

4. Diskussion

4.1. IFN γ -abhängiger nukleärer Import und Export von STAT1 α

4.1.1. Die nukleocytoplasmatische STAT1-Translokation ist dynamisch

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit konnten den IFN γ -abhängigen Import und Export von STAT1 α genauer beschreiben. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand im ersten Teil dieser Arbeit der molekulare Mechanismus des Exports von STAT1 α . Bekanntermaßen führt die Bindung von IFN γ an seinen Rezeptor zur Aktivierung der Jak-Kinasen, die STAT1 am Tyrosinrest 701 phosphorylieren und somit zur Dimerisierung von STAT1 über ihre SH2-Domäne beitragen. Das dimere STAT1 wird, vermittelt über das NLS in der DNA-Bindedomäne, in den Zellkern importiert. Im Zellkern bindet STAT1 an der GAS-Sequenz von DNA und löst eine IFN γ -abhängige Zielgenaktivierung aus. Durch die nukleäre Tyrosin-Phosphatase TC45 wird STAT1 dephosphoryliert und dissoziiert in die monomeren Komponenten. Das dephosphorylierte STAT1 wird dann in das Cytosol transportiert, wo es erneut rephosphoryliert werden kann (McBride et al., 2002; Meyer et al., 2002a; Darnell, 1997b, Shuai et al., 1993b).

Für die Untersuchung der nukleocytoplasmatischen Verteilung der STAT1 α -Proteine wurde an das carboxyterminale Ende von STAT1 α und deren Derivate das Markerprotein GFP fusioniert. Es konnte gezeigt werden, daß es keinen Unterschied in der zeitabhängigen Verteilung von STAT1 α und STAT1 α -GFP-Fusionsprotein nach IFN γ -Stimulation gab. Das endogene STAT1 α und das Fusionsprotein verhielten sich auch in der Ruheverteilung gleich (Abb. 3.1.). In anderen Veröffentlichungen wurde dieses Ergebnis für die Verteilung von STAT1-GFP-Fusionsproteinen bestätigt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß STAT1-GFP nach einer IFN α - und IFN γ -Stimulation in den Kern importiert wird, dort akkumuliert und nach einer gewissen Zeit wieder im Cytosol lokalisiert (Köster und Hauser, 1999). Eine aminoterminaler Kopplung des GFP dagegen führte zu einem funktionalen Verlust der IFN γ -abhängigen Aktivierung von STAT1 α . In weiteren Experimenten wurde deshalb ausschließlich das carboxyterminale STAT1-Fusionsprotein verwendet. In einer weiteren Arbeit konnte für den Glukocorticoidrezeptor keine

Beeinflussung durch fusioniertes GFP beobachtet werden, der nach der Aktivierung im Nukleus internalisiert wird (Htun et al., 1996).

4.1.2. Die Kernakkumulation von STAT1 α ist von der Tyrosin-Phosphorylierung abhängig

In der Literatur gibt es viele Hinweise darauf, daß STAT-Proteine durch Inhibitoren von Kinasen und Phosphatasen in ihrer IFN γ -abhängigen nukleocytoplasmatischen Verteilung beeinflusst werden. Es wurde bereits beschrieben, daß der unspezifische Kinaseinhibitor Staurosporin die Kernakkumulation von STAT1 unterdrückt, da es zu keiner Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 durch die Tyrosinkinase Jak1 und Jak2 kommt (Haspel et al., 1999; Callus und Mathey-Prevot, 1998; Shuai et al., 1993b). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In der Abbildung 3.4. ist gezeigt, daß in Gegenwart des Kinaseinhibitors Staurosporin keine nukleäre Translokation von STAT1 nach IFN γ -Stimulation beobachtet wurde. Kinetische Untersuchungen in Anwesenheit des Tyrosinkinaseinhibitors AG 490, der als Inhibitor für Jak2 beschrieben wurde (Meydan et al., 1996), zeigten keinen Einfluß von AG 490 auf die nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1 α in 293T-Zellen. Die selektive Unterdrückung der Jak2-Kinaseaktivität ist wahrscheinlich nicht ausreichend, um die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 α zu unterdrücken. Der fehlende inhibitorische Effekt von AG 490 stellte eine interessante Beobachtung dar, weil Jak2 in die STAT1-Aktivierung durch IFN γ und zu einem Teil auch durch IFN α/β involviert ist und damit die Vermutung offen läßt, daß die Tyrosin-Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase Jak1 ausreichend ist (Endo et al., 1997), um eine effektive Aktivierung von STAT1 α zu initiieren.

Nach IFN γ -Stimulation in Zellen, die mit AG 490 vorbehandelt wurden, wurde eine mit dem Wildtyp von STAT1 α vergleichbare Kinetik der cytonukleären Translokation beobachtet (Abb. 3.4. A). Es konnte auch kein Effekt für die Inhibitoren von Serin- und Threonin-Kinasen beobachtet werden. Eine Beeinflussung des MAP-Kinase-Signalweges auf den zytokininduzierten Import von STAT1 α konnte ausgeschlossen werden (Dudley et al., 1995; Alessi et al., 1995). Die Serin- und Threonin-Kinasen haben keine Wirkung auf die Dauer der Kernakkumulation von STAT1 α (Abb. 3.4. A). Es konnte auch keine Veränderung der nukleocytoplasmatischen STAT1-Verteilung in ruhenden Zellen festgestellt werden.

Bei Untersuchungen mit Inhibitoren der Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen ergab sich nur für Vanadat ein signifikanter Einfluß auf die Translokation von STAT1 α nach IFN γ -Stimulation (Abb. 3.4. B). Peroxovanadat wurde als potenter Inhibitor von Tyrosin-Phosphatasen beschrieben und erstmalig im Zusammenhang mit dem insulinvermittelten Signalweg untersucht (Posner et al., 1994). Die Behandlung von 293T-Zellen mit Vanadat führte zu einer stark verlängerten Kernpräsenz von STAT1 α nach IFN γ -Aktivierung im Vergleich mit Zellen, die nicht mit Vanadat behandelt wurden (Abb. 3.4. B). Die Ergebnisse aus anderen Veröffentlichungen stehen im Einklang mit dem beobachteten Effekt von Vanadat. So wurde beschrieben, daß eine Vanadatbehandlung zu einer verlängerten Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 führt (Haspel et al., 1999; Bardette et al., 1999) und eine Vielzahl von anderen Signalwegen, in denen die Tyrosin-Phosphorylierung eine zentrale Rolle spielt, beeinflusst (Posner et al., 1994). Genistein wird als Inhibitor der TPK (Tyrosin-Protein-Kinase) beschrieben (Mustelin et al., 1990). Dieses Molekül wird auch als ein Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor beschrieben. Die Tyrosin-Phosphatase kommt an der Plasmamembran von B- und T-Zellen vor und spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Ca²⁺-abhängigen Proliferation dieser Zellen (Lane et al., 1991). Calyculin A ist ein sehr guter Inhibitor der Protein-Phosphatase-1 und Protein-Phosphatase-2A, die zu den Serin- und Threonin-Phosphatasen gehören (Favre et al., 1997). Die IFN γ -abhängige Kernakkumulation von STAT1 α wurde in Dauer und Intensität von Genistein und Calyculin A nicht beeinflusst. Die nukleocytoplasmatische Verteilung von STAT1 α ist direkt von dem Phosphorylierungsstatus des Tyrosinrestes 701 abhängig. Diese Erkenntnis wurde durch die Mutation des Tyrosinrestes 701 in Phenylalanin nochmals untermauert. STAT1 α ^{Y701F} ist zu einer nukleären Akkumulation nicht mehr befähigt (Abb. 3.3.). Die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 701 ist von zentraler Bedeutung für die Aktivierung und den nukleären Import von STAT1 (Darnell, Jr., 1997b).

4.1.3. Das nukleäre Exportsignal von STAT1 α bindet an CRM1

Für den Export von aktiviertem STAT1 ist die Dephosphorylierung durch die Phosphatase TC45 notwendig, die sich im nukleären Kompartiment der Zellen befindet. Von der nukleären Phosphatase TC45 wird angenommen, daß sie die transkriptionelle Aktivität von STAT1 beendet und zum Export der monomeren Proteine aus dem Zellkern beiträgt (Haspel et al., 1996, ten Hoeven

et al., 2002). Diese Phosphatase nimmt deshalb für die Deaktivierung von STAT1 eine Schlüsselposition ein (Shuai et al., 1996; McBride et al., 2000, Haspel und Darnell, 1999).

Ein aktiver nukleärer Export von Transkriptionsfaktoren wurde bereits für eine Vielzahl von Signalwegen beschrieben. Es ist bekannt, daß der Kofaktor I κ B α , der für die Inaktivierung und cytoplasmatische Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF κ B notwendig ist, sich zwischen dem Cytosol und dem Zellkern hin und her bewegen kann. Im N-terminalen Bereich von I κ B α befindet sich ein Exportsignal, das an den Exportrezeptor CRM1 bindet. I κ B α bildet mit NF κ B und RanGTP einen Exportkomplex, der in das Cytosol der Zellen exportiert wird. Im Ruhezustand ist I κ B α an NF κ B im Cytosol der Zellen gebunden, und erst durch TNF α -Stimulation wird eine proteasomenabhängige Degradation von I κ B α eingeleitet, die zu einer Translokation von NF κ B in den Zellkern führt. NF κ B führt dann unter anderem zu einer Genaktivierung des I κ B α -Gens (Johnson et al., 1999; Ganster et al., 2001).

Für dimere STAT1-Proteine wurde ebenfalls ein proteolytischer Abbau durch Proteasomen beschrieben (Kim und Maniatis, 1996). MG 132 ist ein sehr spezifischer Inhibitor für Proteasomen und unterdrückt den proteasomenvermittelten Proteinabbau (Meriin et al., 1998; Wiertz et al., 1996; Kim und Maniatis, 1996). Eigene experimentelle Daten mit STAT1 α -GFP-Fusionsproteinen zeigten keinen Hinweis auf einen proteasomenvermittelten Abbau von STAT1 α im Zellkern (Abb 3.5.). Der Proteasomeninhibitor MG 132 hatte keinen Einfluß auf das Ausmaß der zytokininduzierten Kernakkumulation von STAT1 α . Der Einfluß von Proteasomen auf die Kernpräsenz von der STAT1 α konnte aufgrund eigener experimenteller Befunde ausgeschlossen werden. In der Abbildung 3.1. C konnte auch deutlich gezeigt werden, daß eine De-novo-Synthese von STAT1 α keinen Einfluß auf die STAT1 α -Verteilung hat. Cycloheximid, ein Inhibitor der Transkriptionsmaschinerie (Chow et al., 1995), beeinflusste nicht die Lokalisation von STAT1 α nach IFN γ -Stimulation.

Zu einer deutlich längeren Kernakkumulation kam es jedoch, wenn 293T-Zellen mit Leptomycin B behandelt wurden (Abb. 3.5.). LMB ist ein sehr spezifischer Inhibitor des Exportrezeptors CRM1 (Fukuda et al., 1997). Durch LMB wird die Bildung eines Export-Cargo-Komplexes verhindert, der aus der GTPase RanGTP, dem Cargo-Protein und dem Exportin CRM1 besteht. CRM1 und eine leuzinreiche NES-Sequenz der Cargo-Proteine binden miteinander und diese Bindung wird durch LMB unterdrückt (Ossareh-Nazari et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Kudo et al., 1999). Leptomycin B bindet an den Exportrezeptor CRM1, der dadurch nicht mehr für den

leuzinreichen NES-Bereich der Cargo-Proteine zugänglich ist (Bogerd et al., 1996; Fornerod et al., 1997; Tulpin et al., 1999). Für den Transkriptionsfaktor Dd-STATa wurde erstmals ein LMB-sensitiver Export bei dem Schleimpilz *Dictyostelium* beschrieben. Das Dd-STATa beinhaltet ein leuzinreiches NES, das wahrscheinlich mit CRM1 bindet und aus dem Nukleus exportiert wird, wenn das Protein durch cAMP aktiviert wurde (Ginger et al., 2000).

4.1.4. Das NES von STAT1 α befindet sich im 4-Helix-Bündel

Vor Beginn dieser Studie war die Existenz eines Exportsignals in der Struktur von STAT1 noch nicht beschrieben, jedoch deuteten die Ergebnisse einer verlängerten Akkumulationsphase nach LMB-Behandlung auf die Präsenz eines NES hin (Abb. 3.5.). Im Sequenzvergleich von STAT1 zeigt sich ein leuzinreicher Bereich, der Strukturmerkmale mit klassischen NES-Sequenzen aufwies. Dieser leuzinreiche Bereich befindet sich in dem 4-Helix-Bündel von STAT1. Bei *Dictyostelium* STATa und STATc wurden bereits NES-Sequenzen beschrieben, die Sequenzhomologie mit den klassischen NES-Sequenzen aufweisen (Ginger et al., 2000; Fukuzawa et al., 2003). Die klassischen NES-Sequenzen zeigen ein Strukturmerkmal, das als Kern-Tetramer bezeichnet wird (Elfgang et al., 1999). Die NES-Struktur von Dd-STATa und Dd-STATc aus *Dictyostelium* weicht ebenfalls von der Konsensus-Sequenz des klassischen NES ab, jedoch ist dieses NES-Motiv mit der NES-Sequenz aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 vergleichbar (Ginger et al., 2000; Fukuzawa et al., 2003). Die von uns identifizierte NES-Sequenz in dem 4-Helix-Bündel von STAT1 ist eine leuzinreiche Sequenz, die zu den klassischen NES-Sequenzen ein leicht abweichendes Strukturmerkmal aufweist. Ein Strukturvergleich in der Abbildung 3.9. mit Proteinen, die ein klassisches NES beinhalten, zeigt, daß ein Teil der konservierten Strukturmerkmale in dem NES von STAT1-Proteinen vorkommt (Johnson et al., 1999; Elfgang et al., 1999; Bogerd et al., 1996).

Die Daten aus den Mikroinjektionsexperimenten mit den GST-STAT1 α -GFP-Fusionspeptiden aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 α zeigten deutlich, daß sich die NES-Sequenz in der Helix 4 zwischen den Aminosäureresten 302-314 befindet (Abb. 3.7.). Die Mutation von Leuzin 308 zu Alanin führte zu einem inhibierten Export des C-terminalen Peptidfragments aus der Helix 4 (AS 302-214). Die Punktmutation von Leuzin 308 nach Alanin ist im Kontext des Volle-Länge-STAT1-Moleküls aber nicht ausreichend, um den Export vollständig zu unterdrücken. In der Abbildung 3.11. ist ersichtlich, daß der Austausch der beiden Leuzine 308 und 312 nach Alaninen in

einer Inhibition des Kernexports von STAT1 α resultiert. Der Export von STAT1 $\alpha^{\text{LL308/312AA}}$ wird aber nicht vollständig unterdrückt, es kommt zu einer signifikant verlängerten Kernakkumulationsphase von STAT1 $\alpha^{\text{LL308/312AA}}$. Die Kinetik der reversiblen Kernakkumulation von STAT1 $\alpha^{\text{LL308/312AA}}$ ist mit der Kinetik der LMB-behandelten Zellen vergleichbar. Die Leuzinreste 308 und 312 aus dem 4-Helix-Bündel von STAT1 scheinen für die Bindung von STAT1 an CRM1 wichtig zu sein. Dafür spricht die Sensitivität auf LMB nach einer IFN γ -Stimulation und der vergleichbare Phänotyp von STAT1 $\alpha^{\text{LL308/312AA}}$, beides resultierte in einer prolongierten Kernpräsenz nach Zytokinstimulation. In der Abbildung 3.9. ist in der Struktur des 4-Helix-Bündels von STAT1 zu erkennen, daß der Aminosäurerest Leuzin 308 auf der Oberfläche des Proteins exponiert wird und dadurch sehr gut für die Exportmaschinerie zugänglich sein könnte (Vinkemeier et al., 1998a). Die Zugänglichkeit des NES für Proteine, die in dem nukleären Export involviert sind, ist eine wichtige regulatorische Schaltstelle für die Kontrolle des STAT1-Signalweges, wie die Daten aus den Reporter-Gen-Assays eindrucksvoll bestätigen (Abb. 3.12.). STAT1 wird im Zellkern umgehend durch die nukleäre Tyrosin-Phosphatase dephosphoryliert und dann als monomeres Protein exportiert. Diese Annahme stützt sich auf die Untersuchung der Tyrosin-Phosphorylierung und DNA-Bindfähigkeit von STAT1 $\alpha^{\text{LL308/312AA}}$ und STAT1 α^{WT} (Abb. 3.12). Der Export von STAT1 α^{WT} ist von der CRM1-Bindung abhängig. Nach der Dephosphorylierung können monomere STAT-Proteine an CRM1 binden und unterliegen nach der Bindung an RanGTP einem raschen Export aus dem Zellkern.

Nach unserer Erstbeschreibung eines NES im STAT1-Protein wurden weitere NES-Sequenzen in der STAT1-Struktur beschrieben. In der Helix 2 des 4-Helix-Bündels wurde eine leuzinreiche Struktur als NES-Sequenz beschrieben (Mowen und David, 2000), und in der DNA-Bindedomäne wurde ebenfalls ein Exportsignal beschrieben (McBride et al., 2000), jedoch konnten diese Ergebnisse durch unsere umfangreichen Mikroinjektionsexperimente nicht bestätigt werden (siehe Abb. 3.7 und 3.14).

4.1.5. Eine längere nukleäre Präsenz von STAT1 α führt zu einer verringerten transkriptionellen Antwort

Ein weiterer RanGTP-unabhängiger Export von STAT1 α aus dem Zellkern existiert parallel zu dem RanGTP-abhängigen Export. In der Abbildung 3.11. konnte dieser LMB-sensitive Export

von STAT1 α ^{WT} gezeigt werden. Die Untersuchungen von STAT1 α ^{LL308/312AA} zeigten 10 Stunden nach IFN γ -Stimulation einen deutlichen Rückgang der Kernakkumulation, der durch LMB nicht unterdrückt wurde. Dieser LMB-unabhängige Export von STAT1 α ist ein weiterer Exportmechanismus für STAT1-Proteine, der nach einem CRM1- und RanGTP-unabhängigen Prozeß abläuft. Dieser Exportmechanismus ist wahrscheinlich für den konstitutiven Export von STAT1-Proteinen verantwortlich. Die Enthüllung von zwei verschiedenen Exportmechanismen für STAT1-Proteine offenbart eine weitaus komplexere Regulation der nukleocytoplasmatischen Translokation von STAT1.

Die schnelle Dephosphorylierung durch die nukleäre Phosphatase TC45 und der damit verbundene Verlust der DNA-Bindung von STAT1 ist ein wichtiger Regulationspunkt für die transkriptionelle Inaktivierung von STAT1 (Haspel und Darnell, 1999; ten Hoeven et al., 2002). Die Bindung von STAT1 an CRM1 und die Bildung eines Exportkomplexes mit RanGTP stellen weitere Regulationsprozesse dar, die einen bedeutenden Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von STAT1 ausüben (Ossareh-Nazari et al. 1997; Komeili und O'Shea, 2000). Die nukleäre Exportrate von STAT1 korreliert mit der Dephosphorylierung von dimeren STAT1-Proteinen im Zellkern, die nach ihrer Dissoziation in die monomeren Proteinkomponenten schnell in das Cytosol exportiert werden (McBride et al., 2000). Im Cytosol werden die monomeren STAT1-Proteine durch die aktivierten Jak-Kinasen rephosphoryliert und stehen für einen weiteren Zyklus der Zielgenaktivierung als dimere STAT1-Proteine im Zellkern zur Verfügung (Haspel und Darnell, 1999; Darnell, 1997b).

Überraschenderweise führt ein längerer nukleärer Aufenthalt von STAT1 α im Zellkern zu einer Verminderung der transkriptionellen Antwort. Die Reporterexperimente zeigten eine signifikant verringerte Reporteraktivierung in STAT1 α ^{LL308/312AA}-exprimierenden U3A-Zellen und in STAT1 α ^{WT}-enthaltenden und mit LMB vorbehandelten U3A-Zellen (Abb. 3.12.). STAT1 α ^{LL308/312AA} oder die Blockierung des Exportrezeptors CRM1 auf pharmakologischem Wege führte zu einer verlängerten Akkumulation von STAT1-Proteinen im Zellkern. Vermutlich resultiert die reduzierte nukleäre Exportrate von STAT1 α in einer verringerten cytoplasmatischen Rephosphorylierungsrate von STAT1 α durch Jak-Kinasen. Dieses würde erklären, warum die längere Akkumulationphase im Zellkern von einer verringerten transkriptionellen Antwort begleitet wird. Die Rate der Dephosphorylierung durch nukleäre Tyrosin-Phosphatasen und der damit verbundene Verlust der DNA-Bindfähigkeit an die GAS-Sequenz wird nicht durch die

beiden Punktmutationen im STAT1 α ^{LL308/312AA}-Molekül beeinflusst. Die herabgesetzte Zielgenaktivierung von STAT1 α ^{LL308/312AA} wird nicht durch einen Verlust der Serin-727-Phosphorylierung hervorgerufen. Bekannt ist, daß die Phosphorylierung des Serinrestes 727 für eine vollständige transkriptionelle Aktivität durch STAT1 benötigt wird (Zhang et al., 1995; Wen et al., 1995).

4.1.6. Das Importsignal von STAT1 α befindet sich in der DNA-Bindedomäne

In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Exporsignal für STAT1 α beschrieben. Dieses befindet sich in dem 4-Helix-Bündel und ist für den nukleären Export des STAT1-Proteins verantwortlich. Eine nukleäre Exportaktivität wurde auch in der DNA-Bindedomäne zwischen den Aminosäureresten 400 und 410 von STAT1 beschrieben. In diesem Bereich befindet sich eine leuzinreiche Sequenz, die sensitiv für den CRM1-Inhibitor LMB sein soll (McBride et al., 2000). Unsere Mikroinjektionsexperimente konnten jedoch nur für das Peptidfragment der Sequenz 367-427 aus der DNA-Bindedomäne eine nukleäre Exportaktivität nachweisen (Abb. 3.14.). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit und weitere Veröffentlichungen (Meyer et al., 2002a; McBride et al., 2002) zeigen ein Importsignal in der DNA-Bindedomäne von STAT1, das für den IFN γ -abhängigen nukleären Import von STAT1 wichtig ist. Für die NLS-Funktion sind die Aminosäurereste Leuzin 407 und 409 von zentraler Bedeutung (Meyer et al., 2002a). Die basischen Aminosäuren Lysin 410 und Lysin 413 sind wahrscheinlich ebenfalls für das Importsignal wichtig, jedoch ist STAT1 α ^{KK410/413EE} eine Mutante, die nicht mehr an DNA binden kann (Melen et al., 2001). STAT1 α wird nicht mehr in den Zellkern importiert, wenn die beiden Leuzinreste 407 und 409 zu Threoninen bzw. Alaninen mutiert sind. Die Befähigung zum nukleären Import phosphorylierter STAT1 α ^{LL407/409AA}- und STAT1 α ^{LL407/409TT}-Mutanten ist vollständig aufgehoben (Meyer, T., et al., 2002), was die Ergebnisse der Abbildung 3.15. klar zeigen konnten. Später wurde gezeigt, daß das NLS in der DNA-Bindedomäne direkt an Importin- α 5 bindet und für den Import von phosphoryliertem STAT1 benötigt wird (McBride et al., 2002). Dieses NLS reguliert ausschließlich den IFN γ -abhängigen Import von STAT1-Proteinen (Meyer et al., 2002a).

Klassische Importsignale sind durch eine Sequenz gekennzeichnet, in der die basischen Aminosäurereste Lysin und Arginin häufig vorkommen. Beschrieben wurden zwei Struktur motive für klassische Importsignale: ein monopartites NLS, wie es z.B. im SV40-T-Antigen vorkommt

(Kalderon et al., 1984a), und ein bipartites NLS, wie es im Nukleoplasmin existiert (Robbins et al.; 1991; LaCasse und Lefebvre, 1995; Kalderon, D. et al., 1984b). Das Importin NPI-1 benötigt basische Aminosäuren, an die es mit seiner Armadillo-Region bindet, um das Cargo-Substrat in den Zellkern zu importieren (Weis et al., 1995; Moroianu et al., 1996; Sekimoto et al., 1997). Für STAT1 α konnten zwischen den Aminosäuren 400-413 in der DNA-Bindedomäne sowohl konservierte Leuzinreste als auch konservierte Lysin- und Argininreste gefunden werden (Abb. 3.17.). Es konnte aber kein klassisches NLS, welches diesem Konsensusmotiv entsprechen würde, in dem STAT1 α -Protein identifiziert werden. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, daß dimere STAT1-Proteine an NPI-1 binden (Sekimoto et al., 1997). Das NLS konnte eindeutig in der DNA-Bindedomäne identifiziert werden (Melen et al., 2001; McBride et al., 2002; Meyer et al., 2002a). Eine Importsequenz konnte auch für Dd-STATc von *Dictyostelium* in der aminoterminalen Region nachgewiesen werden. Dieses NLS ist abhängig von der Aktivierung von Dd-STATc durch DIF, einem cAMP-abhängigen extrazellulären Aktivator von *Dictyostelium*. Nach der Aktivierung findet ein schneller Import von Dd-STATc in den Kern statt (Fukuzawa et al., 2001).

4.2. Die Genaktivierung durch STAT1 ist ein dynamischer Prozeß

4.2.1. STAT1 α^{CAAX} ist an der Plasmamembran kovalent gebunden

Die Koppelung der Farnesylierungssequenz CAAX an Proteine, die sich zwischen dem Zellkern und dem Cytosol bewegen, erlaubt es, diese Proteine gezielt zu immobilisieren. Die Farnesylierungssequenz fixiert Proteine an die Lipidschicht der Plasmamembran (Daniels et al., 1998; Lerner et al., 1995). In der Literatur konnte für PAK1 (**p**21-**A**ctivated **K**inase 1) gezeigt werden, daß eine Kopplung mit der Farnesylierungssequenz zu einer kovalenten Bindung der Kinase an der Plasmamembran führt. Die Substitution des Cysteins zu Alanin konnte die membranständige Lokalisation von PAK1 aufheben (Daniels et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, daß die C-terminale Fusion der Farnesylierungssequenz an STAT1 α zu einer kovalenten Assoziation an der Plasmamembran führt. STAT1 α^{CAAX} kann nicht mehr durch IFN γ -Stimulation im Zellkern akkumulieren, da es an die Plasmamembran der Zellen gebunden und immobilisiert vorliegt (Abb. 3.20.). In Übereinstimmung dazu wurde STAT1 α^{CAAX} ausschließ-

lich aus der Membranfraktion isoliert (Abb. 3.21.). Dieser Effekt konnte durch eine Punktmutation des Cysteins nach Alanin teilweise aufgehoben werden (Daniels et al., 1998). Diese als STAT1 α ^{AAAX} bezeichnete Mutante hatte einen partiellen Defekt, der wahrscheinlich dadurch bedingt ist, daß sich STAT1 im Cytosol in der Nähe der rezeptorassoziierten Jak-Kinasen aufhält. Der Phänotyp von STAT1 α ^{CAAX} wurde mit dem von STAT1 α ^{LL407/409AA} verglichen. STAT1 α ^{CAAX} und STAT1 α ^{LL407/409AA} werden beide nach IFN γ -Stimulation nicht in den Zellkern importiert und es kam zu keiner Akkumulation im Zellkern. STAT1 α ^{CAAX} zeigte eine deutliche Abnahme der Dephosphorylierung von Tyrosin 701. Die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 α ^{CAAX} war auch nicht mehr durch Staurosporin zu unterdrücken (Abb. 3.21.). Diese Ergebnisse bestätigten deutlich, daß sich die Tyrosin-Phosphatase für die Dephosphorylierung von STAT1 partiell im Zellkern befindet (Haspel und Darnell, 1999; ten Hoeven et al., 2002).

4.2.2. Die IFN γ -abhängige Zielgenaktivierung durch STAT1 α ist von der Kernpräsenz abhängig

Nach der Bindung der Liganden an Zytokinrezeptoren werden STAT1 α -Proteine durch Jak-Kinasen am Tyrosinrest 701 phosphoryliert und bilden Dimere, die zusammen mit Importin- α 5 in den Zellkern importiert werden (Darnell, 1997b; Meyer et al., 2002a; McBride et al., 2002). Im Zellkern binden die dimeren STAT1 α -Proteine an GAS-Sequenzen und führen zu einer transkriptionellen Aktivierung von IFN γ -abhängigen Zielgenen (Decker et al., 1997; Darnell et al., 1994; Shuai et al., 1993a). Die in dieser Arbeit analysierte IFN γ -abhängige und STAT1-vermittelte Zielgenaktivierung befaßte sich mit einer Reihe von Genen, die für die zelluläre Immunantwort notwendig sind (Gil et al., 2001; Der et al., 1998). Durch Untersuchungen zur Genaktivierung von STAT1 wurde das für die Antigenprozessierung essentielle MHC II als Zielgen für STAT1 erkannt. Dieses Protein präsentiert den Immunzellen Peptid-Fragmente von Viren und Mykobakterien auf der Zelloberfläche der infizierten Zellen (Boehm et al., 1997; Min et al., 1996). Der MHC-II-Komplex ist ein integraler Bestandteil der humoralen und zellulären Immunantwort, und eine IFN γ -abhängige Genaktivierung durch STAT1 führt zu einer raschen Aktivierung des CIITA-Gens (Harton und Ting, 2000). CIITA ist ein Bestandteil des MHC-II-Komplexes (Boehm et al., 1997). Zu den Genen, die für die Antigenpräsentation durch MHC-I-

und MHC-II-Komplexe wichtig sind, gehören TAP-1, HLA Klasse I, LMP-2 und LMP-7. Diese Gene liegen in dem bidirektionalen, GAS-enhaltenden Promotor TAP-1/LMP-2 und werden durch STAT1 aktiviert (Chatterjee-Kishore et al., 1998; Chatterjee-Kishore et al., 2000b; Min et al., 1996). Ein weiteres IFN γ -abhängiges Zielgenrepertoire beinhaltet Gene für Chemokine. Zu den Chemokinen gehören MIG-1 und IP-10, deren Gene ebenfalls durch STAT1 aktiviert werden (Mahalingam et al., 2001).

IRF-9, MIG-1, GBP-1, TAP-1 und IP-10 stellt eine kleine Auswahl der IFN γ -abhängigen Gene dar, die durch STAT1 α aktiviert werden. Die Untersuchungen der Genexpression dieser Gene durch STAT1 α ^{WT} in der Abbildung 3.24. bestätigten die Ergebnisse aus der Literatur (Chatterjee-Kishore et al., 2000b; Gil et al., 2001; Der et al., 1998). Bemerkenswert war allerdings, daß sich diese Gene durch STAT1 α ^{LL308/312AA} nicht in dem gleichen Ausmaß wie STAT1 α ^{WT} zytokinvermittelt aktivieren ließen. Die Genaktivierung auf den nativen Chromosomen in Zellen ist ein sehr komplexer Prozeß, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind (Horvath, 2000; Horvath et al., 1995; Stark et al., 1998). Die Reporter-genexperimente wurden mit Genkonstrukten durchgeführt, die drei GAS-Sequenzen im Promotor enthielten. Diese künstlichen Plasmidkonstrukte lassen sich mit den Promotorregionen natürlicher Zielgene nicht vergleichen, weshalb die Daten des Reporter-gen-Assays sich nicht direkt mit denen der RT-PCR vergleichen lassen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß phosphoryliertes STAT1 α ^{LL407/409AA} nach IFN γ -Stimulation nicht mehr in den Zellkern importiert wird. Das erklärt, warum STAT1 α ^{LL407/409AA} einen vollständigen Verlust der IFN γ -abhängigen Zielgenaktivierung aufweist. Das gleiche Resultat wurde erhalten, wenn STAT1 α mit der Farnesylierungssequenz CAAX gekoppelt und an der Plasmamembran immobilisiert wurde (Abb 3.25.). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß STAT1 α in den Zellkern importiert werden muß, damit es zu einer Induktion IFN γ -responsiver Zielgene durch STAT1 kommt (Meyer et al., 2002a). Die Daten in der Abbildung 3.23. machen den dramatischen Verlust der Reporter-genaktivierung durch STAT1 α ^{LL407/409AA} und STAT1 α ^{CAAX} deutlich und stehen damit im Einklang mit den Resultaten aus den RT-PCR-Experimenten.

4.2.3. Die Apoptosegene ICE und ICH-1 werden IFN γ -unabhängig durch STAT1 α aktiviert

Die basale Genaktivierung durch STAT1-Proteine sollte anhand der Induktion von Apoptose-exekutierenden Genen untersucht werden. Es ist bereits bekannt, daß STAT1 unabhängig von einem IFN γ -Stimulus zur Auslösung der Apoptose beitragen kann. Wenn Zellen durch elektromagnetische Wellen im UV-Bereich oder durch eine Expression von TNF α nach einer viralen Infektion unter Streß geraten, führt STAT1 zur Verstärkung der Apoptose (Liu et al., 2001; Ganster et al., 2000; Hoey, 1997; Kumar et al., 1997a). Für die Auslösung der Apoptose spielt die Phosphorylierung des Tyrosinrests 701 keine Rolle, aber STAT1 mit einer Mutation von Serin 727 nach Alanin führt zur Unterdrückung der Apoptoseinduktion durch STAT1 (Kumar et al., 1997a). Phosphorylierung des Serinrestes 727 trägt zu einem Anstieg der IFN γ -abhängigen Zielgenaktivierung bei. Es offenbart sich eine wichtige Funktion für die Phosphorylierung von Serin 727, die nicht nur für die optimale Genaktivierung durch IFN γ notwendig ist, sondern auch eine Rolle in der basalen Genaktivierung der Caspasegene spielt (Kumar et al., 1997a; Zang et al., 1995; Wen et al., 1995; Nair et al., 2002; Goh et al., 1999).

Die Resultate der RT-PCR machen deutlich, daß die Aktivierung der Caspasegene ICE und ICH-1 von der Anwesenheit von STAT1 abhängig ist. In der Abbildung 3.27. wurde keine Aktivierung der Caspase ICE in STAT1-defizienten U3A-Zellen beobachtet. Wenn STAT1 exprimiert wurde, kam es zu einer signifikanten Induktion des ICE-Gens, und auch das Gen der Caspase ICH-1 wurde stärker aktiviert. Die basale Aktivierung dieser Caspasegene war unabhängig von dem nukleocytoplasmatischen Aufenthaltsort von STAT1 in den Zellen. STAT1 $\alpha^{LL407/409AA}$, STAT1 $\alpha^{LL308/312AA}$, STAT1 α^{CAAX} , STAT1 α^{AAAX} und STAT1 α^{WT} führten zu einer Aktivierung der Caspasegene ICE und ICH-1. Die Untersuchungen zur TNF α -vermittelten Apoptoseinduktion bestätigten die Resultate der basalen Genaktivierung der Caspasen ICE und ICH-1 (Abb. 3.27). Die Expression von STAT1 α führt zu einer TNF α -induzierten Apoptose in U3A-Zellen, wobei die Anwesenheit von STAT1 α im Cytosol bereits für eine Apoptoseinduktion ausreicht. Die TNF α -vermittelte Apoptoseinduktion konnte durch unabhängige Nachweismethoden der Apoptose wie TUNEL-Test und DNA-Fragmentierung in den Abbildungen 3.28. und 3.29. gezeigt werden.

Die Daten für die Induktion der Apoptose decken sich mit den Resultaten aus der Literatur. Die Anwesenheit von monomerem STAT1 ist ausreichend, damit es zu einer basalen Genaktivierung der Caspase ICE kommt und eine signifikante Auslösung der Apoptose durch TNF α beobachtet werden kann (Kumar et al., 1997a; Na et al., 1996; Chin et al., 1997). Es könnte möglich sein, daß der programmierte Zelltod von cytoplasmatisch lokalisiertem STAT1 ausgelöst wird, ohne dabei einer Kernpräsenz zu bedürfen. Dieses würde einem neuen, noch unbekanntem Signalweg entsprechen. In einer weiteren Veröffentlichung wurde gezeigt, daß die Präsenz des C-Terminus von STAT1 ausreicht, damit es zu einer Induktion der Apoptose kommt. So konnte in humanen Herzzellen beobachtet werden, daß die alleinige Expression der Transaktivierungsdomäne von STAT1 apoptotische Zelluntergänge im ischämischen Herzmuskel auslösen kann. Die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 727 ist in Kardiomyozyten für die Auslösung der Apoptose im infarzierten Gewebe wichtig, wobei eine Phosphorylierung von Tyrosin 701 oder die autonome Bindung von STAT1 an GAS-Sequenzen keine Rolle für die Induktion der Apoptose spielt (Stephanou et al., 2002). Weitere Resultate weisen auf einen Abbau von STAT1 durch die Caspase 1 hin, durch die STAT1 in einer Konsensussequenz für das katalytische Zentrum der Caspase 1 an der Aminosäure Asparaginsäure 694 im C-terminalen Bereich geschnitten wird (King und Goodbourn, 1998). Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und die vorhandenen Veröffentlichungen geben Hinweise auf ein sehr dynamisches Bild der Apoptoseauslösung. STAT1 könnte in dem TNF α -vermittelten Signalweg eine regulatorische Rolle zwischen der Apoptoseinduktion und dem NF κ B-vermittelten Überleben der Zellen spielen.

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 -