

**Nukleocytoplasmatischer Transport und Geninduktion
durch den Transkriptionsfaktor STAT1**

DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

**Im Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Andreas Begitt**

2004

Nukleocytoplasmatischer Transport und Geninduktion durch den Transkriptionsfaktor STAT1

DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

**angefertigt am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie
in der Arbeitsgruppe von Dr. Uwe Vinkemeier**

**eingereicht im Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Zelluläre Signalübertragung durch Zytokine	1
1.1.1.	Netzwerk der Zytokine	1
1.1.2.	Rezeptoren der Zytokine	3
1.1.3.	Signalübertragung durch Interferone	5
1.1.4.	Die STAT-Proteinfamilie	6
1.2.	Der Transkriptionsfaktor STAT1	7
1.2.1.	Struktur von STAT1	7
1.2.2.	Die Funktion und Regulation von STAT1	9
1.2.3.	Interferonabhängige Genaktivierung durch STAT1	12
1.2.4.	Interferonunabhängige Genaktivierung durch STAT1	14
1.3.	Nukleocytoplasmatische Translokation von STAT1	15
1.3.1.	Allgemeiner Mechanismus der nukleocytoplasmatischen Translokation	15
1.3.2.	Nukleocytoplasmatischer Transport von STAT1	18
1.4.	Fragestellung	19
2.	Materialien und Methoden	20
2.1.	Chemikalien	20
2.1.1.	Laborchemikalien	20
2.1.2.	Radiochemikalien	24
2.1.3.	Antikörper	24
2.1.4.	Enzyme	25
2.1.5.	Reaktions-Kits	25
2.1.6.	Primer und Oligonukleotide	26
2.1.7.	Plasmide	26
2.1.8.	Puffer und Stammlösungen	27
2.1.9.	Zellen und Zellkulturmedien	30
2.1.10.	Geräte und Utensilien	31
2.1.11.	Software	33
2.1.12.	Verbrauchsmaterialien	33

2.2. Methoden	34
2.2.1. Methoden der Zellkultur	34
2.2.1.1. Zellkultur	34
2.2.1.2. Transfektion der Zellen	35
2.2.2. Nachweismethoden von Apoptose	35
2.2.2.1. Fluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen (TUNEL)	35
2.2.2.2. DNA-Fragmentation	36
2.2.2.3. Annexin-V-Färbung apoptotischer Zellen	36
2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie	37
2.2.4. Immunzytochemische Markierung	37
2.2.5. Mikroinjektion von Zellen	38
2.2.6. Molekularbiologische Methoden	38
2.2.6.1. Restriktionsenzymverdau von DNA	38
2.2.6.2. Gelelektrophorese von DNA	39
2.2.6.3. Isolation und Präparation von DNA	39
2.2.6.4. Ligationsreaktion	39
2.2.6.5. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	40
2.2.6.6. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	40
2.2.6.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.2.6.8. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	41
2.2.6.9. Ethanol-fällung von DNA	42
2.2.6.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	42
2.2.6.11. Klonierungstechnik	42
2.2.6.12. Mutagenese	46
2.2.6.13. Sequenzierung	46
2.2.6.14. Isolation von RNA	47
2.2.6.15. Elektrophorese von RNA	47
2.2.6.16. Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	48
2.2.7. Reportergen-Analyse	48
2.2.8. Nachweis von Protein-DNA-Wechselwirkungen durch Gelshift-Assays	49
2.2.9. Methoden zur Analyse von Proteinen	50
2.2.9.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50

2.2.9.2. Western-Blot-Analyse	50
2.2.9.3. Proteinfärbung mit Coomassie-Blau	51
2.2.9.4. Extraktion von Proteinen aus Zellen und Bakterien	51
2.2.9.5. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	52
2.2.9.6. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	53
3. Ergebnisse	53
3.1. Kinetik der zytokinabhängigen Translokation von STAT1α	53
3.1.1. Darstellung des STAT1 α ^{WT} -GFP-Fusionsproteins	53
3.1.2. Einfluß von Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren auf die nukleocytoplasmatische Lokalisation von STAT1 α ^{WT}	58
3.2. Mechanismen des IFNγ-abhängigen nukleären Exports von STAT1α	62
3.2.1. Untersuchung des nukleären Exportverhaltens von STAT1 α ^{WT}	62
3.2.2. Identifizierung eines IFN γ -abhängigen nukleären Exportsignals im 4-Helix-Bündel von STAT1 α	64
3.2.3. Untersuchung des nukleären Exportsignals von STAT1 α	69
3.2.4. Charakterisierung der nukleären Exportmutante STAT1 α ^{LL308/312AA}	73
3.3. Zytokinabhängiger nukleärer Import von STAT1α	77
3.4. Effekte von membranassoziertem STAT1α	82
3.4.1. Immobilisierung durch carboxyterminale Kopplung von STAT1 α an eine Farnesylierungssequenz	82
3.4.2. Charakterisierung von STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{AAAX}	83
3.5. IFNγ-abhängige Genaktivierung und Translokation von STAT1	88
3.5.1. Untersuchung der Genaktivierung von STAT1 α ^{LL407/409TT} , STAT1 α ^{AAAX} und STAT1 α ^{CAAX}	88
3.5.2. Nukleärer Import und IFN γ -abhängige Zielgenaktivierung von STAT1 α	90
3.6. Basale Translokation von STAT1α und IFNγ-unabhängige Genaktivierung	93
3.6.1. Analyse der IFN γ -unabhängigen Genaktivierung durch STAT1 α	93
3.6.2. Untersuchung der TNF α -vermittelten Apoptose in U3A-Zellen	95

4.	Diskussion	100
4.1.	IFNγ-abhängiger nukleärer Import und Export von STAT1α	100
4.1.1.	Die nukleocytoplasmatische STAT1-Translokation ist dynamisch	100
4.1.2.	Die Kernakkumulation von STAT1 α ist von der Tyrosin-Phosphorylierung abhängig	101
4.1.3.	Das nukleäre Exportsignal von STAT1 α bindet an CRM1	102
4.1.4.	Das NES von STAT1 α befindet sich im 4-Helix-Bündel	104
4.1.5.	Eine längere nukleäre Präsenz von STAT1 α führt zu einer verringerten transkriptionellen Antwort	105
4.1.6.	Das Importsignal von STAT1 α befindet sich in der DNA-Bindedomäne	107
4.2.	Die Genaktivierung durch STAT1 ist ein dynamischer Prozeß	108
4.2.1.	STAT1 α ^{CAAX} ist an der Plasmamembran kovalent gebunden	108
4.2.2.	Die IFN γ -abhängige Zielgenaktivierung durch STAT1 α ist von der Kernpräsenz abhängig	109
4.2.3.	Die Apoptosegene ICE und ICH-1 werden IFN γ -unabhängig durch STAT1 α aktiviert	111
5.	Zusammenfassung	112
6.	Summary	114
7.	Eigene Veröffentlichungen	115
8.	Literaturverzeichnis	115
9.	Abkürzungen	125
10.	Danksagung	128
11.	Erklärung	129
12.	Lebenslauf	130

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor STAT1 befindet sich vor der Stimulation mit IFN γ preferentiell im Cytosol der Zellen. Nach Stimulation wird STAT1 durch Jak-Kinasen phosphoryliert und sehr schnell in den Zellkern transloziert. In dieser Arbeit wurden der IFN γ -abhängige nukleäre Import und Export von STAT1 untersucht. Es wurde beobachtet, daß die Behandlung von 293T-Zellen mit dem Exportinhibitor LMB keinen Einfluß auf die nukleäre Verteilung von STAT1 in unstimulierten Zellen hatte, aber die Phase der nukleären Akkumulation von STAT1 nach einer IFN γ -Stimulation verlängerte. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde ein konserviertes leuzinreiches Segment im 4-Helix-Bündel von STAT1 identifiziert, welches für den effektiven nukleären Export von STAT1 notwendig ist. Durch Mutation von zwei Leuzinresten wird der Rücktransport von STAT1 ins Cytosol vermindert. In gleicher Weise wird die Akkumulationsdauer von STAT1 α^{WT} durch LMB-Behandlung verlängert. Diese Resultate zeigen deutlich, daß STAT1 über einen CRM1-abhängigen Weg in das Cytosol exportiert wird. Die Identifizierung eines konservierten NES in dem 4-Helix-Bündel von STAT1 offenbart erstmalig die Existenz eines aktiven nukleären Exports in der Familie der STAT-Proteine. Eine reduzierte Rate des Rücktransports von STAT1 in das Cytosol der Zellen ist mit einer geringeren transkriptionellen Antwort verbunden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß STAT-Proteine über verschiedene unabhängige Exportwege aus dem Zellkern exportiert werden und daß diese Exportwege mit der transkriptionellen Aktivität von STAT-Proteinen in einer engen Verbindung stehen. Es wurde in dieser Arbeit auch eine leuzinreiche Zielsequenz in der DNA-Bindedomäne näher charakterisiert. Dieses konservierte Signal ist von zentraler Bedeutung für den IFN γ -induzierten nukleären Import von phosphorylierten STAT1-Dimeren. Eine Mutation von zwei Leuzinresten in der NLS-Sequenz blockiert den nukleären Import von tyrosinphosphorylierten STAT1-Proteinen vollständig. Der inhibierte nukleäre Import von phosphoryliertem STAT1 führt zu einer dramatischen Abnahme der Aktivierung IFN γ -sensitiver Zielgene durch STAT1. Der Kernimport von unphosphoryliertem STAT1 wird durch Mutationen in der NLS-Sequenz nicht beeinflußt.

Es wurde ebenfalls gezeigt, daß eine C-terminale Kopplung von STAT1 mit der Farnesylierungssequenz CAAX zu einer Verankerung von STAT1 mit der Plasmamembran führt. Die kovalente Bindung von STAT1 an die Plasmamembran ist mit einer vollständigen Inhibierung der IFN γ -

abhängigen Zielgenaktivierung verbunden. Die Induzierung der TNF α -vermittelten Apoptose wird durch die Verankerung von STAT1 an der Plasmamembran nicht wesentlich beeinflusst. Interessanterweise wird die STAT1-abhängige Expression der Caspasen ICE und ICH-1 und die TNF α -vermittelte Apoptose nicht durch die Mutation des NLS beeinträchtigt. Diese Ergebnisse legen nahe, daß STAT1-Dimere in den Zellkern importiert werden, damit es zu einer IFN γ -abhängigen Zielgenaktivierung durch STAT1 kommen kann. Die nukleäre Akkumulation von STAT1 ist aber nicht für die STAT1-abhängige Aktivierung der Caspasegene und für die TNF α -vermittelte Induktion der Apoptose notwendig. Die tyrosinphosphorylierten und unphosphorylierten STAT1-Proteine werden auf unabhängigen Wegen zwischen Cytosol und Zellkern rasch hin und her bewegt und verursachen in beiden Kompartimenten unterschiedliche Funktionen.

6. Summary

Before stimulation signal transducers and activators of transcription (STATs) reside in the cytoplasm. STATs are phosphorylated by Janus kinases in response to cytokine stimulation and there upon rapidly translocate into the nucleus. In this thesis the IFN γ -dependent nuclear import and export of STAT1 was examined. It was found that treatment of 293T cells with the export inhibitor leptomycin B does not induce nuclear build-up of STAT1 in resting cells, but prolongs the nuclear accumulation phase in IFN γ -stimulated cells. In the course of this work a conserved leucine-rich helical segment in the coiled-coil domain of STAT1 was identified, which is responsible for the efficient nuclear export of this protein. Mutation of two leucines within this segment greatly attenuates the back transport of STAT1 into the cytoplasm. When fused to a carrier protein, the STAT1 export sequence can mediate nuclear export after intranuclear microinjection. This result indicates that STAT1 returns to the cytoplasm via a CRM1-dependent pathway. The identification of a conserved NES motif in the coiled-coil domain of STAT1 reveals for the first time the existence of an active nuclear export for a member of the STAT family of transcription factors. Notably, a reduced rate of back transport of STAT1 into the cytoplasm results in a aborted transcriptional response to stimulation with IFN γ . These data suggest that STAT proteins

are actively exported from the nucleus via several separate pathways and link their activity to transcriptional activation.

In addition, a nuclear targeting sequence in the DNA-binding domain of STAT1 was identified. This conserved signal is critical for the IFN γ -induced nuclear import of phosphorylated STAT1 dimers. Mutations of two leucines within this NLS-sequence inhibits nuclear entry of tyrosine-phosphorylated STAT1, which in turn prevents induction of IFN γ -inducible target genes. Interestingly, the nuclear import of unphosphorylated STAT1 continues and the STAT1-dependent constitutive expression of caspases and the TNF α -mediated induction of apoptosis proceed unaltered. Thus, tyrosine-phosphorylated and unphosphorylated STAT1 proteins shuttle via independent pathways to distinct sets of target genes. Furthermore, it was demonstrated that STAT1 proteins C-terminal fused with a CAAX-motif functioning as a membrane anchor are fully competent to induce TNF α -mediated apoptosis. In contrast, membrane-bound STAT1 lost the ability to activate IFN γ -dependent target genes. These results indicate that STAT1 dimers require nuclear localisation for the activation of IFN γ -dependent target genes and that nuclear accumulation is not necessary for the induction of the STAT1-dependent activation of caspase genes and TNF α -mediated apoptosis.

10. Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für molekulare Pharmakologie Berlin-Buch in der Arbeitsgruppe für zelluläre Signalverarbeitung angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Saenger danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Referats, das Interesse an meinem Thema und die Vertretung am Fachbereich Chemie, Biologie und Pharmazie der Freien Universität Berlin. Desgleichen bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Meyer für die Übernahme des Koreferats und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Uwe Vinkemeier besonders herzlich für die Bereitstellung des Themas, die Schaffung der Arbeitsmöglichkeiten und für die vielen hilfreichen Diskussionen und Ratschläge bedanken. Desweiteren bedanke ich mich für die sehr gute Betreuung und für das hilfreiche Korrekturlesen der Arbeit bei Dr. Uwe Vinkemeier.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Andreas Marg und Torsten Meissner für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die sehr gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe Zelluläre Signalverarbeitung. Besonders möchte ich mich für die Einführung in die Mikroinjektion bei Marleen van Rossum und für die Unterstützung meiner Arbeit durch Thomas Meyer bedanken. Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken.

9. Abkürzungen

A	Alanin
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
CIITA	Cystein Klasse-II-Transaktivator
CMV	Cytomegalie-Virus
D	Asparaginsäure
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor-Receptor
F	Phenylalanin
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
G	Erdbeschleunigung
Gly	Glycin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBP-1	Guaninnukleotid-bindendes Protein-1
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
H	Histidin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino-ethansulfonsäure
h	Stunden
I	Isoleuzin
IFN	Interferon
ISGF-3γ	Interferon-stimulierter Genfaktor 3

K	Lysin
L	Leuzin
M	Methionin
min	Minuten
MMLV-RT	Moloney-Murine-Leukemia-Virus Reverse Transkriptase
N	Asparagin
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
P	Prolin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Meerrettich-Peroxydase-gekoppeltes Immunoglobulin
Poly-dI-dC	Poly-Deoxyinosid-phosphat-Deoxycytidin-phosphat
Q	Glutamin
R	Arginin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S	Serin
sek	Sekunden
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T	Threonin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
U	Katalytische Einheiten
V	Valin
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin