

磷酸化和乙酰化修饰对 STAT3 功能的调节

谢宏霞 曾凤辉¹ 刘 鸿 蒋 海 王毅刚*

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

¹浙江理工大学生命科学学院生物化学研究所, 杭州 310018)

摘要 STAT3 是细胞因子和生长因子受体的胞质转录因子。当细胞因子与 JAK 相连受体结合时, JAK 通过自身磷酸化而被激活, 激活后的 JAK 可磷酸化一个或多个受体位点并呈递给 STAT3 而与之结合。随后 STAT3 发生 Tyr705 和 Ser727 位点的磷酸化并从受体上解离, 而后转移至细胞核中调控基因表达。近来有研究表明 STAT3 的 Lys685 可发生乙酰化修饰, 并且它对 STAT3 二聚体的稳定形成非常重要。为了进一步研究 STAT3 的乙酰化与磷酸化修饰之间的关系以及对 STAT3 活性调节的影响, 本文应用 Western 印迹和荧光素酶报告基因检测等方法发现 CBP 可以增强 STAT3 Ser727 的磷酸化, 增强 STAT3 的转录活性。此外, STAT3 Tyr705 去磷酸化能减弱 STAT3 的乙酰化水平, 而且 Tyr705 的磷酸化修饰对 STAT3 的转录活性影响很大。上述结果对于如何靶向持续激活的 STAT3 用于肿瘤治疗提供了依据。

关键词 磷酸化; 乙酰化; STAT3; 转录活性

JAK-STAT 通路由细胞因子受体激活, 这些受体本身不具有明显的激酶活性, 但当细胞因子结合使得受体发生二聚化时, 即提供了结合并激活 JAK 激酶的信号。随后 JAK 磷酸化 STATs, 使后者发生同源或异源二聚化, 并移至细胞核内, 结合到靶基因专一性识别元件上, 从而激活靶基因转录^[1-4]。JAK-STAT 通路参与细胞的分化、增殖、凋亡和免疫应答等多种过程^[3]。目前被鉴定的 STATs 共有七种, 包括 STAT1~STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6^[3]。在人类多种癌症以及转化的细胞系中, STATs 呈持续激活状态, 尤其是 STAT3, 活化的 STAT3 是多种肿瘤或细胞发生癌症转化和抗凋亡所必需的^[5]。

STAT3 接受信号时 Tyr705 位点被 JAK 激酶磷酸化, 之后两者相互结合形成活化状态的二聚体^[6], 而 STAT3 的 Ser727 位点是经 JNK 磷酸化^[7], 两个磷酸化均在细胞因子和生长因子的刺激下发生^[6]。然而 Ser727 磷酸化修饰的功能并不是很明确, 先前报道 Ser727 磷酸化可使 STAT3 的转录功能活性达到最大^[8], 最近又发现 MAPKs 可以负调控 STAT3 的信号传递, 并同时引起 Ser727 的磷酸化^[9], 这使得 Ser 磷酸化的功能变得复杂。此外另有证据表明线粒体中 STAT3 作用于 Ras 引起的致癌性转化依赖于 Ser727 而不是 Tyr705 的磷酸化^[10]。这些更加说明 Ser727 和 Tyr705 磷酸化功能之间的关系很复杂。

近年来研究发现乙酰化修饰参与很多转录因子

以及酶的活性调节。例如乙酰化可以调节 p53 与 DNA 的结合活性、结合稳定性以及与其它因子的相互作用^[11,12]。CBP (cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein) 介导的 Lys 乙酰化可以和 Ser 磷酸化一起调节 IFN α 引发的信号转导通路^[13]。乙酰化还可以调控尿素循环中氨甲酰磷酸合成酶 (carbamoyl phosphate synthetase 1, CPS1) 的活性, 调节尿素循环^[14]。Yuan 等^[15]报道了在细胞因子刺激下, STAT3 单个氨基酸残基 Lys685 会被组蛋白乙酰基转移酶 p300 或者 CBP 乙酰化修饰, 并且这些修饰对 STAT3 形成稳定的二聚体从而激活转录是必需的。STAT3K685R 突变体的 Tyr 和 Ser 仍然能够发生磷酸化, 而且能转运到细胞核中, 但它形成二聚体和结合 DNA 的能力减弱。晶体结构分析揭示了 STAT (STAT1 和 STAT3)、核因子 NF- κ B (Rel) 和 p53 以相似的拓扑结构与 DNA 结合^[1]。提示 p53 可能是通过 C 端乙酰化来改变其构象从而调节与 DNA 结合活性的。类似的, 对 RelA 来说, 二聚体结构域的 Lys 乙酰化增强了它与 DNA 的结合活性。研究的结果表明 STAT3 乙酰化提高转录活性的机制可能与 NF- κ B,

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-01-11

国家自然科学基金资助项目(No.30800093)、浙江省自然科学基金资助项目(No.Y2090935)和浙江省“生物医学工程”重中之重学科开放基金(No.SWYX0815)资助

* 通讯作者。Tel: 0571-86843186, Fax: 0571-86843555, E-mail: wangyigang43@163.com

p53 的乙酰化相类似^[1]。另外有研究表明在 IFN α 的刺激下 STAT1 也会发生乙酰化, 但它是使 STAT1 去磷酸化从而失去转录活性的一个计时器, 对 STAT1 的转录是起负调控作用的^[15]。

然而, 乙酰化对 STAT3 的转录活性影响并没有被详细地研究过, 它和 STAT3 Tyr 以及 Ser 磷酸化之间的关系也没有得到仔细的阐述。为了更好地探讨翻译后修饰之间的相互关系以及对 STAT3 功能的影响, 我们运用 Western 印迹以及荧光素酶报告基因等方法检测发现 CBP 可以增强 STAT3 Ser727 的磷酸化以及 STAT3 的转录活性, 另外 Tyr705 的磷酸化对 STAT3 的转录活性影响是最大的, 而且 Tyr705 的磷酸化消失会使得 STAT3 乙酰化水平降低。STAT3 的乙酰化和磷酸化作用之间是相互调节的, 最终目的是调节 STAT3 的转录活性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

人胚肾 293T 细胞株和 pRL-SV40 质粒由中科院上海生命科学研究院提供。质粒 pcDNA3.1-HA-hSTAT3、pcDNA3.1-HA-hSTAT3E652K、pcDNA3.1-6cMyc-mSTAT3、pcDNA3.1-6cMyc-mSTAT3Y705F、pcDNA3.1-6cMyc-mSTAT3S727A、pcDNA3.1-6cMyc-mSTAT3K685R、pcDNA3.1-HA-CBP、p2xSIE-luciferase 由美国布朗大学秦樾教授馈赠, pcDNA3.1 empty vector (EV) 由本实验室提供。抗体 cMyc 兔多抗(SC-789)、cMyc 鼠单抗(SC-40)、Phospho-STAT3 (pY705)鼠单抗(SC-8059)购自 Santa Cruz 公司, Phospho-STAT3(pS727)兔单抗购自 Epitomics 公司, Acetylated Lysine 兔多抗(9441#)购自 Cell Signaling 公司。二抗 IRDy680 标记的羊抗兔抗体, IRDy800 标记的羊抗鼠抗体购自 LI-COR 公司, Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, DMEM 培养液、Opti-MEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司, PCR 高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司, *DpnI* 购自 NEB 公司, IFN α 由本实验室提供。发光检测仪购自 Promega 公司, 红外激光扫描成像系统购自 LI-COR 公司。Western 印迹湿转膜仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建及定点突变 设计突变引物上下游两条, 其中引物包含突变位点, hSTAT3K685R 上

游引物: 5'-GCATTCGGAAGGTATTGTCCGCCAGAGAGC3', 下游引物: 5'-GCTCTCTGGCCGACAATACCTTCCGAATGC-3'; hSTAT3Y705F 上游引物: 5'-GCGCTGCCCATTCCTGAAGACCAAGTTTATC-3', 下游引物: 5'-GATAAACTTGGTCTTCAGGAATGGG-GCAGCGC-3'; hSTAT3S727A 上游引物: 5'-CCTGCCGATGGCCCCCGCACTTTAGATTCA-3', 下游引物: 5'-TGAATCTAAAGTGCGGGGGGCCATCGGCAGG-3', 以带相应目的基因的质粒为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经 *DpnI* 消解质粒模板后转化到 DH5 α 感受态中, 15 h 挑取克隆并用双酶切和测序鉴定, 保存突变成功的质粒。

1.2.2 细胞培养及转染 将 293T 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中(内含 1 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素和 100 g/L 链霉素), 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下培养, 每 2 天传代一次。

转染前一天, 使用无抗生素培养液接种 293T 细胞于六孔板中(5 \times 10⁵ 个/孔), 第二天细胞长至 90%~95% 时开始转染。具体步骤见 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书。

1.2.3 免疫沉淀 在收集好的细胞中加入 500 μ l 裂解液(1% TritonX-100 溶于 PBS, 加入 20 μ g/ml Aprotinin、20 μ g/ml Leupeptin、10 mol/L NaF、10 mol/L Na₃VO₄、1 mol/L PMSF), 4 °C 旋转 1 h 使其充分裂解, 20 000 g 离心 20 min, 取上清液, 加入一抗(2 μ g/ml), 4 °C 混合过夜, 再加 20 μ l Protein A/G 混合 4~6 h。之后用裂解液洗涤 beads 1 次, 再用 PBS 洗涤 beads 3 次。最后加 20 μ l 2 \times SDS 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min 后离心, 吸出液体后进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 Western 印迹 取 50 μ g 蛋白样品, 加入 5 \times SDS 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min 后在 10% SDS-PAGE 胶中分离, 并转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 牛奶室温封闭 2 h 之后, 加一抗(1:1 000, 5% BSA 稀释) 37 °C 温育 2 h, 然后用 IRDy680 标记的羊抗兔抗体或 IRDy800 标记的羊抗鼠抗体作为二抗(1:15 000, 5% BSA 稀释) 37 °C 温育 1 h, 检测荧光。

1.2.5 荧光素酶报告基因检测 将 293T 细胞接种于 24 孔板中, 第二天转染 p2xSIE-luciferase、pRL-SV40 和实验组质粒, 方法同 1.2.2。转染之后 24 h 加药物处理细胞 6 h, 再加 PLB 裂解液裂解细胞, 用荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶值和内参海肾荧光素酶值, 取两者的比值作统计, 比较差异。

2 结果

2.1 定点突变体的构建及鉴定

STAT3 分为 N 端、卷曲螺旋区、DNA 结合结构域、SH2 结构域以及转录激活结构域(图 1A)。研究表明在细胞因子处理下, 活化的 STAT3 Tyr705 和 Ser727 位点会发生磷酸化, Lys685 位点会发生乙酰化, 三个位点的修饰对它自身的转录激活有重要的意义^[1,6]。为了进一步弄清这些修饰之间的相互关系以及对 STAT3 转录活性影响的差别, 我们构建了一系列突变体: HA-hSTAT3K685R、HA-hSTAT3Y705F、HA-hSTAT3S727A、HA-hSTAT3K685RY705F、HA-hSTAT3K685RS727A、HA-hSTAT3Y705FS727A、HA-hSTAT3K685RY705FS727A, 经测序鉴定完全正确。

为了对 6cMyc-STAT3Y705F 和 6cMyc-STAT3S727A 突变体做进一步的验证, 我们将 CBP 和 STAT3 野生型(wild type, WT)或者 STAT3 突变体共转染, 48 h 后加 IFN α (1 000 U/ml)处理 15 min, 再收

集细胞裂解, 然后对其进行 Western 印迹验证。可以看到 STAT3Y705F 用 Tyr705 磷酸化抗体检测时无条带(图 1B)。同样 STAT3S727A 在 Ser727 磷酸化抗体的作用下也检测不到条带(图 1C)。说明突变体是不会发生相应突变位点的磷酸化的, 进一步表明突变成功。此外, 野生型 STAT3 加上 CBP 的实验组与对照组相比, 不论内源还是过表达的外源 Ser727 的磷酸化水平都升高(图 1C)。

2.2 不同位点突变对 STAT3 整体乙酰化的影响

293T 细胞转染 STAT3 和 CBP 48 h 后, 加 IFN α (1 000 U/ml)处理 15 min, 然后裂解细胞, 加 anti-cMyc 抗体做免疫沉淀实验, 再用 Acetylated Lysine 抗体检测 STAT3 的乙酰化水平。我们发现转染了 CBP 的实验组(CBP+ 野生型 STAT3)相对于没有转染 CBP 的对照组(野生型 STAT3), STAT3 的乙酰化水平明显增强。另外在过表达 CBP 的情况下, 突变体 Y705F 的乙酰化水平相对于野生型 STAT3 明显减弱(图 2)。在 CBP 存在时, 突变体 K685R 的乙酰化程度与野生

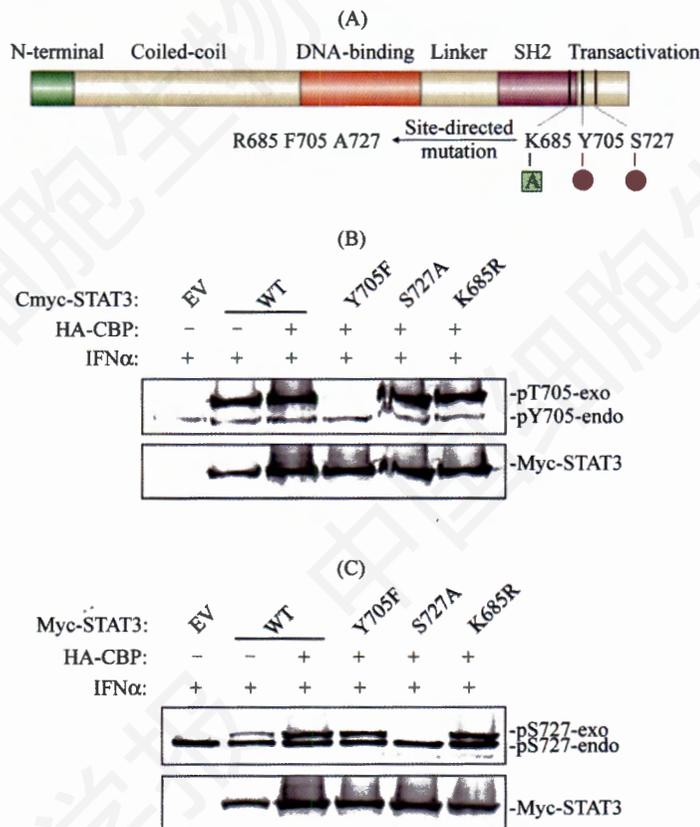


Fig.1 The construction and identification of mutated STAT3

A: domains and the modified sites of STAT3; B: analysis of the successful construction of STAT3Y705F mutant; C: analysis of the successful construction of STAT3S727A mutant.

型 STAT3 相比明显下降, 不过乙酰化并没有完全消失(图 2)。

2.3 CBP 乙酰化调节对 STAT3 转录功能的影响

基于有转录活性的 STAT3 可以使带 SIE 启动子的 p2xSIE-luciferase 质粒荧光素酶表达增强, 我们用 p2xSIE-luciferase 质粒做了荧光素酶报告基因检测实验来进一步研究在 CBP 的作用下 STAT3 突变体的转录活性的变化。我们转染 p2xSIE-Luc、pRL-Sv40、STAT3 以及 CBP 到 293T 细胞中, 转染 30 h 之后裂解细胞, 做荧光素酶报告基因检测实验并分析得到图 3。从图 3 中看到加了 CBP 的实验组荧光素酶表达值较对照组有明显增高, 这说明 CBP 可以增强 STAT3 野生型和突变体的转录活性。而且不论是否共转染

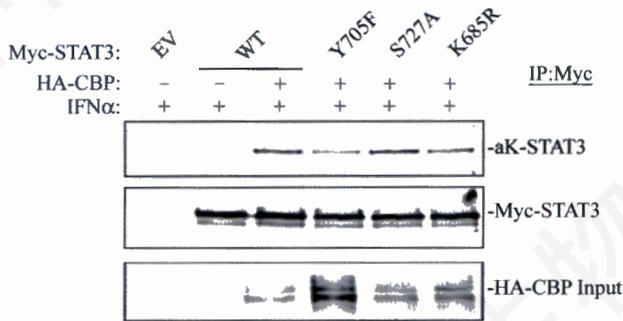


Fig.2 Analysis of the acetylation level of STAT3 mutants by Western blotting

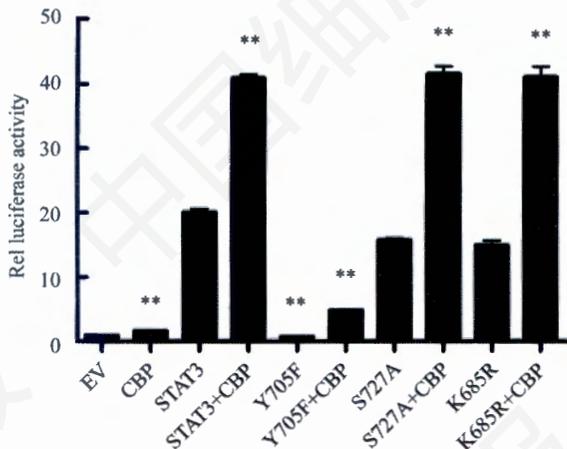


Fig.3 STAT3 transcriptional activity was estimated in 293T cells transfected with or without CBP

The transcriptional activity of STAT3 have significant enhancement (** $P < 0.01$) when co-transfected with CBP compared with have no transfected with CBP. On the other hand, the transcriptional activity of Y705F have significant decrease (** $P < 0.01$) compared with STAT3WT, whether CBP is present or not.

CBP, Y705F 突变体较野生型 STAT3 的荧光素酶表达值都显著降低。而不论 CBP 存在与否, S727A 和 K685R 突变体的荧光素酶表达值相对于野生型 STAT3 来说变化都不是很明显。

2.4 不同突变位点对 IFN α 诱导 STAT3 活性的影响

在细胞因子的处理下, STAT3 会发生磷酸化和乙酰化的修饰, 形成二聚体, 并转移到细胞核中, 促进目的基因的转录^[2,16]。为了研究不同突变位点在 IFN α 诱导下对 STAT3 转录活性的影响, 我们做了荧光素酶报告基因检测实验, 在 293T 细胞中转染 p2xSIE-Luc、pRL-Sv40 和 STAT3, 转染 30 h 之后收集细胞并裂解, 做荧光素酶报告基因检测并分析得到图 4A。图 4B 是在转染质粒 24 h 后, 加入 IFN α (1 000 U/ml) 处理 6 h, 再裂解细胞检测得到。如图 4A 所示, 在 IFN α 处理之前各突变体荧光素酶表达值差异不是很大。但在 IFN α 处理之后, 差异明显增大(图 4B)。在干扰素的诱导下, STAT3 的单突变体 Y705F、双突变体 K685RY705F 和 Y705FS727A、三突变体 K685RY705FS727A 的荧光素酶表达值和野生型相比都明显下降, 说明它们的转录活性降低, 但是这四个突变体之间的转录活性并没明显差异。此外 STAT3 的单突变体 K685R、S727A、双突变体 K685RS727A 的转录活性与野生型相比下降不是很明显。

3 讨论

为了研究 STAT3 磷酸化与乙酰化之间的关系, 我们构建了一系列的突变体, 并用 Western 印迹检测了突变体的磷酸化和乙酰化水平。发现在 CBP 存在的情况下, Ser727 的磷酸化水平会升高, 这表明 CBP 可以直接或间接正向调节 Ser727 的磷酸化。因为 CBP 是 STAT3 的乙酰化酶^[1], 推测这可能和 STAT3 的乙酰化有关, 即乙酰化对 Ser727 磷酸化的发生是起促进作用的, 一定程度上与 CBP 增强 STAT3 的转录活性是一致的。我们通过 IP 实验检测到共转染了 CBP 的 STAT3 乙酰化水平和未转染 CBP 的相比有显著增强, 这进一步证实了 CBP 是 STAT3 的乙酰基转移酶。另外相对于野生型 STAT3, 突变体 Y705F 的乙酰化水平有明显减弱(图 2), 这说明 Tyr705 的磷酸化对 STAT3 乙酰化的发生具有促进作用。因为 CBP 会和位于 STAT3 C 端的转录激活结构域结合^[17-20], 而 Tyr705 就位于该结构域中, 故推测这可能是由于 Tyr705 的磷酸化对自身与 CBP 的结合是起促进作用

的, 磷酸化的消失降低了 STAT3 与 CBP 的结合能力, 从而使得乙酰化程度减弱。图 2 还证实了 Lys685 是 STAT3 的乙酰化位点, 因为 K685R 突变体的乙酰化程度明显下降。但是 Lys685 不是它唯一的乙酰化位点, 因为该突变体的乙酰化没有完全消失。这和后来发现的 STAT3 的 Lys679、Lys707、Lys709 位点也会发生乙酰化修饰是一致的^[21]。

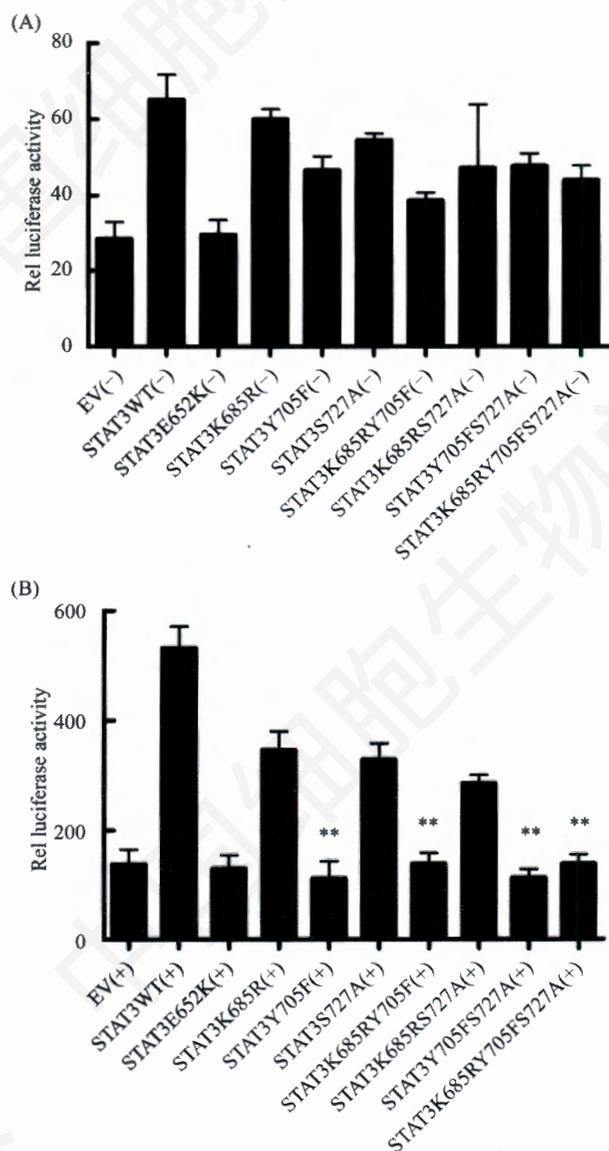


Fig.4 The transcriptional activation difference among STAT3 mutants when treated with or without IFN α

A: the transcriptional activation difference among STAT3 mutants when treated without IFN α ; B: the transcriptional activation difference among STAT3 mutants when treated with IFN α . The transcriptional activity of Y705F, K685RY705F, Y705FS727A, K685RY705FS727A have significant decrease (** $P < 0.01$) compared with STAT3WT.

随后为了研究 STAT3 的乙酰化和磷酸化对自身转录活性的影响, 我们用 STAT3 突变体和 CBP 做了荧光素酶报告基因检测实验。结果表明 CBP 可以增强 STAT3 的转录活性(图 3), 而之前通过 Western 印迹实验已证明 CBP 是 STAT3 的乙酰化酶, 这表明 STAT3 的乙酰化修饰对自身的转录活性是起促进作用的。此外还发现 Tyr705 的磷酸化对 STAT3 转录活性是非常重要的, 磷酸化消失后转录活性明显降低。但 Ser727 的磷酸化和 Lys685 的乙酰化对 STAT3 的转录活性影响较小。之前有研究表明 MAPKs 可以引起 Ser727 的磷酸化却同时负调控 STAT3 的信号传递^[9], 这说明 Ser727 的磷酸化可能不是绝对正调控 STAT3 转录活性的。与此一致的是在 IFN α 处理下, STAT3 的单突变体 K685R、S727A 和双突变体 K685RS727A 的转录活性与野生型相比下降不是很明显, 说明 Ser727 的磷酸化和 Lys685 的乙酰化对转录活性影响并不大。这表明 STAT3 的转录活性主要还是受到 Tyr705 磷酸化的影响。而 Lys685 并不是 STAT3 唯一的乙酰化位点^[21], 另有研究表明 STAT3 的乙酰化位点 Lys679、Lys685、Lys707、Lys709 同时突变时, STAT3 的转录活性是明显受到抑制的, 但是当这四个位点突变之后, 不仅乙酰化消失, Tyr705 的磷酸化也同时消失^[21]。所以说乙酰化对 STAT3 的 Tyr705 和 Ser727 的磷酸化起到正调节的作用, 从而增强 STAT3 的转录活性。

参考文献(References)

- 1 Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 2005; 307(5707): 269-73.
- 2 Reich NC. STAT dynamics. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18(5-6): 511-8.
- 3 O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002; 109 Suppl: S121-31.
- 4 Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007; 282(28): 20059-63.
- 5 Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109(9): 1139-42.
- 6 Schroder M, Kroeger KM, Volk HD, Eidne KA, Grutz G. Preassociation of nonactivated STAT3 molecules demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer: a new model of STAT activation? *J Leukoc Biol* 2004; 75(5): 792-7.
- 7 Zhang Y, Liu G, Dong Z. MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J Biol Chem* 2001; 276(45): 42534-42.

- 8 Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995; 82(2): 241-50.
- 9 Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000; 19(21): 2628-37.
- 10 Gough DJ, Corlett A, Schlessinger K, Wegrzyn J, Larner AC, Levy DE. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 2009; 324(5935): 1713-6.
- 11 Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(2): 164-71.
- 12 Brooks CL, Gu W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 2006; 21(3): 307-15.
- 13 Tang X, Gao JS, Guan YJ, McLane KE, Yuan ZL, Ramratnam B, *et al.* Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell* 2007; 131(1): 93-105.
- 14 Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. SIRT5 deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 2009; 137(3): 560-70.
- 15 Kramer OH, Knauer SK, Greiner G, Jandt E, Reichardt S, Guhrs KH, *et al.* A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* 2009; 23(2): 223-35.
- 16 Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003; 101(8): 2940-54.
- 17 Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, *et al.* Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature* 1996; 383(6598): 344-7.
- 18 Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE Jr. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(26): 15092-6.
- 19 Paulson M, Pisharody S, Pan L, Guadagno S, Mui AL, Levy DE. Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. *J Biol Chem* 1999; 274(36): 25343-9.
- 20 Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, *et al.* Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 1998; 279(5351): 703-7.
- 21 Nie Y, Erion DM, Yuan Z, Dietrich M, Shulman GI, Horvath TL, *et al.* STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. *Nat Cell Biol* 2009; 11(4): 492-500.

Functional Regulation of STAT3 by Phosphorylation and Acetylation Modifications

Hong-Xia Xie, Feng-Hui Zeng¹, Hong Liu, Hai Jiang, Yi-Gang Wang*

(Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

¹Institute of Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract STAT3 is a cytoplasmic transcriptional factor of cytokine and growth factor receptor. When cytokine binds Janus kinases (JAKs)-associated receptor, JAKs are activated by itself phosphorylation. Activated JAK can phosphorylate one or more receptor chains to generate docking sites for binding STAT3, and then STAT3 is phosphorylated on Tyr705 and Ser727 sites. Phosphorylated STAT3 dissociate from the receptor and form dimers, then translocate into the nucleus to regulate the gene expression. Recent studies indicated that Lys685 site of STAT3 can be modified by acetylation, which contributed to the formation of stable STAT3 dimers. In this study, to better understand the relationship between acetylation and phosphorylation modification of STAT3 and the important effect for regulation of STAT3 activity, we used Western blot and luciferase reporter assay etc to find that CBP can enhance the phosphorylation of Ser727 site and promote the transcriptional activation of STAT3. Moreover, the dephosphorylation of Tyr705 site weakens to the level of STAT3 acetylation. The phosphorylation of Tyr705 site has a great influence on STAT3 transcriptional activation. The results provide a basis for cancer therapy through how to target the sustained activated STAT3.

Key words phosphorylation; acetylation; STAT3; transcriptional activation

Received: November 9, 2009 Accepted: January 11, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30800093), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090935) and the Zhejiang Provincial "Biomedical Engineering" for the Most Important Subject Open Fund Project (No.SWYX0815)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843186, Fax: 86-571-86843555, E-mail: wangi-gang43@163.com