

STAT3 入核的核定位序列研究*

叶中德^{1,2)} 沈倍奋¹⁾** 黎 燕¹⁾

(¹⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; ²⁾北京国家生命科学研究所, 北京 100100)

摘要 STAT3 (signal transducers and activators of transcription) 是胞浆中的潜在转录因子, 在细胞因子、生长因子等外界信号分子的刺激下发生磷酸化和二聚化进入细胞核, 结合在基因特定的启动子上调控转录。目前对 STAT3 的磷酸化和二聚化都相当清楚, 但对其怎样进入细胞核还知之甚少。入核分子一般都有一段碱性氨基酸的核定位序列 (NLS), 但通过比较 STAT 家族没有发现经典的核定位序列 (NLS)。以 IL-6 为外界信号分子, 293T 为细胞模型, 绿色荧光蛋白 GFP 为标签分子, 研究发现 STAT3 分子在 IL-6 刺激前呈胞浆分布, 刺激后聚集胞核中是由于构象的改变暴露了核定位序列。通过同源比较和缺失突变发现, 位于 STAT3 DNA 结合域 403~426 位氨基酸之间的一段富含赖氨酸和精氨酸的碱性氨基酸对 STAT3 入核起重要作用, 具有核定位序列 (NLS) 的功能。

关键词 STAT3, 核定位序列 (NLS), 入核

学科分类号 Q5

STATs (signal transducers and activators of transcription) 是一种转录因子, 在调节发育、分化、增殖和细胞凋亡等生物学功能方面起到重要作用^[1,2]。现已证实 STATs 家族共有 7 个成员: STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6, 大规模基因组测序没能发现新的成员^[3,4]。STAT3 是 STAT 家族的一个重要成员, 能被多种细胞因子、生长因子和致癌蛋白激活, 从而对细胞的生长和存活发挥重要的调控作用^[5]。

当细胞表面的受体激活后, STAT3 蛋白通过自身的 SH2 结构域的相互作用和受体磷酸化位点而被招募到受体结合位点^[2]。随后, STAT3 直接通过受体激酶而被磷酸化, 或间接通过中间激酶而激活, 包括 Janus 激酶 (JAK) 家族。从而介导了 STAT3 的二聚化^[2,5]。二聚化的 STAT3 随后进入细胞核, 结合在基因启动子的特定序列上, 通过与其他转录调控元件的相互作用来调控表达^[2]。但是, 自 STAT 家族发现以来, 对于 STAT 在胞浆中被活化后怎样进入细胞核发挥它的生物学功能的分子机制目前尚不清楚。

一般来说, 分子质量大于 40 ku 的核-胞浆转运蛋白的跨膜被精密地调控, 并且是个需要能量的过程^[6,7]。蛋白质出入细胞核依赖于可溶性穿梭受体的识别, 从而能使蛋白质穿过核孔复合物出入细胞核。入核蛋白一般拥有一个特定核定位序列, 命名为核定位信号 (NLS)。经典的 NLS 包括一段单价的碱性氨基酸或双价的碱性氨基酸^[8]。目前还没有证实 STAT 家族也具有核定位序列 NLS。但有

报道^[8]认为 STAT1 的 DNA 结合域的碱性氨基酸对其进入细胞核起关键作用。同源性比较发现, STAT 家族在 DNA 结合域具有一定的同源性。本研究通过重叠 PCR 对 STAT3 基因的 DNA 结合域具有碱性氨基酸的部分缺失突变, 并借助报告基因绿色荧光蛋白证实该缺失片段对 STAT3 入核起到重要作用, 从而为更精细地研究 STAT 家族的入核机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与细胞

质粒 pBluescript-KS 及 pEGFP-N1 由本室保存。含有全长 STAT3 基因的质粒 PMS1 由耶鲁大学的付新元博士提供。转化菌 DH5 α 由新加坡国立大学李蓬博士提供。NIH3T3 和 293T 细胞由本室保存。

1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶及 T4DNA 连接酶来自 New England Biolab 公司, Pyrobest™ DNA 聚合酶购自 TakaRa 公司, 转染试剂盒购自 Gibco 公司。

1.3 STAT3 的野生及缺失突变体的 PCR 扩增

利用 Gene tool 软件设计 4 条引物如下。引物 1: 5'-CCG CTCGAG (Xho I) ATG GCC CAA TGG AAT CAG CTA CA-3', 引物 2: 5'-AGG GAA GCA

* 国家杰出青年科学基金资助项目 (39925019) 和国家重点基础研究发展规划项目 (973) (001CB510005)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66931325, E-mail: shenbf@mx.cei.gov.cn

收稿日期: 2003-05-19, 接受日期: 2003-06-30

TCG CTG CCG TTG TTG GAT TCT TC-3', 引物 3: 5'-ACA ACG GCA GCG ATG CTT CCC TGA TTG TGA CTG-3', 引物 4: 5'-CCC AAGCTT (*Hind* III) CAT GGG GGA GGT AGC GCA CT-3'. 引物 1 和引物 2 扩增 *STAT3* 基因的 1 ~ 1 209 bp 得产物 A, 引物 2 和 4 扩增 *STAT3* 基因的 1 278 ~ 2 310 bp 得产物 B, 将产物 A 和产物 B 纯化, 利用产物 A 和产物 B 的部分重叠, 加入引物 1 和引物 4 进行 PCR 对 *STAT3* 基因的 1 209 ~ 1 278 bp 之间的碱基缺失.

1.4 *STAT3* 及其缺失突变体的真核表达载体的构建

将纯化后的 PCR 产物经 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切过夜. 经凝胶分离纯化后, 克隆在载体 pBlueScript-Ks 的 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点之间. 经酶切鉴定和上海生物工程公司测序证实正确后, 亚克隆于表达载体 pEGFP-N1 的 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点之间. 分别命名为 *STAT3*-GFP (wild type *STAT3*-pEGFP-N1) 和 *DSTAT3*-GFP (deleted *STAT3*-pEGFP-N1).

1.5 转染及激光共聚焦显微镜观察

分别将 2 μ g 的空载体 pEGFP-N1, *STAT3*-GFP, *DSTAT3*-GFP 和 5 μ l Lipofectamine 2000 分别稀释于 250 μ l 的无双抗和无血清的 DMEM 中, 将 DNA 滴入脂质体中轻轻混匀, 室温静止 20 min. 转染激光共聚焦专用培养皿培养 24 h 的 NIH3T3 和 293T 细胞, 转染 24 h 后经 100 μ g/L IL-6 刺激 20 min 或直接用激光共聚焦显微镜观察.

2 结 果

2.1 *STAT3* 及家族的 DNA 同源性比较

通过 Clustal X (1.81) 对 *STAT* 家族成员的 DNA 结合域进行比较发现, 它们在一些位置上的赖氨酸和精氨酸具有同源性 (图 1). 有研究证明 *STAT1* 的 DNA 结合域对其入核起重要作用^[8], 从而为用生物学手段研究 *STAT3* 入核提供了理论依据.

```

STAT1 400 LAAEFRHLQLKEQ-K-NAGTRTN 420
STAT2 396 LIWDFGYNLTLVEQRSGSGKGS 418
STAT3 404 LSAEFKHLTLREQ-RCGNGGRAN 425
STAT4 395 LSVEFRHLQPKEM-KSSAGGKGN 416
STAT5 412 LSAHFRNMSLKRI-K-RADRRGA 432
STAT6 356 CSALFKNLLKKI-K-RCERKGT 376

```

Fig. 1 Clustal X (1.81) multiple sequence alignment of *STAT* family in DNA binding domain

2.2 对 IL-6 反应敏感的 *STAT3* 入核细胞模型建立
用质粒大提试剂盒提取高纯度的质粒用于转染, 分别将 2 μ g 质粒 pEGFP-N1 和重组质粒 *STAT3*-GFP 转染培养 24 h 的 NIH3T3 和 293T 细胞, 24 h 后经 100 μ g/L IL-6 刺激 20 min 或直接用激光共聚焦显微镜油镜观察. 结果空载体 pEGFP-N1 在两种细胞中均全细胞分布. 在 NIH3T3 细胞中, 重组质粒 *STAT3*-GFP 在 IL-6 刺激前后主要呈胞浆分布. 在 293T 细胞中, 重组质粒 *STAT3*-GFP 在 IL-6 刺激前主要在胞浆分布, 刺激后主要分布于细胞核 (图 2).

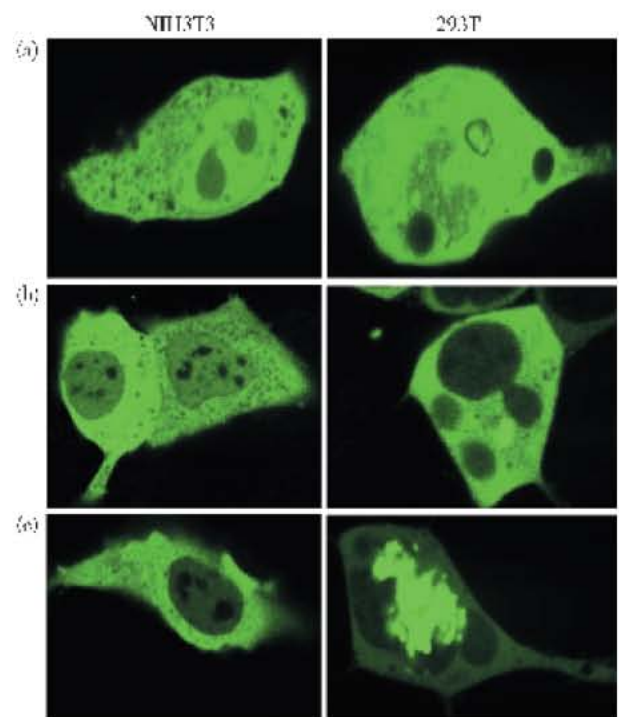


Fig. 2 Cell model establishment for *STAT3* nuclear import study

(a) NIH3T3 and 293T cell transiently transfected with pEGFP-N1 24 h later, imaged with laser confocal microscopy; (b) NIH3T3 and 293T cell transiently transfected with *STAT3*-GFP 24 h later without IL-6 stimulation and imaged with laser confocal microscopy; (c) NIH3T3 and 293T cell transiently transfected with *STAT3*-GFP 24 h later stimulated with 100 μ g/L IL-6 and imaged with laser confocal microscopy.

2.3 DNA 结合域中碱性氨基酸对入核的影响

分别将 *STAT3* 的缺失突变体 *DSTAT3*-GFP 和野生 *STAT3*-GFP 各 2 μ g 转染长满 75% 的 293T 细胞, 24 h 后用 100 μ g/L IL-6 刺激 20 min 或直接用激光共聚焦显微镜观察. 结果发现, 缺失突变体在刺激前后主要分布在胞浆, 不能进入细胞核, 而野生型

STAT3 刺激前主要呈胞浆分布, 刺激后主要呈细胞核分布 (图 3)。

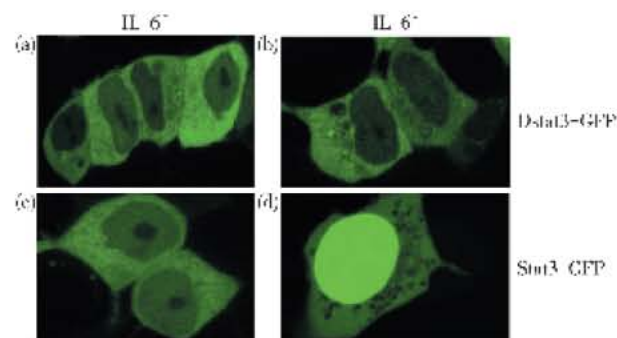


Fig. 3 Localization of STAT3-GFP fusion protein with deleted mutation in the NLS was evaluated by laser confocal microscopy

(a) 403 ~ 426aa deleted STAT3-GFP without IL-6 stimulation; (b) 403 ~ 426aa deleted STAT3-GFP stimulated with 100 $\mu\text{g/L}$ IL-6 20 min; (c) STAT3-GFP without IL-6 stimulation; (d) STAT3-GFP stimulated with 100 $\mu\text{g/L}$ IL-6 20 min.

3 讨 论

转录因子 STAT3 最初是作为急性期反应因子而被发现^[9]。STAT3 能够被 IL-6 等多种细胞因子所激活。它是个大小为 770 个氨基酸的信号分子。STAT3 与其家族蛋白具有相似的结构, 有一个具有形成四聚物的保守氨基端, 一个干扰素 γ 特定激活序列 (GAS) 的 DNA 结合域, 用于受体招募和形成二聚体的 SH2 结构域和 C 端转录激活域^[10]。和其家族蛋白一样, STAT3 在 C 端 705 位酪氨酸磷酸化而被激活。在没有信号分子刺激的情况下, STAT3 分子主要分布在胞浆中。受 IL-6 等细胞因子的刺激后, 数分钟内发生磷酸化而聚集在细胞核内。目前对 STAT 家族的磷酸化和二聚化的分子机制已有充分证据, 但对其家族怎样进入细胞核来发挥其对基因的转录调控从而发挥重要的生物学功能还知之甚少^[11]。本研究通过将 STAT3 分子融合于表达标签绿色荧光蛋白 GFP 的 N 端, 借助激光共聚焦显微镜清楚地观察到 STAT3 表达在细胞中位置 (图 2)。有绿色荧光蛋白的空载体表达后全细胞分布。在没有 IL-6 刺激的情况下, STAT3-GFP 主要呈胞浆分布, 而通过 IL-6 刺激后进入细胞核。这一结果首先说明, 将 STAT3 融合于绿色荧光蛋白 GFP 的 N 端用于研究 STAT3 入核而对其功能没有影响。同时证明 STAT3-GFP 是有功能的分子,

为下面的实验做了一个很好的铺垫。

不同的细胞其表面有不同的受体, 对不同的信号分子的反应各不相同, 本研究首先旨在找到一种对 IL-6 敏感的用于研究 STAT3 入核的细胞模型。我们根据文献 [12] 报道选择 NIH3T3 和 293T 细胞作为我们的细胞模型, 通过转染 STAT3-GFP 24 h 及 100 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-6 刺激 20 min, 发现 NIH3T3 细胞在 IL-6 刺激前后 STAT3-GFP 均主要在胞浆分布, 而转染 293T 细胞, IL-6 刺激前主要呈胞浆分布, 刺激后呈细胞核分布。说明 NIH3T3 细胞的表面没有 IL-6 的可溶受体, 不能对 IL-6 的刺激发生反应从而启动 JAK-STAT 信号通路, 不能用于 STAT3 入核研究的细胞模型。而 293T 则是理想的细胞模型。它不仅在 IL-6 刺激后启动 JAK-STAT 信号通路使 STAT3 进入细胞核, 而且该细胞还有转染效率高的特点, 可用于瞬时转染得到高表达。

蛋白质分子进入细胞核通常拥有一个单价或双价的由碱性氨基酸组成的核定位序列 (NLS)。它可以结合在特定的 NLS 受体 importin- α 上从而进入细胞核^[8]。目前通过基因同源性比较还没有发现 STAT 家族也具有这种特殊的核定位序列 (NLS)。但有证据表明^[13], STAT1 的 DNA 结合域中有一段碱性的氨基酸对其入核起关键作用。通过 Clustal X (1.81) 对 STAT 家族的同源性比较发现 STAT3 的 DNA 结合域也具有一段这样的序列。对该段有碱性氨基酸的 403 ~ 426 氨基酸部位进行缺失后发现, STAT3 在 IL-6 的刺激后不能进入细胞核, 主要在胞浆中表达。说明该段碱性氨基酸对 STAT3 入核有重要作用, 即有核定位序列 (NLS) 的功能。在 IL-6 等细胞因子的刺激下野生型 STAT3 分子的构象发生变化, 该段碱性氨基酸暴露出来使 STAT3 分子获得了核定位信号从而进入细胞核, 这为更精细地研究 STAT3 入核机制打下了基础。但对是否有其他的伴侣分子协助 STAT3 分子入核还知之甚少, 有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Shindler C, Damell J E Jr. Transcriptional response to polypeptide ligands: the Jak-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64** (1): 621 ~ 651
- 2 Damell J E Jr. STATs and gene regulation. *Science*, 1997, **277** (5332): 1630 ~ 1635
- 3 Horvath C M. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25** (8): 496 ~ 502
- 4 Ihle J N. The STAT family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13** (2): 211 ~ 217

- 5 Bowman T, Garcia R, Turkson J, *et al.* STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 2000, **19** (21): 2474 ~ 2488
- 6 Davis L I. The nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64** (1): 865 ~ 896
- 7 Nigg E A. Nucleocytoplasmic transport: signal, mechanisms and regulation. *Nature*, 1997, **386** (6627): 779 ~ 787
- 8 Fagerlund R, Melen K, Kinnunen L, *et al.* Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin α . *J Biol Chem*, 2002, **277** (33), 30072 ~ 30078
- 9 Akira S, Nishio Y, Inoue M, *et al.* Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 1994, **77** (1): 63 ~ 71
- 10 Levy D E, Lee C K. What does STAT3 do?. *The Journal Clinical Investigation*, 2002, **109** (9): 1143 ~ 1148
- 11 O'Shea J J, Gadina M, Scheiber R D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/STAT pathway. *Cell*, 2002, **109** (Review supplement): s121 ~ s131
- 12 Collum R G. A STAT3-interacting protein (StIp1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97** (18): 10120 ~ 10125
- 13 McBride K M, McDonald C, Reich N C. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J*, 2000, **19** (22): 6196 ~ 6206

Basic Amino Acid Enriching Element in DNA Binding Domain Has Critical Role in STAT3 Nuclear Import *

YE Zhong-De^{1,2)}, SHEN Bei-Fen¹⁾ **, LI Yan¹⁾

⁽¹⁾ *Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;*

⁽²⁾ *National Institute of Biological Science, Beijing 100100, China)*

Abstract Latent signal transducers and activators of transcription (STATs) reside in the nucleus following cytokine stimulation and regulate gene expression upon activation of cytokine or growth factor receptors. While this translocation event is essential for gene regulation by STATs, their mechanism of transport through the cytoplasm to the nucleus has remained elusive. Nuclear shuttling molecules often own a mono or bipartite basic amino acid stretch, but STAT family do not own the classic nuclear localization sequence (NLS). Now, it is reported that STAT3 accumulate nucleus after IL-6 stimulation 20 min. With IL-6 stimulation, STAT3 molecule conformation changed and the NLS in DNA binding domain exposure to make it gain nuclear targeting function. Deleted a stretch (403 ~ 426aa) of basic amino acid in STAT3 DNA binding domain which destroys the nuclear importing function even with cytokine stimulation. It indicated that this stretch of basic amino acid has critical role for STAT3 nuclear import, which has nuclear localization sequence (NLS) function.

Key words STAT3, nuclear localization sequence (NLS), nuclear import

* This work was supported by the Youth Fund of National Science Foundation of China (39925019) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (001CB510005).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931325, E-mail: shenbf@mx.cei.gov.cn

Received: May 19, 2003 Accepted: June 30, 2003