

5. Summary

The signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins are central mediators in the response of cells to cytokines and growth factors. By their movement from the cytosol to the nucleus, STATs link signals at the cell surface to specific target genes. However, how the nucleocytoplasmic translocation of STATs is regulated is only poorly understood.

In this work I analysed the contribution of the highly conserved N-terminal domain (N-domain) of STAT1 to the interferon-induced nuclear accumulation of the transcription factor. It was found that the N-domain is required for binding to the import receptor importin- α 5. The nuclear accumulation defect of N-terminal mutants can thus be attributed to a nuclear import defect rather than to impaired retention in the nucleus. Our mutagenesis analysis revealed that the STAT1 N-domain does not contain a classical transferable nuclear localisation sequence (NLS). While substitutions of surface residues had no influence on the nuclear accumulation of the transcription factor, mutations affecting the N-domain structure all resulted in identical phenotypes that entail N-terminal degradation, loss of nuclear import and defective tyrosine dephosphorylation. We conclude that mutation of structurally important residues, such as arginine 31, destabilises the N-domain resulting in unspecific functional consequences.

The re-investigation of STAT1 arginine methylation performed in this work contradicts the current model that this post-translational modification modulates the transcriptional activity of STAT1. Mass spectrometric analyses and metabolic labelling of cells followed by fluorography of immunoprecipitated STAT1 both failed to provide evidence for methylation of STAT1. It is demonstrated here that methylthioadenosine, an alleged STAT1 methylation inhibitor, effected multiple phosphorylation and dephosphorylation reactions in an unspecific manner. Moreover, contrary to previous reports, mutation of arginine 31 to alanine does not constitute a valid model of methylated STAT1, since this alteration destroys the N-domain architecture, thus precluding nuclear import and gene induction. Hence, alternative explanations to STAT1 methylation need to be explored in order to understand the molecular mechanisms that underlie the reduced interferon sensitivity of many tumor cells.

Furthermore, during the course of this work the myxobacterial cytotoxin ratjadone A was characterised as a new inhibitor of nuclear protein export. It is demonstrated that ratjadone A employs the same molecular mechanism as the actinobacterial toxin leptomycin B (LMB) to specifically inactivate the export receptor CRM1. Using ratjadone A, it was revealed that the cell type-specific distribution of STATs in resting cells results from a co-operation of both CRM1-mediated export and carrier-free nucleocytoplasmic shuttling.

Zusammenfassung

Die “Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription” (STAT) Proteine sind zentrale Mediatoren der zellulären Antwort auf Zytokine und Wachstumsfaktoren. Durch ihre Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern, verbinden STATs Signale an der Zelloberfläche mit spezifischen Zielgenen. Zu Beginn dieser Arbeit war jedoch wenig über den Mechanismus der Kerntranslokation der STATs bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung der hoch-konservierten N-terminalen Domäne (N-Domäne) von STAT1 an der Interferon-abhängigen Kernakkumulation dieses Transkriptionsfaktors untersucht. Es wurde gefunden, dass die N-Domäne für die Bindung an den Importrezeptor Importin- α 5 benötigt wird. Somit läßt sich der Kernakkumulationsdefekt von N-terminal verkürzten Mutanten auf einen defekten Kernimport zurückführen und nicht auf eine eingeschränkte Retention im Zellkern. Durch eine Mutationsanalyse konnte ausgeschlossen werden, dass die N-Domäne von STAT1 über eine klassische, übertragbare Kernlokalisierungssequenz (NLS) verfügt. Während Substitutionen von Oberflächenresten die Zytokin-induzierte Kernakkumulation des Transkriptionsfaktors nicht beeinträchtigten, zeigten alle untersuchten Eingriffe in die Struktur der N-Domäne die selben Konsequenzen: Abbau des N-Terminus, Verlust der Kernakkumulation sowie eine eingeschränkte Tyrosin-Dephosphorylierung. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Mutationen von Strukturresten wie Arginin 31 die N-Domäne destabilisieren und von unspezifischen funktionellen Konsequenzen begleitet sind.

Die in dieser Arbeit vorgenommene Untersuchung der STAT1-Argininmethylierung widerspricht dem aktuellen Modell, dass diese posttranslationale Modifikation die transkriptionelle Aktivität von STAT1 moduliert. Weder durch massenspektroskopische Analyse noch durch fluorographische Detektion von metabolisch-markiertem und immunpräzipitiertem STAT1 konnte ein Hinweis auf eine Methylierung von STAT1 gewonnen werden. Hier konnte gezeigt werden, dass Methylthioadenosin, welches als Methylierungsinhibitor von STAT1 beschrieben wurde, unspezifisch verschiedene Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen beeinflusst. Darüber hinaus stellt eine Mutation des Argininrestes 31 kein valides genetisches Model für argininmethyliertes STAT1 dar, da diese Veränderung die Architektur der N-Domäne zerstört und damit Kernimport und Genaktivierung verhindert. Dementsprechend müssen alternative mechanistische Erklärungen zur STAT1-Methylierung gefunden werden, um die molekularen Zusammenhänge der verringerten Interferon-Sensitivität vieler Tumorzellen zu verstehen.

5. Summary

Weiterhin wurde im Verlauf dieser Arbeit das aus Myxobakterien isolierte Zytotoxin Ratjadon A als ein neuer Inhibitor des Kernexports charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Ratjadon A den selben molekularen Wirkmechanismus benutzt wie das aktinobakterielle Toxin Leptomycin B (LMB) und spezifisch den Exportrezeptor CRM1 inhibiert. Unter Verwendung von Ratjadon A konnte gezeigt werden, dass die Zelltyp-spezifische Verteilung von STATs in unstimulierten Zellen durch das Zusammenspiel von CRM1-vermitteltem Kernexport und Transporter-unabhängiger nucleocytoplasmatischer Translokation der STAT-Proteine bestimmt wird.