

PATOGENEZE TRANSDUKČNÍCH DRAH INTERFERONOVÝCH SIGNÁLŮ A JEJICH VYZNAM PRO PREDIKCI CITLIVOSTI NÁDORU NA IMUNOTERAPII

PATHOGENESIS OF THE TRANSDUCTION PATHWAYS OF INTERFERONE SIGNALS AND THEIR SIGNIFICANCE FOR THE PREDICTION OF TUMOR SENSITIVITY TO IMMUNOTHERAPY.

BOUDNÝ V.¹, KOCÁK I.², KOVAŘÍK J.¹

¹ ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

² ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE II, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Nové poznatky o molekulární podstatě signálních drah, které zprostředkovávají biologické efekty různých externích stimulů a kontrolují řadu normálních fyziologických procesů buňky (jako například buněčný růst, diferenciaci, apoptózu a stárnutí buněk) odhalily tři hlavní skupiny proteinů, které hrají klíčovou úlohu v přenosu externích signálů z povrchu membrány k cílovým genům v buněčném jádře. Tyto bílkoviny zahrnují Janus tyrozinkinázy (JAK), signální transduktory a aktivátory transkripce (STAT) a jejich endogenní inhibitory - rodinu SOCS (supresory cytokinových signálů). Ukazuje se, že molekulární i funkční alterace těchto proteinů se podílejí na patogenezi řady lidských chorob včetně některých imunopatií a neoplazií. Existují důkazy, že perturbace v proteinech STAT jsou zahrnuty v patogenezi některých lidských malignit. Navíc defektní JAK/STAT/SOCS signální dráhy mohou negativně ovlivnit odpověď nádoru na imunoterapii cytokiny. Tato práce poskytuje přehled současných znalostí o intracelulárních signálních drahách JAK/STAT/SOCS se speciálním důrazem na jejich abnormality u nádorových onemocnění.

Klíčová slova: STAT 1, SOCS 3, interferony (IFN), maligní melanom, signální transdukcce

Summary: Recent highlights in gradual understanding the molecular nature of signaling pathways that mediate biological effects of various external stimuli and control a number of normal physiological processes of cells (such as cellular growth, differentiation, senescence and apoptosis) defined three major groups of proteins which apparently play an essential role in transmitting external signals from surface membrane to target genes in the nucleus. These include Janus kinases (JAKs), signal transducers and activators of transcription (STATs) and their endogenous inhibitors of SOCS family. Their inappropriate functioning and defective cross-talking associate with several human disorders including cancer. There is an increasing evidence that perturbances in STAT proteins are involved in the pathogenesis of some human malignancies. Moreover, cancer-related defective JAK/STAT/SOCS pathways may negatively affect tumor response to the cytokine-based immunotherapy. This article provides an overview of the current knowledge about JAK/STAT/SOCS intracellular signaling cascades with special emphasis on their abnormalities in cancer.

Key words: STAT 1, SOCS 3, interferons (IFNs), malignant melanoma, signal transduction

Statistické analýzy incidence a mortality onkologických onemocnění v období posledních dvou dekad prokazují, byť s kontinentálními, regionálními specifiky a odlišnostmi pro jednotlivé diagnózy, kontinuální nárůst incidence a nepřilíš přesvědčivé ovlivnění mortality na zhoubné novotvary. Ukazuje se, že stávající léčebné přístupy vyčerpaly své možnosti a že je nutné hledat nové, nestandardní terapeutické modalit s větší léčebnou efektivitou. Jedním z perspektivních přístupů je biologická léčba nádorů. Z řady přístupů, jejichž příkladem jsou inhibitory neoangiogeneze, induktory apoptózy, antigen specifické vakcíny a genové reparační biotechnologie, se zatím do širšího klinického využívání dostaly cytokiny ze skupiny interleukinů a zejména pak interferony (IFN).

1. Cytokiny a jejich význam

Poznávání regulačních mechanismů imunologických procesů ukazuje, že to jsou právě cytokiny, které představují klíčové molekuly zajišťující homeostázu imunitního systému. Tyto polypeptidy s autokrinními i parakrinními účinky se aktivně podílejí na všech rozhodujících fázích imunitní reakce. Ovlivňují buněčnou proliferaci a diferenciaci, mohou být fyziologicky aktivovány, ale mohou současně reprimovat aktivující signály. V souvislosti s protinádorovou imunoterapií je mož-

no spekulovat, že nízký stupeň léčebné odpovědi může alespoň částečně souviset s funkční alterací cytokinů, která provází nádorovou evoluci a progresi. Může se jednat o defektní syntézu cytokinů, sníženou expresi příslušných receptorů, změnou proporcionalitu cytokinů s převahou působků s imunosupresivními účinky a konečně i o sníženou aktivitu specifických transdukčních a transkripčních faktorů rodiny JAK/STAT. Některé z těchto abnormalit mohou tedy být příčinou patologického imunitního stavu onkologicky nemocných.

2. Interferony v klinické praxi

Účinnost interferonů v léčbě malignit je vysvětlována jejich schopností zvýšit relativně nízkou protinádorovou imunitu jak na úrovni efektorových buněk, tak i na úrovni imunogenitů buněk nádorových. V řadě experimentálních prací nedávné doby bylo prokázáno, že na protinádorovém účinku interferonů se významně podílí jejich antiproliferativní a tumoricidní aktivita, indukce zvýšené exprese adhezivních proteinů a antigenů MHC I. třídy, schopnost inhibovat nádorem indukovanou neoangiogenezu a schopnost indukovat apoptózu (1-5). Nepřekvapuje tedy, že do interferonů se vkládaly naděje na zlepšení léčebných výsledků některých onkologických diag-

nóz. Dnes, po více než 10-ti letech klinických zkušenostech s podáváním interferonů je zřejmé, že tato skupina cytokinů nesplnila optimistická očekávání. Jejich terapeutická účinnost je s určitými limitacemi klinicky využívána v léčbě leukémie z vlasatých buněk, kožního T-buněčného lymfomu, mnohočetného myelomu a chronické myeloblastická leukémie. U většiny solidních nádorů však terapeutický efekt prokázán nebyl. Výjimkou je karcinom z renálních buněk a maligní melanom. Výsledky četných studií efektivity interferonů u těchto diagnóz však udávají léčebnou odpověď pouze u 15-20% případů bez ohledu na typ interferonu, dávkovací režim a způsob aplikace (6). Navíc zcela chybějí údaje o tom do jaké míry kliniky úspěšná léčba interferonem ovlivňuje celkovou dobu přežití. Do nedávné doby byla nízká efektivita interferonů v léčbě solidních nádorů vysvětlována funkčními poruchami imunitního systému a produkcí imunosupresivních faktorů samotnou nádorovou populací.

3. Proteiny JAK/STAT

Postupné poznávání intracelulárních molekulárních mechanismů, které se podílejí na realizaci biologických účinků interferonů, nabízí možnost studovat předpokládané poruchy v interferonových signálních drahách nádorové buňky. Je pravděpodobné, že patologické alterace v přenosech interferonových signálů v ose receptor-cytoplazma-jádro-DNA výrazně ovlivňují účinky interferonů na nádorovou buňku a v konečných důsledcích pak odpověď nádoru na léčbu interferony. V této souvislosti je pozornost zaměřena především na rodinu tyrozinkináz, označovanou jako Janus kinázy (JAK) a na signální transduktory a aktivátory transkripce, tj. multigenovou rodinu proteinů STAT, která zahrnuje 7 členů (STAT 1-4, STAT 5a, 5b, STAT 6). Jedná se o faktory, které aktivně propagují signály různých cytokinů, včetně interferonů, z buněčné membrány do jádra. Zájem o výzkum defektů STAT proteinů v souvislosti s nádorovým procesem vyvolaly nedávné práce, v nichž je u řady lidských nádorů popisována porucha v aktivaci těchto proteinů a jejich dysfunkce je dávána do souvislosti s patogenezí lidských malignit (7, 8).

4. Interferonové receptory a JAK/STAT signální dráha

Je známo, že interferony (IFN), jako jedna ze skupiny cytokinů představují extracelulární signální mechanismy, které se parakrině i autokrině podílejí na regulaci proliferace a diferenciace buněk. IFN- α a IFN- β se váží na společný receptor typu I (9), receptor typu II je vazebnou strukturou pro IFN- γ (9, 10). Stimulace receptoru má za následek aktivaci různých kombinací s receptorem asociovaných Janus proteintyrozinkináz (JAK PTK), které následně indukují ligand dependentní aktivaci proteinů STAT. JAK/STAT signální dráha je charakterizována pro celou řadu ligandů (11-14). Vazba ligandu na receptor je provázána jeho dimerizací a následně aktivací tyrozinkináz JAK, které katalyzují fosforylaci tyrozinu v cytoplazmatické části receptoru. Fosfotyroziny receptoru jsou determinantou pro SH2 domény proteinů STAT a zprostředkovávají tak připojení STATů k receptoru. Po vazbě na receptor JAK proteiny fosforylují STAT na evolučně konzervovaném tyrozinu. Dochází tak k aktivaci STAT proteinu, jeho uvolnění z receptoru a k jeho dimerizaci interakcí SH2 domény jednoho STAT proteinu s fosfotyrozinem dalšího STATu. Následně tyto dimery putují do jádra, kde se váží na specifické enhancerové sekvence, jimiž jsou pro interferony skupiny I tzv. ISRE („IFN Stimulation Response Element“) a pro IFN- γ tzv. GAS determinanty („IFN-Gamma Activation Site“). Efektorovým mechanismem interferonové JAK/STAT dráhy je aktivace exprese řady cílových genů.

Ačkoli fosfotyrozinová aktivace STAT proteinů je pro přenos signálů považována za klíčovou, ukazuje se, že fosforylace proteinů STAT 1 a STAT 3 na serinu se rovněž na této dráze podílí. Nedávno Yaffe a Cantley (15) identifikovali fosfoserinové vazebné domény, které participují na fosforylaci závis-

lých proteinových interakcí a následně i na propagaci cytokinových signálů. Lokalizace serinu 727 (Ser 727) v sekvenci rozpoznávané MAP kinázami („Mitogen-activated Protein Kinase“) je důvodem ke spekulaci, že fosfoserinová aktivace představuje mechanismus jímž STAT proteiny harmonizují proteinové interakce v rámci alternativních signálních drah.

5. Cílové geny, které jsou pod kontrolou STAT proteinů

Přestože identifikace cílových genů, jejichž transkripce je pod kontrolou STAT proteinů, není zdaleka vyčerpávající, řada z nich je již v současnosti dobře charakterizována. Za povšimnutí stojí, že v řadě případů se jedná o geny, které regulují buněčný cyklus, proliferaci a apoptózu, tj. procesy, jejichž defekty jsou atributem maligní buňky. Jako příklad je možné uvést geny *bcl-XL* (7, 16, 17), *cyklin D1* (7, 18), *p21 WAF/CIP* (18) a *c-myc* (7, 19). Lze předpokládat, že deregulace těchto, ale pravděpodobně i řady jiných genů, jejichž exprese je kontrolována STATy, představuje mechanismus, jímž se tyto proteiny spolupodílejí na maligní přeměně buňky. Na podporu této hypotézy lze uvést několik nedávných studií, které dokladují překvapivě vysokou incidenci patologické aktivace STAT proteinů v různých lidských nádorech a maligních buněčných liniích (8, 20, 21).

6. Defekty v expresi a aktivaci proteinů STAT *in vitro*

Je pravděpodobné, že defektní exprese či aktivace STAT proteinů významně ovlivňuje vnímavost buňky na interferonové signály. Wong a spol. (22), na modelu buněčných kultur lidského maligního melanomu, prokázali úzkou souvislost mezi sníženou expresí a aktivací STAT 1, STAT 2 a p48-ISGF 3 transkripčního faktoru („Interferon-stimulated Gene Factor 3) na jedné straně a sníženou odpovědí na interferony na straně druhé. Podobnou analýzu s identickými výsledky uvádí studie Kolla a spol. u buněčných linií z lidského karcinomu mléčné žlázy (23).

7. Negativní regulátory signálních drah cytokinů

Ve vztahu k abnormální signální dráze STAT 1 lze předpokládat existence několika alternativních mechanismů. Ty zahrnují aberantní autokrinní nebo parakrinní stimulaci normálních receptorů, zvýšenou nebo nedostatečnou aktivitu tyrozinkináz a abnormální expresi negativních regulátorů signálních drah cytokinů, které za fyziologických podmínek inhibují STAT aktivaci. Poslední ze zmíněných mechanismů souvisí s identifikací několika nových proteinů, které specificky antagonizují signální dráhu JAK/STAT (24-30). Jedná se o fyziologické supresory cytokinových signálů (SOCS: „Suppressors of Cytokine Signaling“), proteinové inhibitory aktivovaných STATů (PIAS: „Protein Inhibitors of Activated STATs“) a fosfatázy obsahující SH2 domény (SHP: „SH2-containing Phosphatases“).

8. Proteiny SOCS

Proteiny SOCS, objevené nezávisle na sobě třemi různými výzkumnými skupinami zhruba ve stejné době, představují zřejmě nejdůležitější faktory v klasické negativní zpětnovazební smyčce, které negativně regulují JAK/STAT signální dráhu iniciovanou mnoha cytokiny (29, 30). Některé výsledky naznačují, že transkripce většiny, ne-li dokonce všech genů kódujících proteiny SOCS, je indukována nebo regulována samotnými cytokiny, a to pravděpodobně přes aktivované molekuly STAT proteinů (30). Ačkoli je již známo 20 proteinů, které sdílí identickou C-terminální sekvenci, tzv. „SOCS box“, pouze 8 z nich, které obsahují jak C-terminální SOCS box, tak i centrální Src homologní doménu (SH2), se podílí na signální transdukcii cytokinů (25-29).

První člen této rodiny, označený symbolem CIS („Cytokine Inducible SH2-containing protein“), byl identifikován jako produkt genů, jejichž transkripce je indukována v časně fázi cytokinové aktivace („immediate early genes“) (26, 31). SOCS

1, označovaný rovněž jako JAB („JAK Binding Protein“) nebo SSI 1 („STAT-induced STAT Inhibitor 1“), byl identifikován na základě jeho schopnosti: 1. inhibovat diferenciaci buněk myeloidní leukémie linie M1 závislé na interleukinu 6 (28); 2. interagovat s doménou JH1 peptidu JAK1 (25); 3. jako cílový protein specifické protilátky proti doméně SH2 (27). SOCS 2-7 byly objeveny na základě jejich homologie se SOCS 1 (28, 29).

Proteiny SOCS inhibují přenos signálu různými, ne zcela známými mechanismy. Bylo například dokázáno, že SOCS 1 se váže na všechny čtyři JAK kinázy a inhibuje jejich aktivitu *in vitro*, zatímco CIS asociuje s receptorem, ale neinteraguje s ním, ani neinhibuje JAK peptidy. SOCS 3, podobně jako SOCS 1, váže JAK kinázy, ale s menší afinitou, a proto musí být jeho exprese podstatně vyšší než v případě SOCS 1, aby dosáhl ekvivalentní inhibice kinázové aktivity. Charakteristickou a pro SOCS 3 specifickou vlastností je fosforylace na tyrozinu po stimulaci cytokiny. Inhibice signální dráhy JAK/STAT vede „feedback“ mechanismem ke snížení exprese proteinů SOCS, což má za následek připravenost buňky odpovídat na další cytokinový signál. V některých případech, indukce proteinů SOCS jedním cytokinem může inhibovat signální transdukcí dalšího cytokinu. Například působení interleukinu 10 na monocyty inhibuje prostřednictvím indukce SOCS 3 následný přenos signálu IFN- α nebo IFN- γ (32). Ukazuje se, že proteiny SOCS mohou zprostředkovávat komunikaci („crosstalk“) mezi různými signálními drahami. Ačkoli přesný molekulární mechanismus, kterým peptidy SOCS blokují dráhu JAK/STAT zůstává stále nejasný, je pravděpodobné, že tyto proteiny mohou ovlivňovat prahovou hladinu cytokinu, na níž bude buňka významně odpovídat.

9. Úloha proteinů STAT/SOCS v přenosu cytokinových signálů

Poznání úlohy STAT/SOCS proteinů v přenosu cytokinových signálů a v regulaci genů, které kontrolují řadu fyziologických procesů buňky a zajišťují její homeostázu, vyvolává narůstající zájem onkologického výzkumu. Není sporu o tom, že extracelulární cytokinové signály šířené intracelulární JAK/STAT dráhou harmonizují procesy buněčné proliferace, diferenciacce a programované smrti buňky. Poněvadž deregulace těchto procesů je atributem většiny lidských neoplazií, je namísto představa, že abnormální signální transdukcce s následnou defektní transkripcí STAT dependentních genů se může podí-

let na etiopatogenezi maligní přeměny, ale i na odpovědi nádoru na léčbu cytokiny (8). V souvislosti s nádorovým procesem jsou předpokládány a v některých případech již prokázány abnormality, které zahrnují sníženou expresi nebo konstitutivní syntézu STAT molekul, jejich patologickou aktivaci a v neposlední řadě i poruchy v degradaci proteinů SOCS. O tom, že se mohou normální a pravděpodobně i defektní STAT/SOCS zprostředkované cytokinové signály manifestovat v různých systémech odlišné svědčí studie, v nichž byl sledován vliv indukce STAT/SOCS proteinů na apoptózu. Zatímco v některých buněčných systémech STAT aktivace IFN- γ zvyšuje expresi induktorů apoptózy Fas a Fas L, v jiných systémech, a za ne zcela jasných podmínek, může STAT 1 rovněž indukovat transkripci antiapoptického genu *bcl-XL* (33, 34). Naka a spol. (35) uvádějí, že SOCS 1 významně zvyšuje rychlost apoptózy, a to pravděpodobně přes zvýšenou expresi proapoptického genu *bax*.

Až doposud jen několik málo prací analyzovalo úlohu signálních drah STAT proteinů u pacientů postižených nádorovým onemocněním ve vztahu k IFN- α indukované antiproliferační aktivitě a k citlivosti nádorových buněk na tento cytokin (36, 37). Dosavadní výsledky podporují názor, že abnormalita v hladině proteinů STAT 1/STAT 3 nebo v jejich aktivaci koreluje se sníženou odpovědí nádorových buněk na inhibiční aktivitu IFN- α .

10. Závěr

V literatuře jsou jenom sporadické údaje o defektech v transdukčních proteinech rodiny STAT v nádorové buňce a doposud nebylo vůbec studováno, zda i jejich inhibitory, proteiny SOCS, se negativně podílejí na biologických účincích interferonů v maligní populaci. Existují však i údaje, že některé ze STAT proteinů se podílejí na patogenезi onkologických onemocnění a na procesech programované smrti buněk. Signální dráhy představují jednu z dalších možností blíže poznat kompletní mechanismus maligní přeměny buňky a z praktického hlediska nový nástroj pro předpověď vnímavosti nemocného. Experimentální údaje o defektech v těchto transdukčních a transkripčních drahách v nádorové buňce mohou přispět k vývoji nových, specifitějších a účinnějších léčiv nádorových onemocnění.

Práce byla podpořena grantovým projektem 301/00/0564 GA ČR a VVZ MOU č. MZ 00020980501.

Literatura

- DeMaeyer E. and DeMaeyer-Guignard J. (1988): Interferons and Other Regulatory Cytokines. New York: John Wiley and Sons.
- Von Stamm U., Brocker E.B., von Depka Prondzinski M., Rüter D.J., Rumke P., Broding C., Carrel S., Lejeune F.J. (1993): Effects of systemic interferon-alpha (IFN-alpha) on the antigenic phenotype of melanoma metastases. EORTC melanoma group cooperative study No. 18852. *Melanoma Res.*, 3, 173-180.
- Agarwala S.S. and Kirkwood J.M. (1995): Potential uses of interferon alpha 2 as adjuvant therapy in cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2, 365-371. Review.
- Deiss L.P., Feinstein E., Berissi H., Cohen O., Kimchi A. (1995): Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15 kDa protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev.*, 9, 15-30.
- Kirkwood J.M. (1995): Biologic therapy with interferon alpha and beta: Clinical applications: Melanoma. In: DeVita V.T., Hellman S., and Rosenberg S.A. (eds.): *Biologic therapy of cancer: Principles and Practice of Oncology*, pp. 388-411. Philadelphia: J.B. Lippincott.
- Rosenberg S.A. (1997). In: DeVita D.T., Hellman S., and Rosenberg S.A. (eds.): *Principles of Cancer Management: Biologic Therapy*, pp. 349-373. Philadelphia: J.B. Lippincott.
- Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C., Darnell J.E. Jr. (1999): STAT 3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.
- Frank D.A. (1999): STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Mol. Med.*, 5, 432-456. Review.
- Pestka S. (1997): The human interferon-alpha species and hybrid proteins. *Semin. Oncol.*, 24 (3 Suppl. 9) S9, 4-17. Review.
- Farrar M.A. and Schreiber R.D. (1993): The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 571-611. Review.
- Ihle J.N., Witthuhn B., Tang B., Yi T., Quelle F.W. (1994): Cytokine receptors and signal transduction. *Baillieres Clin. Haematol.*, 7, 17-48. Review.
- Ihle J.N. and Kerr I.M. (1995): JAKs and STATs in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.*, 11, 69-74. Review.
- Schindler C. and Darnell J.E. Jr. (1995): Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 621-651. Review.
- Darnell J.E. Jr. (1997): STATs and gene regulation. *Science*, 277, 1630-1635. Review.
- Yaffe M.B. and Cantley L.C. (1999): Signal transduction. Grabbing phosphoproteins. *Nature*, 402, 30-31.
- Catlett-Falcone R., Landowski T.H., Oshiro M.M., Turkson J., Levitzki A., Savino R., Ciliberto G., Moscinski L., Fernandez-Luna J.L., Nunez G., Dalton W.S., Jove R. (1999): Constitutive activation of STAT 3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10, 105-115.
- Karni R., Jove R., Levitzki A. (1999): Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene*, 18, 4654-4662.
- Sinibaldi D., Wharton W., Turkson J., Bowman T., Pledger W.J., Jove R. (2000): Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT 3 signaling. *Oncogene*, 19, 5419-5427.
- Kiuchi N., Nakajima K., Ichiba M., Fukada T., Narimatsu M., Mizuno K.,

- Hibi M., Hirano T. (1999): STAT 3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J. Exp. Med.*, 189, 63-73.
20. Kube D., Holtick U., Vockerodt M., Ahmadi T., Haier B., Behrmann I., Heinrich P.C., Diehl V., Tesch H. (2001): STAT 3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*, 98, 762-770.
 21. Garcia R., Bowman T.L., Niu G., Yu H., Minton S., Muro-Cacho C.A., Cox C.E., Falcone R., Fairclough R., Parsons S., Laudano A., Gazit A., Levitzki A., Kraker A., Jove R. (2001): Constitutive activation of STAT 3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20, 2499-2513.
 22. Wong L.H., Krauer K.G., Hatzinisiriou I., Estcourt M.J., Hersey P., Tam N.D., Edmondson S., Devenish R.J., Ralph S.J. (1997): Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF 3 components, STAT 1, STAT 2, and p48-ISGF 3gamma. *J. Biol. Chem.*, 272, 28779-28785.
 23. Kolla V., Lindner D.J., Xiao W., Borden E.C., Kalvakolanu D.V. (1996): Modulation of interferon (IFN)-inducible gene expression by retinoic acid. Up-regulation of STAT 1 protein in IFN-unresponsive cells. *J. Biol. Chem.*, 271, 10508-10514.
 24. Chung C.D., Liao J., Liu B., Rao X., Jay P., Berta P., Shuai K. (1997): Specific inhibition of STAT 3 signal transduction by PIAS 3. *Science*, 278, 1803-1805.
 25. Endo T.A., Masuhara M., Yokouchi M., Suzuki R., Sakamoto H., Mitsui K., Matsumoto A., Tanimura S., Ohtsubo M., Misawa H., Miyazaki T., Leonor N., Taniguchi T., Fujita T., Kanakura Y., Komiya S., Yoshimura A. (1997): A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387, 921-924.
 26. Matsumoto A., Masuhara M., Mitsui K., Yokouchi M., Ohtsubo M., Misawa H., Miyajima A., Yoshimura A. (1997): CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT 5 pathway and modulates STAT 5 activation. *Blood*, 89, 3148-3154.
 27. Naka T., Narazaki M., Hirata M., Matsumoto T., Minamoto S., Aono A., Nishimoto N., Kajita T., Taga T., Yoshizaki K., Akira S., Kishimoto T. (1997): Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387, 924-929.
 28. Starr R., Willson T.A., Viney E.M., Murray L.J., Rayner J.R., Jenkins B.J., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J. (1997): A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature*, 387, 917-921.
 29. Hilton D.J., Richardson R.T., Alexander W.S., Viney E.M., Willson T.A., Sprigg N.S., Starr R., Nicholson S.E., Metcalf D., Nicola N.A. (1998): Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 114-119.
 30. Hilton D.J. (1999): Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 1568-1577. Review.
 31. Yoshimura A., Ohkubo T., Kiguchi T., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Hara T., Miyajima A. (1995): A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.*, 14, 2816-2826.
 32. Ito S., Ansari P., Sakatsume M., Dickensheets H., Vazquez N., Donnelly R.P., Larner A.C., Finbloom D.S. (1999): Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT 1. *Blood*, 93, 1456-1463.
 33. Xu X., Fu X.Y., Plate J., Chong A.S. (1998): IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT 1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.*, 58, 2832-2837.
 34. Frank D.A., Mahajan S., Yuan H. (1999): The chemoprotectant butyrate down-regulates IL-6-induced signaling events in colorectal carcinoma cells. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 40, 318.
 35. Naka T., Matsumoto T., Narazaki M., Fujimoto M., Morita Y., Ohsawa Y., Saito H., Nagasawa T., Uchiyama Y., Kishimoto T. (1998): Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI 1 (STAT-induced STAT inhibitor 1) deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15577-15582.
 36. Carson W.E. (1998): Interferon alpha-induced activation of signal transducer and activator of transcription proteins in malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 4, 2219-2228.
 37. Yang C.H., Murti A., Pfeffer L.M. (1998): STAT 3 complements defects in an interferon-resistant cell line: evidence for an essential role for STAT 3 in interferon signaling and biological activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5568-5572.