

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung einer neuen STAT1-Mutante

Um mehr über die Mechanismen und Signale zu erfahren, die die subzelluläre Verteilung von STAT1 regulieren, wurde die Lokalisation verschiedener GFP-markierter STAT1-Derivate in HeLa-Zellen untersucht. Wie bereits demonstriert, ist das Verhalten von C-terminalen STAT1-Fusionsproteinen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* mit dem von endogenem STAT1 vergleichbar (Köster und Hauser, 1999; Begitt et al., 2000). So konnte gezeigt werden, dass eine IFN γ -Stimulation die Aktivierung und Kernakkumulation von GFP-markiertem STAT1 α induziert.

Abbildung 2 zeigt die subzelluläre Verteilung von STAT1 α und den zwei N-terminal deletierten STAT1-Derivaten STAT1 Δ N und STAT1 Δ N Tyrosin⁷⁰¹Phenylalanin, denen jeweils die ersten 126 Aminosäuren fehlen. In unstimulierten Zellen weisen alle drei STAT1-Derivate eine panzelluläre Verteilung auf, was auf ihre Fähigkeit zur Passage der Kernmembran schließen lässt. Verblüffenderweise induziert die Stimulation mit IFN γ , die zur Kernakkumulation von STAT1 α führt, bei STAT1 Δ N eine Abnahme der nukleären Fluoreszenz und resultiert in einer Akkumulation des Proteins im Cytoplasma. Diese inverse Akkumulation bedarf, genau wie die Kernakkumulation des wildtypischen Proteins, der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung, denn die Mutante STAT1 Δ N Tyrosin⁷⁰¹Phenylalanin, bei der die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierungsstelle mutiert wurde, bleibt insensitiv gegenüber IFN γ .

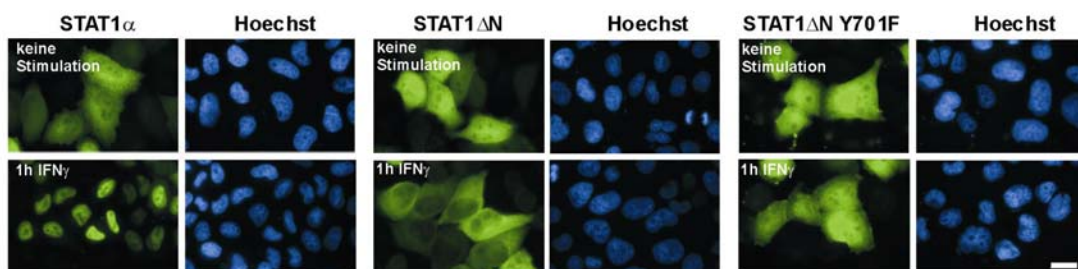


Abbildung 2: IFN γ -Stimulation induziert die cytoplasmatische Akkumulation N-terminaler STAT1-Mutanten.

STAT1 α -, STAT1 Δ N-, oder STAT1 Δ N Tyrosin⁷⁰¹Phenylalanin (Y701F)- GFP-Fusionsprotein-exprimierende HeLa-Zellen wurden für 1 h mit IFN γ stimuliert, anschließend fixiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz und die Kernfärbung fixierter Zellen. Balken: 20 μ m.

Um auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten Cytokin-induzierten, inversen Akkumulation von STAT1 Δ N um ein durch den GFP-Anteil des Fusionsprotein hervorgerufenes Artefakt handelt, wurden die in Abbildung 2 dargestellten Versuche mit nicht-GFP-markiertem STAT1 wiederholt. Die Detektion der in STAT1-defizienten Zellen exprimierten, unmarkierten STAT1-Derivate erfolgte immunocytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper. Da STAT1-defiziente U3A-Zellen, vermutlich aufgrund einer nur unzureichenden Expression der IFN-Rezeptoren, relativ insensitiv gegenüber IFN γ -Stimulation sind, wurde ein chimärer Erythropoietinrezeptor kotransfiziert. Dieser Rezeptor ermöglicht die STAT1-Aktivierung durch Stimulation mit Erythropoietin (Gerhartz et al., 1996), wodurch auch IFN γ -spezifische Effekte ausgeschlossen werden können. Wie in Abbildung 3 zu sehen, zeigt auch unmarkiertes STAT1 Δ N in unstimulierten Zellen eine panzelluläre Verteilung und akkumuliert nach Cytokin-Stimulation nicht wie STAT1 α im Kern, sondern im Cytoplasma. Der beobachtete Phänotyp ist demzufolge unabhängig vom GFP-Anteil des Fusionsproteins.

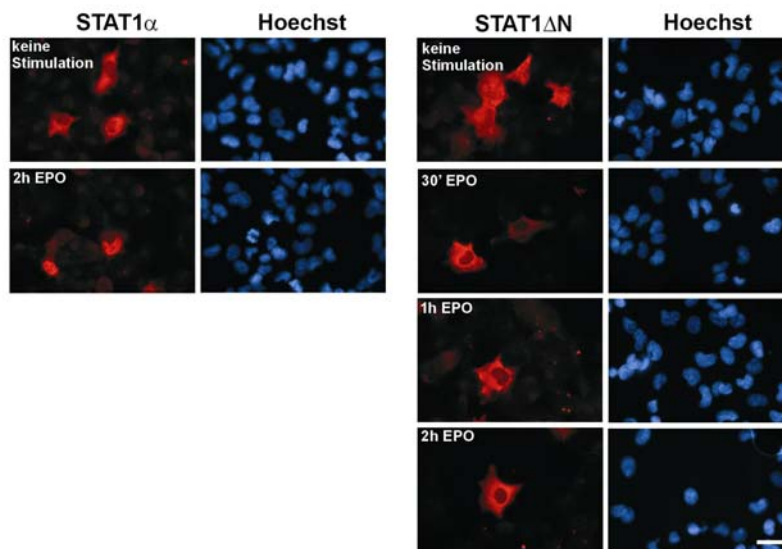


Abbildung 3: Die Cytokin-induzierte cytoplasmatische Akkumulation von STAT1 Δ N ist unabhängig vom GFP-Anteil.

STAT1 α oder STAT1 Δ N und einen chimären Erythropoietinrezeptor koexprimierende U3A-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 7 Einheiten/ml Erythropoietin (EPO) stimuliert, bevor die STAT1 Lokalisation immunocytochemisch mit einem STAT1-spezifischen Antikörper detektiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt wurde. Balken: 20 μ m.

Bereits Strehlow und Schindler demonstrieren eine fehlende Kernakkumulation von N-terminalen STAT1-Mutanten (1998). Der von den Autoren postulierte Importdefekt N-terminal deletierter STAT1-Derivate konnte bislang jedoch nicht bewiesen werden. Die über eine fehlende Kernakkumulation hinaus gehende Beobachtung, dass N-terminal deletierte STAT1-Derivate auf Cytokin-Stimulation mit einer Anreicherung im Cytoplasma reagieren, ist bisher jedoch nicht beschrieben worden. Die Tatsache, dass STAT1 Δ N in unstimulierten Zellen im Kern lokalisiert ist, spricht gegen einen generellen Importdefekt. Wenn überhaupt, so scheint ein Importdefekt nur das Tyrosin-phosphorylierte Molekül zu betreffen. Für das Verhalten von STAT1 Δ N nach Cytokin-Stimulation sind jedoch auch alternative Ursachen, wie eine unzureichende Kernretention oder ein verstärkter Export denkbar. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

Die Möglichkeit, dass eine Cytokin-Stimulation den Abbau von STAT1 Δ N im Kern induziert, wurde mit Hilfe des Proteasom-Inhibitors MG132 untersucht. Die Zugabe von MG132 kann die beobachtete „Kern-frei-Bewegung“ jedoch weder verhindern, noch verzögern (Abbildung 4). Auch Western-Blot-Experimente liefern keine Indizien für einen erhöhten Abbau von STAT1 Δ N nach Cytokin-Stimulation. So können weder Abbauprodukte detektiert werden, noch nimmt die STAT1 Δ N-Konzentration nach Cytokin-Stimulation ab (Abbildung 22B).

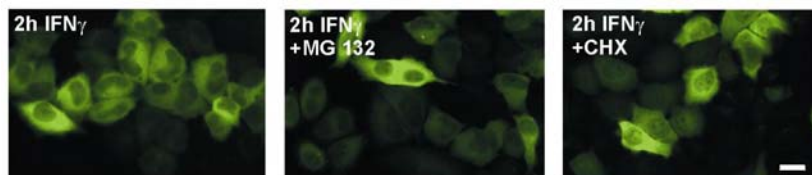


Abbildung 4: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die cytoplasmatische Akkumulation von STAT1 Δ N.

STAT1 Δ N-GFP-exprimierende HeLa-Zellen wurden für 2 h mit IFN γ stimuliert, um eine cytoplasmatische Akkumulation zu induzieren. Bereits 1 h vor IFN γ -Stimulation wurde, wenn angegeben, Cycloheximid (+CHX) oder MG 132 (+MG 132) zu den Zellen gegeben. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz fixierter Zellen. Balken: 20 μ m.

Um einen Hinweis auf die Ursache der beobachteten cytoplasmatischen Akkumulation von STAT1 Δ N zu erhalten, wurde das in Abbildung 2 beschriebene Experiment in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren wiederholt. Aber weder die spezifische Inhibition einzelner Serinkinasen, wie der Proteinkinase C (durch Behandlung der Zellen mit Bisindolylmaleimid oder Rottlerin), der Ca⁺⁺/Calmodulin-abhängigen Kinase CaMK III (durch Rottlerin), der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase (durch PB98059), der Kinase p38 (durch SB 202190) oder der Phosphatidylinositol 3-Kinase (durch Ly 294002) noch der unspezifische Kinase-Inhibitor H7 können die cytoplasmatische Akkumulation von STAT1 Δ N nach IFN γ -Stimulation verhindern (Daten nicht

gezeigt). Auch der Translations-Inhibitor Cycloheximid (Abbildung 4) und die Phosphatase-Hemmer Wortmannin und Okadaic acid (Daten nicht gezeigt) haben keinen Effekt auf die „Kern-frei-Bewegung“ von STAT1 Δ N. Allein der unspezifische Tyrosinkinase-Inhibitor Staurosporin, der die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 hemmt, verhindert, genau wie die Mutation der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierungsstelle (Abbildung 2), eine cytoplasmatische Akkumulation von STAT1 Δ N nach IFN γ -Stimulation (Daten nicht gezeigt).

4.1.1 Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten STAT1-Derivate

Die Kernakkumulation von STAT1 nach Cytokin-Stimulation erfordert die Tyrosin-Phosphorylierung, Dimerisierung und DNA-Bindung des Proteins (Shuai et al., 1992; Darnell et al., 1994; Mowen und David, 1998; Herrington et al., 1999). Um zu prüfen, ob diese Eigenschaften durch eine Deletion des N-Terminus beeinträchtigt werden und um zu zeigen, dass das Expressionsniveau von STAT1 α und STAT1 Δ N vergleichbar ist, wurden Western-Blot- und Gelretardations-Experimente durchgeführt. Da STAT1 in zwei unterschiedlich gespleißten Isoformen, STAT1 α und STAT1 β , existiert, die sich in der Expression des C-Terminus unterscheiden und da der Einfluss des C-Terminus auf die Translokationseigenschaften von STAT1 im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch untersucht werden wird, wurden auch die Isoform STAT1 β und die Punktmutante STAT1 Serin⁷²⁷Alanin, sowie deren N-terminal deletierten Derivate STAT1tc und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin in diese Untersuchungen mit einbezogen. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung dieser Derivate.

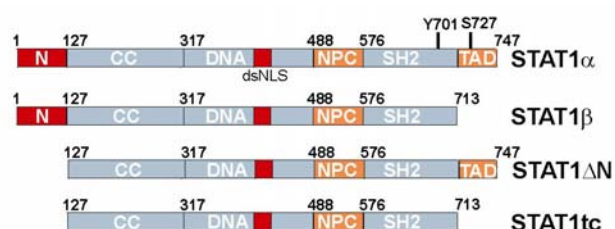


Abbildung 5: Schematische Darstellung der verwendeten STAT1-Derivate

N- (N); Vier-Helix-Bündel (coiled coil) (CC); DNA-Binde- (DNA); Verbindungs- oder Kernporenkomplex-Binde- (NPC); SH2- (SH2) und Transaktivierungsdomäne (TAD). Das dimerspezifische nukleäre Lokalisationssignal (dsNLS), sowie die beiden Phosphorylierungsstellen Tyrosin⁷⁰¹ und Serin⁷²⁷ sind eingezeichnet.

Die Expression der STAT1-GFP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen wurde im Western-Blot-Experiment mit einem STAT1-spezifischen Antikörper untersucht (Abbildung 6A: oberer Blot). Um zu zeigen, dass Zellextrakte vergleichbarer Proteinkonzentration aufgetragen worden waren,

wurde nach Entfernen des STAT1-spezifischen Antikörpers die β -Aktin-Expression überprüft. Auf einem separaten Blot wurden die Zelllysate außerdem mit einem GFP-spezifischen Antikörper analysiert (Abbildung 6A: unterer Blot). Wie zu sehen, ist das Expressionsniveau der STAT1-Derivate untereinander vergleichbar und es sind weder Abbauprodukte noch freies GFP detektierbar.

Zur Expression in STAT1-defizienten U3A-Zellen wurden pcDNA-Vektoren verwendet, die die Expression von nicht-GFP-markiertem STAT1 erlauben. Auch hier wurde für alle untersuchten STAT1-Derivate ein vergleichbares Expressionsniveau erreicht (Abbildung 6B).

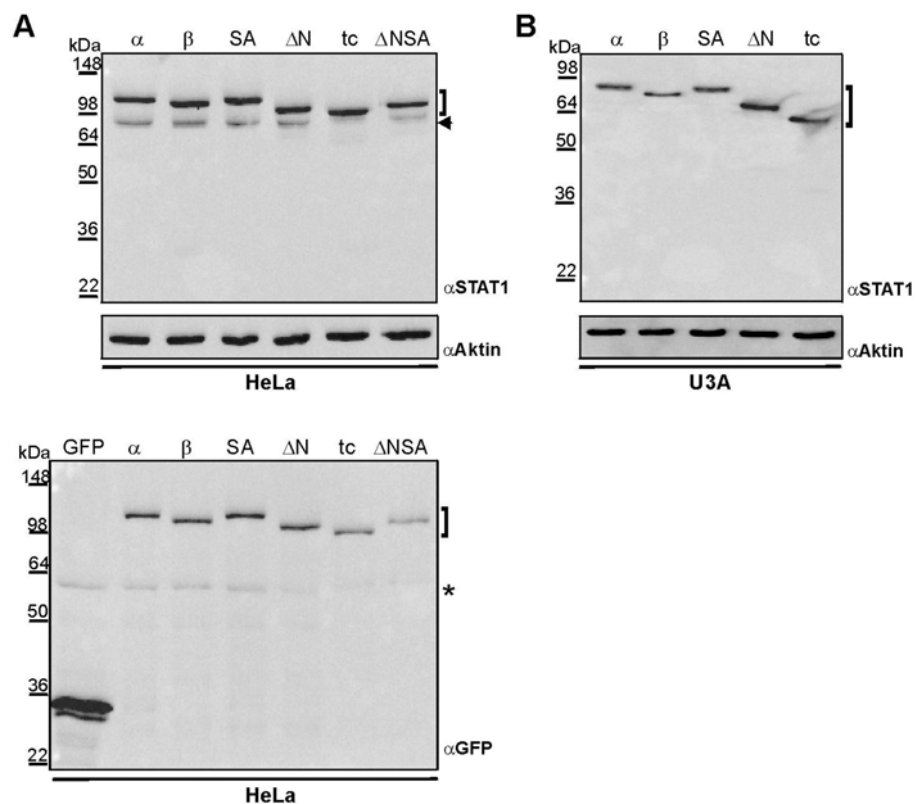


Abbildung 6: Expressionsniveau der in dieser Arbeit verwendeten STAT1-Derivate.

(A) Western-Blot-Experiment mit einem STAT1-spezifischen (α STAT1), einem β -Aktin-spezifischen (α Aktin), sowie einem gegen GFP gerichteten Antikörper (α GFP) zur Analyse des Expressionsniveaus transient exprimierter STAT1-Derivate. Aufgetragen wurden Ganzzellextrakte gleicher Zellzahl von unstimulierten HeLa-Zellen, die GFP-markiertes STAT1 α (α), STAT1 β (β), STAT1 Serin⁷²⁷Alanin (SA), STAT1 ΔN (ΔN), STAT1tc (tc), STAT1 ΔN Serin⁷²⁷Alanin (ΔNSA) oder freies GFP (GFP) enthielten. Die Position der ektopisch exprimierten STAT1-Proteine ist durch eine Klammer, endogenes STAT1 durch einen Pfeil gekennzeichnet; der Stern markiert eine unspezifische Bande. (B) Wie in (A), außer dass Ganzzellextrakte von mit den entsprechenden unmarkierten STAT1-Derivaten transfizierten U3A-Zellen verwendet wurden.

Gelretardations-Experimente („Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA)) erlauben über den Nachweis der DNA-Bindung auch einen Rückschluss auf eine erfolgreiche Dimerisierung von STAT-Proteinen. In EMSA-Reaktionen mit Ganzzellextrakten transfizierter U3A-Zellen konnte die Bindung von STAT1 α , STAT1 β , STAT1 Serin⁷²⁷ Alanin, STAT1 Δ N und STAT1tc an eine [³²P]-markierte, hochaffine DNA-Sonde (M67) demonstriert werden (Abbildung 7). Die Reaktion in Anwesenheit eines STAT1-Antikörpers (S) beweist die Identität der detektierten Bande als STAT1-DNA-Komplex. Stimuliert wurde für 45 Min. mit IFN γ , gefolgt von einer fünfzehnminütigen Inkubation mit dem Phosphatase-Inhibitor Vanadat. Die Koexpression der Tyrosinkinase c-Eyk gewährleistete eine maximale Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung (Zong et al., 1996). Im Western-Blot-Experiment wurde die STAT1-Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung zunächst überprüft und die Extrakte anschließend durch Mischen mit identisch hergestellten Extrakten untransfizierter U3A-Zellen hinsichtlich der Konzentrationen von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 abgeglichen (3.3.13). Es wurden gleiche Mengen normalisierter Extrakte in die EMSA-Reaktion eingesetzt.

Bei vergleichbarer Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung (Western-Blot-Experiment in Abbildung 7 unten) zeigen alle STAT1-Derivate die gleiche Bindungsaktivität. Dies demonstriert, dass eine Deletion des N- oder des C-Terminus, sowie die Mutation der Phosphorylierungsstelle Serin⁷²⁷ zu Alanin keinen Einfluss auf die Dimerisierung von STAT1 hat und bestätigt damit frühere Ergebnisse (Shuai et al., 1996; Vinkemeier et al., 1996; Wen et al., 1997; Strehlow und Schindler, 1998).

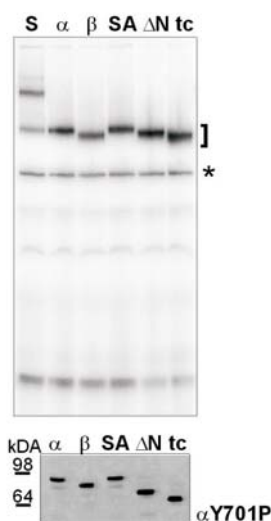


Abbildung 7: Gelretardations-Experiment zum Nachweis der STAT1-DNA-Bindeaktivität.

Ganzzellextrakte (3.3.14) von U3A-Zellen, die mit den angegebenen STAT1-Derivaten und der Tyrosinkinase c-Eyk kotransfiziert worden waren, wurden für 30 Min. mit einer [³²P]-markierten, hochaffinen STAT1-DNA-Sonde inkubiert und nachfolgend elektrophoretisch aufgetrennt. Der STAT1-DNA-Komplex ist durch eine Klammer gekennzeichnet, der Stern markiert eine unspezifische Bande. Die Reaktion in Bahn (S) ist identisch zu der in (α), außer dass ein STAT1-spezifischer Antikörper nach 15 Min. zur Reaktion zugegeben wurde. Der Einsatz vergleichbarer Konzentrationen an Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 in die Reaktion wurde im Western-Blot-Experiment (unten) mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper nachgewiesen.

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass STAT1 Δ N durch einen Tyrosin⁷⁰¹-Dephosphorylierungsdefekt gekennzeichnet ist, der eine Hyperphosphorylierung des Proteins nach Cytokin-Stimulation zur Folge hat (Shuai et al., 1996; Meyer et al., 2004). Es wurde nun untersucht, ob auch STAT1tc und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin diesen Tyrosin⁷⁰¹-Dephosphorylierungsdefekt zeigen. Hierfür wurden STAT1 Δ N-, STAT1tc- und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin-exprimierende U3A-Zellen für 45 Min. mit Erythropoietin stimuliert. Anschließend wurde das Cytokin entzogen und Staurosporin zugegeben. Der Kinase-Inhibitor Staurosporin verhindert eine Rephosphorylierung und ermöglicht so die direkte Analyse der Dephosphorylierungsrate. Im Fall von STAT1 α führt die Zugabe von Staurosporin innerhalb von 30 Min. zu einem Zusammenbruch der Tyrosin-Phosphorylierung (Abbildung 23; Abbildung 33). Wie Abbildung 8 zeigt, sind die drei N-terminal verkürzten STAT1-Derivate STAT1 Δ N, STAT1tc und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin dagegen resistent gegenüber Dephosphorylierung. Die einmal induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von N-terminal deletierten STAT1-Derivaten ist demzufolge nahezu irreversibel.

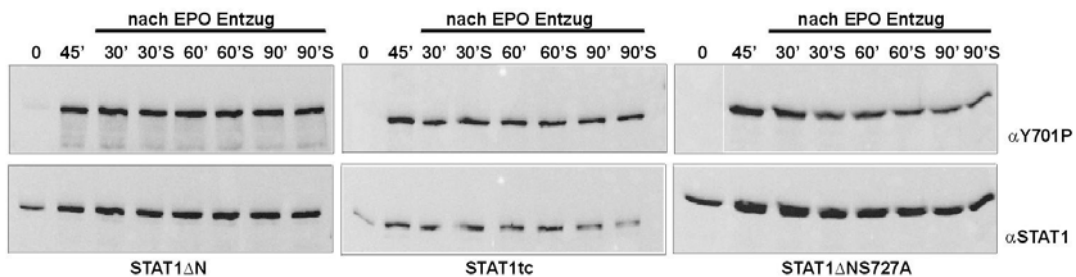


Abbildung 8: Tyrosin⁷⁰¹-Dephosphorylierungskinetik N-terminaler STAT1-Deletionsmutanten.

Western-Blot-Experiment mit Ganzzell-extrakten von U3A-Zellen, die mit den angegebenen STAT1-GFP-Fusionsproteinen und einem chimären Erythropoietinrezeptor kotransfiziert worden waren. Die Zellen wurden für 45 Min. mit 7 Einheiten/ml Erythropoietin (EPO) stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach Erythropoietin-Entzug wurden die Zellen für 30, 60 oder 90 Min. in An- (S) oder Abwesenheit des Kinase-Inhibitors Staurosporin (0,5 μ M) weiterkultiviert. Die Analyse der Ganzzell-extrakte erfolgte mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1- (α Y701P) und anschließend mit einem STAT1-spezifischen (α STAT1) Antikörper.

4.1.2 N-terminal deletierte STAT1-Derivate sind nach Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung vom Kernimport ausgeschlossen

In Mikroinjektions-Experimenten mit rekombinantem STAT1 konnte demonstriert werden, dass der N-Terminus keinen Einfluss auf den Kernimport von unphosphoryliertem STAT1 hat (Marg et al., 2004). Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse sind einer Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe entnommen (Marg et al., 2004) und wurden freundlicherweise von Dr. A. Marg zur Verfügung gestellt. Für diese Experimente wurde aus Insektenzellen aufgereinigtes STAT1 α oder STAT1tc in das Cytoplasma ruhender HeLa-Zellen injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. wurden die Zellen fixiert und das injizierte Protein durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines STAT1-spezifischen Antikörpers detektiert (Abbildung 9). Um die injizierten Zellen identifizieren zu können und um das Kompartiment zu kennzeichnen, in das die Injektion erfolgte, wurde FITC-gekoppeltes BSA koinjiziert. BSA ist mit einer Größe von 66 kDA nicht in der Lage, die Kernmembran zu passieren und verbleibt daher im injizierten Kompartiment. Wie Abbildung 9 demonstriert, kommt es bereits innerhalb weniger Minuten zu einem Übertritt von unphosphoryliertem STAT1 in den Kern und sowohl STAT1 α als auch STAT1tc können im Zellkern detektiert werden. Beide Derivate zeigen 15 Min. nach cytoplasmatischer Mikroinjektion eine panzelluläre Verteilung. Die Deletion des N- oder C-Terminus hat demnach keinen Einfluss auf den Kernimport von unphosphoryliertem STAT1.

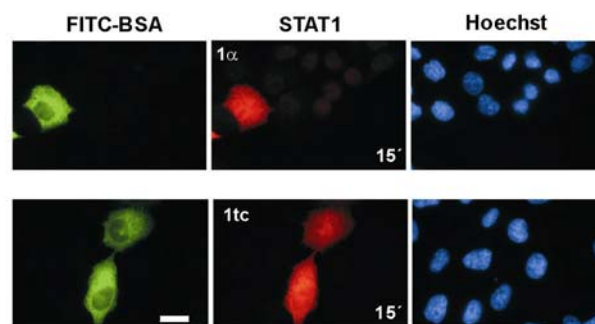


Abbildung 9: Der N-Terminus hat keinen Einfluss auf den Kernimport von unphosphoryliertem STAT1

Komikroinjektion von rekombinantem, unphosphoryliertem STAT1 α (1 α) oder STAT1tc (1tc) und FITC-markiertem BSA (als Injektionskontrolle) in das Cytoplasma unstimulierter HeLa-Zellen. 15 Min. nach Injektion wurden die Zellen fixiert und das injizierte STAT1 immunocytochemisch detektiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst-Farbstoff. Balken: 20 μ m.

Für den Aufbau einer Kernakkumulation ist neben einem Kernimport auch die Retention von STAT1 im Kern erforderlich (Meyer et al., 2003). Um zwischen Import und Retention zu unterscheiden, wurden Mikroinjektions-Experimente mit Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 Δ N

durchgeführt. Für diese Experimente wurde rekombinantes STAT1 α und STAT1 Δ N mit Hilfe des EGF-Rezeptors *in vitro* Tyrosin⁷⁰¹ phosphoryliert (Vinkemeier et al., 1996) und wie gerade beschrieben in das Cytoplasma unstimulierter HeLa-Zellen injiziert. Abbildung 10A (wie auch Abbildung 31A) zeigt, dass Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 α bereits 15 Min. nach cytoplasmatischer Injektion im Zellkern akkumuliert. Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 Δ N verbleibt dagegen im Cytoplasma (Abbildung 10A) und kann auch nach längeren Inkubationszeiten (Zeitpunkte nicht gezeigt) nicht im Zellkern detektiert werden.

Die Möglichkeit, dass Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 Δ N zwar in den Kern transportiert wird, diesen aber sofort wieder verlässt, wurde durch die Mikroinjektion von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 Δ N in den Kern ausgeschlossen. Genau wie Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 α (Meyer et al., 2003) kann auch Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 Δ N den Zellkern nicht verlassen und verbleibt im injizierten Kompartiment (Abbildung 10B).

Zusammen demonstrieren diese Experimente, dass die fehlende Kernakkumulation von STAT1 Δ N auf einen Importdefekt des Tyrosin⁷⁰¹-phosphorylierten Moleküls zurückzuführen ist. Der Kernimport von unphosphoryliertem STAT1 wird dagegen durch eine Deletion des N-Terminus nicht beeinflusst.

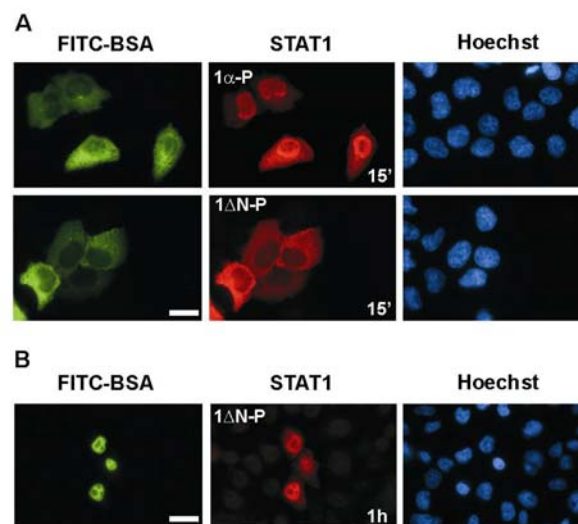


Abbildung 10: Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 Δ N ist vom Kernimport ausgeschlossen.

(A) Komikroinjektion von rekombinantem, *in-vitro*-Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 α (1 α -P) oder STAT1 Δ N (1 Δ N-P) und FITC-markiertem BSA in das Cytoplasma ruhender HeLa-Zellen. 15 Min. nach Injektion wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation der injizierten STAT1-Proteine immunocytochemisch mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper detektiert und die Kerne mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Balken: 20 μ m. (B) Wie (A), außer dass *in-vitro*-Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 Δ N (1 Δ N-P) in den Kern injiziert wurde und die Zellen 1 h nach Injektion fixiert wurden.

4.1.3 Der N-Terminus von STAT1 ist für eine Bindung an Importin $\alpha 5$ erforderlich

Der Import von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 erfordert die Bildung eines Transportkomplexes mit Importin $\alpha 5$ und Importin β (Sekimoto et al., 1997). Um zu untersuchen, ob der N-Terminus von STAT1 für eine Interaktion mit dem Importrezeptor Importin $\alpha 5$ erforderlich ist, wurden Bindungsstudien durchgeführt (Abbildung 11).

In einem Vorversuch, der zur Etablierung der Methode diente (Abbildung 11A), wurden zunächst Ganzzellextrakte von unstimulierten oder IFN γ -stimulierten HeLa-Zellen mit rekombinantem Importin $\alpha 5$ inkubiert. Nach zweistündiger Inkubation wurde Importin $\alpha 5$ präzipitiert und gebundenes STAT1 im Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 11A: Bahn 3 und 4). Der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierungs-Status von STAT1 in den eingesetzten Extrakten wurde auf einem separaten Blot mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Antikörper überprüft (Bahn 5 und 6). Wie Abbildung 11A zeigt, kann STAT1 nur aus Extrakten stimulierter Zellen, die Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 enthalten, präzipitiert werden (Bahn 4), obwohl beide Extrakte vergleichbare Mengen an STAT1 enthalten (Bahn 1 und 2). Dieses Ergebnis bestätigt Sekimoto und Kollegen, die bereits zeigen konnten, dass nur Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 mit Importin $\alpha 5$ interagiert (Sekimoto et al., 1997).

Um zu untersuchen, ob STAT1 Δ N die Fähigkeit zur Bindung an Importin $\alpha 5$ verloren hat, wurde der Importin $\alpha 5$ -Bindungs-Assay mit Zellextrakten wiederholt, die Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 α oder STAT1 Δ N enthielten. Hierfür wurden STAT1 α und STAT1 Δ N in STAT1-defizienten U3A-Zellen exprimiert. Wie kürzlich von uns und anderen gezeigt werden konnte, führt der Austausch kritischer Lysine (410/413) oder Leuzine (407/409) innerhalb eines Motivs, das sich in der DNA-Bindedomäne von STAT1 befindet, zum Verlust der Importin $\alpha 5$ -Bindung (Fagerlund et al., 2002; Meyer et al., 2002b). Die beiden STAT1-Derivate STAT1 Lysin^{410/413}Glutamat und STAT1 Leuzin^{407/409}Alanin, bei denen dieses Motiv mutiert wurde, konnten daher als Negativ-Kontrollen eingesetzt werden (Abbildung 11B und C: Bahn 3 und 6). Um eine möglichst hohe Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung zu erreichen, wurde die Tyrosinkinase c-Eyk, die STAT1 Signal-unabhängig phosphoryliert (Zong et al., 1996), kotransfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen für 30 Min. mit IFN γ stimuliert. Die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung der STAT1-Derivate wurde im Western-Blot analysiert und die Konzentration von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 in den Extrakten durch Mischen mit Zellextrakten untransfizierter U3A-Zellen abgeglichen. Es wurden gleiche Mengen normalisierter Extrakte in die Bindungsre-

aktion eingesetzt (Abbildung 11B: Bahn 1, 2 und 3). Wie erwartet kann phosphoryliertes STAT1 α durch Importin $\alpha 5$ präzipitiert werden (Bahn 4). Phosphoryliertes STAT1 ΔN zeigt dagegen keine Bindung an Importin $\alpha 5$ (Bahn 5). Der N-Terminus von STAT1 ist demzufolge für die Bindung an den Importrezeptor Importin $\alpha 5$ erforderlich. Auch die bereits charakterisierte Importmutante STAT1 Lysin^{410/413}Glutamat kann nicht im Präzipitat nachgewiesen werden (Bahn 6).

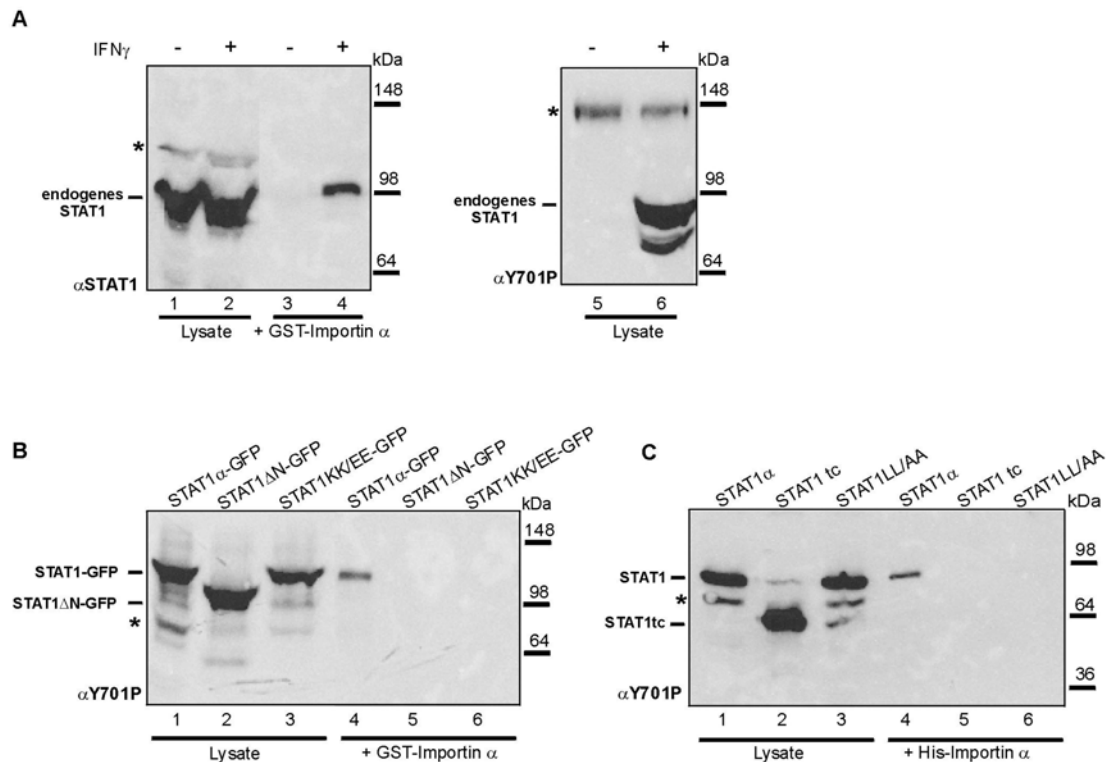


Abbildung 11: N-terminale STAT1 Deletionsmutanten sind nicht in der Lage Importin $\alpha 5$ zu binden.

(A) Nur Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 α interagiert mit Importin $\alpha 5$. Pulldown-Assay mit rekombinatem, an Glutathion-Sepharse-gebundenem Importin $\alpha 5$ und Ganzzelextrakten von unstimulierten (-) oder für 30 Min. mit IFN γ -stimulierten (+) HeLa-Zellen. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach Bradford bestimmt und vergleichbare Konzentrationen in die Bindungsreaktion eingesetzt. Nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine in SDS-Probenpuffer gelöst und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit einem STAT1-spezifischen Antikörper (α STAT1); die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung nach IFN γ -Stimulation wurde mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper nachgewiesen (α Y701P). Die Sterne markieren unspezifische Banden. (B) Der Importin $\alpha 5$ -Bindungs-Assay erfolgte wie in (A), außer dass Ganzzelextrakte von IFN γ -stimulierten und mit Vanadat behandelten U3A-Zellen, die mit STAT1 α -, STAT1 ΔN - oder STAT1K^{410/413}E-GFP-Fusionsproteinen und der Tyrosinkinase c-Eyk kotransfiziert worden waren, verwendet wurden. Vergleichbare Konzentrationen an Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 wurden in die Bindungsreaktion eingesetzt und die Analyse erfolgte im Western-Blot mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper. (C) Identisch zu (B), außer dass GST-markiertes-Importin $\alpha 5$ durch an Nickelagarose-gebundenes Histidin-markiertes Importin $\alpha 5$ ersetzt wurde und die U3A-Ganzzelextrakte unmarkierte STAT1-Derivate enthielten. In diesem Fall diente die Mutante STAT1L^{407/409}A als Negativ-Kontrolle, und die Bindungsaktivität der N-terminalen Deletionsmutante STAT1tc wurde untersucht.

Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Versuch mit nicht-GFP-markierten STAT1-Derivaten bestätigt werden (Abbildung 11C). Durch die Verwendung von Histidin-markiertem Importin $\alpha 5$ (ein Geschenk von Dr. M. Köhler, MDC-Berlin) konnte darüber hinaus eine Tag-spezifische Bindung ausgeschlossen werden. Wie die Abbildung 11C zeigt, bindet nur Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 α an Importin $\alpha 5$ (Bahn 4), obwohl gleiche Mengen an Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 α , STAT1tc und STAT1 Leuzin^{407/409}Alanin in die Bindungsreaktion eingesetzt wurden (Abbildung 11C: Bahn 1, 2 und 3). Die N-terminal deletierte Mutante STAT1tc kann wiederum nicht im Präzipitat nachgewiesen werden (Bahn 5). Auch die Negativ-Kontrolle STAT1 Leuzin^{407/409}Alanin zeigt keine Bindung an Importin $\alpha 5$ (Bahn 6).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals, dass der N-Terminus von STAT1 für die Interaktion mit dem Importrezeptor Importin $\alpha 5$ (Abbildung 11) und den Kernimport von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 erforderlich ist (Abbildung 10). Alle anderen Eigenschaften, die für eine Kernakkumulation von Bedeutung sind, wie Rezeptor-Erkennung, Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung, Dimerisierung und die Bindung an einfache GAS-Sonden sind von einer Deletion des N-Terminus nicht betroffen (Abbildung 7; Abbildung 8; Shuai et al., 1996; Vinkemeier et al., 1996; Strehlow und Schindler, 1998). Darüber hinaus ergaben Versuche mit dem Proteasom-Inhibitor MG 132 oder dem Translations-Hemmer Cycloheximid keine Hinweise darauf, dass proteasomaler Abbau oder Protein-Neusynthese für die cytoplasmatische Akkumulation von STAT1 ΔN nach Cytokin-Stimulation verantwortlich sind (Abbildung 4). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der beobachteten „Kern-frei-Bewegung“ von STAT1 ΔN ein Importdefekt des Tyrosin-phosphorylierten Moleküls zugrunde liegt.

4.2 Die Expression des C-Terminus erhöht die Rate der „Kern-frei-Bewegung“

In einem weiterführenden Versuch wurde nun die Zeitkinetik der Cytokin-induzierten „Kern-frei-Bewegung“ analysiert. Da STAT1 in zwei alternativen gespleißten Isoformen, STAT1 α und STAT1 β , vorkommt, wurden beide Spleißformen in diesem Experiment untersucht. Deletionen, die über den C-Terminus hinausgehen, wurden nicht eingeführt, da sie mit der Fähigkeit von STAT1 zur Dimerisierung und DNA-Bindung interferieren. Für die Induktion der cytoplasmatische Akkumulation, wurden die N-terminal verkürzten Derivate von STAT1 α (STAT1 ΔN) und STAT1 β (STAT1tc) als GFP-Fusionsproteine in HeLa-Zellen exprimiert und 24 Stunden nach Transfektion mit IFN γ stimuliert (Abbildung 12A).

Wie Abbildung 12A demonstriert, werden beide STAT1-Derivate vergleichbar gut exprimiert (vergleiche auch Western-Blot-Experiment in Abbildung 6) und zeigen in unstimulierten Zellen eine panzelluläre Verteilung. Bei STAT1 Δ N führt die Stimulation mit IFN γ bereits nach einer Stunde zu einer cytoplasmatischen Akkumulation des Proteins (Abbildung 12A: 1), die innerhalb der nächsten zwei Stunden noch geringfügig zunimmt (Abbildung 12: 2 und 3). Demgegenüber zeigt STAT1tc auch nach zwei Stunden Cytokin-Stimulation noch eine panzelluläre Verteilung (Abbildung 12A: 10, 11). Erst nach drei Stunden Stimulation wird eine Anreicherung von STAT1tc im Cytoplasma sichtbar (Abbildung 12A: 12).

Die Expression des C-Terminus scheint demnach die „Kern-frei-Bewegung“ zu beschleunigen. Um die Bedeutung des C-Terminus für die „Kern-frei-Bewegung“ weitergehend zu untersuchen, wurde nun auch die Rate der cytoplasmatischen Akkumulation bei der Punktmutante STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin nach Cytokin-Stimulation bestimmt (Abbildung 12). Bei dieser Mutante ist der konservierte Serinrest, der sich im C-Terminus befindet und der Signal-abhängig phosphoryliert wird, durch Alanin ersetzt. Interessanterweise hat diese Mutation einen intermediären Phänotyp zur Folge. Auch STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin zeigt eine Stunde nach Stimulation noch eine panzelluläre Verteilung (Abbildung 12A: 18). Im Gegensatz zu STAT1tc kommt es bei dieser Mutante aber bereits nach zwei Stunden Cytokin-Stimulation zu einer cytoplasmatischen Akkumulation (Abbildung 12A: 19), die dann noch weiter zunimmt (Abbildung 12A: 20).

Der Eindruck, dass über die Expression des C-Terminus und eine Serin⁷²⁷-Phosphorylierung die „Kern-frei-Bewegung“ von STAT1 reguliert wird, konnte durch eine quantitative Auswertung unterstützt werden (Abbildung 12B). Mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops wurde die Fluoreszenzdichte in Cytoplasma und Zellkern von 30 bis 60 Zellen pro STAT1-Derivat und Zeitpunkt ermittelt und der Quotient von nukleärer zu cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte bestimmt. Ein Quotient kleiner als 0,5 wurde als cytoplasmatische Akkumulation gewertet.

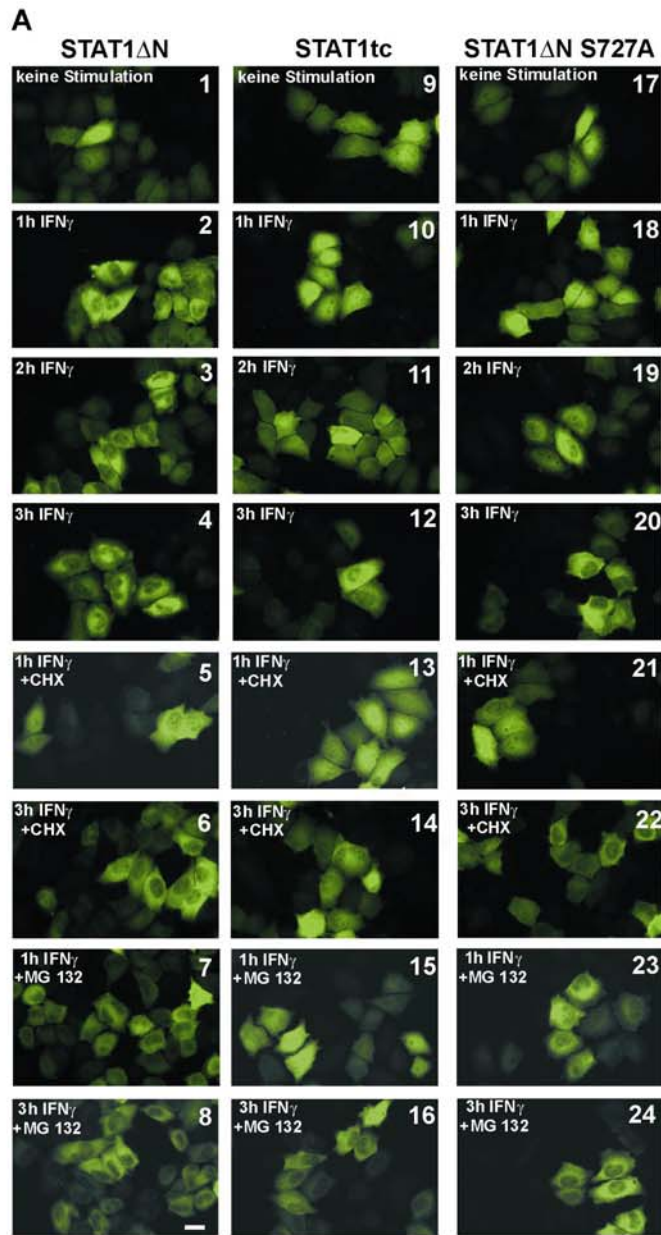
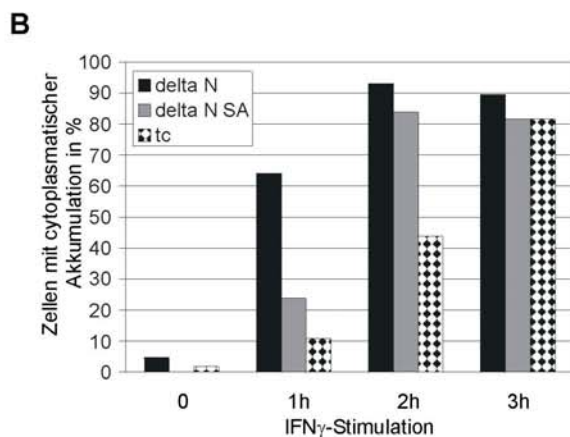


Abbildung 12: Einfluss der C-terminalen Transaktivierungsdomäne auf die „Kern-frei-Bewegung“ von STAT1 in stimulierten HeLa-Zellen.

(A) Transient STAT1 Δ N-, STAT1tc- und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin-GFP-Fusionsprotein-exprimierende HeLa-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit IFN γ stimuliert und anschließend fixiert. 1 h vor IFN γ -Stimulation wurde, wo angegeben, 10 μ g/ml Cycloheximid (+CHX) oder 50 nM MG132 (+MG132) zu den Zellen gegeben. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz fixierter Zellen. Balken: 20 μ m. (B) Quantitative Analyse der cytoplasmatischen Akkumulation N-terminaler Deletionsmutanten. STAT1 Δ N-, STAT1tc- oder STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin-GFP-exprimierende HeLa-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit IFN γ stimuliert und anschließend fixiert. Anhand konfokaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurde die Fluoreszenzdichte von 30-60 Zellen pro Zeitpunkt in Cytosol und Kern bestimmt und der Quotient von nukleärer zu cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte errechnet. Ein Quotient von [nukleärer Fluoreszenzdichte/cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte] \leq 0,5 wurde als cytoplasmatische Akkumulation gewertet.



Diese Auswertung bestätigt, dass die Mehrzahl der STAT1 Δ N-exprimierenden Zellen bereits eine Stunde nach Stimulation eine cytoplasmatische Akkumulation erreicht, für die die meisten der STAT1tc-exprimierenden Zellen drei Stunden benötigen (Abbildung 12B). So zeigen eine Stunde nach Stimulation bereits 60% der STAT1 Δ N-exprimierenden Zellen eine cytoplasmatische Akkumulation, aber erst 20% der STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin- und nur 10% der STAT1tc-exprimierenden Zellen. Nach zwei Stunden sind es 90% der STAT1 Δ N-, 80% der STAT1 Δ N S727A- und 40% der STAT1tc-exprimierenden Zellen. Erst eine dreistündige Stimulation führt auch bei 80% der STAT1tc-exprimierenden Zellen zu einer Akkumulation des Proteins im Cytoplasma (Abbildung 12B).

Es konnte bereits demonstriert werden, dass proteasomaler Abbau und Protein-Neusynthese nicht für die cytoplasmatische Akkumulation von STAT1 Δ N verantwortlich sind (Abbildung 4). Um darüber hinaus auszuschließen, dass diese Prozesse einen Einfluss auf die beobachteten Translokationsunterschiede zwischen STAT1 Δ N, STAT1tc und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin haben, wurden die oben beschriebenen Versuche in Anwesenheit von MG132 oder Cycloheximid wiederholt (Abbildung 12A: 5-8; 13-16; 21-24). Die Inhibitoren zeigen jedoch keinen Effekt auf die Rate der „Kern-frei-Bewegung“ von STAT1 Δ N, STAT1tc oder STAT1 Δ N Serin⁷²⁷Alanin.

Durch die Verwendung des Translations-Inhibitors Cycloheximid, aber auch durch die Tatsache, dass N-terminal deletierte STAT1-Derivate nach Aktivierung nicht in den Kern gelangen, kann die IFN γ -induzierte Expression eines regulatorischen Proteins als Ursache für die beobachteten Translokationsdifferenzen ausgeschlossen werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da der C-Terminus von STAT1 die Transaktivierungsdomäne umfasst und STAT1 β transkriptionell nicht aktiv und die Transkriptionsleistung nach Serin⁷²⁷-Mutation deutlich reduziert ist (Müller et al., 1993; Shuai et al., 1993; Wen et al., 1995).

Die Beobachtung einer durch Serin⁷²⁷-Mutation verlangsamten „Kern-frei-Bewegung“ impliziert, dass eine Serin⁷²⁷-Phosphorylierung die Rate der „Kern-frei-Bewegung“ erhöht. Aus diesem Grund sollte gezeigt werden, dass GFP-markiertes STAT1 Δ N in HeLa-Zellen tatsächlich Serin⁷²⁷-phosphoryliert wird (Abbildung 13). Hierfür wurden Extrakte stimulierter oder unstimulierter HeLa-Zellen, die GFP-markiertes STAT1 α , STAT1Serin⁷²⁷Alanin oder STAT1 Δ N exprimierten, im Western-Blot mit einem Phospho-Serin⁷²⁷-spezifischen Antikörper (Abbildung 13: oberer Western-Blot) und anschließend mit einem STAT1-spezifischen Antikörper (Abbildung 13: unterer Western-Blot) analysiert. Der eingesetzte Phospho-Serin⁷²⁷-spezifische Antikörper zeigt aller-

dings, wie die Negativ-Kontrolle STAT1 Serin⁷²⁷Alanin deutlich macht, eine gewisse Reaktivität auch gegenüber dem mutierten Epitop (Abbildung 13: Bahn 3, 4).

Erwartungsgemäß wird die Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von endogenem STAT1 durch IFN γ -Behandlung stark stimuliert. (Abbildung 13: Bahn 1 bis 6). Die ektopisch exprimierten, GFP-markierten STAT1-Derivate STAT1 α und STAT1 Δ N zeigen dagegen bereits vor Stimulation eine Serin⁷²⁷-Phosphorylierung, die durch Stimulation nur noch geringfügig gesteigert werden kann (Abbildung 13: Bahn 1, 2 und 5, 6). Eine nur schlecht regulierbare Serin⁷²⁷-Phosphorylierung transient transfizierter STAT1-Derivate wurde bereits beschrieben, der Grund hierfür ist jedoch nicht bekannt (Nguyen et al., 2001). Ungeachtet dessen demonstriert dieses Experiment, dass GFP-markiertes STAT1 Δ N in HeLa-Zellen an Serin⁷²⁷ phosphoryliert ist und bereits in unstimulierten Zellen in Serin⁷²⁷-phosphorylierter Form vorliegt.

Diese Ergebnisse machen jedoch auch deutlich, dass die Serin⁷²⁷-Phosphorylierung transient transfizierter STAT1-Derivate nur schlecht modulierbar ist. Dies ist möglicherweise der Grund dafür, dass es nicht gelang, die „Kern-frei-Bewegung“ von STAT1 durch eine zusätzliche Stimulation der Serin⁷²⁷-Phosphorylierung zu beschleunigen. Durch die Stimulation mit TNF α kann die Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von endogenem STAT1 unabhängig von einer Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung induziert werden (Decker und Kovarik, 2000). Auf die Rate der IFN γ -induzierten cytoplasmatischen Akkumulation von STAT1 Δ N hatte eine zusätzliche TNF α -Behandlung jedoch keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Wie das vorliegende Western-Blot-Experiment (Abbildung 13) demonstriert, ist die Serin-Phosphorylierung transient transfizierter STAT1-Derivate, im Gegensatz zu der des endogenen Proteins, jedoch kaum induzierbar und eine zusätzliche Stimulation bleibt daher vermutlich ohne Wirkung.

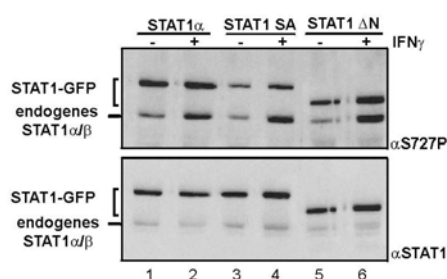


Abbildung 13: Nachweis der STAT1 Serin⁷²⁷-Phosphorylierung. STAT1 α -GFP-, STAT1 Serin⁷²⁷Alanin-GFP- und STAT1 Δ N-GFP-exprimierende HeLa-Zellen wurden für 45 Min. mit IFN γ stimuliert (+) oder unbehandelt belassen (-). Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit einem Phospho-Serin⁷²⁷-spezifischen STAT1- (α S727P) und anschließend einem STAT1-spezifischen (α STAT1) Antikörper. Die STAT1-GFP-Derivate sind durch eine Klammer (I) gekennzeichnet, endogenes STAT1 durch einen Strich (-).

Die in HeLa-Zellen beobachtete Regulation der „Kern-frei-Bewegung“ durch Expression des C-Terminus (Abbildung 12) konnte in U3A-Zellen bestätigt werden (Abbildung 14). STAT1-defiziente U3A-Zellen wurden ausgewählt, um sicherzugehen, dass die beobachteten Translokationsdifferenzen zwischen STAT1 Δ N und STAT1tc nicht die Folge einer möglicherweise unterschiedlichen Tendenz zur Heterodimerbildung mit endogenem STAT1 sind. Die Kotransfektion eines chimären Erythropoietinrezeptors erlaubte die Stimulation mit Erythropoietin (EPO), so dass auch IFN γ -spezifische Effekte ausgeschlossen werden konnten (vergleiche 4.1).

Eine Stimulation mit 7 Einheiten/ml Erythropoietin führt bei STAT1 α innerhalb von einer Stunde zu der erwarteten Kernakkumulation, bei STAT1 Δ N dagegen zu einer Reduktion der nukleären Fluoreszenz und zu einer cytoplasmatischen Anreicherung (Abbildung 14A). Wie auch in HeLa-Zellen, zeigt STAT1tc nach einer Stunde Cytokin-Behandlung noch eine panzelluläre Verteilung und benötigt bis zum Erreichen einer cytoplasmatischen Akkumulation drei Stunden (Abbildung 14A).

Die bislang nur anhand fixierter Zellpopulationen dokumentierte cytoplasmatische Akkumulation von STAT1 Δ N und STAT1tc wurde nun in isolierten lebenden Zellen beobachtet. Für diese Versuche wurden U3A-Zellen, die GFP-markiertes STAT1 Δ N oder STAT1tc sowie einen chimären Erythropoietinrezeptor koexprimierten auf Deckgläsern kultiviert, die in die beheizbare Apparatur eines Laser-Scanning-Mikroskops eingespannt werden konnten. Pro STAT1-Derivat wurden fünf GFP-exprimierende Zellen ausgewählt und ein Fluoreszenzbild der mittleren Z-Ebene aufgenommen (Zeitpunkt = 0 Min.). Anschließend wurden die Zellen mit Erythropoietin stimuliert und über einen Zeitraum von drei Stunden alle zehn Min. erneut fotografiert.

Für die graphische Auswertung in Abbildung 14B wurde die Fluoreszenzdichte in Cytoplasma und Zellkern für jeden Zeitpunkt bestimmt und der Quotienten von nukleärer zu cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte errechnet. Der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils fünf Zellen wurden über die Zeit aufgetragen (Abbildung 14B). Auch dieses Experiment macht deutlich, dass STAT1 Δ N bereits nach 50 Min. Cytokin-Stimulation eine cytoplasmatische Akkumulation erreicht (Abbildung 14B: [nukleäre/cytoplasmatische Fluoreszenzdichte] \leq 0,5). STAT1tc benötigt für eine vergleichbare cytoplasmatische Akkumulation annähernd die dreifache Zeit (140 Min.; Abbildung 14B).

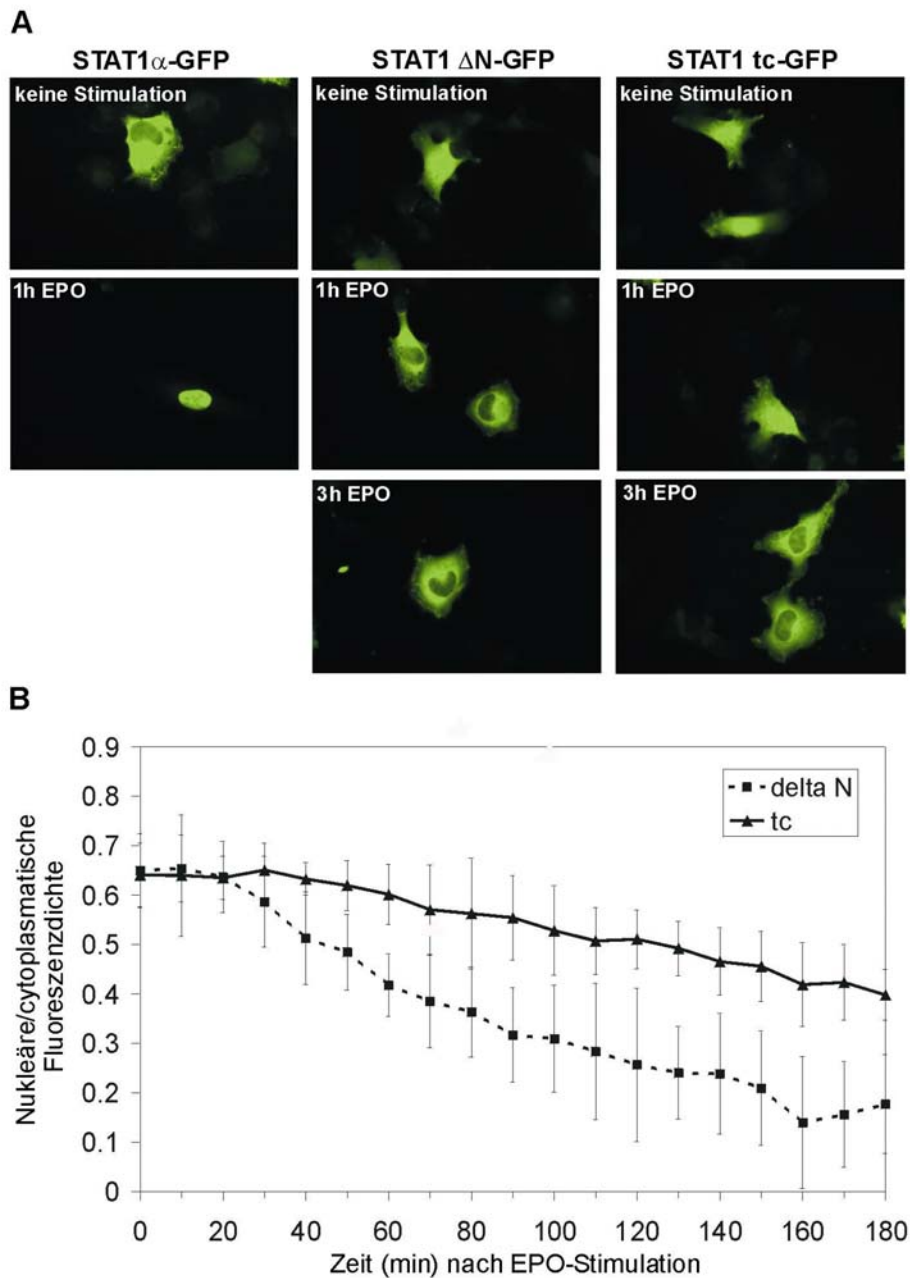


Abbildung 14: Einfluss der C-terminalen Transaktivierungsdomäne auf die Exportrate von STAT1 in stimulierten U3A-Zellen.

(A) STAT1-defiziente U3A-Zellen, die transient mit den angegebenen STAT1-Derivaten und einem chimären Erythropoietinrezeptor transfiziert worden waren, wurden unstimuliert belassen oder für 1 h oder 3 h mit 7 Einheiten/ml Erythropoietin stimuliert und anschließend fixiert. (B) Graphische Auswertung der Erythropoietin-induzierten, cytoplasmatischen Akkumulation N-terminaler Deletionsmutanten auf Ein-Zell-Ebene in lebenden U3A-Zellen. Für diese Auswertung wurden pro Mutante (STAT1 Δ N-GFP oder STAT1tc-GFP) jeweils fünf STAT1-GFP-exprimierende Zellen ausgewählt und ein Fluoreszenzbild aufgenommen (Zeitpunkt = 0 Min.). Anschließend wurden die Zellen mit Erythropoietin stimuliert und über einen Zeitraum von 3 h alle 10 Min. dokumentiert. Die Fluoreszenzdichte in Cytoplasma und Zellkern wurde für jeden Zeitpunkt bestimmt und der Quotient von nukleärer zu cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte errechnet. Im Diagramm dargestellt ist der Mittelwert der [nukleären Fluoreszenzdichte/ cytoplasmatischen Fluoreszenzdichte] von jeweils 5 Zellen \pm Standardabweichung.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei der beobachteten „Kern-frei-Bewegung“ um einen Exportprozess handelt. Dieser wird sichtbar, da eine Cytokin-Stimulation den Import N-terminal deletierter STAT1-Derivate unterbindet. Wie demonstriert wurde (Abbildung 10), verhindert eine Deletion des N-Terminus den Kernimport von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1. Da der N-Terminus darüber hinaus auch für die Inaktivierung des Proteins erforderlich ist, reichert sich nach Cytokin-Stimulation Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes Protein irreversibel an (Abbildung 8). Der Import versiegt und der fortlaufende Export resultiert in der Akkumulation des Proteins im Cytoplasma.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen zum erstenmal, dass der nucleo-cytoplasmatische Transport von STAT1 in stimulierten Zellen reguliert wird und identifizieren den C-Terminus sowie die Serin⁷²⁷-Phosphorylierung als wichtige Modulatoren (Abbildung 12 und Abbildung 14). Alternative Ursachen, die die beobachteten Translokationsunterschiede erklären könnten, wie Unterschiede im Expressionsniveau (Abbildung 6), bei der Dimerisierung (Abbildung 7), der Synthese oder Degradation des Proteins (Abbildung 12) wurden untersucht, Hinweise auf eine Beteiligung dieser Prozesse aber nicht gefunden.

Wie bereits demonstriert (Abbildung 10), ist Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1ΔN nicht in der Lage die Kernmembran zu passieren. Die beobachtete Exportregulation betrifft demzufolge nur das unphosphorylierte Molekül. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass auch in unstimulierten Zellen der Export von STAT1 durch Expression des C-Terminus reguliert wird. Dies sollte nun in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Zwischen Cytoplasma und Kern pendelnde Proteine können durch Mikroinjektion eines spezifischen Antikörpers in einem zellulären Kompartiment retiniert werden (Meyer et al., 2002b). Durch cytoplasmatische Injektion eines GFP-spezifischen Antikörpers kann auf diese Weise der konstitutive Kernimport GFP-markierter STAT1-Derivate unterbunden werden. Findet ein konstitutiver Export statt, so sollte es zu einer Akkumulation des Proteins im Cytoplasma kommen. In dem hier dargestellten Versuch erfolgte die Mikroinjektion eines GFP-spezifischen Antikörpers in das Cytoplasma STAT1α-GFP-, STAT1β-GFP- oder STAT1 Serin⁷²⁷Alanin-GFP-exprimierender HeLa-Zellen. 30, 60, 120 oder 180 Min. nach Injektion wurden die Zellen fixiert und analysiert. Die Koinjektion von TRITC-gekoppeltem BSA erlaubte die Identifikation der injizierten Zellen.

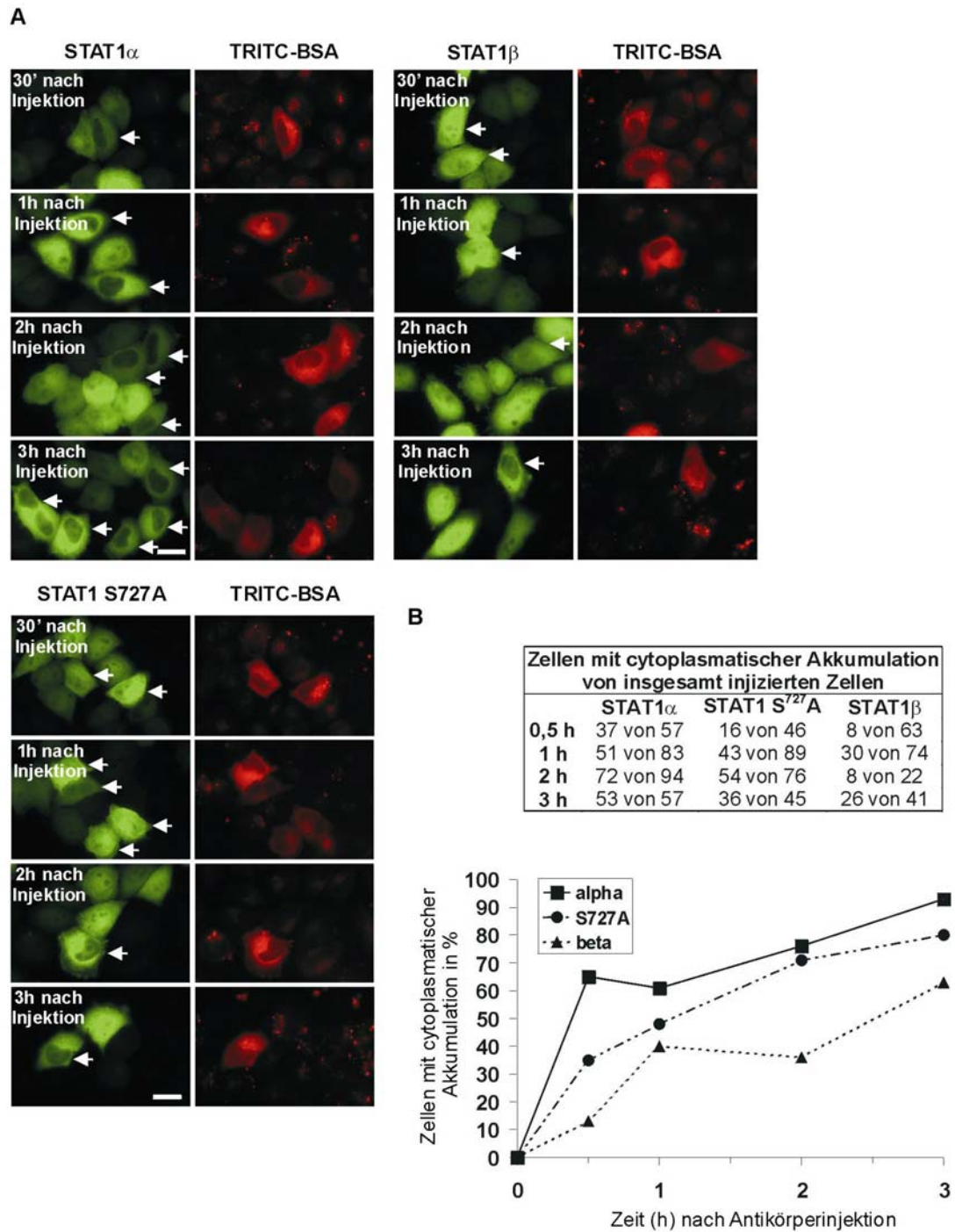


Abbildung 15: Einfluss der C-terminalen Transaktivierungsdomäne auf die Exportrate von STAT1 in unstimulierten HeLa-Zellen.

(A) Mikroinjektion eines GFP-spezifischen Antikörpers in das Cytosol unstimulierter, die angegebenen STAT1-GFP-Derivate exprimierender HeLa-Zellen. Die Injektion erfolgte über einen Zeitraum von 10 Min. und 30, 60, 120 oder 180 Min. nach Injektion wurden die Zellen fixiert. TRITC-markiertes BSA diente als Injektionsmarker und die Zellen, in die eine Injektion erfolgte, sind zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. Balken: 20 μ m. (B) Quantitative Auswertung des Antikörper-basierten Mikroinjektions-Assays aus (A). Für jeden Zeitpunkt wurden 40-90 injizierte Zellen untersucht und der Prozentsatz der Zellen ermittelt, die eine cytoplasmatische Akkumulation zeigen.

Wie die Abbildung 15A exemplarisch und die Abbildung 15B quantitativ zeigt, führt eine cytoplasmatische Immobilisierung von STAT1 α bereits innerhalb von 30 Min. zu einer cytoplasmatischen Akkumulation in 65% der Zellen (37 von 57 injizierten Zellen). Im Fall der C-terminalen Deletionsmutante STAT1 β zeigen 30 Min. nach Injektion nur 10% der injizierten Zellen (8 von 63) eine Reduktion der nukleären GFP-Fluoreszenz. Erst nach weiteren 150 Min. sind es auch hier 60% (26 von 41). Die Mutation von Serin⁷²⁷ zu Alanin hat auch in diesem Experiment einen intermediären Phänotyp zur Folge. 30 Min. nach Injektion zeigen 35% (16 von 46) der injizierten Zellen eine cytoplasmatische Akkumulation, 120 Min. nach Injektion sind es 70% (54 von 76) und nach 180 Min. 80% (36 von 45).

Diese Experimente bestätigen also, dass die Expression des C-Terminus sowie eine Serin⁷²⁷-Phosphorylierung die Exportrate von STAT1 erhöhen und demonstrieren, dass diese Regulation auch in unstimulierten Zellen erfolgt.

Eine weitere Möglichkeit Transportaktivitäten zu untersuchen ist die Mikroinjektion rekombinanter Proteine (Marg et al., 2004). Aus Sf9-Zellen aufgereinigtes STAT1 α , STAT1 β , STAT1 Δ N oder STAT1tc wurde in den Kern unstimulierter HeLa-Zellen injiziert und nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurden die Zellen fixiert. Die Lokalisation der injizierten Proteine wurde immunocytochemisch nachgewiesen und die Zellkerne mit Hoechstfarbstoff angefärbt. Die Koinjektion von FITC-gekoppeltem BSA diente zur Markierung injizierter Zellen. (Abbildung 16).

Während der zweistündigen Inkubation findet ein Export von STAT1 aus dem Kern ins Cytoplasma statt und STAT1 α ist, wie in Abbildung 16 zu sehen, nach dieser Zeit gleichmäßig über Cytoplasma und Zellkern verteilt. Eine Deletion des N-Terminus hat keinen Einfluss auf die Exportrate und so zeigt auch STAT1 Δ N nach zwei Stunden eine panzelluläre Verteilung. Die Deletion des Carboxy-Terminus hingegen resultiert in einer deutlichen Reduktion der Exportrate und zwei Stunden nach Injektion können STAT1 β und STAT1tc noch nicht im Cytoplasma detektiert werden (Abbildung 16). Wird die Inkubationszeit jedoch auf vier Stunden verlängert, so erreichen auch STAT1 β und STAT1tc eine panzelluläre Verteilung (Marg et al., 2004). Auch diese Versuche bestätigen demnach den Befund einer durch Expression des C-Terminus regulierten Exportrate.

Die Beobachtung, dass sich auch eine fehlende Serin⁷²⁷-Phosphorylierung oder die Mutation der Serin-Phosphorylierungsstelle negativ auf die Exportrate von STAT1 auswirkt, konnte in diesem

Experiment nicht wiederholt werden. Weder die Mikroinjektion von *in-vitro*-Serin⁷²⁷-phosphoryliertem STAT1 α noch die Injektion von STAT1 Serin⁷²⁷ Alanin offenbaren eine von STAT1 α abweichende Exportkinetik (Daten nicht gezeigt). Im Unterschied zu den beiden zuvor beschriebenen Methoden (Abbildung 12, Abbildung 15), können nach nukleärer Mikroinjektion rekombinanter Proteine jedoch nur vergleichsweise wenig Zellen ausgewertet werden. Da die Zellen bereits untereinander gewisse Variationen zeigen, können geringe Unterschiede im Exportverhalten mit dieser Methode möglicherweise nicht erfasst werden.

Zusammenfassend konnte jedoch in drei unabhängigen Experimenten erstmals gezeigt werden, dass die Expression des C-Terminus den Export von STAT1 fördert. In zwei der drei Experimente konnte darüber hinaus auch der positive Einfluss einer Serin⁷²⁷-Phosphorylierung auf die Exportrate von STAT1 demonstriert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Regulation sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Zellen stattfindet.

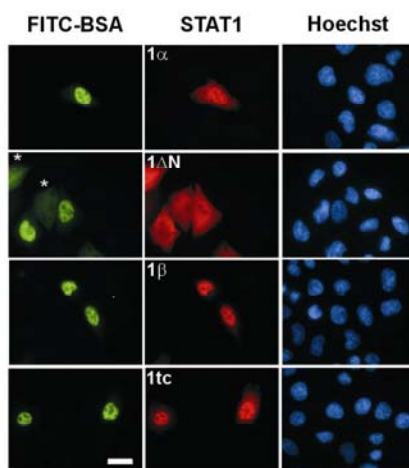


Abbildung 16: Einfluss der N- und C-terminalen Domänen auf die Exportrate von STAT1.

Komikroinjektion von rekombinantem, unphosphoryliertem STAT1 und FITC-markiertem BSA in den Kern unstimulierter HeLa-Zellen. 2 h nach Injektion wurden die Zellen fixiert und das injizierte STAT1 immunocytochemisch detektiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst-Farbstoff. Balken: 20 μ m. Die Sterne (*) kennzeichnen zwei cytoplasmatische Mikroinjektionen.

4.3 Untersuchungen zum Mechanismus der C-terminalen Exportaktivität

Die vorausgegangenen Experimente konnten aufdecken, dass eine Expression des C-Terminus sowie dessen Serin-Phosphorylierung den Export von unphosphoryliertem STAT1 aus dem Kern fördert. Es stellte sich nun die Frage nach dem Mechanismus, der dieser Exportaktivität zugrunde liegt.

4.3.1 Der C-Terminus von STAT1 enthält kein übertragbares Exportsignal

Die Transporteigenschaften, die von klassischen Exportsequenzen vermittelt werden, sind in der Regel übertragbar. Um zu untersuchen, ob auch der isolierte C-Terminus über transferierbare

Exporteigenschaften verfügt, wurde der C-Terminus (AS 685-750) von STAT1 als GFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen exprimiert. Mit einer Masse von nur 27 kDA ist GFP in der Lage, die Kernpore durch freie Diffusion zu passieren und zeigt, wie in Abbildung 17 zu sehen, eine panzelluläre Verteilung mit einer leichten Anreicherung im Zellkern. Die Fusion mit einer Exportsequenz, wie dem Exportsignal aus dem Vier-Helix-Bündel von STAT1 (AS 292-314), führt zu einem Ausschluss von GFP aus dem Zellkern (Begitt et al., 2000).

Die Fusion mit dem C-Terminus von STAT1 hat dagegen keinen Einfluss auf die Lokalisation von GFP. So kann kein Unterschied in der subzellulären Verteilung zwischen dem STAT1C-GFP-Fusionsprotein und freiem GFP in unstimulierten oder mit $\text{IFN}\gamma$ stimulierten Zellen detektiert werden (Abbildung 17). Auch der spezifische Inhibitor des Exportrezeptors CRM1, Ratjadon (Meissner et al., 2004), hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des STAT1C-GFP-Fusionsproteins (Abbildung 17). Der C-Terminus von STAT1 enthält demzufolge kein übertragbares Exportsignal, das zum Ausschluss eines heterologen Proteins aus dem Kern führen würde.

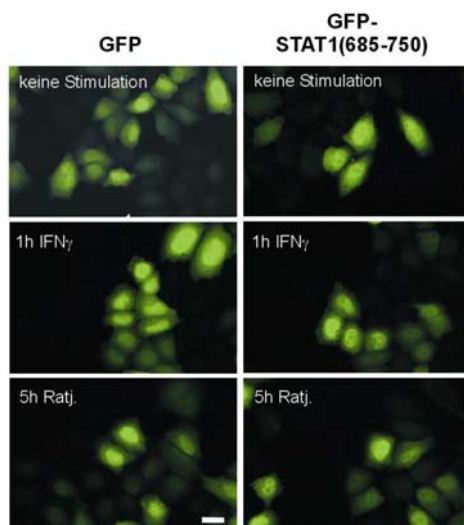


Abbildung 17: Der C-Terminus von STAT1 enthält kein übertragbares Exportsignal.

Subzelluläre Lokalisation von transient exprimiertem GFP oder einem GFP-STAT1C (685-750)-Fusionsprotein in unstimulierten HeLa-Zellen, oder in HeLa-Zellen die für 1 h mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert oder für 5 h mit Ratjadon behandelt worden waren. Balken: 20 μm .

Dieses Ergebnis konnte in Mikroinjektions-Experimenten bestätigt werden. Für diese Experimente wurde ein synthetisches Peptid, das dem C-Terminus (AS 713-750) von STAT1 entspricht, mit Hilfe einer quervernetzenden Substanz (Sulfo-MBS) an rekombinantes GFP gekoppelt (Abbildung 18A) und anschließend in HeLa-Zellen injiziert. Eine Stunde nach cytoplasmatischer oder nukleärer Injektion wurden die Zellen fixiert und die GFP-Lokalisation analysiert (Abbildung 18B). TRITC-markiertes BSA diente als Injektionsmarker, der die Identifikation des injizierten Kompartiments ermöglichte.

Die Kopplung des Peptids an GFP erfolgte über Lysinreste, die zuvor durch den Quervernetzer aktiviert worden waren, und führte zu der Konjugation von mehr als einem Peptid an das Protein (Abbildung 18A: Bahn 2 und 3). Dies hat den Vorteil, dass eine unter Umständen nur schwache Exportaktivität im C-Terminus von STAT1 verstärkt werden könnte. Darüber hinaus stand das synthetische Peptid in der Serin⁷²⁷-phosphorylierten und in der unphosphorylierten Form zur Verfügung.

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, zeigt ungekoppeltes GFP 60 Min. nach cytoplasmatischer (Abbildung 18B: 1) oder nukleärer Mikroinjektion (Abbildung 18B: 4) eine panzelluläre Verteilung mit einer leichten Anreicherung im Zellkern (vergleiche auch Abbildung 17). Die Kopplung mit dem Serin⁷²⁷-phosphorylierten (Abbildung 18: 3 und 6) oder unphosphorylierten Peptid (Abbildung 18B: 2 und 5) hat auf diese Verteilung keinen Einfluss. Dies bestätigt, dass der C-Terminus von STAT1 kein übertragbares Exportsignal enthält. Da GFP bereits 5 Min. nach Injektion einen Gleichgewichtszustand erreicht (Abbildung 18B: 7 und 8), war es nicht möglich zu bestimmen, ob durch die Kopplung der Peptide die Exportrate und damit die Einstellung des Gleichgewichtszustandes beschleunigt wird.

Im Gegensatz zu GFP ist ein GFP-GST-Fusionsprotein vermutlich aufgrund seiner größeren Masse (60 kDA) nicht in der Lage, die Kernpore durch freie Diffusion zu passieren und verbleibt im injizierten Kompartiment (Abbildung 18D: 1 und 4). Auch in diesem Fall führt die Kopplung mit dem Serin⁷²⁷-phosphorylierten oder dem unphosphorylierten Peptid nicht zu einer cytoplasmatischen Relokalisation des Proteins nach nukleärer Mikroinjektion (Abbildung 18D: 2 und 3).

Überraschenderweise hat die Peptidkopplung, die zu einer deutlichen Zunahme der Masse führt (Abbildung 18C: Bahn 1 und 3), zur Folge, dass das Protein nach cytoplasmatischer Mikroinjektion im Kern detektiert werden kann. Peptid-gekoppeltes GST-GFP, egal, ob mit oder ohne Serin-Phosphorylierung, zeigt 90 Min. nach cytoplasmatischer Mikroinjektion eine deutliche Anreicherung im Zellkern (Abbildung 18D: 5 und 6), während das nicht gekoppelte Fusionsprotein im Cytoplasma verbleibt (Abbildung 18D: 4). Es scheint demnach, als würde der C-Terminus von STAT1 die Kernpermeabilität des GST-GFP-Fusionsproteins erhöhen und so die Einstellung eines Gleichgewichtszustandes (eine Anreicherung im Kern) ermöglichen. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass der C-Terminus von STAT1 nicht als Erkennungssequenz für einen Exportrezeptor wirkt, sondern die direkte Kernporenpassage erleichtert.

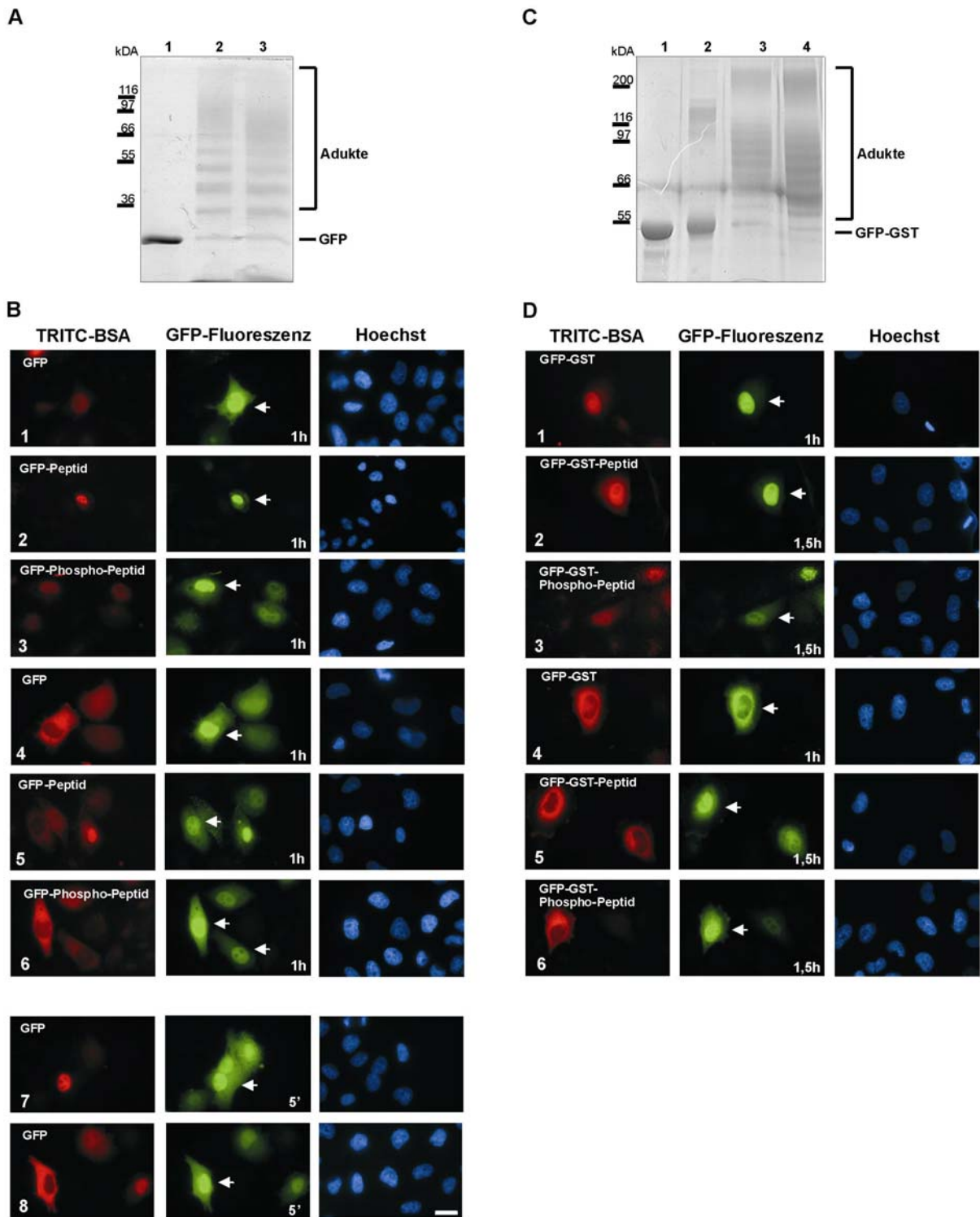


Abbildung 18: Der C-Terminus von STAT1 enthält kein übertragbares Exportsignal.

(A) Ergebnis der Kopplungsreaktion des synthetischen, Serin⁷²⁷-phosphorylierten oder unphosphorylierten Peptids (STAT1 713-750) an GFP. Rekombinantes, alkyliertes GFP wurde für 1h mit dem Quervernetzer (Sulfo-MBS; 40-facher molarer Überschuss) inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Quervernetzer entfernt und das phosphorylierte oder unphosphorylierte Peptid (10-facher molarer Überschuss) für 4 h zu dem aktivierten Protein

gegeben. Ein Aliquot von etwa 5 µg wurde jeweils vor der Reaktion (Bahn 1), sowie nach der Reaktion mit dem phosphorylierten (Bahn 2) oder unphosphorylierten (Bahn 3) Peptid entnommen und auf das abgebildete Coomassie-gefärbte SDS-Gel aufgetragen. **(B)** Mikroinjektion von rekombinantem GFP oder von mit Serin⁷²⁷-phosphoryliertem- (Phosphopeptid) oder unphosphoryliertem- (Peptid) Peptid-konjugiertem GFP in HeLa-Zellen. Die Injektion erfolgte über einen Zeitraum von 10 Min. und die Zellen wurden 5 Min. oder 1 h nach Injektion fixiert. Die Komikroinjektion von TRITC-gekoppeltem BSA erlaubte die Identifikation des injizierten Kompartiments. Balken: 20 µm. **(C)** Ergebnis der Kopplungsreaktion des synthetischen Serin⁷²⁷-phosphorylierten Peptides (STAT1 713-750) an GFP-GST. Wie in (A), außer dass rekombinantes, alkyliertes GFP-GST für 30 Min. mit einem 10-fachen molaren Überschuss des NHS-Quervernetzers inkubiert wurde und die Reaktion mit dem Peptid (15-facher molarer Überschuss) für 1 h erfolgte. Ein Aliquot von 5 µg GST-GFP wurde jeweils vor der Reaktion (Bahn 1), nach Reaktion mit dem Quervernetzer (Bahn 2), nach Reaktion mit dem Phosphopeptid (Bahn 3) und nach anschließender Dialyse in PBS (Bahn 4) entnommen und auf das abgebildete Coomassie-gefärbte SDS-Gel aufgetragen. **(D)** Mikroinjektion wie in (B), außer dass in diesem Fall GFP-GST oder Peptid-gekoppeltes GFP-GST injiziert und die Zellen 1 h oder 1,5 h nach Injektion fixiert wurden.

4.3.2 Die Regulation der Exportrate durch Expression des C-Terminus ist unabhängig vom Exportrezeptor CRM1

Wie von uns und anderen gezeigt werden konnte, erfolgt der Export von STAT1 über den Exportrezeptor CRM1 und potentielle CRM1-abhängige Exportsignale konnten bereits im Vier-Helix-Bündel und der DNA-Bindedomäne von STAT1 identifiziert werden (Begitt et al., 2000; McBride et al., 2000, Mowen und David, 2000). Es stellte sich nun die Frage, ob auch die Exportaktivität im C-Terminus von STAT1 abhängig vom Exportrezeptor CRM1 ist. Um dies zu untersuchen wurde die cytoplasmatische Akkumulation der drei N-terminal deletierten Derivate STAT1ΔN, STAT1ΔN Serin⁷²⁷Alanin und STAT1tc, in An- oder Abwesenheit des CRM1-Inhibitors Ratjadon induziert (Abbildung 19).

Es zeigte sich, dass die Inkubation mit Ratjadon in allen drei Fällen zu einer Reduktion der Exportrate führt (Abbildung 19). Während STAT1ΔN ohne die Zugabe von Ratjadon bereits eine Stunde nach IFN γ Stimulation eine cytoplasmatische Akkumulation erreicht (Abbildung 19A: 2), wird diese in Ratjadon-behandelten Zellen erst nach zwei Stunden sichtbar (Abbildung 19A: 5 und 6). Auch STAT1tc- und STAT1ΔN Serin⁷²⁷Alanin-exprimierende Zellen zeigen einen Unterschied zwischen Ratjadon-behandelten und unbehandelten Zellen. Die Zugabe von Ratjadon verzögert die Zeit bis eine cytoplasmatische Akkumulation sichtbar wird bei STAT1tc von drei auf vier Stunden (Abbildung 19A: 11, 13, 14) und bei STAT1ΔN Serin⁷²⁷Alanin von zwei auf drei Stunden (Abbildung 19A: 17, 20, 21).

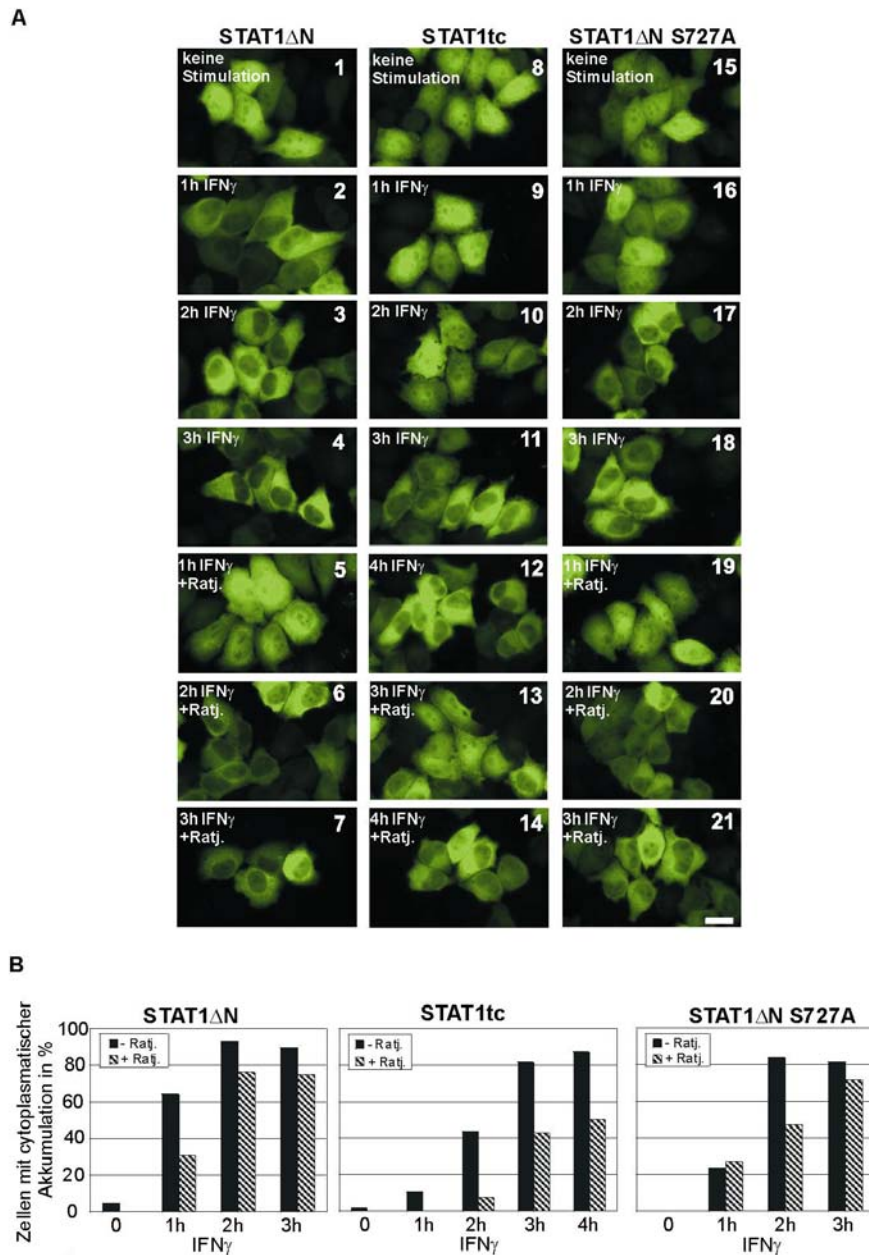


Abbildung 19: Die cytoplasmatische Akkumulation N-terminaler STAT1-Deletionsmutanten wird durch CRM1-Inhibition verlangsamt, nicht aber verhindert.

(A) Durch IFN γ -Stimulation für die angegebenen Zeiten wurde eine cytoplasmatische Akkumulation in STAT1 Δ N-, STAT1tc- und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷ Alanin-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen induziert. Um den Einfluss des Exportrezeptors CRM1 auf diesen Prozess zu untersuchen, wurden die Zellen, wenn angegeben, 1 h vor IFN γ -Stimulation mit 10 ng/ml Ratjadon behandelt (+Ratj.). Balken: 20 μ m. (B) Quantitative Auswertung der cytoplasmatischen Akkumulation N-terminaler Deletionsmutanten. (vergleiche auch Abbildung 12B). Mit Hilfe konfokaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurde die Fluoreszenzdichte von 30-60 STAT1 Δ N-, STAT1tc- und STAT1 Δ N Serin⁷²⁷ Alanin-GFP-exprimierenden, fixierten HeLa-Zellen in Cytoplasma und Zellkern bestimmt. Die Zellen waren für die angegebenen Zeiten mit IFN γ stimuliert (schwarzer Balken) oder 1 h vor IFN γ -Stimulation mit Ratjadon vorbehandelt (gestrichelter Balken) worden. Ein Quotient von [nukleärer Fluoreszenzdichte/cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte] $\leq 0,5$ wurde als cytoplasmatische Akkumulation gewertet.

Die quantitative Auswertung von jeweils 30 bis 60 Zellen pro Derivat und Zeitpunkt unterstützt diese Beobachtung (Abbildung 19B). So zeigt STAT1ΔN in mehr als 60% der Zellen eine cytoplasmatische Akkumulation nach einer Stunde IFN γ -Stimulation, die Zugabe von Ratjadon reduziert diese Zahl auf 30% und erst nach zwei Stunden erreichen auch 70% der Ratjadon-behandelten Zellen eine cytoplasmatische Akkumulation. Bei STAT1tc wird die Zahl der Zellen, die nach zweistündiger Stimulation eine cytoplasmatische Akkumulation zeigen, von etwas über 40% auf unter 10% reduziert, erst nach einer weiteren Stunde sind es auch 40% der Ratjadon-behandelten Zellen (Abbildung 19B).

Die Beobachtung, dass die cytoplasmatische Akkumulation N-terminal deletierter STAT1-Derivate durch Inhibition des Exportrezeptors CRM1 verzögert wird, ist zunächst einmal eine weitere Bestätigung dafür, dass es sich bei diesem Phänomen tatsächlich um Export handelt. Die Tatsache, dass die cytoplasmatische Akkumulation durch CRM1-Inhibition aber nicht vollständig unterbunden wird, zeigt, dass es neben dem CRM1-abhängigen Export noch einen weiteren, CRM1-unabhängigen Exportmechanismus geben muß und ist in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe (Begitt et al., 2000; Marg et al., 2004)

Da die Translokationsunterschiede zwischen STAT1ΔN und STAT1tc in Anwesenheit von Ratjadon erhalten bleiben, scheint die Exportaktivität im C-Terminus von STAT1 nicht abhängig vom Exportrezeptor CRM1 zu sein. Dies schließt zum einen aus, dass der C-Terminus von STAT1 selbst als CRM1-abhängiges Exportsignal wirkt (vergleiche auch Abbildung 17). Es spricht aber auch gegen die Möglichkeit, dass der C-Terminus einen CRM1-abhängigen Export positiv beeinflusst, der von einem anderen Exportsignal innerhalb des Proteins oder über ein Adapterprotein erfolgt.

4.3.3 Einfluss des C-Terminus auf die intranukleäre Mobilität von STAT1

Die Geschwindigkeit von Transportprozessen über die Kernmembran kann nicht nur durch die Rate der Kernporentranslokation, sondern auch durch die Existenz von cytoplasmatischen oder nukleären Retentionsfaktoren beeinflusst werden (zusammengefasst in Xu und Massague, 2004; Poon und Jans, 2005). So konnte beispielsweise für SMAD2 und SMAD4 gezeigt werden, dass die Kernakkumulation dieser beiden Proteine mit einer reduzierten intranukleären Mobilität einhergeht (Nicolás et al., 2004). Der Zusammenhang zwischen Exportrate und intranukleärer Mobilität von STAT1 wurde in Photobleichungs-Experimenten („fluorescence recovery after pho-

tobleaching“ (FRAP)) untersucht (Abbildung 20). Hierfür wurde ein kleines Areal (0,5% der Kernfläche) im Zellkern von STAT1 α -, STAT1 β -, STAT1 Δ N- oder STAT1tc-GFP-exprimierenden HeLa-Zellen gebleicht und die Regeneration der Fluoreszenz in diesem Areal gemessen. Je höher die Mobilität eines Proteins ist, um so größer ist der Austausch zwischen gebleichten und ungebleichten Molekülen und umso schneller kommt es zu einer Wiederauffüllung der Fluoreszenz. Als Kontrolle dienten freies GFP sowie eine STAT1-Mutante (STAT1 DNA^{minus}), die nicht zur DNA-Bindung befähigt ist (Meyer et al., 2003). Da nur unphosphoryliertes STAT1 in der Lage ist den Zellkern zu verlassen (Meyer et al., 2003), erfolgte die Mobilitätsmessung zunächst in unstimulierten Zellen.

Wie die Auffüllkinetik in Abbildung 20A zeigt, ist die Mobilität aller untersuchten Proteine im Zellkern unstimulierter Zellen sehr hoch und bereits nach weniger als 10 Millisekunden (Halbwertszeit) ist die Fluoreszenz des gebleichten Areals durch einströmende ungebleichte Moleküle zur Hälfte wiederhergestellt. Die Kinetik der Fluoreszenzauffüllung lässt darauf schließen, dass es eine immobile Fraktion, die nicht am schnellen Austausch mit dem Nukleoplasma teilnimmt, bei den untersuchten STAT1-Derivaten nicht gibt.

Die statistische Analyse der Auffüllkinetik ergibt keinen signifikanten Unterschied in der Mobilität der STAT1-Derivate untereinander sowie zu freiem GFP (eine tabellarische Zusammenstellung sowie die statistische Auswertung der gemessenen FRAP-Daten findet sich im Anhang). Dies unterstreicht für die hier untersuchten STAT1-Derivate die bereits für STAT1 α -GFP und STAT1 DNA^{minus} beschriebene hohe Mobilität im Kern unstimulierter Zellen (Lillemeier et al., 2001; Meyer et al., 2003) und spricht gegen eine dauerhafte Bindung von STAT1 an immobile Strukturen, sondern für sehr hohe Austauschraten von Protein oder DNA-gebundenem STAT1.

Aufgrund der hohen Mobilität der Proteine und einer begrenzten Laserstärke ist es nicht möglich, das zu untersuchende Areal vollständig auszubleichen. Bereits während des Bleichvorgangs kommt es zum Austausch gebleichter und ungebleichter Moleküle, und so kann für STAT1 eine Reduktion der Fluoreszenzintensität um nur 40%, für freies GFP lediglich eine Reduktion um 20% erreicht werden (Abbildung 20A: untere Graphik: der Schnittpunkt der Kurve mit der y-Achse kennzeichnet die erreichte Bleichtiefe (Bleichtiefe: $100 - [\text{Fluoreszenzintensität unmittelbar nach dem Bleichen in \% der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen}]$)). An einem fixierten Präparat hätten die gewählten Bedingungen zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität um mindestens 80% geführt (persönliche Mitteilung von Dr. B. Wiesner). Wie dieses Beispiel verdeut-

licht, ist eine hohe Mobilität mit einer geringen Bleichtiefe verbunden. Die statistisch signifikant niedrigere Bleichtiefe, die freies GFP (20%) im Vergleich zu den STAT1-GFP-Derivaten (40%) erreicht, reflektiert die höhere Mobilität dieses Proteins. Untereinander zeigen die einzelnen STAT1-Derivate dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildung 20A, untere Graphik). Die Expression des N- oder des C-Terminus hat also keinen Einfluss auf die Mobilität von unphosphoryliertem STAT1 im Kern. Die verlangsamte Exportrate von STAT1 β im Vergleich zu STAT1 α korreliert demnach nicht mit einer erhöhten Assoziation an nukleäre Bindungsstellen.

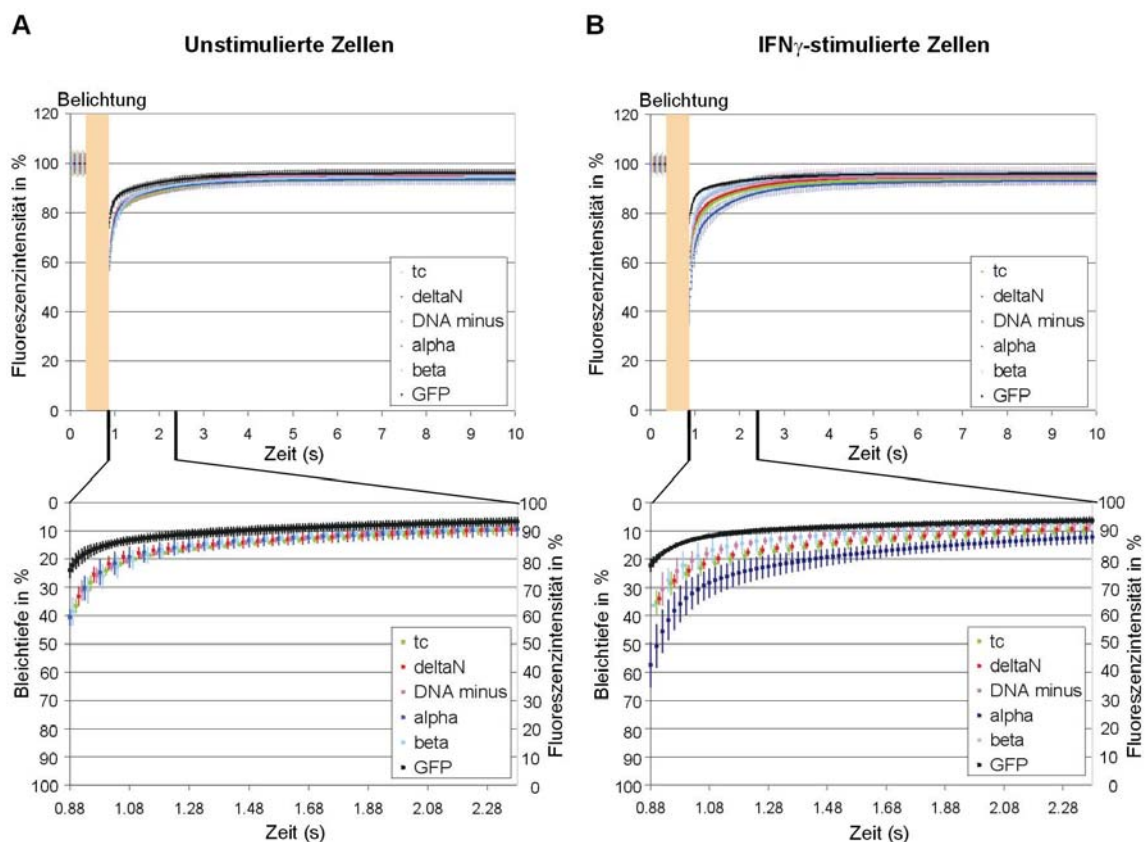


Abbildung 20: Die Beschleunigung der Exportrate durch Expression des C-Terminus korreliert nicht mit einer erhöhten Mobilität im Zellkern.

(A) FRAP-Analyse an STAT1 $_{tc}$ -, STAT1 $_{\Delta N}$ -, STAT1 DNA minus -, STAT1 $_{\alpha}$ -, STAT1 $_{\beta}$ -GFP-Fusionsprotein oder GFP-exprimierenden HeLa-Zellen. Gebleicht wurde ein kleines Areal (0,5% der Kernfläche) im Zellkern von unstimulierten Zellen und die Fluoreszenzintensität dieses Areals wurde über einen Zeitraum von 10 s alle 16 ms bestimmt. Die obere Graphik zeigt die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichvorgang, die Bleichperiode, sowie die Wiederauffüllkinetik über die gesamte Zeit der FRAP-Messung. Die untere Graphik ist eine Vergrößerung der ersten 1,5 s unmittelbar nach dem Bleichprozess. Bleichtiefe: 100 – (Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen in % der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen). Jede Kurve repräsentiert die mittlere Fluoreszenzintensität von mindestens 5 Zellen \pm Standardabweichung. (B) Identisch zu (A) außer dass die FRAP-Messungen an Zellen durchgeführt wurden, die für 30 Min. mit IFN $_{\gamma}$ stimuliert worden waren. Um eine vergleichbare Tyrosin-Phosphorylierung zu erreichen wurden die STAT1 $_{\alpha}$ -GFP-, STAT1 DNA minus -GFP- und GFP-exprimierenden Zellen mit 1,0 ng/ml IFN $_{\gamma}$ stimuliert, die STAT1 $_{\beta}$ -GFP-, STAT1 $_{\Delta N}$ -GFP- und STAT1 $_{tc}$ -GFP-exprimierenden Zellen jedoch mit 5,0 ng/ml IFN $_{\gamma}$.

In einem Kontroll-Experiment wurde nun der Einfluss der durch Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung induzierten DNA-Bindung auf die intranukleäre Mobilität der STAT1-Derivate untersucht (Abbildung 2B). Hierfür wurden die FRAP-Messungen mit Zellen wiederholt, die zuvor für 30 Min. mit IFN γ stimuliert worden waren. Da, wie noch gezeigt werden wird, STAT1 β eine höhere IFN γ -Konzentration erfordert, um eine mit STAT1 α vergleichbare Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung zu erreichen, erfolgte die Stimulation mit zwei unterschiedlichen IFN γ -Konzentrationen, die eine vergleichbare Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung der Derivate sicher stellten. Eine IFN γ -Stimulation hat auf die intranukleäre Mobilität von STAT1 Δ N und STAT1tc keinen Einfluss (Abbildung 20B; tabellarische Zusammenstellung und statistische Auswertung der Daten im Anhang). Weder die Werte für die Halbwertszeit der Wiederauffüllung noch für die Bleichtiefe weichen signifikant von den Werten ab, die in unstimulierten Zellen für diese Derivate gemessen wurden. Vor dem Hintergrund, dass N-terminal deletierte STAT1-Derivate im Tyrosin⁷⁰¹-phosphorylierten Zustand vom Kernimport ausgeschlossen sind (Abbildung 10) und so auch in stimulierten Zellen nur die Mobilität unphosphorylierter Moleküle im Zellkern gemessen werden kann, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen.

Demgegenüber sind STAT1 α , STAT1 β und STAT1 DNA^{minus} in der Lage nach Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung in den Zellkern zu translozieren. Im Gegensatz zu STAT1 α und STAT1 β , die eine, in EMSA-Experimenten vergleichbare DNA-Bindung zeigen (Abbildung 7), ist STAT1 DNA^{minus} jedoch nicht zur DNA-Bindung befähigt (Meyer et al., 2003). Trotz dieser unterschiedlichen Fähigkeit zur Bindung an DNA, ergab die statistische Auswertung der Wiederauffüllkinetik keine signifikanten Unterschiede in der nukleären Mobilität zwischen Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 α , STAT1 β und STAT1 DNA^{minus}. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten, die in stimulierten und in unstimulierten Zellen gemessen wurden, gefunden werden. Die Kernakkumulation von STAT1 korreliert demnach nicht mit einer reduzierten intranukleären Mobilität. Diese Daten, die in Übereinstimmung mit für STAT1 α und STAT1 DNA^{minus} bereits in ähnlicher Weise durchgeführten Experimenten sind (Meyer et al., 2003), unterstreichen nochmals die transiente Natur der STAT1-Interaktionen im Kern, selbst nach Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung.

Lediglich bei dem Vergleich der Bleichtiefen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 α und STAT1 β oder STAT1 DNA^{minus}. Es zeigte sich, dass STAT1 α in stimulierten Zellen eine signifikant höhere Bleichtiefe (60%) erreicht als in unstimu-

lierten Zellen, während STAT1 β und STAT1 DNA^{minus} auch in stimulierten Zellen eine Bleichtiefe von 40% erreichen. Wir vermuten, dass die geringfügig reduzierte Mobilität von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 α im Vergleich zu der ebenfalls DNA-bindenden Spleißvariante STAT1 β auf eine erhöhte Einbindung von STAT1 α in Transkriptionskomplexen auf DNA zurückzuführen ist. Zahlreiche der bisher identifizierten transkriptionellen Kofaktoren von STAT1, wie CBP/p300, BRCA1 oder MCM5, interagieren mit dem C-Terminus des Proteins, so dass in der Tat mehr potentielle Retentionspartner für STAT1 α als für STAT1 β im Kern beschrieben sind (Zhang et al. 1996; Zhang et al., 1998; Ouchi et al., 2000; zusammengefasst in Horvath, 2000). Dennoch ist die Aufenthaltsdauer im Kern von STAT1 α gegenüber der von STAT1 β verkürzt.

Die C-terminale Transaktivierungsdomäne von STAT1 scheint demzufolge zwei auf den ersten Blick entgegengesetzte Aufgaben zu erfüllen. Im Kontext des Tyrosin⁷⁰¹-phosphorylierten Moleküls erhöht der C-Terminus die Retention von STAT1 in Transkriptionskomplexen auf DNA. Dies ist möglicherweise der Grund für die nach Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung geringfügig reduzierte Mobilität von STAT1 α im Kern. Nach Tyrosin⁷⁰¹-Dephosphorylierung erleichtert der C-Terminus den Kernexport. Bei dieser Überlegung muss beachtet werden, dass der erste Prozess sich in einem Bruchteil von Sekunden abspielt, der zweite hingegen über einen Zeitraum von Minuten.

4.3.4 Untersuchungen zur Bindung von STAT1 an Phenylalanin-Glyzin-reiche Fragmente der Nukleopore NUP153 und NUP214

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich aufgedeckt werden, dass STAT1 über eine direkte Interaktion mit Proteinen des Kernporenkomplexes zu einer von Transportfaktoren und Energie unabhängigen Kernporenpassage befähigt ist (Marg et al., 2004). Eine Bindung von STAT1 an Fragmente der Nukleopore NUP153 und NUP214 konnte in jener Arbeit beschrieben werden (Marg et al., 2004). Da eine direkte Kernporentranslokation von der Affinität der translozierenden Proteine zu Proteinen des Kernporenkomplexes bestimmt wird (Bednenko et al., 2003a), stellte sich die Frage, ob der C-Terminus von STAT1 diese möglicherweise beeinflusst und so die Rate der Kernporenpassage von STAT1 moduliert. Aus diesem Grund wurde die bereits beschriebene Bindung von STAT1 α an Phenylalanin-Glyzin-reiche Fragmente der Nukleo-

porine NUP153 (AS 333-618) und NUP214 (AS 1549-2090) mit der von STAT1 β verglichen (Abbildung 21).

Hierfür wurden Bakterienlysate, die die entsprechenden Fragmente enthielten, mittels eines denaturierenden SDS-Gels aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach einem Renaturierungsschritt wurden die immobilisierten Proteine für 16 Stunden mit rekombinantem STAT1 α oder STAT1 β inkubiert und gebundenes STAT1 anschließend immunologisch nachgewiesen.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, zeigt STAT1 β eine mit STAT1 α vergleichbar starke Bindung an die immobilisierten NUP153- und NUP214-Fragmente. Auf die Interaktion zu den hier eingesetzten Phenylalanin-Gyizin-reichen Motiven hat die Expression des C-Terminus demnach keinen Einfluss.

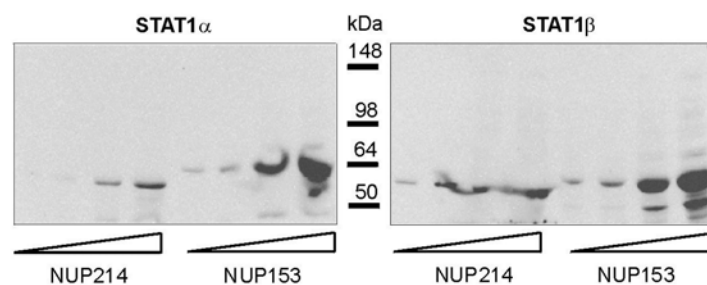


Abbildung 21: Die C-terminale Transaktivierungsdomäne hat keinen Einfluss auf die Bindung von STAT1 an NUP153 oder NUP214.

Overlay-Assay mit immobilisierten Phenylalanin-Glyzin-reichen Fragmenten der Nukleoporine NUP153 und NUP214 und rekombinantem STAT1 α oder STAT1 β . Abnehmende Mengen von Bakterienlysaten, die die entsprechenden NUP-Fragmente enthielten, wurden in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach einem Renaturierungsschritt wurde die Membran für 16 h mit rekombinantem STAT1 α (links) oder STAT1 β (rechts) inkubiert. Die Bindung von STAT1 an die immobilisierten Nukleoporine wurde mit einem STAT1-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Der Mechanismus, der einer Beschleunigung der Exportrate durch Expression des C-Terminus zugrunde liegt, konnte demnach in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Wie die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, ist die C-terminale Exportaktivität weder auf andere Proteine übertragbar (Abbildung 17) noch können die Translokationsunterschiede von N-terminal verkürztem STAT1 α (Δ N) und STAT1 β (tc) durch Inhibition des Exportrezeptors CRM1 aufgehoben werden (Abbildung 19). Es gibt darüber hinaus keine Hinweise darauf, dass die Expression des C-Terminus die Bindung von STAT1 an nukleären Retentionsfaktoren schwächt (Abbildung 20). Die Möglichkeit, dass der C-Terminus die direkte Kernporenpassage von STAT1 fördert, konnte dagegen nicht im Detail untersucht werden. Ein Einfluss des C-Terminus auf die Bindung von

STAT1 zu den beiden bereits bekannten Interaktionspartnern NUP153 und NUP214 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 21).

4.4 Einfluss der Exportrate auf die Signalstärke

4.4.1 Die Steigerung der Exportrate ist mit einer erhöhten Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung verbunden

Wie von uns und anderen demonstriert werden konnte, ist die Kernakkumulation von STAT-Proteinen ein hochdynamischer Prozess, der durch einen kontinuierlichen, nucleocytoplasmatischen Austausch geprägt ist (Andrews et al., 2002; Meyer et al., 2002b; Meyer et al., 2003; Swameye et al., 2003). Während einer experimentellen Kernakkumulationsphase, die in der Regel über mehrere Stunden andauert, werden zahlreiche Zyklen von Tyrosin-Phosphorylierung, Kernimport, Dephosphorylierung, Kernexport und Rephosphorylierung durchlaufen, um eine konstante Konzentration transkriptionell aktiver Moleküle im Kern aufrecht zu erhalten (Meyer et al., 2003). Stimmt dieses Modell, so könnte die Steigerung der Exportrate zu einer erhöhten Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 führen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 Δ N und STAT1tc, sowie von STAT1 α und STAT1 β nach Cytokin-Stimulation quantitativ im Western-Blot verglichen. Für diese Experimente wurden STAT1-defiziente U3A-Zellen verwendet, die die einzelnen Derivate transient exprimierten.

Zuvor wurde jedoch sichergestellt, dass der eingesetzte Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifische STAT1-Antikörper die gleiche Reaktivität gegenüber STAT1 α und der C-terminal verkürzten Form (AS 1-713) STAT1 β zeigt. Hierfür wurden gleiche Mengen von rekombinantem, *in-vitro*-Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 α und STAT1 β in einem Western-Blot-Experiment mit dem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper, sowie mit einem, gegen die SH2-Domäne gerichteten, STAT1-spezifischen Antikörper, analysiert (Abbildung 22A). Es zeigte sich, dass der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifische STAT1-Antikörper Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 α oder STAT1 β gleich gut erkennt.

Die Signalintensität einer Bande im Western-Blot hängt von verschiedenen Faktoren, wie der aufgetragenen Proteinkonzentration, dem Transfer vom Gel auf die Blotmembran, der Güte und Inkubationsdauer mit Antikörper- oder Chemilumineszenz-Lösung, sowie der Belichtungszeit ab.

Aus diesem Grund ist es nicht möglich Western-Blot-Experimente, die unabhängig voneinander entwickelt wurden, quantitativ miteinander zu vergleichen. Die Western-Blot-Experimente, die im folgenden in einer Abbildung zusammengefasst sind (z. B. Abbildung 22B), sind jedoch Seite an Seite beladen, transferiert, inkubiert und entwickelt worden und daher miteinander vergleichbar. Für die Aufzeichnung der Signalintensitäten stand ein LumiImager (Roche) zur Verfügung und die Quantifizierung erfolgte mit dem Softwareprogramm LumiAnalyst 3. Die Antigenkonzentrationen und Belichtungszeiten wurden so gewählt, dass die resultierenden Signalintensitäten innerhalb des linearen Bereiches des LumiImager-Systems lagen. Um die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] zu bestimmen, wurde nach Entfernen des gebundenen Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörpers dieselbe Membran mit einem STAT1-spezifischen Antikörper analysiert.

Der Vergleich der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1ΔN und STAT1tc belegt eindrucksvoll die eingangs formulierte Hypothese einer Korrelation zwischen Exportrate und Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung und demonstriert, dass die gesteigerte Exportrate von STAT1ΔN im Vergleich zu STAT1tc mit einer erhöhten Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung einhergeht (Abbildung 22B, C). Wie die quantitative Analyse zeigt (Abbildung 22C), liegt die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] von STAT1ΔN zu allen Zeitpunkten um das drei- bis achtfache über der von STAT1tc.

Zur Ladungs-Kontrolle und um eine vergleichbare Stimulierbarkeit der STAT1ΔN- und STAT1tc-exprimierenden Zellen zu demonstrieren, wurden die Zellextrakte in einem separaten Experiment mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen JAK2- und anschließend einem JAK2-spezifischen Antikörper analysiert. Das Expressionsniveau und der Tyrosin-Phosphorylierungsstatus der IFN-abhängigen STAT1-Kinase JAK2 ist in allen Zellysaten vergleichbar (Abbildung 22B). Da die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von N-terminal verkürzten STAT1-Derivaten nahezu irreversibel ist (Abbildung 8), können Dephosphorylierungsunterschiede als Ursache für die Differenzen der spezifischen Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1ΔN und STAT1tc ausgeschlossen werden.

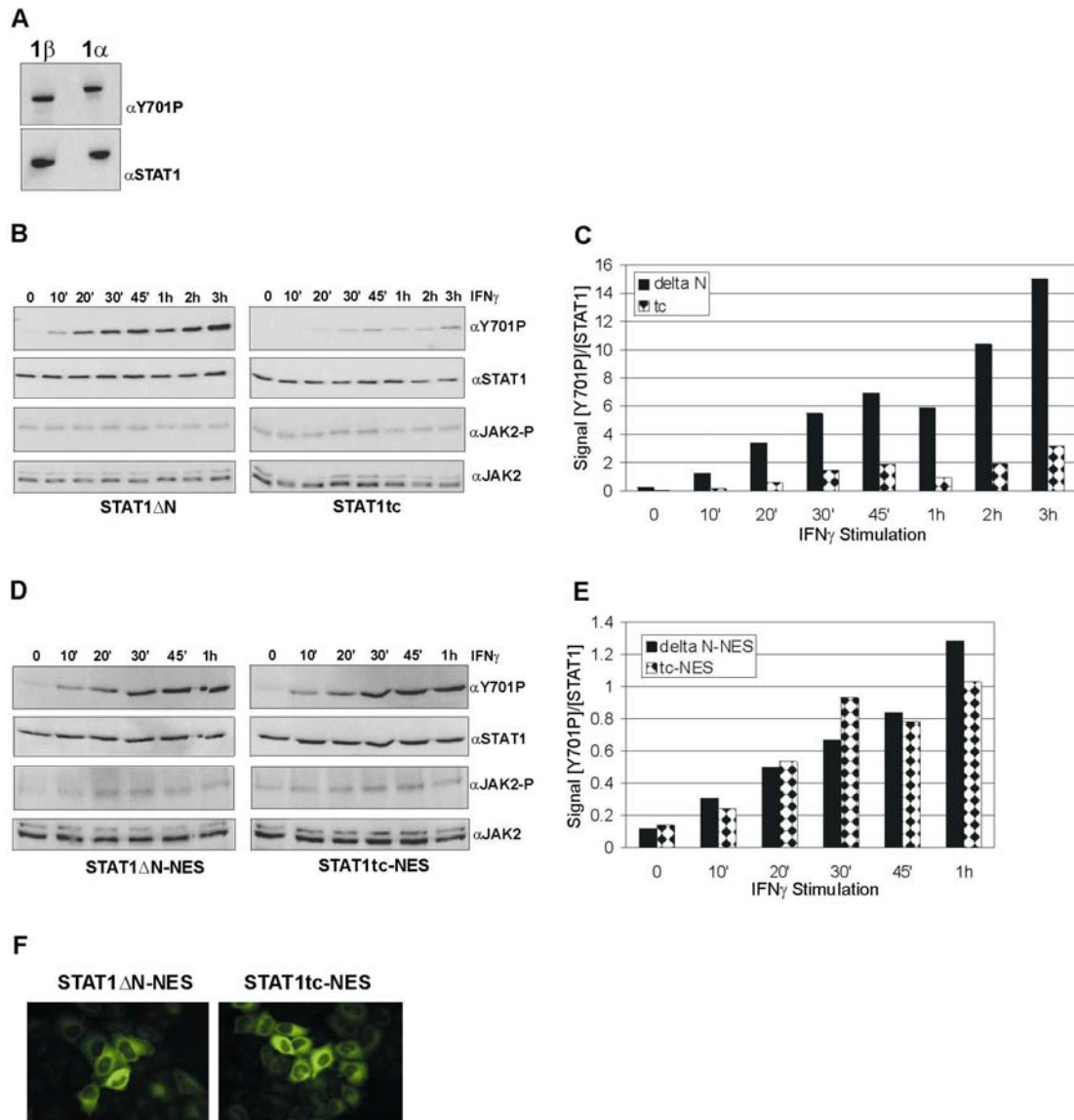


Abbildung 22: Die gesteigerte Exportrate von STAT1 Δ N im Vergleich zu STAT1tc korreliert mit einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung.

(A) Der verwendete Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifische STAT1-Antikörper zeigt die gleiche Reaktivität gegenüber STAT1 α und der C-terminal verkürzten Variante STAT1 β . Western-Blot-Analyse mit dem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper (α Y701P) und einem (gegen die SH2-Domäne gerichteten) STAT1-spezifischen Antikörper (α STAT1). Aufgetragen wurden je 5 ng rekombinantes, *in vitro* an Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertes STAT1 α (1 α) oder STAT1 β (1 β). Wie durch massenspektrometrische Untersuchungen gezeigt worden war, betrug die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung der beiden STAT1-Proteine > 95%. (B) STAT1 Δ N- oder STAT1tc-exprimierende U3A-Zellen wurden für 10 bis 180 Min. mit IFN γ stimuliert, Ganzzellextrakte hergestellt und diese im Western-Blot mit dem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper analysiert (α Y701P). Zur Bestimmung des STAT1-Expressionsniveaus wurde die Membran nach Entfernen des in der ersten Reaktion gebundenen Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Antikörpers erneut mit einem STAT1-spezifischen Antikörper inkubiert (α STAT1). Außerdem wurden die Ganzzellextrakte auf einem separaten Blot mit einem Phospho-Tyrosin^{1007/1008}-spezifischen JAK2- (α JAK2-P) und anschließend mit einem JAK2-spezifischen Antikörper (α JAK2) analysiert. (C) Quantitative Auswertung des Western-Blot-Experiments in (B). Mit Hilfe des LumiAnalyst 3-Programms wurde die jeweilige Bandenintensität

bestimmt und daraus die spezifische STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] berechnet. **(D)** und **(E)** identisch zu **(B)** und **(C)**, außer dass die untersuchten U3A-Zellen STAT1 Δ N-NES-GFP- oder STAT1tc-NES-GFP-Fusionsproteine exprimierten und nur bis zu 1 h mit IFN γ stimuliert wurden. Die in **(B)** und **(D)** beschriebenen Experimente wurden zweimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. **(F)** Subzelluläre Verteilung von STAT1 Δ N-NES-GFP oder STAT1tc-NES-GFP in unstimulierten HeLa-Zellen. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz fixierter Zellen 24 h nach Transfektion.

Bemerkenswerterweise verschwinden die Unterschiede in der spezifischen Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung, wenn die Translokationsunterschiede zwischen STAT1 Δ N und STAT1tc aufgehoben werden (Abbildung 22D, E). Dies geschah durch die Fusion mit einem transferierbaren, CRM1-abhängigen Exportsignal (NES), das zu einer cytoplasmatischen Relokalisation der Fusionsproteine führt (Abbildung 22F). Dieses Experiment macht deutlich, dass STAT1tc nicht generell schlechter phosphoryliert wird. Die Unterschiede zwischen STAT1 Δ N und STAT1tc sind vielmehr die Folge einer durch Translokationsunterschiede bedingten, ungleichen cytoplasmatischen Verfügbarkeit. Werden die Translokationsunterschiede zwischen STAT1 Δ N und STAT1tc jedoch ausgeschaltet, so ist auch die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung der beiden STAT1-Derivate vergleichbar.

Es stellte sich nun die Frage, ob die für die N-terminal deletierten Derivate STAT1 Δ N und STAT1tc gewonnen Erkenntnisse, auch auf STAT1 α und STAT1 β übertragbar sind. Wie der Vergleich der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 α und STAT1 β ergab, ist auch in diesem Fall die Expression des C-Terminus mit einer Steigerung der spezifischen Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung verbunden (Abbildung 23). Das Western-Blot-Experiment und die Quantifizierung in Abbildung 23A und B machen deutlich, dass das Niveau der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 α zu allen Zeitpunkten um das zwei- bis fünffache über dem von STAT1 β liegt. Auch hier werden die Phosphorylierungsunterschiede durch die Fusion mit einem transferierbaren, nukleären Exportsignal (NES), das die Translokationsunterschiede ausschaltet, aufgehoben (Abbildung 23C, D).

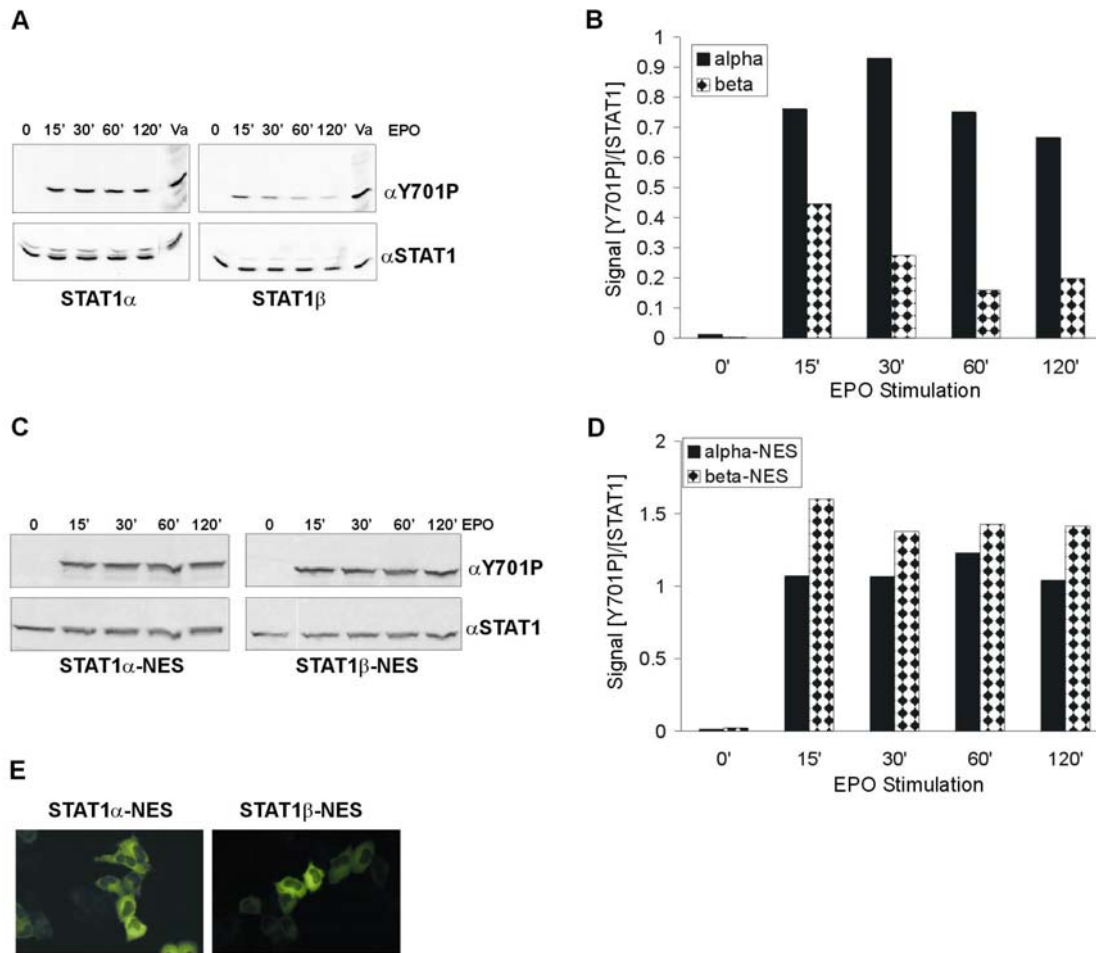


Abbildung 23: STAT1 α zeigt eine im Vergleich zu STAT1 β erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung.

(A) STAT1 α oder STAT1 β und einen chimären Erythropoietinrezeptor koexprimierende U3A-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Erythropoietin oder für 30 Min. mit Erythropoietin und Vanadat (Va) stimuliert. Die Tyrosin-Phosphorylierung sowie das Expressionsniveau der STAT1-Derivate wurde anschließend im Western-Blot-Experiment bestimmt. (B) Quantitative Auswertung von (A). Die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] von STAT1 α und STAT1 β wurde ermittelt und im Balkendiagramm dargestellt. (C) Tyrosin-Phosphorylierung und Expressionsniveau von STAT1-NES-Fusionsproteinen, die für die angegebenen Zeiten mit IFN γ stimuliert worden waren. Die in (A) und (C) dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. (D) Quantitative Auswertung von (C). Die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] der STAT1-NES-Fusionsproteine ist im Balkendiagramm dargestellt. (E) Subzelluläre Verteilung von STAT1 α -NES-GFP oder STAT1 β -NES-GFP in unstimulierten HeLa-Zellen. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz fixierter Zellen 24 h nach Transfektion.

Da die Halbwertszeit der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung nur wenige Minuten beträgt (Abbildung 24), hat auch die Rate der Dephosphorylierung einen entscheidenden Einfluss auf die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 und könnte die Unterschiede zwischen STAT1 α und STAT1 β erklären. Aus diesem Grund wurde die Rate der Dephosphorylierung von STAT1 α und STAT1 β bestimmt (Abbildung 24).

Erwartungsgemäß liegt die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 α nach 45-minütiger IFN γ -Stimulation über der von STAT1 β . Die Dephosphorylierungsrate der beiden Proteine nach Staurosporin-Behandlung ist jedoch vergleichbar. Eine Zugabe von Staurosporin führt sowohl bei STAT1 α als auch bei STAT1 β innerhalb von 10 Min. zu einer Reduktion der spezifischen Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung auf die Hälfte des Ausgangswertes (Abbildung 24B). Die Unterschiede in der spezifischen Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung sind demzufolge nicht auf eine unterschiedliche Dephosphorylierungsrate zurückzuführen.

Die schnelle Abnahme der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung nach Inhibition der Rephosphorylierung durch Staurosporin führt noch einmal die Bedeutsamkeit einer kontinuierlichen Rephosphorylierung für die Aufrechterhaltung einer konstanten Konzentration Tyrosin⁷⁰¹-phosphorylierter Moleküle vor Augen.

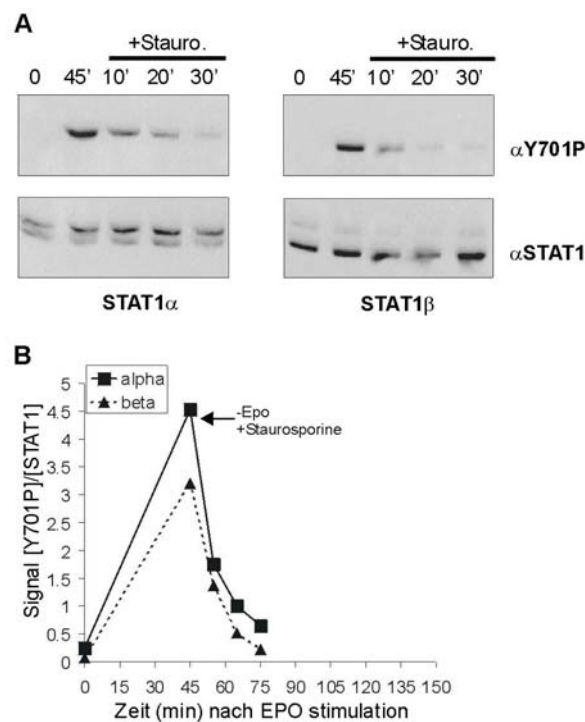


Abbildung 24: STAT1 α und STAT1 β unterscheiden sich nicht in ihrer Tyrosin⁷⁰¹-Dephosphorylierungskinetik.

(A) STAT1 α oder STAT1 β und einen chimären Erythropoietinrezeptor koexprimierende U3A-Zellen wurden für 45 Min. mit Erythropoietin (EPO) stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach 45 Min. wurde das Cytokin entzogen und die Zellen für 10, 20, 30 Min. in Anwesenheit (+Stauro.) des Kinase-Inhibitors Staurosporin (0,5 μ M) weiterkultiviert. Gezeigt ist die Western-Blot-Analyse der Ganzzellextrakte mit dem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1- (α Y701P) sowie einem STAT1-spezifischen (α STAT1) Antikörper. (B) Quantitative Auswertung von (A). Das Diagramm zeigt die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/Intensität der STAT1-Bande] der beiden STAT1-Varianten nach IFN γ -Entzug in Anwesenheit von Staurosporin.

Zusammenfassend demonstrieren diese Versuche, dass eine durch Expression des C-Terminus gesteigerte Exportrate mit einer erhöhten Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 verbunden ist. Die Unterschiede im Phosphorylierungs-Niveau zwischen STAT1 α und STAT1 β oder zwischen STAT1 Δ N und STAT1tc können durch das Ausschalten der Translokationsdifferenzen aufgehoben werden.

Wie die Versuche in Kapitel 4.2 zeigen konnten, hat nicht nur die Deletion des gesamten C-Terminus, sondern auch die Mutation der Serin⁷²⁷-Phosphorylierungsstelle einen negativen Einfluss auf die Exportgeschwindigkeit von STAT1. Eine Korrelation von Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung wurde, insbesondere aufgrund der stimulatorischen Rolle, die der Serin⁷²⁷-Phosphorylierung für die Geninduktion zukommt, bereits in verschiedenen Studien untersucht. Unterschiede in der Intensität und Kinetik der Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung konnten nach Mutation von Serin⁷²⁷ jedoch nicht festgestellt werden (Wen et al., 1995; Wen und Darnell, 1997; Kovarik et al., 2001; Pilz et al., 2003). Ein sorgfältiger quantitativer Vergleich erfolgte bislang jedoch nicht.

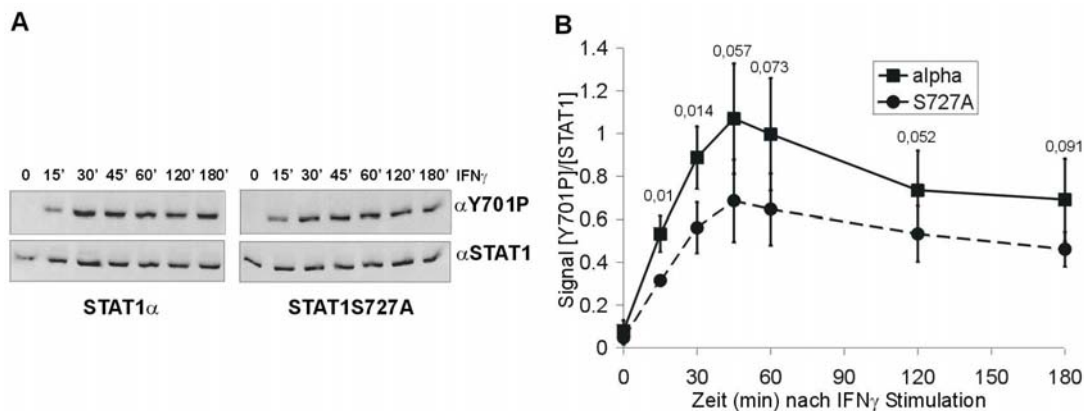


Abbildung 25: Einfluss der Mutation von Serin⁷²⁷ nach Alanin auf die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1.

(A) U3A-Zellen, die transient mit STAT1 α oder der Punktmutante STAT1 Serin⁷²⁷Alanin transfiziert worden waren, wurden für die angegebenen Zeiten mit IFN γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Analyse der Ganzzellextrakte erfolgte im Western-Blot mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1-Antikörper (α Y701P) oder mit einem STAT1-spezifischen Antikörper (α STAT1). (B) Quantitative Auswertung von (A). Die mittlere spezifische Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] aus vier unabhängigen Experimenten, die parallel im Western Blot entwickelt wurden und von denen eins repräsentativ in (A) dargestellt ist, wurde ermittelt und \pm Standardabweichung gegen Zeit aufgetragen. Die mit Hilfe des Student'schen T-Tests errechneten p-Werte der einzelnen Zeitpunkte sind über den entsprechenden Messpunkten angegeben.

Wie die quantitative Analyse von vier unabhängigen Western-Blot-Experimenten (Abbildung 25B), von denen eines in Abbildung 25A dargestellt ist, demonstriert, ist der Mittelwert der spezifischen Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 Serin⁷²⁷ Alanin in der Tat zu allen Zeitpunkten geringfügig niedriger als der von STAT1 α . Das Signifikanzkriterium von $p < 0,5$ konnte aber nicht für alle Zeitpunkte erfüllt werden.

4.4.2 Die Exportrate bestimmt die Cytokin-Sensitivität von STAT1

In den zuvor geschilderten Experimenten (4.4.1) konnte eine Korrelation zwischen der Exportrate und der Signalstärke, also der Konzentration an zu einem Zeitpunkt Tyrosin⁷⁰¹-phosphorylierter STAT1-Moleküle, demonstriert werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass ein gesteigerter Export die Interferon-Sensitivität von STAT1 erhöht. Um dies zu zeigen, wurden STAT1 α - oder STAT1 β -exprimierende U3A-Zellen für 45 Min. mit steigenden IFN γ -Konzentrationen stimuliert (Abbildung 26A) und die mittlere spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] aus drei unabhängigen Experimenten wurde ermittelt (Abbildung 26B).

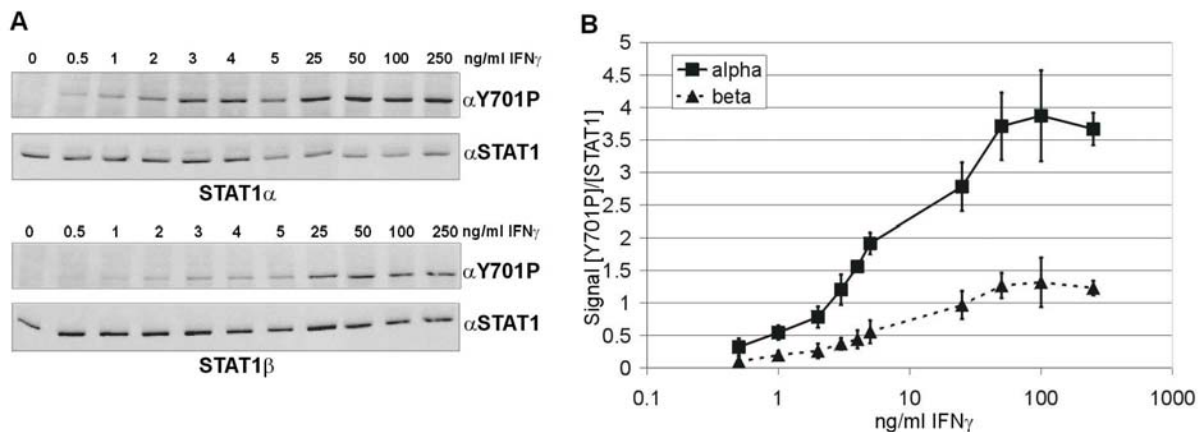


Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve von STAT1 α und STAT1 β auf IFN γ

(A) STAT1 α - oder STAT1 β -exprimierende U3A-Zellen wurden für 45 Min. mit den angegebenen IFN γ -Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurde die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung und das Expressionsniveau von STAT1 im Western-Blot bestimmt. (B) Quantitative Auswertung von (A). Die mittlere spezifische Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, von denen eins in (A) gezeigt ist, wurde ermittelt und im Diagramm gegen die IFN γ -Konzentration aufgetragen.

Die Induktion einer detektierbaren Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung erfordert bei STAT1 β eine IFN γ -Konzentration von 3 bis 4 ng/ml; bei STAT1 α genügt hierfür schon eine Konzentration von 0,5 bis 1 ng/ml. STAT1 β erreicht bei einer Konzentration von ungefähr 50 ng/ml IFN γ ein Plateau. Eine vergleichbar hohe Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung wird für STAT1 α dagegen bereits nach einer Stimulation mit 3 ng/ml IFN γ erzielt. Auch STAT1 α erreicht bei einer Stimulation mit 50 ng/ml IFN γ ein Plateau, das allerdings auf einem sehr viel höheren Niveau liegt (Abbildung 26).

Die Exportrate bestimmt demnach über die Regulation der cytoplasmatischen Verfügbarkeit von STAT1 den Schwellenwert der für eine STAT1-Aktivierung erforderlichen IFN γ -Konzentration (4.4.2). Dies führt, trotz gleicher Fähigkeit zur Rezeptorbindung (4.4.1), zu einer bevorzugten Aktivierung von STAT1 α .

4.4.3 Der Zusammenhang zwischen Exportrate und Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung kann auch für die endogenen STAT1-Spleißvarianten demonstriert werden

Abschließend sollte gezeigt, dass die zuvor erhobenen Befunde auch für endogenes STAT1 gelten. STAT1 β liegt in allen untersuchten Zellen, so auch in HeLa-Zellen, neben STAT1 α vor. Die großen Konzentrationsunterschiede zwischen STAT1 α und STAT1 β erschweren jedoch eine Quantifizierung, da die Signalintensitäten außerhalb des linearen Bereiches des Lumilmagers liegen (Abbildung 27A: linker Blot: 1 h IFN γ).

Um die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von endogenem STAT1 α und STAT1 β vergleichen zu können, wurde daher zunächst die zelluläre STAT1-Konzentration durch IFN γ -Stimulation erhöht. Über Autoregulation induziert eine IFN-Stimulation die STAT1-Expression (Pine et al., 1994). Wie in Abbildung 27A zu sehen ist, führt eine sechzehnstündige IFN γ -Stimulation zu einem deutlichen Anstieg der STAT1 α - und STAT1 β -Konzentration (Abbildung 27A: linker Blot: 16 h IFN γ), eine Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung ist nach dieser Zeit jedoch nicht mehr detektierbar (Abbildung 27A: linker Blot: 16 h IFN γ). Aus diesem Grund wurden die Zellen nach dieser Zeit und einem Mediumwechsel erneut für eine Stunde mit IFN γ stimuliert (Abbildung 27A: rechter Blot).

Die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung und die STAT1-Expression von sieben unabhängigen Proben wurde anschließend im Western-Blot-Experiment analysiert (Abbildung 27A) und die mittlere spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/

Intensität der STAT1-Bande] bestimmt (Abbildung 27B). Es zeigte sich, dass bei vergleichbarer Expression (STAT1 α : 50933 BLU („Boehringer Lichteinheiten“); STAT1 β : 35271 BLU) die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 β deutlich unter der von STAT1 α bleibt (Stat1 α : 64510 BLU; STAT1 β : 17615 BLU) (Abbildung 27). Demnach wird auch die Aktivierbarkeit von endogenem STAT1 über die Expression des C-Terminus reguliert.

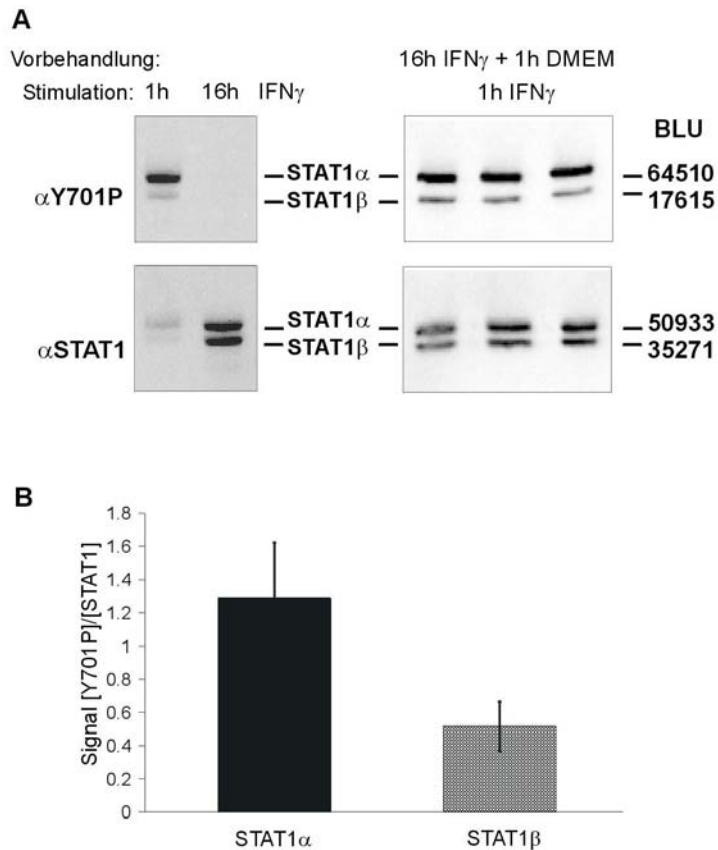


Abbildung 27: Die Expression des C-Terminus reguliert die Tyrosin-Phosphorylierung von endogenem STAT1.

(A) Western-Blot-Analyse untransfizierter HeLa-Zellen mit dem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1- (α Y701P) und einem STAT1-spezifischen (α STAT1) Antikörper. Rechter Western-Blot: HeLa-Zellen wurden zunächst für 16 h mit IFN γ vorbehandelt, um die Expression von endogenem STAT1 α und STAT1 β zu erhöhen. Nach IFN γ -Entzug für 1 h wurden die Zellen erneut, diesmal für 1 h mit IFN γ stimuliert und Ganzzellextrakte hergestellt. Gezeigt sind 3 von 7 Proben. Die mittlere Bandenintensität aller 7 Proben, gemessen in Boehringer Lichteinheiten („Boehringer light units“ (BLU)) ist rechts neben dem Western-Blot angegeben. Der linke Western-Blot zeigt die Tyrosin-Phosphorylierung und das Expressionsniveau von endogenem STAT1 nach 1 h bzw. 16 h IFN γ -Stimulation. (B) Quantitative Auswertung des rechten Western-Blots aus (A). Die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] von STAT1 α und STAT1 β wurde ermittelt und im Balkendiagramm dargestellt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 7 Proben \pm Standardabweichung. $p = 0,00042$.

4.5 Einfluss der Exportrate auf die Signaldauer

4.5.1 Die Mutation der Serin⁷²⁷-Phosphorylierungsstelle verlängert die Kernakkumulationsphase von STAT1

Ein Charakteristikum der STAT-Proteine ist ihre Stimulations-induzierte Akkumulation im Zellkern (Schindler et al., 1992). STAT1 erreicht ungefähr 15 bis 30 Min. nach IFN γ -Stimulation eine Kernakkumulation, die, abhängig von Zelltyp und Stimulationsintensität, über vier bis acht Stunden andauern kann.

Ein Vergleich der Kernakkumulation von STAT1 α und der STAT1 Serin⁷²⁷Alanin-Mutante sollte Aufschluss darüber geben, ob und wie sich eine Regulation der Exportrate auf die Dauer der Kernakkumulation auswirkt. Hierfür wurden STAT1 α und STAT1 Serin⁷²⁷Alanin-exprimierende Zellen für 30 Min. mit IFN γ stimuliert und 2, 4, 6, oder 8 Stunden nach Cytokin-Entzug fixiert. Die GFP-Fluoreszenz fixierter Zellen wurde analysiert (Abbildung 28A) und eine quantitative Auswertung erfolgte für jeweils 30 bis 40 Zellen pro Zeitpunkt (Abbildung 28B).

Die Stimulation mit 20 ng/ml IFN γ induziert eine vergleichbare Kernakkumulation der beiden STAT1-Derivate innerhalb von 30. Min. Vier Stunden nach IFN γ -Entzug ist die Anzahl der Zellen, die eine Kernakkumulation zeigen, im Fall von STAT1 α auf 30% gesunken, während noch alle STAT1 Serin⁷²⁷Alanin-exprimierenden Zellen (35 von 35 Zellen) eine deutliche Kernakkumulation aufweisen. Auch nach weiteren zwei Stunden dauert die Kernakkumulation der Punktmutante an (22 von 42 Zellen), die zu diesem Zeitpunkt für STAT1 α schon vorüber ist.

Eine Reduktion der Exportrate verlängert demnach die Dauer der Kernakkumulationsphase und verzögert so die Zeit bis das System zu seinem Vorstimulationszustand zurückgekehrt ist. Dies bedeutet umgekehrt, dass das System schneller in seinen Ausgangszustand vor Stimulation zurückkehrt, wenn der Export durch Serin⁷²⁷-Phosphorylierung beschleunigt wird.

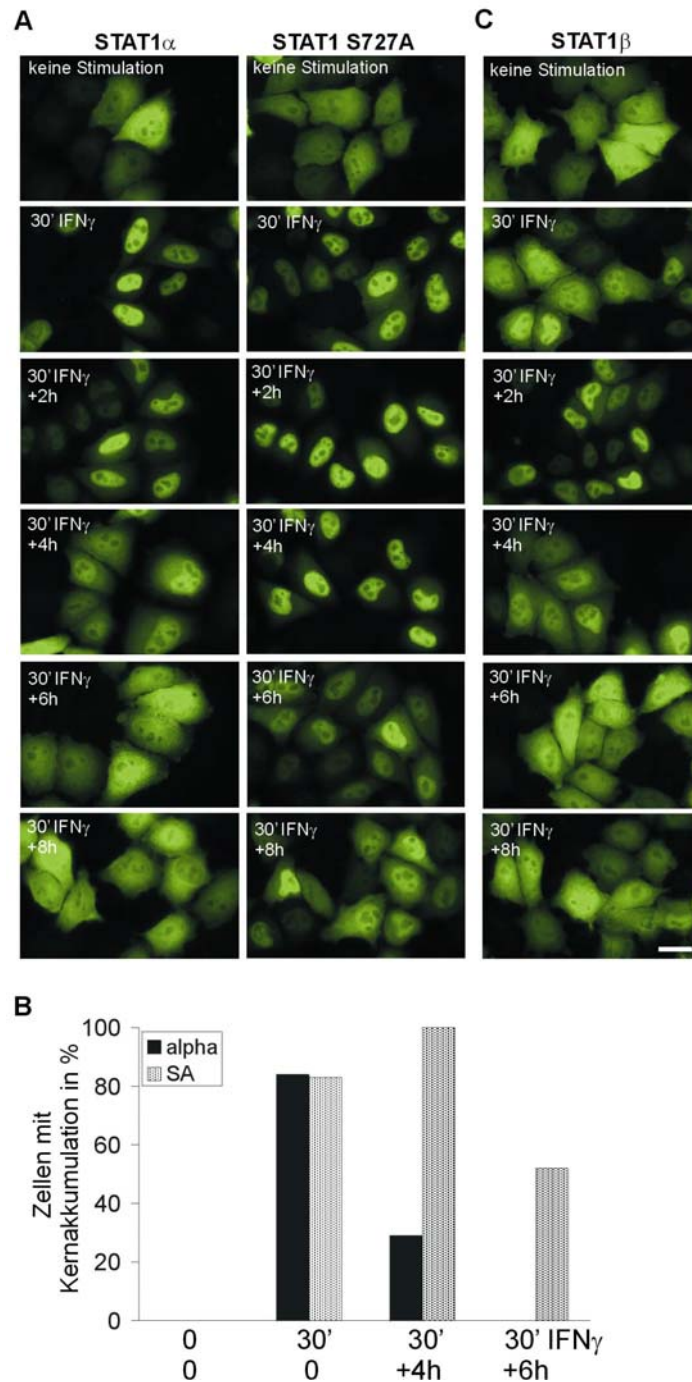


Abbildung 28: Die Punktmutante STAT1 Serin⁷²⁷Alanin zeigt eine im Vergleich zu STAT1 α verlängerte Kernakkumulationsphase nach IFN γ -Stimulation.

(A, C) STAT1 α -GFP- (A), STAT1 Serin⁷²⁷Alanin-GFP- (A) und STAT1 β -GFP- (C) exprimierende HeLa-Zellen wurden mit 20 ng/ml IFN γ stimuliert. Nach 30 Min. Stimulation wurde das Cytokin entzogen und die Zellen für die angegebenen Zeiten in IFN γ -freiem Medium weiterkultiviert. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz fixierter Zellen. Balken: 20 μ m. (B) Quantitative Auswertung von (A). Zu den angegebenen Zeiten wurde die Fluoreszenzintensität in Cytoplasma und Zellkern von 30-40 STAT1 α -GFP- oder STAT1 Serin⁷²⁷Alanin-GFP-exprimierenden Zellen bestimmt und der Quotient von nukleärer zu cytoplasmatischer Fluoreszenzdichte berechnet. Ein Quotient [nukleäre Fluoreszenzdichte/ cytoplasmatische Fluoreszenzdichte] > 4 wurde als Kernakkumulation gewertet.

In einem weiterführenden Experiment wurde der Einfluss alternativer Serin⁷²⁷-Austausch-Mutationen auf die Dauer der Kernakkumulationsphase von STAT1 untersucht (Abbildung 29). Interessanterweise hat der Austausch von Serin⁷²⁷ durch die negativ-geladene Aminosäure Asparat (Abbildung 29: 2. Spalte), die häufig als Phosphat-Imitat eingesetzt wird, einen milderen Phänotyp zur Folge. Die Kernakkumulationsphase dieser Mutante ist im Vergleich zu STAT1 α zwar ebenfalls deutlich verlängert (vergleiche Abbildung 29: 4 h und 6 h), sie bleibt aber kürzer als die der Alanin-Mutante (vergleiche Abbildung 29: 6 h und 8 h). Der Austausch von zwei Aminosäuren des LPMSP-Motivs (Methionin⁷²⁶ und Serin⁷²⁷) führt dagegen zu einer im Vergleich zur Alanin-Mutante verlängerten Kernakkumulationsphase.

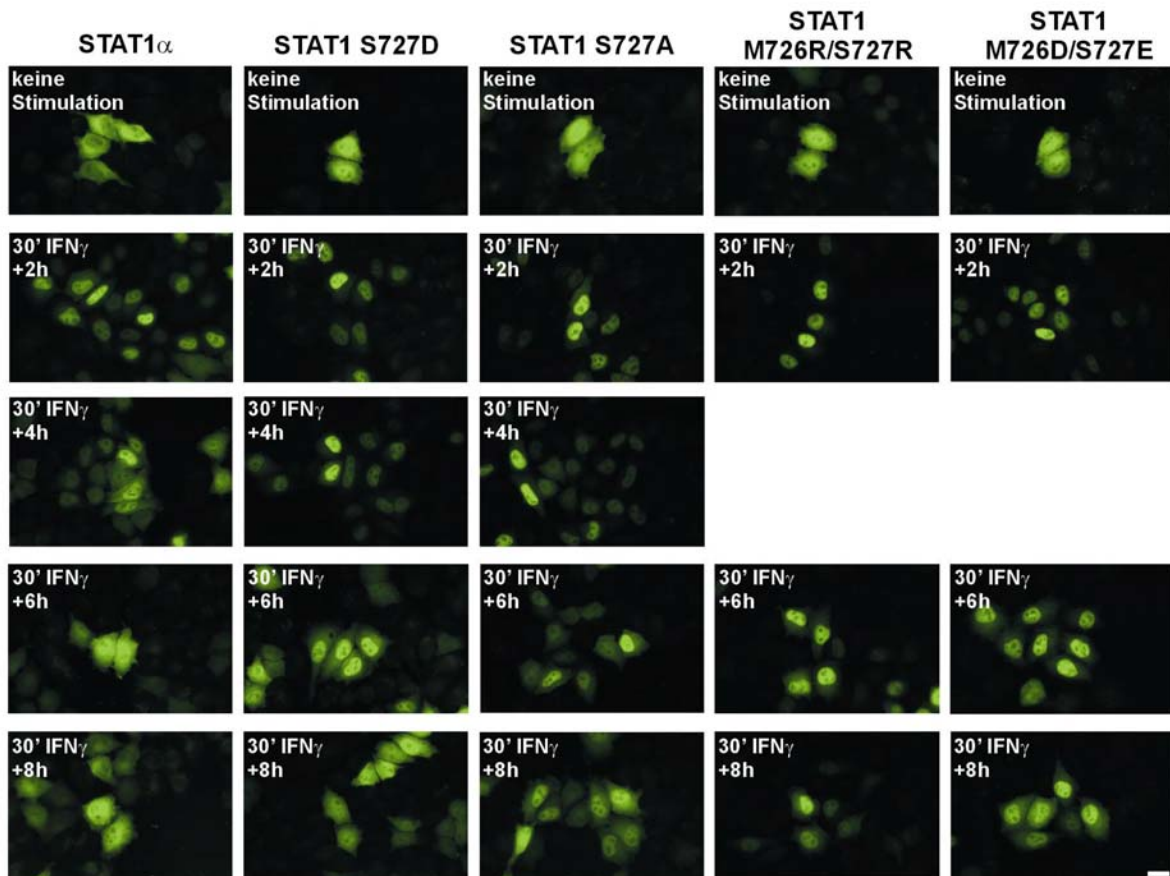


Abbildung 29: Verlängerte Kernakkumulationsphase verschiedener Serin⁷²⁷ Austausch-Mutanten.

HeLa-Zellen, die die angegebenen STAT1-GFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden für 30 Min. mit IFN γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 30 Min. Stimulation wurden die Zellen gewaschen und für 2 h, 4 h, 6 h oder 8 h in IFN γ -freiem Medium weiterkultiviert. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz fixierter Zellen. Balken: 20 μ m.

4.5.2 Die Kernakkumulationsphase von STAT1 β ist gegenüber der von STAT1 α verlängert

Entgegen der Erwartung eines schwerwiegenderen Phänotyps, zeigt STAT1 β dagegen keine verlängerte Kernakkumulationsphase (Abbildung 28C). Vergleichbar mit STAT1 α ist auch die Kernakkumulation von STAT1 β sechs Stunden nach IFN γ -Entzug vorüber (Abbildung 28A, C).

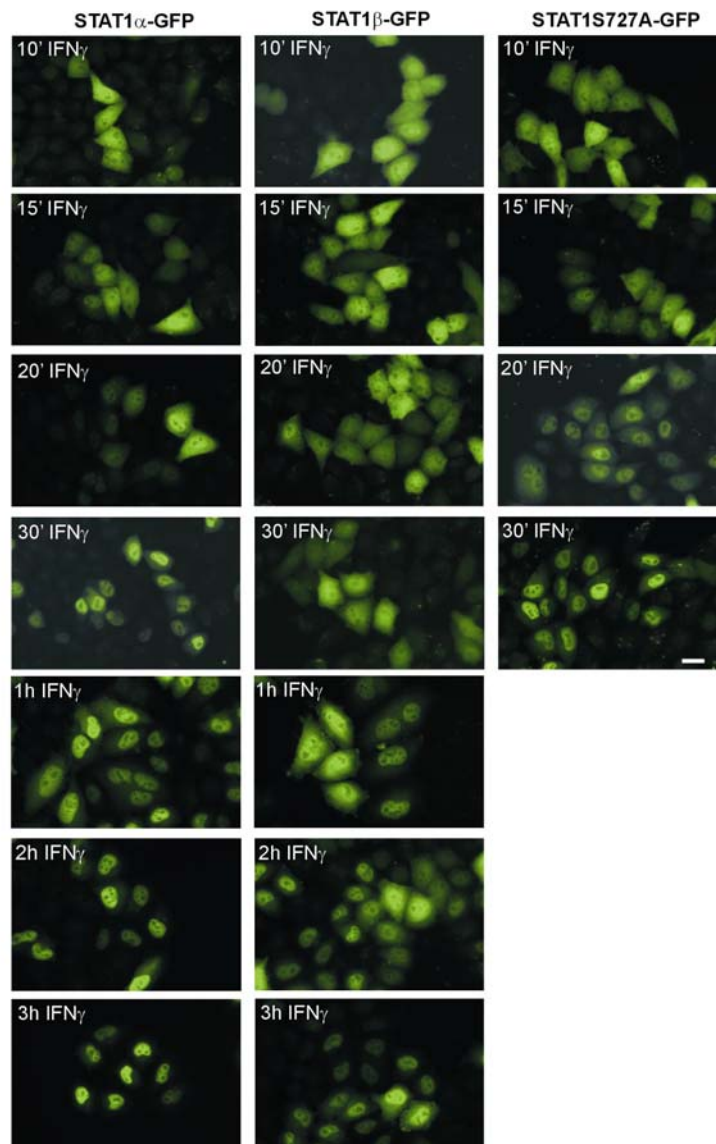


Abbildung 30: Die Kernakkumulation von STAT1 β nach IFN γ -Stimulation ist verzögert und unvollständig. STAT1 α -GFP-, STAT1 β -GFP- oder STAT1 Serin⁷²⁷ Alanin-GFP-exprimierende HeLa-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit IFN γ stimuliert und anschließend fixiert. Balken: 20 μ m.

Betrachtet man jedoch frühe Zeitpunkte (Abbildung 30), so fällt auf, dass STAT1 β 30 Min. nach IFN γ -Stimulation eine noch weitgehend panzelluläre Verteilung aufweist (Abbildung 28A, C). In der Tat erreicht STAT1 β erst nach zwei Stunden IFN γ -Stimulation eine Kernakkumulation, während STAT1 α und STAT1 Serin⁷²⁷Alanin bereits innerhalb von 20 bis 30 Min. im Zellkern nahezu aller Zellen akkumulieren. Die Kernakkumulation von STAT1 β ist darüber hinaus durch eine Vielzahl von Zellen mit einer noch erheblichen Restfluoreszenz im Cytoplasma gekennzeichnet (Abbildung 30).

Es stellte sich daher die Frage, ob die nur unzureichende Kernakkumulation von STAT1 β auf einen Importdefekt zurückzuführen ist oder aber die bereits beschriebene schlechte Aktivierbarkeit des Proteins widerspiegelt (4.4). Diese Frage konnte anhand von Mikroinjektions-Experimenten geklärt werden, die von Dr. A. Marg durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (Abbildung 31).

Wie Abbildung 31A demonstriert, führt eine Injektion von *in-vitro*-Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 in das Cytoplasma unstimulierter HeLa-Zellen, bereits 15 Min. nach Mikroinjektion zu einer vollständigen Akkumulation beider STAT1-Derivate im Kern. Die Kernakkumulation von STAT1 β ist also mit der von STAT1 α vergleichbar, wenn beide Proteine in bereits Tyrosin⁷⁰¹-phosphorylierter Form vorliegen. Dies macht deutlich, dass der Kernimport von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 β nicht schlechter ist als der von STAT1 α .

In einem zweiten Experiment wurde nun unphosphoryliertes STAT1 in das Cytoplasma unstimulierter HeLa-Zellen injiziert und die Zellen anschließend für 30 Min. mit IFN γ stimuliert. Auch hier ist die resultierende Kernakkumulation von STAT1 β mit der von STAT1 α vergleichbar (Abbildung 31B). Demzufolge sind auch die Rezeptor-Erkennung und Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 β und STAT1 α vergleichbar, wenn beide Proteine in gleicher Konzentration im Cytoplasma vorliegen.

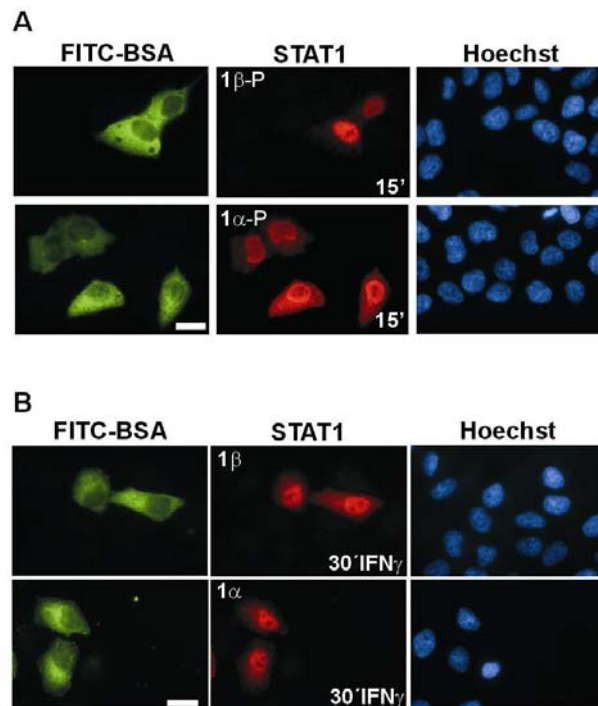


Abbildung 31: Vergleichbare Kernakkumulation von STAT1 α und STAT1 β nach cytoplasmatischer Mikroinjektion.

(A) Mikroinjektion von rekombinantem, *in-vitro*-Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 β (1 β -P) oder STAT1 α (1 α -P) in das Cytoplasma ruhender HeLa-Zellen. 15 Min. nach Injektion wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation der injizierten STAT1-Proteine immunocytochemisch mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Antikörper detektiert. Die Komikroinjektion von FITC-gekoppeltem BSA diente als Injektionskontrolle. Balken: 20 μ m. (B) Mikroinjektion von rekombinantem, unphosphoryliertem STAT1 β (1 β) oder STAT1 α (1 α) in das Cytoplasma ruhender HeLa-Zellen. Unmittelbar nach Mikroinjektion wurden die Zellen für 30 Min. mit IFN γ stimuliert und anschließend fixiert. Die Immunfärbung mit einem STAT1-spezifischen Antikörper folgte. Balken: 20 μ m.

Der Unterschied im Kernakkumulationsverhalten von STAT1 α und STAT1 β (Abbildung 30) beruht also allein auf der unterschiedlichen cytoplasmatischen Verfügbarkeit der beiden Proteine und kann durch eine Anhebung der cytoplasmatischen Konzentration (durch cytoplasmatische Mikroinjektion) aufgehoben werden (Abbildung 31). Dies ergänzt und bestätigt die im vorangegangenen Kapitel (4.4) beschriebenen Versuche, die gezeigt hatten, dass über die Exportrate, die cytoplasmatische Verfügbarkeit und Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 reguliert wird. Auch hier konnten die Unterschiede durch einen Ausgleich der Translokationsraten aufgehoben werden. Da die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung die Voraussetzung für eine Kernakkumulation ist, spiegelt sich die schlechte Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 β auch in einer verringerten Kernakkumulation wieder.

Dies zeigt sich auch nach Fusion mit einem übertragbaren, CRM1-abhängigen Exportsignal (NES). Wie bereits beschrieben (4.4.1) sind STAT1-NES-Fusionsproteine überwiegend im Cytoplasma lokalisiert, wodurch die Translokationsunterschiede zwischen STAT1 α und STAT1 β aufgehoben werden. Dies führt dazu, dass STAT1 α und STAT1 β als NES-Fusionsproteine nicht nur eine vergleichbare Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung (Abbildung 23C, D), sondern auch eine vergleichbare Kernakkumulation zeigen (Abbildung 32).

Da die Fusion mit dem CRM1-abhängigen Exportsignal (NES) den Exportblock von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1 aufhebt (persönliche Mitteilung Dr. T. Meyer), müssen die STAT1-NES-Fusionsproteine zusätzlich zur IFN γ -Stimulation mit dem CRM1-Inhibitor-Ratjadon behandelt werden, um eine Kernakkumulation zu induzieren (Abbildung 32).

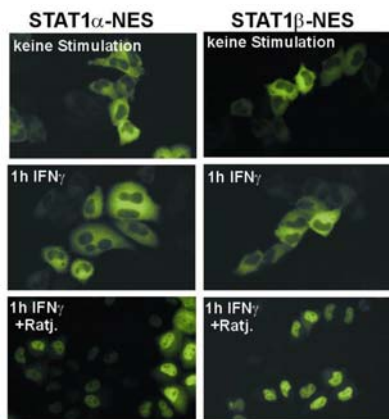


Abbildung 32: Subzelluläre Verteilung von STAT1 α -NES-GFP- und STAT1 β -NES-GFP-Fusionsproteinen.

Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz fixierter STAT1 α - oder STAT1 β -NES-GFP-Fusionprotein-exprimierender HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 1 h mit IFN γ oder mit IFN γ und Ratjadon stimuliert oder unbehandelt belassen. Bedingt durch die starke Exportaktivität des CRM1-abhängigen NES zeigen die Fusionsproteine in unstimulierten Zellen eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation. Die Stimulation mit IFN γ alleine führt nicht zu einer Veränderung dieser Verteilung; erst die zusätzliche Inkubation mit dem CRM1-Inhibitor Ratjadon induziert eine Kernakkumulation, die aber für STAT1 α -NES-GFP und STAT1 β -NES-GFP vergleichbar ist.

In den vorausgegangenen Experimenten ist deutlich geworden, dass eine vergleichbare Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 α und STAT1 β gewährleistet sein muss, um die Dauer der Kernakkumulationsphase der beiden Proteine vergleichen zu können. Wie die Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 26 zeigt, erreicht die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 α und STAT1 β bei einer Konzentration von etwa 50 ng/ml IFN γ ein Plateau. Es ist daher nicht möglich die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 β durch Steigerung der IFN γ -Konzentration auf das Niveau anzuheben, dass STAT1 α nach Stimulation mit 20 ng/ml IFN γ erzielt. Aus diesem Grund wurde die IFN γ -Konzentration für die Stimulation von STAT1 α reduziert.

Abbildung 33 zeigt die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Kinetik von GFP-markiertem STAT1 α und STAT1 β in HeLa-Zellen. Erwartungsgemäß liegt bei einer Stimulation

mit 20 ng/ml IFN γ die spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 α deutlich über der von STAT1 β . Nach einer Reduktion auf 4 ng/ml (für die Stimulation von STAT1 α) zeigen STAT1 α und STAT1 β (stimuliert mit 20 ng/ml IFN γ) eine vergleichbare spezifische Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung und ein entsprechendes Aktivierungs- und Deaktivierungs-Profil.

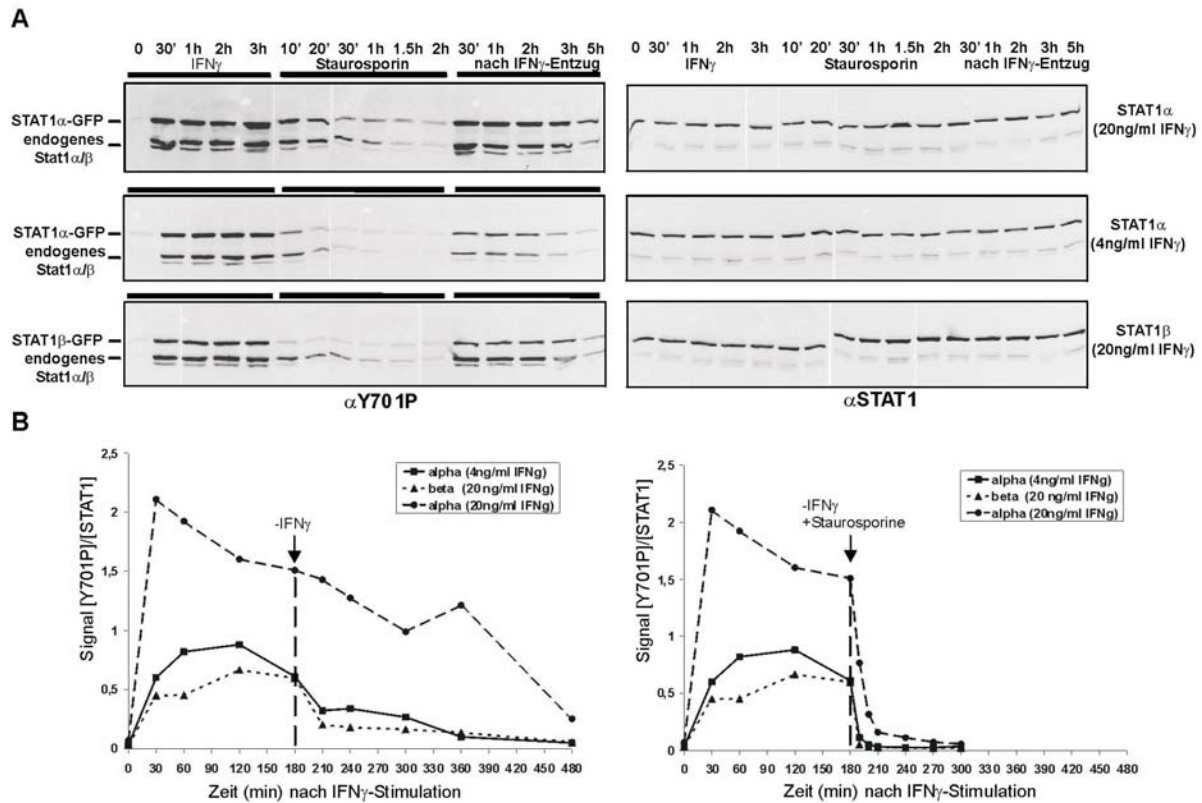


Abbildung 33: Die Stimulation von STAT1 α mit 1/5 der üblichen IFN γ -Konzentration resultiert in einer mit STAT1 β vergleichbaren Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung.

(A) STAT1 α -GFP- oder STAT1 β -GFP-exprimierende HeLa-Zellen wurden für bis zu 3 h mit 4 ng/ml oder 20 ng/ml IFN γ stimuliert oder unstimuliert belassen. Um die Dephosphorylierungsrate zu bestimmen, wurden die Zellen 3 h nach Stimulationsbeginn gewaschen und in IFN γ -freiem (nach IFN γ -Entzug) oder in IFN γ -freiem Medium das zusätzlich den Kinase-Inhibitor Stausporin enthielt (Stausporin) für die angegebenen Zeiten weiterkultiviert. Die Analyse der Ganzzellextrakte erfolgte im Western-Blot mit einem Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen STAT1- (α Y701P) und anschließend einem STAT1-spezifischen (α STAT1) Antikörper. Die obere Bande repräsentiert die ektopisch exprimierte STAT1-GFP-Fusionsproteine, die schneller laufende Doppelbande endogenes STAT1 α und β . (B) Quantitative Auswertung von (A). Die spezifische Tyrosin-Phosphorylierung [Intensität der Phospho-Tyrosin⁷⁰¹-spezifischen Bande/ Intensität der STAT1-Bande] von STAT1 α - oder STAT1 β -GFP wurde ermittelt und im Diagramm aufgetragen. Das linke Diagramm zeigt die Dephosphorylierungskinetik nach IFN γ -Entzug, das rechte nach IFN γ -Entzug mit zusätzlicher Stausporin-Behandlung.

Die Länge der Kernakkumulationsphase wurde nun in transfizierten HeLa-Zellen untersucht. Die Stimulation der STAT1 α -exprimierenden Zellen erfolgte mit 4 ng/ml IFN γ , die der STAT1 β -

exprimierenden Zellen mit 20 ng/ml IFN γ (Abbildung 34). Zunächst offenbarte sich, dass STAT1 α bei dieser niedrigen Tyrosin-Phosphorylierung ebenfalls nahezu zwei Stunden benötigt, um eine Kernakkumulation zu erreichen (Abbildung 34B). Diese ist, genau wie bei STAT1 β , durch eine Vielzahl von Zellen mit einer vergleichsweise hohen Restfluoreszenz im Cytoplasma geprägt (Abbildung 34B und E). Um eine maximale Kernakkumulation zu erlauben, wurde der Stimulus daher nicht bereits nach 30 Min., sondern erst nach drei Stunden entzogen. Wie in Abbildung 34 zu sehen, ist bei einer vergleichbaren Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung die Phase der Kernakkumulation von STAT1 β gegenüber der von STAT1 α deutlich verlängert (Abbildung 34B). Noch sieben Stunden nach IFN γ -Entzug weisen die meisten der STAT1 β -exprimierenden Zellen eine Kernbetonung auf, wohingegen STAT1 α schon drei Stunden nach IFN γ -Entzug zu einer panzellulären Verteilung zurückgekehrt ist.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die unterschiedlichen IFN γ -Dosen, mit denen die STAT1 α - oder STAT1 β -exprimierenden Zellen stimuliert wurden, zu einer unterschiedlich starken Rezeptor-Aktivierung und damit verbunden zu möglicherweise unbekanntem Nebeneffekten führen, wurde in einem sich anschließenden Experiment nach drei Stunden Stimulation, nicht nur das Cytokin entzogen, sondern auch jede weitere Kinaseaktivität durch Zugabe von Staurosporin unterbunden (Abbildung 34D). Die Zugabe von Staurosporin reduziert die Tyrosin⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 α und STAT1 β innerhalb von 30 Min. auf ein undetektierbares Niveau (Abbildung 34C) und führt zu einem schnellen Zusammenbruch der Kernakkumulation (Abbildung 34D).

Eine quantitative Auswertung (Abbildung 34E) macht deutlich, dass bereits 60 Min. nach Staurosporin-Zugabe nur noch 6% der STAT1 α -exprimierenden Zellen eine Kernakkumulation aufweisen (Abbildung 34E). Zu diesem Zeitpunkt sind es aber noch 41% bei STAT1 β . Und selbst nach 180 Min. Staurosporin-Behandlung kann noch in 9% der STAT1 β -exprimierenden Zellen eine Kernakkumulation detektiert werden (Abbildung 34E). Die Kernakkumulationsphase von STAT1 β ist demzufolge gegenüber der von STAT1 α verlängert.

Das Experiment mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin macht darüber hinaus deutlich, dass die verlängerte Kernakkumulationsphase von STAT1 β die Folge einer verlängerten Kernretention unphosphorylierter Moleküle ist. Über die Modulation der Exportrate werden somit Kernretention und Tyrosin-Phosphorylierungs-Status entkoppelt.

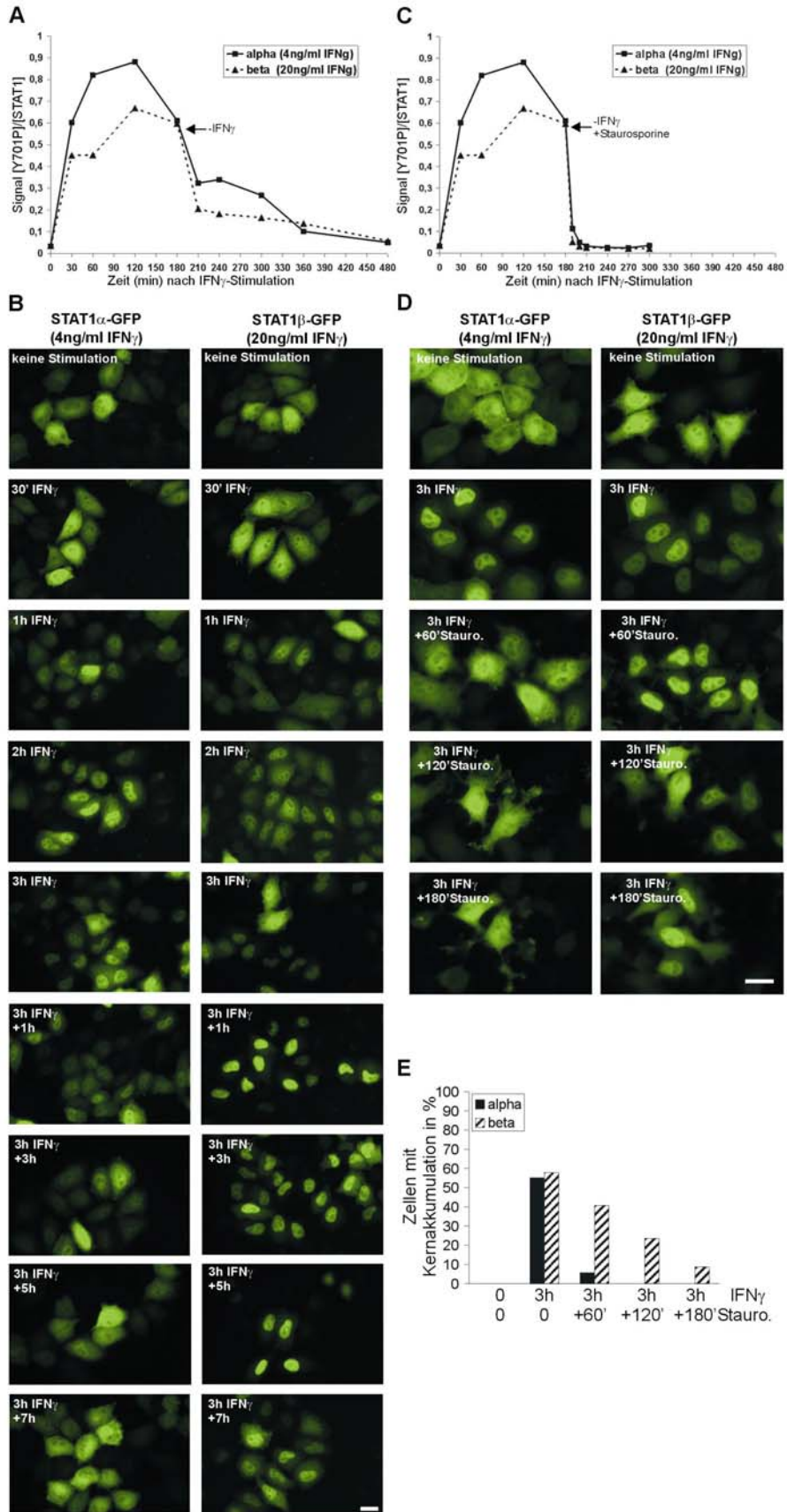


Abbildung 34 (vorherige Seite): Bei vergleichbarer Tyrosin-Phosphorylierung ist die Phase der Kernakkumulation von STAT1 β gegenüber der von STAT1 α deutlich verlängert.

(A, C) Tyrosin-Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungskinetik von STAT1 α und STAT1 β nach Stimulation mit 4 ng/ml IFN γ bzw. 20 ng/ml IFN γ , bestimmt durch Western-Blot-Analyse (vergleiche Abbildung 33). Die Stimulation der Zellen erfolgte wie für (B) und (D) jeweils detailliert beschrieben. (B) Fluoreszenz-Analyse fixierter STAT1 α -GFP- oder STAT1 β -GFP-Fusionsprotein-exprimierender HeLa-Zellen. Um eine vergleichbare Tyrosin-Phosphorylierung zu erzielen, wurden die STAT1 α -exprimierenden Zellen mit 4 ng/ml IFN γ , die STAT1 β -exprimierenden Zellen mit 20 ng/ml IFN γ für bis zu 3 h stimuliert. Nach 3 h Stimulation wurde das Cytokin entzogen und die Zellen für die angegebenen Zeiten in IFN γ -freiem Medium weiterkultiviert. Balken: 20 μ m. (D) Identisch zu (B), außer das die Zellen nach IFN γ -Entzug in IFN γ -freiem Medium, das zusätzlich den Kinase-Inhibitor Staurosporin (0,5 μ M) enthielt, gehalten wurden. Balken: 20 μ m. (E) Quantitative Auswertung von (D). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops die Fluoreszenzdichte in Cytoplasma und Zellkern von 40-80 fixierten STAT1 α -GFP- oder STAT1 β -GFP-exprimierenden Zellen bestimmt. Ein Quotient [nukleäre Fluoreszenzdichte/ cytoplasmatische Fluoreszenzdichte] > 2 wurde als Kernakkumulation gewertet.

4.6 Einfluss der Exportrate auf die STAT1-vermittelte Geninduktion

Der C-Terminus von STAT1 umfasst die Transaktivierungsdomäne des Proteins, über die eine, zum Teil Serin⁷²⁷-Phosphorylierungs-abhängige, Rekrutierung transkriptioneller Kofaktoren erfolgt. Eine Deletion des C-Terminus führt zum Verlust, die Mutation der Serin⁷²⁷-Phosphorylierungsstelle zu einer deutlichen Reduktion der Transkriptionsleistung von STAT1 (zusammengefasst in Levy und Darnell, 2002).

Der in dieser Arbeit aufgedeckte Zusammenhang zwischen Exportrate und Aktivierbarkeit impliziert einen zusätzlichen Mechanismus, über den die Expression des C-Terminus und die Serin⁷²⁷-Phosphorylierung zur Steigerung der Transkriptionsleistung beitragen. Durch den erleichterten Export wird die Konzentration Tyrosin⁷⁰¹-phosphorylierter Moleküle im Kern erhöht.

Es stellte sich daher die Frage, wie diese beiden Funktionen getrennt werden können, um den Beitrag, den die Exportrate an der durch Serin⁷²⁷-Phosphorylierung gesteigerten Transkriptionsleistung hat, darzustellen. In einem Kontext, in dem Kerntransport keine Rolle spielt, sollte der Einfluss einer Serin-Phosphorylierung auf die Transkriptionsleistung geringer ausfallen. Aus dieser Überlegung heraus wurden, in Zusammenarbeit mit dem Labor von Thomas Oelgeschläger, *in-vitro*-Transkriptions-Experimente durchgeführt, die es erlauben, die Transkriptionsinitiation von rekombinantem, Serin⁷²⁷-phosphoryliertem oder nicht Serin⁷²⁷-phosphoryliertem STAT1 α zu vergleichen, ohne dass Prozesse wie Im- oder Export eine Rolle spielen.

4.6.1 *In-vitro*-Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von STAT1 α

Da wie massenspektrometrische Untersuchungen ergeben haben, aus Sf9-Zellen aufgereinigtes STAT1 α nicht an Serin⁷²⁷ phosphoryliert ist (Daten nicht gezeigt; Zakharova et al., 2003), wurde

eine *in-vitro*-Serin⁷²⁷-Phosphorylierung des rekombinanten Proteins erforderlich. In allen bislang veröffentlichten Studien diente die Serin⁷²⁷ nach Alanin-Mutante als Model für nicht-Serin-phosphoryliertes STAT1. Hierbei bleibt jedoch immer die Frage offen, inwieweit die beobachteten Effekte auf die fehlende Phosphorylierung oder aber auf den Aminosäureaustausch zurückzuführen sind. Mit dem direkten Vergleich von unphosphoryliertem und Serin⁷²⁷-phosphoryliertem STAT1 entfällt dieses Problem.

Serin⁷²⁷ liegt in einer potentiellen Konsensus-Sequenz für Kinasen der MAP (mitogen activated protein)-Familie und die *in-vitro*-Phosphorylierung des isolierten STAT1 C-Terminus durch die MAP-Kinase p38 konnte bereits beschrieben werden (Kovarik et al., 1999). Wie das Autoradiogramm in Abbildung 35 zeigt, führt die einstündige Inkubation von STAT1 α mit der Kinase p38 und [³²P]-markiertem ATP (3.3.10) nicht zu einer Phosphorylierung von STAT1 α (Abbildung 35A: 2. Bahn). Erst die Zugabe einer konstitutiv aktiven Form der p38-aktivierenden Kinase MKK6 (MAPK/ERK Kinase 6) resultiert in der Phosphorylierung aller drei in der Reaktion vorhandenen Proteine (Abbildung 35A: 3. Bahn). Dies lässt darauf schließen, dass es unter den gewählten Bedingungen zu einer Autophosphorylierung von MKK6 (80 kDA, mittlere Bande) und einer anschließender Phosphorylierung von p38 (65 kDA, untere Bande) und STAT1 α (90 kDA, obere Bande) kommt. Die durch p38 und MKK6 katalysierte Phosphorylierung erfolgt im C-Terminus von STAT1 α , wie durch den Austausch von STAT1 α durch STAT1 β demonstriert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Auch im Western-Blot-Experiment mit einem Phospho-Serin⁷²⁷-spezifischen Antikörper konnte die Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von Stat1 α nach Inkubation mit p38 und MKK6 detektiert werden (Abbildung 35B: Bahn 2). Die Phosphorylierung von STAT1 α führt außerdem zu einem leicht retardierten Laufverhalten in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, so dass die erfolgreiche Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von STAT1 α auch im Coomassie-gefärbten SDS-Gel sichtbar wird (Abbildung 35C: Bahn 2).

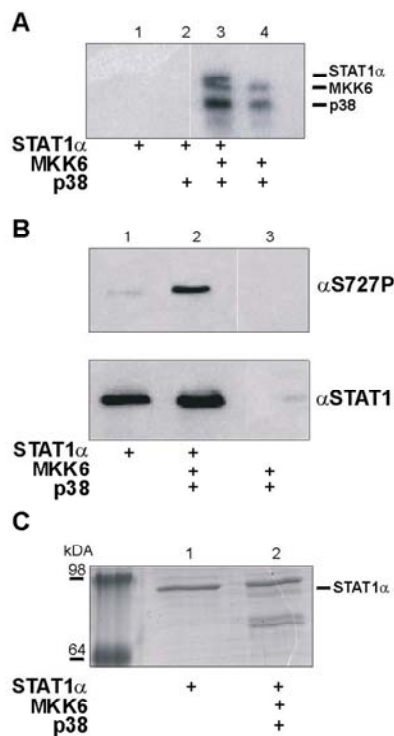


Abbildung 35: In-vitro-Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von rekombinatem STAT1α.

(A) Autoradiogramm. Rekombinantes STAT1α wurde mit den Kinase p38 und MKK6 für 1 h (3.3.10) inkubiert. Anschließend wurden die Proteine in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und die Phosphorylierung von STAT1α (Bahn 3) und p38 (Bahn 3 und 4), sowie die Autophosphorylierung von MKK6 (Bahn 3 und 4) durch Autoradiographie sichtbar gemacht. (B) Western-Blot-Analyse von rekombinatem STAT1α vor (Bahn 1) und nach (Bahn 2) Inkubation mit den Kinasen p38 und MKK6. Die Detektion erfolgte mit einem Phospho-Serin⁷²⁷-spezifischen STAT1- (αS727P) sowie einem STAT1-spezifischen (αSTAT1) Antikörper. (C) Coomassiegefärbtes SDS-Gel. Rekombinantes STAT1α wurde vor (Bahn 1) und nach (Bahn 2) Inkubation mit den Kinasen p38 und MKK6 auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Nachdem durch diese Versuche gezeigt wurde, dass eine *in-vitro*-Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von STAT1 möglich ist, erfolgte nun eine Phosphorylierung quantitativer Mengen (bis zu 2 mg) von unphosphoryliertem oder bereits Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem STAT1α (3.3.9). Die beiden Kinasen p38 und MKK6 wurden nach der Reaktion durch Affinitätsreinigung entfernt und eine erfolgreiche Serin⁷²⁷-Phosphorylierung im Western-Blot-Experiment nachgewiesen. Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben eine Serin⁷²⁷-Phosphorylierung von etwa 90% des nicht-Tyrosin- und 50% des bereits Tyrosin-phosphorylierten Proteins (Daten im Anhang).

In einem Kontroll-Experiment wurde die DNA-Bindung von Tyrosin⁷⁰¹-phosphoryliertem und doppelt Tyrosin⁷⁰¹- und Serin⁷²⁷-phosphoryliertem Protein verglichen. Das Gelretardations-Experiment zeigt, dass die zusätzliche Serin⁷²⁷-Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Stabilität des Protein-DNA-Komplexes hat.

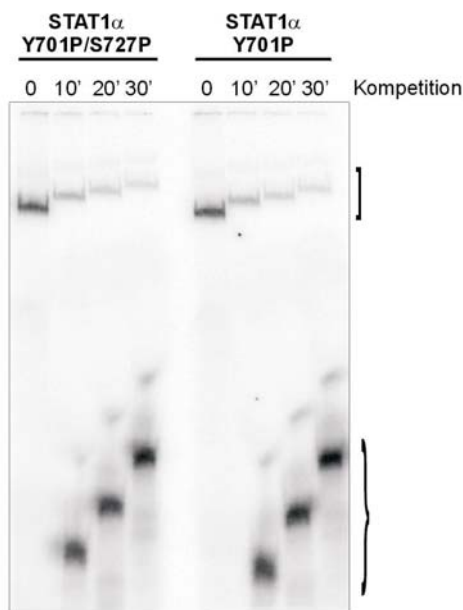


Abbildung 36: Vergleich der DNA-Bindeaktivität von einfach Tyrosin⁷⁰¹- und doppelt Tyrosin⁷⁰¹- und Serin⁷²⁷-phosphoryliertem STAT1 α .

Rekombinantes, *in-vitro*-Tyrosin⁷⁰¹- oder doppelt Tyrosin⁷⁰¹- und Serin⁷²⁷-phosphoryliertes STAT1 α wurden mit einer [³²P]-markierten, hochaffinen STAT1-DNA-Sonde inkubiert. Nach 30 Min. wurde der Protein-DNA-Komplex gelelektrophoretisch aufgetrennt (0 Competition) oder für 10, 20 oder 30 Min. mit einem 750-fachen molaren Überschuss der gleichen aber unmarkierten Sonde inkubiert und anschließend auf das schon laufende Gel aufgetragen (10', 20' 30' Competition). Die eckige Klammer (]) markiert den STAT1-DNA-Komplex, die nicht gebundene radioaktiv-markierte Sonde ist durch eine runde Klammer () gekennzeichnet.

Im Labor von Thomas Oelgeschläger wurden die von uns bereit gestellten rekombinanten Proteine (unphosphoryliertes, Tyrosin⁷⁰¹-, Serin⁷²⁷- und doppelt Tyrosin⁷⁰¹- und Serin⁷²⁷-phosphoryliertes STAT1 α) in 60-minütige Standard-*in-vitro*-Transkriptionsreaktionen eingesetzt (Oelgeschläger et al., 1998). Es zeigte sich, dass nicht-Serin⁷²⁷-phosphoryliertes STAT1 α in vollem Umfang Transkriptions-kompetent und zur Rekrutierung aller notwendigen basalen Transkriptionsfaktoren befähigt ist (Lödige et al., 2005). Allerdings muss beachtet werden, dass die DNA-Matrize in diesem System nicht in Chromatinstrukturen vorliegt, so dass auch die Rekrutierung von Kofaktoren wie Histon-Acetyltransferasen keine Rolle spielt. Ein Rückschluss über das Verhältnis von Transkriptionsleistung, Export und Kofaktor-Rekrutierung lässt sich anhand dieser Versuche nicht ziehen.

4.6.2 Der Export hat einen Anteil an der durch Serin⁷²⁷-Phosphorylierung gesteigerten Transkriptionsleistung von STAT1

Um sich dennoch der Frage zu nähern, ob und in welchem Umfang eine Beschleunigung der Exportrate einen Anteil an der durch Serin⁷²⁷-Phosphorylierung gesteigerten Transkriptionsleistung hat, wurde der Einfluss der Serin⁷²⁷-Mutation in einem Kontext untersucht, in dem nukleärer Export für eine Rephosphorylierung und daher für die Aktivierbarkeit von STAT1 keine Rolle spielt.

Bedingt durch einen Dephosphorylierungsdefekt (Meyer et al., 2004) führt die IFN γ -Stimulation der STAT1-Mutante Phenylalanin⁷⁷ Alanin zu einer nahezu irreversiblen Akkumulation transkriptionell aktiver Moleküle im Kern, wodurch die Notwendigkeit einer cytoplasmatischen Rephosphorylierung entfällt. Dementsprechend zeigt diese Mutante (F77A) eine im Vergleich zu STAT1 α (WT) deutlich gesteigerte Geninduktion im Reporter-gen-Assay (Abbildung 37A).

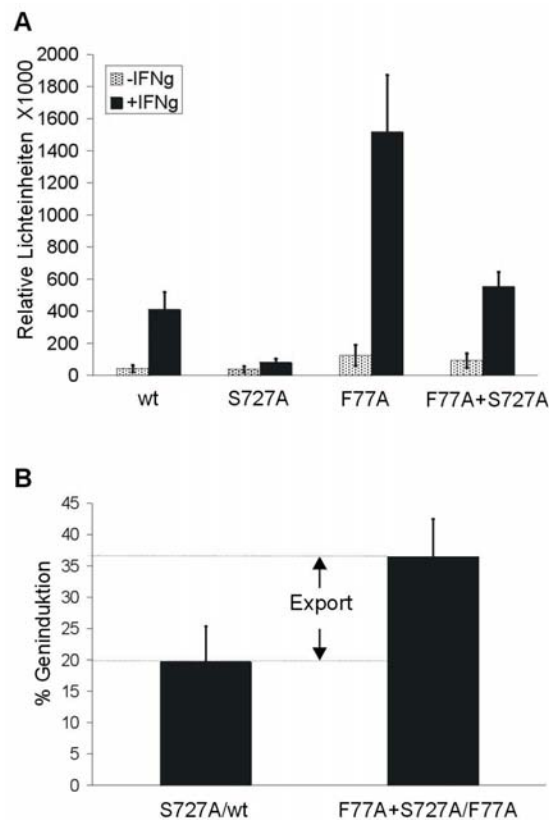


Abbildung 37: Einfluss der durch Serin⁷²⁷-Phosphorylierung gesteigerten Exportrate auf die Transkriptionsleistung von STAT1 α .

(A) Ergebnis eines Reporter-gen-Assays mit STAT1 α (wt) oder den angegebenen STAT1-Punktmutanten und einem STAT1-abhängigen Luciferase-Reporter-gen in transient transfizierten U3A-Zellen. 30 h nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität in unstimulierten (-IFN γ) oder in für 6 h mit IFN γ - (+IFN γ) stimulierten Zellen bestimmt und auf die Aktivität der ebenfalls kotransfizierten β -Galaktosidase normiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung aus 6 unabhängigen Experimenten. (B) Reporter-genaktivität der Serin⁷²⁷ zu Alanin-Mutanten ausgedrückt in % der maximalen Reporter-genaktivität. Für die Berechnung wurden die Werte des Reporter-gen-Assays aus (A) zugrunde gelegt und der Quotient aus dem Wert der Reporter-genaktivität der jeweiligen Serin⁷²⁷ Alanin Mutante und dem mittleren Wert der Aktivität von STAT1 α oder der Phenylalanin⁷⁷ Alanin Mutante gebildet. Der Beitrag der durch Serin⁷²⁷-Phosphorylierung erhöhten Exportrate an der Transkriptionsleistung ist angegeben. Die Daten wurden mit Student's *T*-Test analysiert und sind statistisch signifikant mit $p < 0,05$. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Wie das Reporter-Experiment in Abbildung 37 zeigt, führt eine sechsstündige IFN γ -Stimulation von STAT1 α -exprimierenden U3A-Zellen zu einer zehnfachen Induktion des kotransfizierten Luciferasegens. Die Zunahme der Reporteraktivität nach IFN γ -Stimulation liegt bei STAT1 Phenylalanin⁷⁷ Alanin-exprimierenden Zellen um das drei- bis vierfache höher.

In beiden Fällen führt die Mutation von Serin⁷²⁷ zu Alanin zu einer deutlichen Reduktion der Transkriptionsleistung (Abbildung 37A). Die Export-unabhängige Mutante (F77A) ist hiervon jedoch weniger stark betroffen. Unter Bedingungen, die eine kontinuierliche Rephosphorylierung im Cytoplasma erfordern, reduziert die Serin-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-Mutation auf die Transkriptionsleistung kleiner. In diesem Kontext behält die Serin-Mutante 36% ihrer ursprünglichen Aktivität (Abbildung 37B: F77).

Nimmt man diese Zahlen als Grundlage, so ergibt sich ein Anteil von ungefähr einem Fünftel, den der Export an der Transkriptionsminderung durch die Mutation der Serin⁷²⁷-Phosphorylierungsstelle hat (Abbildung 37B; dieser Wert berechnet sich aus dem Beitrag den der Export (16%) an der durch Serinmutation reduzierten Transkriptionsleistung (80%) hat).