. Aus diesem Grund unterbleibt nach Cytokin-Stimulation eine Kernakkumulation und der fortlaufende Export wird sichtbar. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für einen neuen Assay, mit dem der Export von STAT1 in Cytokin-stimulierten Zellen erstmals untersucht werden konnte. Die hier

vorgestellten Ergebnisse fügen sich zu einem neuen Modell, dass die STAT-Aktivierung als einen dynamischen Signalzyklus darstellt, der über das Zusammenspiel von konstitutiven, Signal-unabhängigen und induzierten, Signal-abhängigen Transportmechanismen die Intensität der Cytokin-induzierten Genexpression reguliert.

### **Summary**

Binding of extracellular ligands to cell-surface receptors can change the gene expression profile of a cell within minutes. Signal transmitters such as the signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins, that mediate the cellular response to numerous cytokines and growth factors, link activated receptors at the cell membrane with transcriptional control in the nucleus. Here, we demonstrate for the first time that the rate of nucleo-cytoplasmic shuttling of signal transducers plays a critical role in modulating the signal that emanates from the receptor. Nuclear export controls the activation of STAT-transcription factors by regulating their availability at the receptor-kinase-complex. This determines the extent and specificity of the cytokine response. It was shown that expression of the alternatively spliced transactivation domain and its signal-dependent serine phosphorylation increase the rate of STAT1 nuclear export. Mechanistically, this regulation seems to be independent of nuclear retention factors and the export receptor CRM1. Our results disclose a dual function for the C-terminal transactivation domain; on the one hand, expression of the C-terminus reduces the intranuclear mobility of tyrosine-phosphorylated STAT1. Presumably this results from increased retention of activated STAT1 $\alpha$  within transcriptional complexes on DNA. On the other hand, the same domain facilitates nuclear export after tyrosine dephosphorylation and thus promotes re-activation in the cytoplasm. Therefore, despite their identical receptor recognition, the two splice variants STAT1 $\alpha$  und STAT1 $\beta$  differ strongly in the level of tyrosine phosphorylation and in the duration of the signal. Reportergene assays show, that facilitated nuclear export accounts for about 20% of the stimulatory influence of serine phosphorylation on STAT1 transcriptional activity. Starting point of this study was the characterisation of N-terminally truncated STAT1 mutants. Their analysis uncovered that the N-Domain of STAT1 is required for binding to the import receptor Importin  $\alpha$ 5 und thus nuclear import of tyrosine-phosphorylated STAT1. Nevertheless deletion of the N-domain did not affect the constitutive nucleo-cytoplasmic transport of the unphosphorylated protein. Hence, cytokine induced nuclear accumulation is prevented and the ongoing nuclear export is revealed. These findings

provided the basis for a novel assay, that enabled the analysis of STAT1 nuclear export in cytokine stimulated cells. The results presented here comply with a new model that describes STAT activation as a dynamic signalling cycle. The combination of constitutive, signal-independent and induced, signal-dependent transport mechanisms control the intensity of cytokine induced gene expression.