Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation des Proteins Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) in Zellen des angeborenen Immunsystems

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Humanbiologin Andrea Bätz
aus Sonneberg

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Humanbiologin Andrea Bätz
aus Sonneberg

Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation des Proteins Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) in Zellen des angeborenen Immunsystems

Tag der mündlichen Prüfung: ……..

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Bartenschlager
Prof. Dr. med. Alexander Dalpke

INHALTSVERZEICHNIS ..... **I**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **V**

ZUSAMMENFASSUNG ..... **VIII**

SUMMARY ..... **IX**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 Das angeborene Immunsystem **1**
1.1.1 Toll-like Rezeptoren 3
1.1.2 Liganden der Toll-like Rezeptoren 5
1.1.3 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren 5

1.2 Zytokine und ihre Rezeptoren **6**
1.2.1 Signalmechanismen von Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren 7
1.2.2 Inhibitoren im JAK/STAT-Signalweg 9

1.3 Suppressor of Cytokine Signaling- (SOCS-) Proteine **9**
1.3.1 Induktion und molekulare Wirkmechanismen der SOCS-Proteine im JAK/STAT-Signalweg 11
1.3.2 Induktion und inhibitorische Wirkung der SOCS-Proteine in JAK/STAT-unabhängigen Signalwegen 15
1.3.3 Physiologische Rolle von SOCS-Proteinen 16
1.3.4 Bedeutung der SOCS-Proteine im Immunsystem 21

1.4 Wissenschaftliche Fragestellung **21**

2 MATERIAL UND METHODEN **23**

2.1 Material **23**
2.1.1 Geräte 23
2.1.2 Verbrauchsmaterial 24
2.1.3 Gebrauchsfertige Kits 26
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien 26
2.1.4.1 Allgemeine Chemikalien, Biochemikalien 26
2.1.4.2 Wasser 28
2.1.5 Lösungen 28
2.1.6 Puffer 29
2.1.7 Vektoren und rekombinante Plasmide 31
2.1.8 Primer, Sonden 32

2.1.9 Marker ... 36
2.1.10 Enzyme ... 36
2.1.11 Antikörper ... 36
2.1.12 Stimulanzien ... 37
2.1.13 Mauslinien ... 38
2.1.14 Wachstumsmedien ... 38
2.1.14.1 Wachstumsmedien für Säugerzellen ... 38
2.1.14.2 Wachstumsmedien für Bakterienzellen ... 39
2.1.15 Zellen ... 39
2.1.15.1 Eukaryotische Zellen ... 39
2.1.15.2 Prokaryotische Zellen ... 40

2.2 Methoden ... 41
2.2.1 Zellbiologische Methoden ... 41
2.2.1.1 Kultivierung eukaryoter Zellen ... 41
2.2.1.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien ... 41
2.2.1.1.2 Kultivierung von Zelllinien ... 41
2.2.1.1.3 Test auf Kontamination mit Mycoplasmen in der Zellkultur ... 42
2.2.1.1.4 Zellzahlbestimmung ... 42
2.2.1.2 Kultivierung prokaryoter Zellen ... 43
2.2.1.2.1 Einfrieren und Auftauen von Bakterien ... 43
2.2.1.2.2 Anzucht von Bakterien ... 43
2.2.2 Molekularbiologische Methoden ... 44
2.2.2.1 Klonierung der SOCS-Gene in pEGFP-C1 und pEGFP-N1 ... 44
2.2.2.1.1 Amplifikation von SOCS1-, SOCS3- und CIS-Sequenzen mittels PCR ... 44
2.2.2.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren ... 46
2.2.2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen ... 47
2.2.2.1.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen ... 47
2.2.2.1.5 Reinigung von Nukleinsäuren ... 48
2.2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten ... 49
2.2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen ... 49
2.2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien ... 49
2.2.2.1.9 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Plasmiden ... 50
2.2.2.1.10 Sequenzierung ... 51
2.2.2.2 Gezielte Mutation durch ortsgerichtete Mutagenese ... 51
2.2.2.3 Modifikation durch Einfügen von Oligonukleotiden ... 53
2.2.2.3.1 Generierung einer Restriktionsenzymschnittstelle im humanen CIS-Protein ... 53
2.2.2.3.2 Insertionen in das humane CIS-Protein ... 53
2.2.2.4 Transiente Transfektion eukaryoter Zelllinien ... 54
2.2.2.5 Quantitative RT-PCR ... 55

2.2.2.5.1 RNA-Aufreinigung ... 55
2.2.2.5.2 cDNA-Synthese ... 55
2.2.2.5.3 Quantitative RT-PCR ... 55
2.2.3 Biochemische und immunologische Methoden ... 57
2.2.3.1 Western Blot Analyse ... 57
2.2.3.1.1 Herstellung von Proteinlysat ... 57
2.2.3.1.2 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) ... 57
2.2.3.1.3 SDS-PAGE ... 58
2.2.3.1.4 Western Blot (Elektrotransfer von Proteinen) ... 59
2.2.3.1.5 Immunblot (Immunanfärbung nach Western Blot) ... 59
2.2.3.1.6 Strippen von PVDF-Membranen ... 60
2.2.3.2 Immunzytochemie ... 60
2.2.3.3 Zellfraktionierung von transfizierten HEK 293 Zellen ... 62
2.2.3.4 Endogener SOCS-Nachweis aus RAW 264.7 Zellen ... 63
2.2.3.4.1 Endogener SOCS-Nachweis aus Gesamtzellextrakten mit anschließender Immunpräzipitation ... 63
2.2.3.4.2 Endogener SOCS-Nachweis nach Zellfraktionierung mit anschließender Immunpräzipitation ... 64
2.2.3.5 Luciferase Reportergen-Assay ... 65
2.2.3.6 Durchflusszytometrie ... 66
2.2.3.6.1 Intrazelluläre Färbung von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1 ... 66

3 ERGEBNISSE ... 68

3.1 Mechanismen der TLR-vermittelten SOCS-Induktion ... 68

3.2 Aktivierung des indirekten Typ I Interferon-abhängigen Signalwegs nach TLR-Stimulation ... 70

3.3 Induzierte SOCS-Proteine inhibieren indirekte Zielgene nach TLR-Stimulation ... 71

3.4 Lokalisation von SOCS-Proteinen in HEK 293 Zellen ... 72

3.4.1 Klonierung von GFP-markierten SOCS-Fusionsproteinen ... 73
3.4.2 Lokalisationsanalysen von GFP-markierten SOCS-Fusionsproteinen in HEK 293 Zellen ... 74
3.4.3 Expressionsnachweis verschiedener humaner N- und C-terminal GFP-markierter SOCS-Proteine in HEK 293 Zellen ... 81
3.4.4 Lokalisationsnachweis von N-terminal GFP-markierten SOCS-Fusionsproteinen in weiteren Zelllinien ... 82
3.4.5 Detektion der Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS über weitere Nachweisepitope ... 83
3.4.6 Zellfraktionierung transient transfizierter HEK 293 Zellen ... 84
3.4.7 Endogener SOCS-Nachweis aus RAW 264.7 Zellen ... 86

3.5 Identifizierung eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) im SOCS1-Protein ... 89

3.6 Mutation der putativen NLS minimiert die Kernexpression des SOCS1-Proteins ... 91

3.6.1 Lokalisation verschiedener SOCS1-Mutanten in HEK 293 Zellen ... 91

3.6.2 Quantitative Lokalisationsanalyse der verschiedenen humanen SOCS1-Mutanten in HEK 293 Zellen ... 94

3.6.3 Expressionsnachweis der humanen SOCS1-Mutanten in HEK 293 Zellen ... 96

3.7 Transfer der NLS-Sequenz des humanen SOCS1-Proteins in das humane CIS-Protein ... 96

3.8 Funktionelle Analyse der humanen SOCS1-Mutanten bezüglich der Inhibition im JAK/STAT Signalweg ... 98

4 DISKUSSION ... 102

4.1 Abwehr von Mikroorganismen durch das angeborene und das adaptive Immunsystem ... 102

4.2 Zytokinregulation durch SOCS-Proteine ... 103

4.2.1 Induktion von SOCS-Proteinen: klassischer Weg ... 104

4.2.2 Induktion von SOCS-Proteinen: alternativer Weg ... 104

4.2.3 Wirkung der TLR-induzierten SOCS-Proteine ... 107

4.3 Subzelluläre Lokalisation von SOCS-Proteinen ... 110

4.4 Identifizierung eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) im SOCS1-Protein ... 113

4.5 Mutationsanalyse der putativen NLS im SOCS1-Protein ... 114

4.6 Funktionelle Analyse der humanen SOCS1-Mutanten bezüglich der bekannten Inhibition im JAK/STAT Signalweg ... 117

4.7 Mögliche Funktionen des SOCS1-Proteins im Nukleus ... 121

4.8 Ausblick ... 126

5 LITERATURVERZEICHNIS ... 127

6 VERÖFFENTLICHUNGEN UND PRÄSENTATIONEN ... 143

6.1 Veröffentlichungen ... 143

6.2 Präsentationen ... 143

7 DANKSAGUNG ... 144

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AP-1	activating protein 1
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CIS	cytokine inducible SH2 domain containing protein
c_t	threshold cycle number
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DC	dendritic cell (Dendritische Zelle)
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Mix aus Desoxynukleotidtriphosphaten
ds	double-stranded (doppelsträngig)
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular signal-regulated kinase
F	Phenylalanin
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
fw, for	forward, Vorwärtsprimer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunden
HEK-Zellen	human embryonic kidney cells
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IFN	Interferon
IKK	IκB kinase complex
IL	Interleukin
IP-10	IFN inducible protein 10
IRAK	IL-1-receptor associated kinases
IRF	IFN regulatory factor
I*κ*B	inhibitor of NFκB

JAB	JAK binding protein
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-jun N-terminal kinase
K	Lysin
kDa	Kilodalton
KIR	Kinase-inhibitorische Region
LB	Luria-Bertani
LIF	leukaemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucine-rich repeats
LTA	Lipoteichonsäure
Mal	MyD88 adapter like protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDA-5	melanoma differentiation-associated protein 5
MEZ	mitteleuropäische Zeit
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NFκB	nuclear factor kappa B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain protein
N-Terminus	Aminoterminus
ODN	Oligodesoxynukleotid
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pam_3CSK_4	$Pam_3CysSerLys_4$ = N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
Poly(I:C)	polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	pathogen-recognition receptor
R	Arginin
RasGAP	Ras (Rat Sarcoma Virus) GTPase activating protein
rE	relative Expression
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real-time PCR
rv, rev	reverse, Rückwärtsprimer

S	Serin
SARM	sterile alpha and armadillo motif-containing protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SH2	Src-homology 2 domain
SHP	SH2-containing phosphatase
SOCS	suppressor of cytokine signaling
ss	single-stranded (einzelsträngig)
SSC	sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)
SSI	STAT-induced STAT inhibitor
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris acetate EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris/EDTA
T_H	T-Helferzelle
TICAM	TIR containing adapter molecule
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing protein inducing IFN-β
U	unit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
well	Vertiefung einer Zellkulturplatte
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) Proteine stellen eine Klasse von induzierbaren *Feedback*-Inhibitoren für den JAK/STAT (*janus kinase / signal transducer and activator of transcription*) Signalweg dar. Diese intrazellulären Proteine können durch Zytokine, aber auch nach Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLR) induziert werden. Neuere Daten weisen darauf hin, dass SOCS-Proteine wichtige Negativregulatoren im TLR-Signalweg darstellen. Allerdings ist der genaue Mechanismus der SOCS-Induktion und Wirkungsweise nach TLR-Stimulation noch umstritten.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass SOCS-Proteine (SOCS1, SOCS3, CIS) durch prototypische TLR-Liganden [LPS, LTA, CpG-ODN, Poly(I:C)] induziert werden können. Dabei war die Induktion der Proteine SOCS3 und CIS von MyD88 abhängig. Für das SOCS1-Protein zeigten sich dagegen TLR-abhängige Unterschiede. Die Induktion der SOCS-Proteine erfolgte direkt und war unabhängig von der Wirkung von Typ I Interferon. In SOCS-überexprimierenden Makrophagen konnte nach TLR-Stimulation kein inhibitorischer Effekt der Proteine SOCS1, SOCS2, SOCS3 oder CIS auf das direkte TLR-Zielgen TNF-α (Tumor Nekrose Faktor α) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 die Expression von IFN-β induziert wird. Dieses wird von der Zelle sezerniert, bindet in einem auto-/parakrinen Mechanismus an seinen entsprechenden Rezeptor und führt über die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs zur Induktion von sekundären Genen, wie z. B. IP-10. Dieser, durch TLR-Liganden induzierte, indirekte Signalweg konnte durch das SOCS1-Protein und in geringem Umfang auch von den Proteinen SOCS3 und CIS inhibiert werden. Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass die nach TLR-Stimulation induzierten SOCS-Proteine den direkten TLR-Signalweg nicht beeinflussen, sondern ihre inhibitorische Wirkung auf den indirekten, IFN-β-abhängigen Signalweg ausüben.

Anschließend wurde die Lokalisation der SOCS-Proteine in der Zelle untersucht. Dafür wurden Fusionsproteine bestehend aus GFP und SOCS konstruiert. Überraschenderweise konnte für SOCS1, aber nicht für SOCS3 oder CIS, eine deutliche Kernlokalisation in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer Sequenzanalyse konnte ein putatives nukleäres Lokalisationssignal (NLS) zwischen der SH2-Domäne und der SOCS-Box von SOCS1 identifiziert werden. Deletion oder Substitution dieser Region mit der entsprechenden Sequenz aus SOCS3 sowie eine Serie von R/A-Punktmutationen führten zu einem verstärkten zytoplasmatischen Expressionsmuster. Weiterhin bewirkte die Insertion der NLS aus SOCS1 in das normalerweise zytoplasmatisch-lokalisierte CIS-Protein eine nukleäre Expression. Interessanterweise waren die generierten SOCS1-Mutanten trotz Unterschieden in der Lokalisation noch in der Lage, wenn zum Teil auch etwas abgeschwächt, die IFN-α-vermittelte STAT1-Aktivierung (Tyrosin-Phosphorylierung, Reportergen-Aktivität) zu inhibieren. Die funktionale Signifikanz von nukleär exprimiertem SOCS1 bleibt unklar und wird ausgiebig diskutiert. Es scheint sich um eine neuartige Funktion von SOCS1 zu handeln, die unabhängig von dem bekannten Effekt der SOCS-Proteine im JAK/STAT-Signalweg ist.

Summary

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins constitute a class of inducible feedback inhibitors for janus kinase / signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathways. These intracellular proteins are induced by cytokine signaling, but they can also be induced by stimulation of Toll-like receptors (TLR). It has been suggested that SOCS proteins are important negative regulators of TLR signaling. However, the way of induction and inhibition is still contoversly discussed.

In this study it is shown that prototypic TLR ligands [LPS, LTA, CpG-ODN, Poly(I:C)] induce expression of SOCS proteins (SOCS1, SOCS3, CIS). This induction of SOCS3 and CIS was strictly MyD88 dependent but showed differing needs in the case of SOCS1. However, induction of SOCS proteins by TLR ligands was independent of secreted type I interferon. In macrophages overexpressing SOCS, we were not able to observe an inhibitory effect of SOCS1, SOCS2, SOCS3 or CIS on prototypical TLR target genes such as tumor necrosis factor α (TNF-α). In addition, it is shown that TLR2, TLR3, TLR4 and TLR9 stimulation induced interferon β (IFN-β), which is able to exert auto-/paracrine signaling, leading to the activation of secondary genes like IP-10. SOCS1 and, to a lesser extent, SOCS3 and CIS were able to inhibit this indirect signaling pathway following TLR stimulation. Thus, these data suggest that SOCS proteins induced by TLR stimulation limit the extent of TLR signaling by inhibiting paracrine type I IFN signaling.

Subsequently, we analyzed the localization of different SOCS proteins in the cell. Therefore we constructed fusion proteins consisting of SOCS and GFP. Surprisingly, it was observed that SOCS1 but not SOCS3 or CIS localized predominantly to the nucleus when expressed in various cell lines. Sequence analysis revealed a putative bipartite nuclear localization signal (NLS) located between the SH2 domain and the SOCS-box of SOCS1. Deletion of this region, introduction of a series of R/A point mutations or substitution of this sequence with the respective region of SOCS3 resulted in loss of nuclear and increasing cytoplasmic localization. Fusion of the SOCS1-NLS to CIS resulted in nuclear localization of this otherwise cytoplasmic protein. Interestingly, the generated mutants of SOCS1 were still partly effective in suppressing IFN-α mediated STAT1 (tyrosine phosphorylation; reporter gene activity) activation despite of differences in their localization. However, the functional significance is presently unclear and probably independent on the well-known effects of SOCS on JAK/STAT signaling.

1 Einleitung

Der Mensch ist kontinuierlich einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt. Um Pathogene möglichst frühzeitig zu erkennen und zu eliminieren, haben höhere Organismen im Laufe der Evolution einen hochdifferenzierten und anpassungsfähigen Abwehrapparat in Form des Immunsystems entwickelt. Dieses ist sowohl für die Erkennung als auch für die Effektorfunktionen verantwortlich, die der Abwehr von eingedrungenen Erregern, sowie von Fremd- und Schadstoffen, Toxinen aber auch von malignen Zellen dienen. Das Immunsystem wird in zwei Komponenten unterteilt: das angeborene Immunsystem und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Um eine effektive Verteidigung gegenüber mikrobiellen Angriffen zu gewährleisten, bedarf es eines engen Zusammenspiels beider Systeme.

Das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem stellt dabei die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Krankheitserreger dar und erkennt mittels eines geringen Repertoires an Keimbahn-kodierten Rezeptoren konservierte mikrobielle Strukturen. Die angeborenen Abwehrleistungen werden insbesondere von Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen sowie löslichen Faktoren (z.B. Komplementsystem) erbracht. Die adaptive Immunität wird dagegen durch klonal selektionierte T- und B-Lymphozyten vermittelt. Die spezifischen Rezeptoren (T-Zell-Rezeptor, Antikörper) dieser Zellen sind nicht im Genom fixiert, sondern entstehen durch somatische Rekombination, klonale Selektion und Hypermutation (Antikörper). Nach Antigenkontakt vermehren sich die entsprechenden Zellen durch klonale Expansion und differenzieren zu hochspezifischen Effektorzellen. Dieser Vorgang führt zu einer Verzögerung der Effektorfunktion von etwa drei bis fünf Tagen. Darüber hinaus ist das adaptive Immunsystem durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisiert, welches dem Organismus langanhaltende Immunität verleiht (Janeway et al. 2005).

1.1 Das angeborene Immunsystem

Im zeitlichen Ablauf einer Infektion wird das System der angeborenen Immunität schnell aktiviert. Es wird auch als unspezifisches Immunsystem bezeichnet, da die eingeleiteten Abwehrmaßnahmen zunächst unabhängig vom jeweils eindringenden Erreger aktiv werden. Zum angeborenen Immunsystem zählt zunächst die Barrierefunktion von Epithelien (Haut, Respirationstrakt, Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt), die durch mechanische und chemische Prozesse den Eintritt von Bakterien verhindern. Des Weiteren spielen das Flimmerepithel der Luftwege, das saure Milieu des Magens und der Vagina, antimikrobielle Enzyme (z.B. Lysozym im Speichel) und sezernierte antimikrobielle Substanzen auf Schleimhäuten (z.B. Defensine) eine tragende Rolle in diesem System. Ebenso liefert das Komplementsystem einen wichtigen Beitrag zur natürlichen Immunität. Dieses besteht aus einer Kaskade von proteolytischen Enzymen, die nach sequentieller

Aktivierung zur Opsonisierung und Lyse von Mikroorganismen führt. Schließlich existiert eine Vielzahl von löslichen Mediatoren wie Interferonen und Interleukinen, die zum einen direkte Effektorfunktionen ausüben und zum anderen die Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen. Auf zellulärer Ebene vermitteln insbesondere Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen die unspezifischen Abwehrmechanismen (Abbas and Lichtmann 2004).

Im Gegensatz zum großen Repertoire an hochspezifischen Antigenrezeptoren, die von T- und B-Zellen exprimiert werden, erkennt das angeborene Immunsystem Mikroorganismen über eine limitierte Anzahl an Keimbahn-verschlüsselten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Diese erkennen konservierte mikrobielle Strukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die von unterschiedlichen Pathogenen exprimiert werden, jedoch nicht hochspezifisch für eine Spezies sind und in höheren Eukaryoten nicht existieren. Das Vorkommen dieser mikrobiellen Strukturen nutzt das angeborene Immunsystem aus, um zwischen „Fremd“ und „Selbst“ zu unterscheiden. Die Erkennung molekularer Muster gewährleistet, dass die große Zahl potentieller Pathogene mittels eines begrenzten Repertoires an Keimbahn-kodierten Rezeptoren erkannt werden kann. PAMP-Strukturen sind für das Überleben und die Pathogenität der Mikroorganismen essentiell und dadurch evolutionär konserviert. Sie sind demzufolge lebenswichtig und stellen nur im geringen Maße Angriffspunkte für Mutationen dar (Medzhitov and Janeway 2000).

Anhand ihrer Funktion können die Mustererkennungsrezeptoren in drei Klassen eingeteilt werden (Janeway and Medzhitov 2002): sezernierte, Endozytose-vermittelnde und Signal-transduzierende Rezeptoren.

Die von den Zellen des angeborenen Immunsystems sezernierten Rezeptoren wirken opsonisierend, d.h. sie binden an die Oberfläche von Pathogenen und markieren diese dadurch, so dass sie vom Komplementsystem oder von Phagozyten erkannt werden können. Zu dieser Rezeptorgruppe zählen z.B. das Mannose-bindende Lektin und C-reaktives Protein, die in der frühen Phase der Infektion in der Leber gebildet werden.

Verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen, denen intrazelluläre Moleküle zur Signalweiterleitung fehlen, fungieren als Endozytose-vermittelnde Mustererkennungsrezeptoren, die durch die Erkennung pathogener Strukturen die Antigen-Aufnahme einleiten, den Transport zum lysosomalen Kompartiment vermitteln und somit die Prozessierung und Präsentation von Antigenen zusammen mit MHC- (*major histocompatibility complex*-) Molekülen ermöglichen. Zu dieser Gruppe zählen der Scavenger-Rezeptor (Erkennung negativ geladener Liganden), der fMLP-Rezeptor (Erkennung des bakteriellen Peptids Methionin-Leucin-Phenyalanin, wobei Methionin N-formyliert ist) sowie der Mannose-Rezeptor (Erkennung von speziellen Mannose-Anordnungen auf Bakterien) (Janeway et al. 2005).

Bei der Gruppe der Signal-transduzierenden Rezeptoren gibt es zum einen membranständige Makromoleküle, die nach der Erkennung von bestimmten pathogenen Strukturen eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen und zur Expression verschiedener Gene (z.B. proinflammatorische Zytokine, kostimulatorische Moleküle) führen und somit die Induktion von adaptiven Immunantworten einleiten. Die am besten untersuchten Rezeptoren dieser Gruppe sind die Toll-like Rezeptoren. Zum anderen zählen zu dieser Gruppe auch zytosolisch exprimierte Signal-transduzierende Mustererkennungsrezeptoren. Diese werden eingeteilt in NOD-like Rezeptoren (NLRs), zu denen unter anderem NOD1, NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain protein*) und die NALP-Proteine [*NACHT-, LRR- (leucine rich repeat region-) and PYD- (Pyrin domain-) containing protein*] gehören, außerdem RIG-like Rezeptoren (RLRs), die z.B. RIG-I (*retinoic acid-inducible protein I*) und MDA-5 (*melanoma differentiation-associated protein*) umfassen. Diese Rezeptoren erkennen bakterielle Peptidoglykane (NOD1, NOD2, NALP), virale und bakterielle RNA (NALP, RIG-I, MDA-5), aber auch endogene Gefahrensignale wie einen niedrigen Kalium-Spiegel (NALP) (Meylan et al. 2006). Oftmals arbeiten die zytosolischen Mustererkennungsrezeptoren mit den Toll-like Rezeptoren eng zusammen. So stellen z.B. RIG-I und TLR3 Sensoren für doppelsträngige RNA dar und induzieren über NFκB (*nuclear factor κB*) die Expression proinflammatorischer Gene (Meylan et al. 2006). Weiterhin zählt zu dieser Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren noch die RNA-abhängige Proteinkinase PKR und die 2´-5´-Oligoadenylatsynthase, die beide durch Bindung an doppelsträngige RNA aktiviert werden und inhibierend in die virale und zelluläre Proteinsynthese eingreifen (Clemens and Elia 1997).

1.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Glykoproteine, die zwischen Insekten und Säugetieren evolutionär konserviert sind. Der Name dieser Typ I Transmembranrezeptoren leitet sich vom Toll-Protein ab, dem eine essentielle Rolle bei der dorso-ventralen Achsenbildung während der Embryonalentwicklung in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zugeschrieben wurde (Hashimoto et al. 1988). Später wurde erkannt, dass diese Toll-Proteine auch bei der Abwehr von Pilzinfektionen in *Drosophila melanogaster* von Bedeutung sind (Lemaitre et al. 1996; Hoffmann 2003). Eine zum Toll-Protein homologe Protein-Familie, die sogenannten Toll-like Rezeptoren, konnte auch in Vertebraten identifiziert werden (Medzhitov et al. 1997). Bisher konnten im Menschen zehn Toll-like Rezeptoren (TLR1-10) und in der Maus zwölf (TLR1-9 und TLR11-13) identifiziert werden (Kaisho and Akira 2006). Jeder dieser Toll-like Rezeptoren ist charakterisiert durch eine extrazelluläre Domäne mit mehreren Leucin-reichen Wiederholungsmotiven (*leucine-rich repeats*, LRR), die die Erkennung von PAMPs vermitteln. Weiterhin besitzen die Toll-like Rezeptoren einen Transmembranteil und eine zytoplasmatische Domäne. Letztere ist für die Signaltransduktion verantwortlich und zeigt Homologien zur zytoplasmatischen Domäne der

Interleukin-1-Rezeptor-Familie und wird deswegen auch als Toll/IL-1R- (TIR-) Domäne bezeichnet (Medzhitov 2001; Takeda et al. 2003). Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie werden sowohl von verschiedenen Immunzellen, wie z.B. Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Zellen, speziellen T-Zellpopulationen als auch von vaskulären Endothelzellen, Adipozyten, kardialen Myozyten, Fibroblasten sowie intestinalen und bronchialen Epithelzellen exprimiert (Muzio et al. 2000; Akira et al. 2001; Akira et al. 2006; Mayer et al. 2007). Dabei befinden sich die Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4, 5 und 6 im Regelfall auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz dazu sind die Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 im Endosom bzw. im Lysosom lokalisiert (Ahmad-Nejad et al. 2002; Heil et al. 2003; Latz et al. 2004; Matsumoto et al. 2003). Die Expression der TLRs ist nicht statisch, sondern kann durch eingedrungene Pathogene, eine Vielzahl von Zytokinen oder auch durch umgebende Stressfaktoren moduliert werden (Akira et al. 2006).

Tabelle 1-1: Liganden von Toll-like Rezeptoren

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	Dimerisierung mit TLR2	
	triacylierte Lipopeptide	Bakterien
TLR2	Dimerisierung mit TLR1 oder TLR6	
	Peptidoglykan, Lipoproteine, Lipopeptide, atypisches LPS, Lipoteichonsäure	Bakterien
	Zymosan, Phospholipomannan	Pilze
	Glykophosphatidylinositol-Anker	Protozoen
	Masern-Virus Hämagglutininprotein	Virus
	Pam_3CSK_4	synthetisch
TLR3	dsRNA	Viren
	Poly(I:C)	synthetisch
TLR4	LPS	Bakterien
	Mannan, Glucuronoxylomannan	Pilze
	Glykoinositolphospholipide	Protozoen
	RSV Fusionsprotein	Virus
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Dimerisierung mit TLR2	
	diacylierte Lipopeptide	Bakterien
TLR7/8[1]	ssRNA	Viren
	Imidazoquinolin-ähnliche Moleküle	synthetisch
TLR9	CpG-DNA	Bakterien, Protozoen, Viren
	CpG-Oligodesoxynukleotide	synthetisch
	Hemozoin + Malaria-DNA	Protozoen
TLR10[2]	?	?
TLR11[3]	Profilin-ähnliches Molekül	Protozoen
	Komponenten von uropathogenen Bakterien	Bakterien
TLR12[3]	?	?
TLR13[3]	?	?

modifiziert nach (Uematsu and Akira 2006); [1] Pseudogen in der Maus; [2] nur human beschrieben; [3] nur in der Maus beschrieben; ss/ds: einzelsträngig/doppelsträngig; RSV: respiratorisches Syncytialvirus; LPS: Lipopolysaccharid

1.2.1 Liganden der Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren erkennen spezifisch eine Vielzahl mikrobieller PAMPs, die vor allem bakteriellen Ursprungs sein können. Weiterhin werden auch virale und parasitäre Bestandteile, Pilzkomponenten sowie synthetische Agonisten als TLR-Liganden beschrieben. In Tabelle 1-1 sind die Liganden für die entsprechenden Toll-like Rezeptoren aufgeführt. TLR10 wird dabei nur im Mensch exprimiert, TLR11, 12, 13 kommen in der Maus, jedoch nicht im Menschen vor. Die Erkennungsvielfalt der Toll-like Rezeptoren wird teilweise durch kombinatorische Dimerisierung und durch zusätzliche Erkennungsmoleküle vergrößert.

Die Stimulation von Toll-like Rezeptoren in Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen führt zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen sowie Typ I Interferonen. Des Weiteren kommt es zur vermehrten Bildung von Sauerstoff- und Stickoxidradikalen und einer verstärkten Phagozytose. Außerdem erfolgt eine Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf Dendritischen Zellen. Dieser Prozess der DC-Reifung, welcher die Prozessierung und Präsentation des Antigens beinhaltet, ist essentiell für die Induktion einer Pathogen-spezifischen adaptiven Immunantwort und trägt letztendlich entscheidend zur Elimination des Keimes bei (Iwasaki and Medzhitov 2004).

1.2.2 Signaltransduktion durch Toll-like Rezeptoren

Nach Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne der Toll-like Rezeptoren, die bereits im unstimulierten Zustand als Homo- (TLR9) oder Heterodimer (TLR2 + TLR1/6) vorliegen, kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Assoziation der TIR-Domäne mit Adaptermolekülen ermöglicht (Latz et al. 2007; Triantafilou et al. 2006). Verschiedene Toll-like Rezeptoren führen zur Expression gleicher, aber auch differenter Zielgene. Dies lässt sich durch die Rekrutierung von unterschiedlichen Adapterproteinen an den Rezeptorkomplex erklären. Bislang sind fünf Adapter-proteine bekannt, wobei MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) eine zentrale Rolle spielt (Hemmi et al. 2002; Hacker et al. 2000; Kawai et al. 1999; Underhill et al. 1999; Schnare et al. 2000). Man unterscheidet deswegen zwischen einem MyD88-abhängigen und einem MyD88-unabhängigen Signalweg. Weitere Adaptermoleküle sind TIRAP/Mal (*TIR domain-containing adaptor/MyD88-adaptor-like protein*) (Fitzgerald et al. 2001; Horng et al. 2002), TRIF/TICAM1 (*TIR domain-containing protein inducing IFN-β/TIR containing adaptor molecule 1*) (Oshiumi et al. 2003; Hoebe et al. 2003a), TRAM/TICAM2 (*TRIF-related adaptor molecule/TIR containing adaptor molecule 2*) (Fitzgerald et al. 2003; Yamamoto et al. 2003) und SARM (*sterile alpha and armadillo motif-containing protein*) (O'Neill and Bowie 2007). Es konnte allerdings kürzlich gezeigt werden, dass SARM im Gegensatz zu den anderen Adaptermolekülen einen Negativregulator im TRIF-abhängigen TLR-Signalweg darstellt (Carty et al. 2006). MyD88 wird

von allen Toll-like Rezeptoren mit Ausnahme von TLR3 genutzt. Dieser rekrutiert dagegen ausschließlich TRIF als Adaptermolekül zur Signalweiterleitung. TLR4 kann sowohl den MyD88-abhängigen, als auch den MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Signalweg nutzen.
Die Stimulation von Toll-like Rezeptoren, die ausschließlich MyD88 als Adaptermolekül nutzen, führt dazu, dass MyD88 über seine C-terminal gelegene TIR-Domäne mit der gleichnamigen Domäne im TLR interagiert. An die N-terminale *death*-Domäne von MyD88 binden Mitglieder der IRAK-Familie (*IL-1-receptor associated kinases*). Nach Phosphorylierung von IRAK4 und IRAK1 dissoziieren beide Moleküle vom Rezeptorkomplex und führen zur Aktivierung von TRAF6 [*tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6*] (Cao et al. 1996). Dieser Komplex aus IRAK1/IRAK4/TRAF6 führt zum einen zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) p38, JNK (*c-jun N-terminal kinase*) und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) und zum anderen zur Aktivierung des IKK-Komplexes (*IκB kinase complex*). Die folgende IKK-induzierte Phosphorylierung von IκB (*inhibitor of NFκB*) führt zu dessen Degradierung und zur gleichzeitigen Freisetzung von NFκB (*nuclear factor κB*). NFκB-Dimere und MAPK-abhängige Transkriptionsfaktoren (AP-1: *activating protein 1*) translozieren in den Nukleus und bewirken dort die Transkription von Genen, die in die Entzündungsreaktion involviert sind (proinflammatorische Zytokine). In diesem MyD88-abhängigen Signalweg benötigen TLR2 und TLR4 ein weiteres Adaptermolekül für die Signaltransduktion. TIRAP ist dabei für die Rekrutierung von MyD88 an den jeweiligen Rezeptor erforderlich.
Der MyD88-unabhängige Signalweg von TLR4 führt zur Rekrutierung der Adaptermoleküle TRAM und TRIF, wobei TRAM als Bindeglied zwischen TLR4 und TRIF fungiert. Letzteres interagiert, auch nach TLR3-Stimulation, mit der Kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*). Daraufhin bewirkt TBK1 zusammen mit IKKi (beides IKK-verwandte Proteine) die Phosphorylierung von IRF3 (*interferon regulatory factor 3*). Phosphoryliertes IRF3 dimerisiert, transloziert in den Kern und induziert die Expression von Typ I Interferonen, insbesondere von IFN-β, und von IFN-induzierten Genen (Akira et al. 2006).

1.3 Zytokine und ihre Rezeptoren

Leistungen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems werden, wie bereits schon erwähnt, von verschiedenen Zellen getragen. Diese Zellen sind allerdings nicht ausschließlich in bestimmten Organen lokalisiert. Somit ist eine interzelluläre Kommunikation über Zellkontakte und vor allem über lösliche Faktoren für das Zusammenspiel von größter Wichtigkeit. In diesem Kontext spielen Zytokine und ihre Rezeptoren eine entscheidende Rolle (Dalpke and Heeg 2003).
Im Allgemeinen handelt es sich bei Zytokinen um kleine Proteine (von etwa 20 kDa), die von Zellen des Immunsystems und anderen Zelltypen synthetisiert und sezerniert werden. Dabei erfüllen sie verschiedene Aufgaben: Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems,

Kontrolle des hämatopoetischen Systems und Beteiligung an der Organisation von angeborenen und adaptiven Immunantworten. Aufgrund ihrer Struktur können die Zytokine in verschiedene Familien eingeteilt werden. Es gibt die Hämatopoetine, Interferone, Chemokine und die Mitglieder der Tumornekrosefaktor- (TNF-) Familie. Als Proteine sind Zytokine hydrophile Signalstoffe, die ihre Funktion über membranständige Rezeptoren vermitteln. Alle Zytokin-Rezeptoren bestehen aus einem oder mehreren Transmembranproteinen, deren extrazellulärer Bereich für die Zytokinbindung und deren zytoplasmatischer Anteil für die Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade verantwortlich sind. Aufgrund von Homologien in der extrazellulären Zytokinbindungsdomäne lassen sich die Rezeptoren in fünf Gruppen einteilen: Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren, TNF-Rezeptoren, Immunglobulin-Superfamilie-Rezeptoren und Chemokin-Rezeptoren (Abbas et al. 2000).

1.3.1 Signalmechanismen von Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren

Zytokin-Rezeptoren vom Typ I (auch als Hämatopoetin-Rezeptoren bezeichnet) und Typ II besitzen selbst keine Kinase-Aktivität. Die zytoplasmatischen Domänen dieser Rezeptoren sind mit Tyrosin-Kinasen der Janus-Familie (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2) assoziiert. Die Bindung des Zytokins an den entsprechenden Rezeptor führt zur Aggregation des Zytokin-Rezeptors. Dabei gelangen die Rezeptorketten in räumliche Nähe. Dies führt zur Aktivierung der Rezeptor-ständigen Janus-Kinasen durch Transphosphorylierung. Gleichzeitig werden durch die aktivierten Janus-Kinasen Tyrosin-Reste in den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptorketten phosphoryliert. Diese phosphorylierten Tyrosine stellen Bindungsstellen für Proteine des Zytosols dar, die als Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (*signal transducers and activators of transcription*, STATs) bezeichnet werden. Die Bindung erfolgt über die SH2-Domäne der im Zytoplasma vorkommenden STAT-Moleküle (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) (Abbas et al. 2000; Ihle et al. 1994; Leonard and O'Shea 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass im ruhenden Zustand unphosphorylierte STAT-Moleküle überwiegend als Dimere vorliegen und sich teilweise kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Nukleus hin und her bewegen (Meyer et al. 2002; Pranada et al. 2004). Die Dimerisierung erfolgt dabei über zwei Regionen innerhalb der beiden einzelnen STAT-Moleküle: zum einen zwischen den N-terminalen Domänen und zum anderen zwischen den *core*-Fragmenten, die die *coiled-coil*-Domäne, die DNA-Bindungsdomäne, die *Linker*-Region und die SH2-Domäne einschließt. Es wird postuliert, dass in diesem inaktiven Zustand die STAT-Dimere in der sogenannten antiparallelen Konformation vorliegen. Das bedeutet, dass sich die SH2-Domänen der beiden STAT-Moleküle an den gegenüberliegenden Enden der Dimere befinden. Es wird spekuliert, dass sich nach Zytokin-Stimulation die antiparallel angeordneten unphosphorylierten STAT-Dimere im Zytoplasma zu parallel ausgerichteten STAT-Dimeren neu arrangieren und an die phosphorylierten Tyrosin-Reste

am Rezeptor binden. In diesem Konformationszustand liegen die SH2-Domänen nun am gleichen Ende der Dimere. Dies hat den Vorteil, dass die SH2-Domänen und die C-Termini der beiden STAT-Moleküle in näherer Umgebung zueinander liegen und somit ein erleichterter Übergang zur parallel angeordneten phosphorylierten Dimer-Formation nach Tyrosin-Phosphorylierung durch die Rezeptor-gebundenen aktivierten Janus-Kinasen ermöglicht wird (Mao et al. 2005; Zhong et al. 2005; Lim and Cao 2006). Durch die Phosphorylierung kommt es zur Freilegung des nukleären Lokalisationssignals, welches nach Dissoziation der Dimere vom Rezeptor mit Importinen in der Kernmembran assoziiert und dadurch den nukleären Transport über die Kernporen vermittelt. Hier wirken die STAT-Dimere als Transkriptionsfaktoren, binden an spezifische DNA-Elemente und aktivieren die Gentranskription. Für die vollständige transkriptionelle Aktivität ist darüber hinaus eine Phosphorylierung von Serin-Resten in den STAT-Molekülen erforderlich (Decker and Kovarik 2000; Kovarik et al. 2001; O'Shea et al. 2002). Bei diesem Signalübertragungsweg erfolgt die Gentranskription sehr schnell, nachdem das Zytokin an seinen Rezeptor gebunden hat. Die Spezifität der Signalgebung, die durch verschiedene Zytokine ausgelöst wird, beruht auf der unterschiedlichen Kombination von JAKs und STATs.

Obwohl der Transkriptionsfaktor STAT1 für viele IFN-γ-abhängige Reaktionen essentiell ist, konnte gezeigt werden, dass dieses Zytokin auch in der Abwesenheit von STAT1 die Expression von einigen Genen regulieren kann. Für diesen Signalweg ist der IFN-γ-Rezeptor und JAK1 erforderlich. Man konnte dabei drei Genexpressionsmuster unterscheiden. Zum einen gab es Gene, die nur in Wildtyp-Zellen, aber nicht in STAT1$^{-/-}$ Zellen induziert wurden. Hierbei handelte es sich um komplett STAT1-abhängige Gene, wie z.B. IRF-1 (*interferon regulatory factor 1*), IP-10 (*interferon inducible protein 10*), MIG (*monokine induced by IFN-γ)* und das SOCS1- (*suppressor of cytokine signaling 1*-) Protein, die von einem STAT1-abhängigen Element (GAS: *interferon-gamma activated site*) induziert werden. Weiterhin konnten Gene identifiziert werden, die sowohl in den Wildtyp- als auch in den STAT1-defizienten Zellen reguliert wurden. Diese Gene wurden von STAT1-unabhängigen Elementen beeinflusst. Dabei wurden z.B. MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), EGR-1 (*early growth response 1*), das SOCS2- und das SOCS3-Gen induziert. Im Gegensatz dazu wurde das Chemokin-Gen CXCR4 (*CXC-chemokine receptor*) supprimiert. Außerdem wurden Gene bestimmt, die nur in den STAT1$^{-/-}$ Zellen induziert wurden, jedoch nicht in Wildtyp-Zellen. Solche Gene wiederum werden von STAT1-unabhängigen Elementen induziert und gleichzeitig von STAT1-abhängigen Elementen reprimiert. Dazu zählen z.B. das Gen für das Zytokin IL-1β und die Protoonkogene *c-myc* und *c-jun*. Dieser IFN-abhängige, STAT1-unabhängige Signalweg führt zur Induktion eines antiviralen Zustands und beeinflusst das Zellwachstum (Ramana et al. 2001; Gil et al. 2001). Daraus ist ersichtlich, dass für die komplette biologische IFN-γ-Aktivität die STAT1-unabhängige Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle spielt.

1.3.2 Inhibitoren im JAK/STAT-Signalweg

Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs durch Rezeptor-gebundene Zytokine ist nur transient. Dies bedeutet, dass dieser Signalweg an verschiedenen Stellen negativ reguliert werden muss (Yasukawa et al. 2000). Neben Rezeptor-Internalisierung werden aktivierte Rezeptorketten durch konstitutiv exprimierte Tyrosin-Phosphatasen (SHP-1: *SH2-containing phosphatase 1*, PTP1B: *protein tyrosine phosphatase 1B*, TCPTP: *T cell protein tyrosine phosphatase*) und Lipid-Phosphatasen (PTEN: *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*, SHIP: *SH2-containing 5´-inositol phosphatse*) inaktiviert (Heim 1999; Myers et al. 2001; Irie-Sasaki et al. 2001; Simoncic et al. 2002). Außerdem wurden Proteine der PIAS-Familie (*protein inhibitor of activated STAT*) beschrieben, die mit verschiedenen aktivierten STAT-Molekülen interagieren und dadurch deren Bindung an DNA verhindern können (Shuai 2000; Yasukawa et al. 2000). Des Weiteren wurden diese Proteine als E3-SUMO- (*small ubiquitin related modifier-)* Ligasen identifiziert, die die posttranslationale kovalente Modifizierung von Proteinen mit kleinen Ubiquitin-ähnlichen Strukturen katalysieren (Rakesh and Agrawal 2005). Schließlich gibt es noch Hinweise, dass dominant-negativ wirkende STAT-Varianten existieren (Wang et al. 1996; Azam et al. 1997). Neben diesen konstitutiv exprimierten Inhibitoren stellen SOCS- (*suppressor of cytokine signaling*-) Proteine echte intrazelluläre *Feedback*-Inhibitoren dar, da sie erst durch aktivierende Signale induziert werden.

1.4 Suppressor of Cytokine Signaling- (SOCS-) Proteine

Eine weitere Gruppe von intrazellulär negativ regulatorisch wirkenden Proteinen wurde mit der Familie der *suppressor of cytokine signaling*- (SOCS-) Proteine beschrieben (Starr et al. 1997; Endo et al. 1997; Naka et al. 2001). Hierbei handelt es sich um Proteine, die durch die Aktivierung von Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren induziert werden. Nach Expression üben diese Proteine ihre inhibitorische Funktion unter anderem am aktivierten Rezeptorkomplex aus. Dadurch wird die weitere Signaltransduktion unterbunden. Somit stellen SOCS-Proteine klassische intrazellulär wirkende *Feedback*-Inhibitoren dar.

Die SOCS-Familie, auch als CIS (*cytokine inducible SH2 domain containing protein*), SSI (*STAT-induced STAT inhibitor*) oder JAB (*Janus kinase binding protein*) bezeichnet, besteht bisher aus acht strukturell verwandten Mitgliedern: SOCS1 bis SOCS7 und CIS. Sequenz- und Struktur-analysen ergaben, dass immer Paare dieser Proteine enger zueinander verwandt sind als zu anderen Familien-Mitgliedern. Somit bilden die Proteine SOCS1 und SOCS3, CIS und SOCS2, SOCS4 und SOCS5 sowie SOCS6 und SOCS7 verwandte Paare (Hilton et al. 1998). Die am besten charakterisierten Mitglieder dieser Familie sind die Proteine SOCS1, SOCS2, SOCS3 und CIS. Diese werden im Folgenden hinsichtlich ihrer Wirkung und physiologischen Rolle näher betrachtet.

Alle Mitglieder der SOCS-Familie besitzen eine zentrale SH2-Domäne (*Src-homology 2 domain*), die zusammen mit der *extended SH2*-Subdomäne (ESS) die Bindung an phosphorylierte Tyrosin-Reste ermöglicht (Yasukawa et al. 1999; Sasaki et al. 1999). Weiterhin enthalten SOCS-Proteine ein konserviertes C-terminales Motiv aus 40 Aminosäuren, das als SOCS-Box bezeichnet wird (Hilton et al. 1998). Die SOCS-Box wird auch noch in anderen Protein-Familien gefunden. Der N-Terminus variiert beträchtlich bei den verschiedenen SOCS-Proteinen hinsichtlich Länge und Aminosäurenzusammensetzung. Diese Region enthält kein erkennbares Motiv. Eine Ausnahme bildet allerdings das SOCS7-Protein, welches in diesem N-terminalen Bereich ein putatives nukleäres Lokalisationssignal und mehrere Prolin-reiche Regionen enthält (Matuoka et al. 1997). Zusätzlich enthalten die Proteine SOCS1 und SOCS3 direkt N-terminal der SH2-Domäne eine Kinase-inhibitorische Region (KIR), welche die negative Beeinflussung der Aktivität von Janus-Kinasen vermittelt (Nicholson et al. 1999; Yasukawa et al. 1999). In Abbildung 1-1 ist die jeweilige Struktur der einzelnen Mitglieder der SOCS-Familie skizziert. Allgemein sind die kodierenden SOCS-Gene klein und enthalten nur wenige Introns (SOCS1 und SOCS3: ein Intron, CIS und SOCS2: zwei Introns). Damit haben sie Charakteristika von schnell induzierbaren (immediate early) Genen.

Eine basale Expression konnte für die einzelnen SOCS-Proteine beobachtet werden. Obwohl es auf Transkriptionsebene kontroverse Daten gibt, scheint das basale Expressionsniveau beachtlich vom Geschlecht, Entwicklungsstadium sowie vom untersuchten Gewebe und von der Zelllinie abhängig zu sein. Naka et al. untersuchten die SOCS1-Expression in verschiedenen Mausgeweben. Dabei konnten sie feststellen, dass das SOCS1-Protein ubiquitär exprimiert wird, jedoch mit einem verstärkten Expressionsmuster in Lunge, Milz und Hoden (Naka et al. 1997). Zusätzlich konnten Starr et al. noch eine Expression vom SOCS1-Protein im Thymus nachweisen. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch für das SOCS3-Protein beobachtet. Zusätzlich konnte dieses Protein auf einem hohen Expressionsniveau auch in der fetalen Leber nachgewiesen werden (Marine et al. 1999a). Im Gegensatz dazu wurde das SOCS2-Protein primär im Hoden und CIS z.B. in Herz, Lunge Niere, Hoden, Leber und der männlichen Milz gebildet (Starr et al. 1997; Yoshimura et al. 1995). Die Proteine SOCS6 und SOCS7 wurden ubiquitär in verschiedenen Mausgeweben exprimiert. Das SOCS7-Protein dabei verstärkt im Hoden und Gehirn (Matuoka et al. 1997; Dogusan et al. 2000; Krebs et al. 2002).

Obwohl das basale Expressionsniveau der Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS oft nur sehr gering oder nicht nachweisbar ist, werden diese Proteine nach Stimulation schnell induziert. Es konnte z.B. nach IL-6-Stimulation SOCS1- und SOCS3-mRNA innerhalb von 20 Minuten detektiert werden. Die Expression war nach vier Stunden für das SOCS1-Gen bzw. nach acht Stunden für das SOCS3-Gen wieder rückläufig. Im Gegensatz dazu folgte die Induktion der SOCS2- und CIS-mRNA der gleichen anfänglichen Kinetik wie für die SOCS1-mRNA, allerdings blieb die

Transkription für mindestens 24 Stunden auf einem erhöhten Niveau erhalten (Starr et al. 1997; Dalpke et al. 2003).

1.4.1 Induktion und molekulare Wirkmechanismen der SOCS-Proteine im JAK/STAT-Signalweg

SOCS-Proteine wirken als intrazelluläre *Feedback*-Inhibitoren von Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren. Die Expression kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine in verschiedenen Zellen und Geweben induziert werden. In den meisten Fällen führt dabei die Zytokin-Stimulation zur Induktion mehrerer SOCS-Gene (Abbildung 1-1). Nach Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs erfolgt die transkriptionelle und translationale Induktion der SOCS-Proteine, welche dann die weitere Rezeptoraktivierung im Sinne eines intrazellulären *Feedback*-Mechanismus inhibieren. Die Aktivierung erfolgt hierbei über die als Transkriptionsfaktoren wirkenden STAT-Moleküle. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Promotor-Region der Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS STAT-bindende Elemente enthält. Eine Deletion des STAT1/STAT3-Bindeelements im murinen SOCS3-Promotor resultierte in einem Verlust der Induktion durch LIF (*leukemia inhibitory factor*) in Reportergen-Experimenten (Auernhammer et al. 1999). Auch die Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs in Versuchen mit Mäusen, die Gendefizienzen im JAK/STAT-Signalweg aufweisen oder in *in vitro* Experimenten, resultierte in einem Verlust der SOCS-Induktion (Naka et al. 2001). Im CIS-Promotor wurden vier STAT5-Bindeelemente identifiziert (Matsumoto et al. 1997) und der SOCS1-Promotor enthält putative STAT1-, STAT3- und STAT6-Bindestellen (Naka et al. 1997; Saito et al. 2000). Ein zusätzlicher Regulationsmodus wurde für das SOCS1-Protein beschrieben. Es ließ sich zeigen, dass das SOCS1-Protein auch durch translationale Repression reguliert werden kann (Gregorieff et al. 2000; Schluter et al. 2000). Dies wird durch die Anwesenheit eines zusätzlichen Startkodons im 5´-nicht-translatierten Abschnitt vermittelt und führt wahrscheinlich zu einer Erniedrigung der endogenen SOCS1-Konzentration in ruhenden Zellen.

Hinsichtlich des Wirkmechanismus von SOCS-Proteinen im JAK/STAT-Signalweg gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Familienmitgliedern (Abbildung 1-2). Das SOCS1-Protein bindet dabei direkt an Janus-Kinasen und inhibiert dadurch deren Kinase-Aktivität (Yasukawa et al. 1999). Dabei bindet die SH2-Domäne des SOCS1-Proteins an Y1007 innerhalb der aktiven Domäne von JAK2. Für eine komplette Inhibition ist die Anwesenheit der KIR-Domäne im SOCS1-Protein erforderlich. Diese Region ähnelt der Aktivierungsdomäne von Janus-Kinasen und fungiert dabei vermutlich als Pseudosubstrat.

Name	Struktur	SOCS-induzierende Liganden	SOCS-sensitive Signalwege
SOCS1		IL-2, IL-13, GM-CSF, IFN-γ, GH, IL-4, IL-6, G-CSF, LIF, IFN-α, IFN-β, PRL, IL-9, IL-10, CNTF, LPS, CpG-DNA, SCF, Insulin, TSH, CT1, EPO, TNF-α	IL-2, IL-3, EPO, IL-4, IL-7, GH, IL-6, OSM, M-CSF, LIF, PRL, IFN-γ, LPS, IFN-α, IGF-1, Insulin, TPO, TNF-α, TSLP, SCF, CT1
SOCS2		GH, IL-3, IL-6, IFN-γ, EPO, PRL, IL-10, IL-2, CNTF, IL-1, Insulin, IGF-1	GH, IGF-1, LIF, IL-6, PRL
SOCS3		EPO, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, IFN-γ, IFN-α, IFN-β, GH, PRL, Leptin, IL-9, IL-10, IL-11, IL-22, LIF, OSM, CNTF, IL-1, TNF-α, LPS, CpG-DNA, IGF-1, EGF, PDGF, TSH, Insulin, BFGF, CT1, TPO, T-Zellrezeptor-Stimulation	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-11, GH, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, EPO, LIF, Leptin, PRL, CNTF, OSM, G-CSF, Insulin, CXCR4, IGF-1, CT1
SOCS4			
SOCS5		IL-6	IL-4, IL-6
SOCS6			
SOCS7		IL-6, PRL, GH, IL-1β	PRL, Leptin, GH
CIS		IL-2, IL-3, GM-CSF, EPO, GH, PRL, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13, IFN-γ, TPO, IL-10, Leptin, CNTF, TNF-α, IL-1, T-Zellrezeptor-Stimulation, TSLP, EGF	IL-2, IL-3, EPO, GH, Leptin, IGF-1, PRL

Abbildung 1-1: Struktur, Induktion und Aktivität von SOCS-Proteinen
Für jedes SOCS-Protein ist die Struktur mit den einzelnen Domänen skizziert. Weiterhin wurden die bis dato bekannten SOCS-induzierenden Liganden (JAK/STAT-abhängig und JAK/STAT-unabhängig) sowie die SOCS-sensitiven Signalwege aufgeführt. BFGF: basic fibroblast growth factor, CNTF: ciliary neurotrophic factor, CT1: cardiotrophin-1, CXCR4: CXC-chemokine receptor 4, EGF: epidermal growth factor, EPO: erythropoietin, G-CSF: granulocyte colony stimulating factor, GH: growth hormone, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor, IFN: interferon, IGF-1: insulin-like growth factor 1, IL: interleukin, LIF: leukemia inhibitory factor, LPS: lipopolysaccharide, M-CSF: macrophage colony stimulating factor, OSM: oncostatin M, PDGF: platelet derived growth factor, PRL: prolactin, SCF: stem cell factor, TNF-α: tumor necrosis factor alpha, TPO: thrombopoietin, TSH: thyroid stimulating hormone, TSLP: human thymic stromal lymphopoietin; dunkelgrau: Kinase-inhibitorische Region (KIR), hellgrau: SH2-Domäne, schwarz: SOCS-Box; (Krebs and Hilton 2000; Krebs and Hilton 2001; Alexander 2002; Dalpke and Heeg 2003)

Das SOCS3-Protein kann ebenfalls die Kinase-Aktivität von Janus-Kinasen unter Verwendung der KIR-Region hemmen (Sasaki et al. 1999). Dabei bindet das SOCS3-Protein selbst allerdings nur schwach an Janus-Kinasen. Vielmehr interagiert es mit phosphorylierten Tyrosin-Resten in den Rezeptorketten in der Nähe der Janus-Kinasen, die dann das SOCS3-Protein ähnlich wie das SOCS1-Protein in ihrer Aktivierung inhibieren kann (Bjorbak et al. 2000; Nicholson et al. 2000; Sasaki et al. 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das SOCS3-Protein Bindestellen für SHP-2 blockiert und damit die Aktivierung von MAP-Kinasen im gp130-Signalweg inhibiert (Nicholson et al. 2000; Schmitz et al. 2000). Interessanterweise kann das SOCS3-Protein selbst Tyrosin-phosphoryliert werden, was dann über die Bindung von RasGAP [*Ras (Rat Sarcoma Virus) GTPase activating protein*] zu einer verstärkten Aktivierung des Ras-Proteins im IL-2-Signalweg führt (COHNEY ET AL. 1999). Die Phosphorylierung beeinträchtigt jedoch nicht die Fähigkeit des SOCS3-Proteins, den JAK/STAT-Signalweg zu inhibieren.

Die hemmende Wirkung der Proteine SOCS2 und CIS wird wahrscheinlich durch Kompetition mit STAT-Molekülen hervorgerufen. Dabei binden beide SOCS-Proteine über ihre SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosin-Reste in den Rezeptorketten und verhindern dadurch die Rekrutierung von STAT-Molekülen an den Rezeptor (Matsumoto et al. 1999).

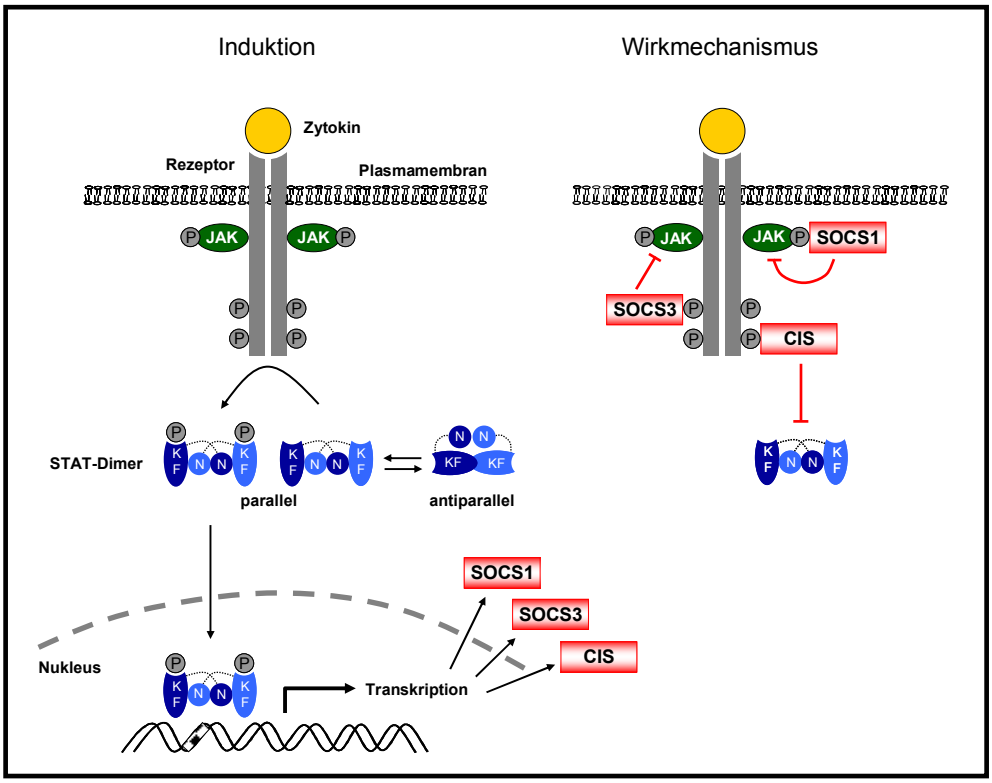

Abbildung 1-2: SOCS-Proteine als *Feedback*-Inhibitoren im JAK/STAT-Signalweg
Nach Bindung des Zytokins an einen Typ I oder Typ II Zytokin-Rezeptor kommt es zur Aggregation der beiden Rezeptorketten. Dies führt zur Aktivierung der Rezeptor-ständigen Janus-Kinasen (JAK) durch Transphosphorylierung. Gleichzeitig werden Tyrosin-Reste in den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptorketten durch JAK phosphoryliert. Die Zytokin-Stimulation bewirkt außerdem, dass die im Zytoplasma antiparallel angeordneten unphosphorylierten STAT-Dimere [Bindung über N-terminale Domänen (N) und *core*-Fragmente (KF) im jeweiligen STAT-Molekül] in die parallele Konformation übergehen und über die SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosin-Reste in den Rezeptorketten binden. Somit gelangen die STAT-Dimere in die räumliche Nähe der JAK-Proteine und werden durch diese an Tyrosin-Resten ebenfalls phosphoryliert. Die phosphorylierte Dimer-Formation dissoziiert vom Rezeptor und transloziert in den Kern. Hier wirken die STAT-Dimere als Transkriptionsfaktoren, binden an spezifische DNA-Elemente und induzieren unter anderem die Expression der SOCS-Gene. Die translatierten SOCS-Proteine können daraufhin die weitere Zytokin-Signaltransduktion hemmen. Dies geschieht entweder durch direkte Inhibition von Janus-Kinasen (SOCS1, SOCS3) oder durch Bindung an phosphorylierte Rezeptorketten (SOCS3, CIS), wobei eine Kompetition mit STAT-Molekülen hervorgerufen wird (CIS).

Schließlich wurde eine Funktion der SOCS-Box für die inhibitorische Wirkung der SOCS-Proteine vorgeschlagen (Abbildung 1-3). Dabei interagiert die SOCS-Box mit Elongin C, das zur Ausbildung eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (ECS: Elongin B/C-Cul-2/Cul-5-SOCS-Box-Protein) führt, an dem die Proteine Elongin B und C, Cullin-2 oder Cullin-5 und das RING-Finger Protein Rbx1 oder Rbx2 beteiligt sind (Kile et al. 2002; Kamura et al. 2004). Der E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex transferiert in der Anwesenheit des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) und eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) Polyubiquitin-Ketten auf das am SOCS-Protein gebundene Substrat, das letztendlich zu dessen proteolytischer Degradierung im Proteasom führt. Tatsächlich konnte unter Verwendung von Proteasomen-Inhibitoren eine verschlechterte Zytokin-Inhibition durch SOCS-Proteine beobachtet werden (Verdier et al. 1998). Im Gegensatz dazu konnten Haan et al. zeigen, dass eine Phosphorylierung von zwei Tyrosin-Resten im Bereich der SOCS-Box des SOCS3-Proteins die Interaktion mit Elongin C inhibierte und dadurch eine proteasomale Degradierung des SOCS3-Proteins aktiviert wurde (Haan et al. 2003). Die Bedeutung der SOCS-Box wurde auch in Versuchen mit gendefizienten Mäusen sichtbar. Nach gezielter Deletion der SOCS-Box im SOCS1-Protein zeigten entsprechende Mäuse eine verstärkte Empfindlichkeit auf Interferon-γ (IFN-γ) und eine sich langsam entwickelnde Entzündungsreaktion, die letztendlich zum Tod der Tiere führte (Zhang et al. 2001). Das Krankheitsbild ähnelte dem der SOCS1$^{-/-}$ Maus, wenn auch mit verzögerter Kinetik und geringfügig milderen Symptomen. In beiden Fällen bewirkte IFN-γ eine verlängerte Aktivierung des STAT1-Moleküls. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass eine Phosphorylierung des SOCS1-Proteins durch die Serin/Threonin-Kinase Pim zu einer verminderten Interaktion des SOCS1-Proteins mit Elongin B/C und damit zu einer erhöhten Stabilität des SOCS1-Proteins führte. Dies resultierte in einer verbesserten inhibitorischen Wirkung des SOCS1-Proteins auf den IL-4 Signalweg (Chen et al. 2002).

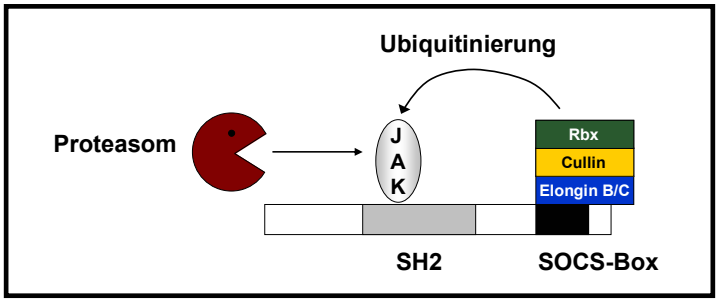

Abbildung 1-3: Inhibitorische Wirkung der SOCS-Proteine über die SOCS-Box
SOCS-Proteine können über die SOCS-Box mit dem Komplex Elongin B/C interagieren. Dieser bindet daraufhin Cullin-2. Hierbei handelt es sich um eine putative E3-Ubiquitin-Ligase, die nun an die SOCS-Proteine gebundene Signalproteine ubiquitinieren kann und somit dem proteasomalen Abbau zuführt.

1.4.2 Induktion und inhibitorische Wirkung der SOCS-Proteine in JAK/STAT-unabhängigen Signalwegen

Neben der Induktion und Wirkung der SOCS-Proteine im JAK/STAT-Signalweg konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass SOCS-Proteine auch noch durch JAK/STAT-unabhängige Signalwege induziert werden können (Abbildung 1-1). So führte z.B. die Stimulation des TNF-Rezeptors wie auch die Stimulation der Toll-like Rezeptoren zur Induktion von verschiedenen SOCS-Proteinen (Stoiber et al. 1999; Bode et al. 1999; Dalpke et al. 2001; Dalpke et al. 2003). Diese schnelle SOCS-Induktion war direkt (Dalpke et al. 2001) und unabhängig von parakrinen Signalwegen, wie ursprünglich angenommen (Crespo et al. 2000). Ramana et al. konnten außerdem zeigen, dass nach Stimulation mit IFN-γ die Proteine SOCS2 und SOCS3 auch in einem JAK1-abhängigen, STAT1-unabhängigen Signalweg induziert werden können (Ramana et al. 2001).

Hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung der SOCS-Proteine in JAK/STAT-unabhängigen Signalwegen konnte z.B. von zwei Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass JAK/STAT-unabhängig induziertes SOCS1-Protein durch Bindung an IRAK den TLR4-Signalweg inhibiert und somit teilweise für LPS-Toleranz verantwortlich sein könnte. SOCS1-defiziente Mäuse reagierten dabei hypersensitiv auf LPS mit einer gesteigerten TNF-α- und IL-12-Produktion (Kinjyo et al. 2002; Nakagawa et al. 2002). Weiterhin wurde für das SOCS3-Protein eine Rolle bei der IL-10-vermittelten Inhibition von LPS, also ebenfalls eine Wirkung im TLR-Signalweg, vorgeschlagen (Berlato et al. 2002). Von weiteren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass das SOCS1-Protein an die p65-Untereinheit von NFκB binden kann, mit dem Tyrosin-phosphorylierten Mal-Adaptorprotein (*MyD88-adaptor-like protein*) interagiert oder in endothelialen Zellen auch mit ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) assoziiert. In diesen drei Fällen bewirkte das SOCS1-Protein die Ubiquitinierung des gebundenen Proteins und führte letztendlich zu dessen proteasomaler Degradierung (Ryo et al. 2003; Saccani et al. 2004; Mansell et al. 2006; He et al. 2006; Maine et al. 2007). Dies bewirkte sowohl eine Inhibition im NFκB- als auch im MAPK-Signalweg. Kamio et. al konnten ebenfalls in einem JAK/STAT-unabhängigen Signalweg eine Funktion für das SOCS1-Protein finden. Die Gruppe konnte zeigen, dass das SOCS1-Protein zur Degradierung des E7-Proteins (Onkoprotein) des Humanen Papilloma Virus (HPV) führte und dadurch die Proliferation von HeLa-Zellen inhibierte (Kamio et al. 2004). Dieser Vorgang wurde im Nukleus beobachtet und war von der SOCS-Box des SOCS1-Proteins abhängig. Weitere SOCS-sensitive Signalwege wurden in Abbildung 1-1 aufgelistet.

Diese Daten wiesen darauf hin, dass SOCS-Proteine, im Besonderen das SOCS1-Protein, in den TLR-Signalweg eingreifen können, jedoch waren die Daten für eine direkte Inhibition zu Beginn dieser Arbeit unzuverlässig. Es blieb die Frage zu klären, welchen Einfluss die verschiedenen

SOCS-Proteine auf das komplexe intrazelluläre Netzwerk im Rahmen der TLR-vermittelten Aktivierung des angeborenen Immunsystems ausüben. Außerdem deuteten die Daten darauf hin, dass das SOCS1-Protein neben seiner inhibitorischen Wirkung im JAK/STAT-Signalweg noch andere Funktionen ausüben könnte, die vielleicht sogar entfernt von der Zytoplasmamembran an anderer Stelle in der Zelle wirksam sind.

1.4.3 Physiologische Rolle von SOCS-Proteinen

Anfänglich wurde einzelnen SOCS-Proteinen eine Gewebs- und Zytokinspezifität zugeschrieben. Mittlerweile ist allerdings klar, dass das SOCS-Inhibitionssystem durch Redundanz und Pleiotropie gekennzeichnet ist. Mehrere verschiedene Zytokine induzieren eine Gruppe von unterschiedlichen SOCS-Proteinen, die daraufhin eine Vielfalt an verschiedenen Zytokinen inhibieren können (Abbildung 1-1). Die funktionelle Bedeutung der SOCS-Proteine wurde in genetisch modifizierten Mäusen, vor allem in transgenen Mäusen oder aber auch in Mäusen, wo das entsprechende Gen deletiert wurde, bewertet. Diese Daten sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst.

Tabelle 1-2: Biologische Relevanz von SOCS-Proteinen: knockout bzw. transgene Maus-Modelle

SOCS-Protein	Phänotyp *knockout*	Phänotyp *transgen*
SOCS1	▪ neonatale Sterblichkeit ▪ Leberdegeneration ▪ hämatopoetische Infiltration verschiedener Organe ▪ Lymphopenie durch beschleunigte Apoptose und aberrante T-Zellaktivierung in der Peripherie ▪ Letalität durch Störung der Signalvermittlung von IFN-γ ▪ Veränderung der Signalvermittlung u. a. von IL-12, TNF-α, LPS, Insulin und Prolaktin	▪ Hemmung der Signalvermittlung diverser Zytokine ▪ gestörte Entwicklung von T-Zellen ▪ vermehrte Generierung von $CD4^+$ T-Zellen ▪ weniger γδ-Zellen ▪ spontane Aktivierung von T-Zellen
SOCS2	▪ Gigantismus ▪ Dysregulation der Signalvermittlung von GH und/oder IGF-1	▪ Gigantismus ▪ Dysregulation der Signalvermittlung von GH
SOCS3	▪ embryonale Letalität aufgrund einer Insuffizienz der Plazenta, Erythrozytose ▪ Veränderung der Signalvermittlung von LIF und IL-6	▪ embryonale Letalität aufgrund von Anämie ▪ verstärkte T_H2-Differenzierung mit multiplen pathologischen Merkmalen für Asthma ▪ Inhibition der NF-AT-vermittelten IL-2-Sekretion
SOCS5		▪ Unterdrückung einer humoral gewichteten T_H2-Antwort ▪ Hemmung der Signalvermittlung von IL-4
SOCS6	▪ leicht verzögertes Wachstum	
SOCS7	▪ bei Geburt 7-10 % kleiner ▪ 50% der Mäuse versterben innerhalb von 15 Wochen an einem Hydrocephalus	
CIS	▪ unauffälliger Phänotyp	▪ reduziertes Körpergewicht ▪ Störung der Laktation ▪ Veränderungen in der Leber ▪ Reduktion von NK-, NKT-, γδ-Zellen ▪ Überwiegen einer T_H2-Differenzierung ▪ Hemmung der IL-2-Signalvermittlung

Mit Hilfe genetisch veränderter Mäuse konnte für das SOCS1-Protein ein wesentlicher inhibitorischer Effekt auf den IFN-γ-Signalweg festgestellt werden. SOCS1-defiziente Mäuse sterben innerhalb von drei Wochen nach der Geburt an einem multi-inflammatorischen Syndrom mit Leberdegeneration und einer massiven Infiltration vieler Organe mit Entzündungszellen (Marine et al. 1999b; Naka et al. 1998; Starr et al. 1998). Außerdem wurde eine Lymphopenie durch beschleunigte Apoptose aufgrund der Hochregulation des proapoptotischen Proteins Bax (*Bcl-2-associated protein X*) und eine aberrante Aktivierung von peripheren T-Zellen beschrieben (Naka et al. 1998). Interessanterweise scheint der neonatale Defekt in SOCS1$^{-/-}$ Mäusen primär auf einer Hypersensitivität gegenüber IFN-γ und dem gleichzeitig erhöhten Expressionsniveaus dieses Zytokins zu beruhen. Da die peripheren T-Zellen in diesen Mäusen aktiviert sind und T-Zellen die Hauptproduzenten von IFN-γ im Rahmen einer Infektion sind, ist es wahrscheinlich, dass die überschießende IFN-γ-Wirkung auf die übermäßige Produktion von unnormal aktivierten T-Zellen in diesen Mäusen zurückzuführen ist. Die Abhängigkeit des Krankheitsbildes von lymphoiden T-Zellen konnte durch die Beobachtung untermauert werden, dass der Phänotyp von SOCS1$^{-/-}$ Mäusen durch den Transfer von hämatopoetischen Stammzellen in Rag2$^{-/-}$ Mäuse übertragen werden kann (Marine et al. 1999b). Das Krankheitsbild ähnelte dem bei Verabreichung von IFN-γ in neonatalen Mäusen. Doppeltdefiziente Mäuse für das SOCS1-Protein und IFN-γ zeigten eine verminderte Pathologie (Alexander et al. 1999). Diese Mäuse versterben erst im Alter von mehreren Monaten an einem komplexen Entzündungssyndrom mit polyzystischer Nieren-degeneration (Metcalf et al. 2002).

Eine partielle Deletion der SOCS-Box des SOCS1-Proteins resultierte in einem milderen, aber prinzipell ähnlichen Phänotyp, was auf eine signifikante Rolle der SOCS-Box hinweist (Zhang et al. 2001). Außerdem führte die Depletion von NK- (natürliche Killerzelle) und NKT- (natürliche Killer-T-) Zellen zur Abschwächung der Hepatotoxizität in SOCS1$^{-/-}$ Mäusen (Naka et al. 2001). Eine T-Zell-restringierte Überexpression des SOCS1-Proteins resultierte in einer gestörten Thymozyten-Entwicklung mit gesteigerter Zahl an CD4^{+}-Zellen und einer spontanen Aktivierung peripherer Lymphozyten. Die transgenen Mäuse zeigten eine Blockierung im Stadium der tripel-negativen Zellen im Thymus und eine spontane periphere T-Zell-Apoptose (Fujimoto et al. 2000). Diese Beobachtungen ähneln dem Phänotyp von JAK3- oder *common gamma chain*-defizienten Mäusen. Außerdem war für eine Proliferation der T-Zellen aus SOCS1-gendefizienten Mäusen die Stimulation mit IL-2 ausreichend, ein T-Zell-Rezeptorsignal war entbehrlich (Marine et al. 1999b). Trotz primärer Bedeutung des SOCS1-Proteins für IFN-γ werden auch weitere Zytokine, wie z.B. IL-4 als STAT6-abhängiges Zytokin, beeinflusst. Naka et. al konnten zeigen, dass Thymozyten aus SOCS1$^{-/-}$ Mäusen nach Gabe von IL-4 eine gesteigerte Proliferation aufwiesen und dieser Phänotyp in STAT6$^{-/-}$ SOCS1$^{-/-}$ doppeltdefizienten Mäusen reduziert war (Naka et al. 1998; Naka et al. 2001). Nach Rekonstituierung des T-Zell-Rezeptorsignalwegs in nicht-lymphoide HEK 293

Zellen durch Koexpression von CD8/ζ und Syk (*spleen tyrosine kinase*) konnte NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) aktiviert werden. Diese Aktivierung wurde durch das SOCS1-Protein inhibiert (Matsuda et al. 2000). Außerdem konnte eine differentielle Expression der SOCS-Proteine in T_H1- (IL-12/STAT4-abhängig) und T_H2- (IL-4/STAT6-abhängig) Zellen nachgewiesen werden. So zeigen z.B. T_H1-Zellen eine vermehrte Expression des SOCS1-Proteins. Dieses wiederum inhibiert den durch IL-4-induzierten STAT6-abhängigen Signalweg und führt somit zur Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen zu T_H1-Zellen. Demgegenüber wird das SOCS3-Protein verstärkt in T_H2-Zellen exprimiert und inhibiert hier die IL-12-induzierte STAT4-Aktivierung (Egwuagu et al. 2002). Weiterhin antworten SOCS1-defiziente Mäuse mit erhöhter Produktion an IFN-γ bzw. IL-4 auf Infektion mit T_H1- und T_H2-Modellorganismen (*Listeria monocytogenes, Nippostrongylus brasiliensis*), was auf eine generell gestörte Differenzierung in diesen Mäusen schließen lässt (Fujimoto et al. 2002). Auf der Ebene der B-Zellen konnte bislang kein spezifischer Defekt beobachtet werden, aber es scheint, dass die reduzierte Zellzahl an B-Lymphozyten in $SOCS1^{-/-}$ Mäusen auf eine gesteigerte Apoptose aufgrund einer länger anhaltenden IFN-γ-Wirkung zurückzuführen ist.

$SOCS3^{-/-}$ Mäuse sind embryonal letal und zeigen Erythrozytose und Störungen der Trophoblastenbildung mit Plazentainsuffizienz. Eine Überexpression resultierte ebenso in embryonaler Letalität mit Anämie. SOCS3-defiziente, fetale Leberzellen jedoch waren in der Lage, die Hämatopoese in bestrahlten und JAK3-defizienten Mäusen zu rekonstituieren (Marine et al. 1999a). Eine interessante Beobachtung ist, dass die SOCS3-vermittelte Inhibition STAT3-aktivierende Rezeptoren unterschiedlich beeinflusst (Niemand et al. 2003). So inhibiert das SOCS3-Protein die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung über den gp130-Rezeptor, während keine Inhibition am IL-10-Rezeptor zu beobachten war (aktiviert ebenfalls STAT3). Dies wurde als differentielle SOCS3-Wirkung interpretiert und könnte erklären, weshalb IL-10 die Signalwirkung von IL-6 inhibiert, selbst aber STAT3 weiter aktivieren kann (Yasukawa et al. 2003). Mit Hilfe chimärer SOCS3-Mäuse (Transfer von embryonalen $SOCS3^{-/-}$ Leberzellen in adulte, bestrahlte Mäuse) und Makrophagen-spezifischen SOCS3-defizienten Mäusen konnten weitere Einblicke in die Bedeutung des SOCS3-Proteins gewonnen werden (Lang et al. 2003; Yasukawa et al. 2003; Croker et al. 2003). Das SOCS3-Protein stellt einen wichtigen Negativregulator im IL-6-Signalweg dar. IL-6 ist an der Regulation von verschiedenen biologischen Mechanismen, wie z.B. Genexpression, Zellproliferation und Differenzierung beteiligt. Die Mäuse zeigten eine vermehrte Geninduktion nach IL-6-Gabe, insbesondere mit einer Erweiterung um STAT1-abhängige Gene, welche normalerweise nach IL-6 nicht induziert werden (STAT3-abhängig). In Versuchen mit Makrophagen aus SOCS3-Chimären bzw. mit Makrophagen- und Hepatozyten-spezifischen SOCS3-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte IL-6-Signalgebung in diesen Zellen vorlag. Außerdem zeigen diese Arbeiten, dass induziertes SOCS3-Protein die

Aktivierung von STAT1-abhängigen Genen nach IL-6-Stimulation verhinderte. Somit wird sichergestellt, dass keine IFN-γ-ähnliche Wirkung während einer Zellstimulation mit IL-6 dominierte. Damit zeigte sich eine gewisse Spezifität des SOCS3-Proteins für den IL-6-Signalweg. Daraus wird ersichtlich, dass SOCS-Proteine von verschiedenen Stimuli im angeborenen Immunsystem induziert werden können und dort eine entscheidende Rolle spielen. So kann sowohl IFN-γ als auch IL-6 eine Expression des SOCS1- und SOCS3-Proteins hervorrufen. Die Proteine üben dann eine spezifische Rolle im IL-6- und IFN-γ-Signalweg aus und koordinieren geeignete biologische Antworten dieser Zytokine. Eine T-Lymphozyten-spezifische Überexpression des SOCS3-Proteins führte zu einer verstärkten T_H2-Differenzierung mit multiplen pathologischen Merkmalen charakteristisch für Asthma. Dagegen hatte die Deletion des SOCS3-Proteins oder dominant negative SOCS3-transgene Mäuse gegenteilige Effekte (Seki et al. 2003). Auch das SOCS3-Protein wird nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation induziert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der retrovirale Transfer des SOCS3-Proteins in primäre murine T-Zellen die NFAT-vermittelte IL-2-Sekretion inhibierte (Li et al. 2000).

Die Deletion des CIS-Proteins erbrachte keinen pathologischen Phänotyp. Allerdings führte eine Überexpression zu einer reduzierten Zahl an γδ-T-Zellen, NK- und NKT-Zellen (Matsumoto et al. 1999). Außerdem war die IL-2-vermittelte STAT5-Aktivierung inhibiert. Zum anderen zeigten sich noch Veränderungen in der Leber und Laktationsdefekte. Das Krankheitsbild hatte damit Ähnlichkeiten zum Phänotyp der STAT5a- oder STAT5b-defizienten Mäuse. Deshalb wird dem CIS-Protein eine spezielle Rolle im STAT5-Signalweg zugeschrieben. Außerdem ist für das CIS-Protein eine verstärkte MAPK-Aktivierung nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation beschrieben worden (Li et al. 2000).

Sowohl SOCS2-gendefiziente als auch SOCS2-transgene Mäuse waren zum Zeitpunkt der Geburt normal entwickelt. Ab der dritten Woche zeigten sie allerdings ein schnelleres Wachstum gegenüber den Wildtyp-Mäusen. Dies äußerte sich in vergrößerten Knochen und erweiterten visceralen Organen als Ergebnis einer erhöhten Zellzahl. Dieser Gigantismus war auf dysreguliertes Wachstumshormon (*growth hormone*, GH) und/oder IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) zurückzuführen (Metcalf et al. 2000; Greenhalgh et al. 2002). Außerdem konnte in diesen Mäusen eine verdickte Dermis aufgrund von Kollagen-Akkumulationen beobachtet werden. Daraus ist ersichtlich, dass das SOCS2-Protein zwei gegenteilige Effekte aufweist: bei niedrigen Konzentrationen inhibiert es die GH-induzierte STAT5-abhängige Gentranskription, dagegen führte es bei höheren Konzentrationen zu einer Wiederherstellung des GH-Signalwegs (Favre et al. 1999).

Über die Funktion und das Vorkommen der Proteine SOCS4, SOCS5, SOCS6 und SOCS7 ist bislang nur wenig bekannt. Das SOCS5-Protein wird vorzugsweise in ausdifferenzierten T_H1-Zellen exprimiert. Hier interagiert es mit der zytoplasmatischen Region der IL-4-α-Rezeptorkette unabhängig von einer vorhandenen Tyrosin-Phosphorylierung und inhibiert dadurch die IL-4-vermittelte STAT6-Aktivierung und T_H2-Differenzierung. In SOCS5-transgenen Mäusen konnte eine verminderte IL-4-vermittelte T_H2-Entwicklung beobachtet werden (Seki et al. 2002). Allerdings konnte in $SOCS5^{-/-}$ Mäusen keine spezifische Rolle des SOCS5-Proteins in der Lymphozyten-Funktion nachgewiesen werden. CD4+ T-Zellen aus diesen Mäusen zeigten eine normale T_H1/T_H2-Antwort *in vivo* und *in vitro* (Brender et al. 2004). Dieses widersprüchliche Ergebnis in den SOCS5-gendefizienten Mäusen könnte dadurch erklärt werden, dass das SOCS5-Protein in seiner Funktion z.B. vom SOCS4-Protein kompensiert wird, da dieses Protein signifikante Homologien mit dem SOCS5-Protein teilt. Außerdem wurde gezeigt, dass der Signalweg von IL-6 und LIF teilweise durch das SOCS5-Protein inhibiert werden kann, allerdings weniger potent als durch das SOCS1- oder SOCS3-Protein (Nicholson et al. 1999). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte das SOCS5-Protein auch als Negativregulator im Signalweg des epidermalen Wachstumsfaktors (*epidermal growth factor,* EGF) identifizieren (Nicola et al. 1999). Auch für das SOCS4-Protein konnte eine negativ regulatorische Funktion im Signalweg des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden (Kario et al. 2005). Nck, Ash/Grb-2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), PLC-γ (*phospholipase C gamma*) und EGF-Rezeptor können vom SOCS7-Protein gebunden werden (Matuoka et al. 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das SOCS7-Protein mit phosphoryliertem STAT3 und STAT5 interagiert, deren Translokation in den Zellkern verhindert und dadurch der Signalweg von Prolactin, Leptin und des Wachstumshormons inhibiert wird (Martens et al. 2005). Krebs et al. konnten eine Interaktion des SOCS7- und SOCS6-Proteins über deren SH2-Domäne mit IRS-2 und IRS-4 (*insulin receptor substrate*) sowie der regulatorischen Untereinheit (p85) der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) nachweisen (Krebs et al. 2002). Weiterhin ist vom SOCS6-Protein bekannt, dass es nach Insulin-Verabreichung an den Insulin-Rezeptor bindet und dadurch nachfolgende Signalwege, wie z.B. die Aktivierung von ERK1/2, Akt/PKB (*protein kinase B*) und IRS-1, inhibieren kann (Mooney et al. 2001). $SOCS6^{-/-}$ defiziente Mäuse entwickeln sich normal und zeigen keine Defekte in der Hämatopoese oder der Glukose-Homöostase. Allerdings zeigen die defizienten Mäuse ab der fünften Woche nach der Geburt ein beständig erniedrigtes Körpergewicht von 8-10 % gegenüber den Kontrollmäusen (Krebs et al. 2002). $SOCS7^{-/-}$ Mäuse waren bei der Geburt 7-10 % kleiner als die Wildtyp-Mäuse. Innerhalb von 15 Wochen verstarben etwa 50% der gendefizienten Mäuse an einem Hydrocephalus (Krebs et al. 2004).

1.4.4 Bedeutung der SOCS-Proteine im Immunsystem

Aufgrund der pleiotropen Beeinflussung von Zytokinen durch SOCS-Proteine ist es offensichtlich, dass diese Proteine eine wichtige regulatorische Rolle im Immunsystem spielen. Klinische Befunde weisen darauf hin, dass individuelle SOCS-Proteine für bestimmte Funktionen des angeborenen oder adaptiven Immunsystems eine besondere Bedeutung einnehmen. So konnte z.B. eine gesteigerte SOCS3-Expression bei entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt werden (Suzuki et al. 2001). Dem gegenüber konnte ein protektiver Effekt des SOCS3-Proteins nach Übertragung mittels adenoviralen Gentransfers in einem experimentellen Modell der Antigen- und Kollagen-induzierten Arthritis beobachtet werden (Shouda et al. 2001). Zusätzlich unterstreicht die erhöhte Expression des SOCS1- und SOCS3-Proteins bei Patienten mit Psoriasis und allergischer Kontaktdermatitis die Rolle der SOCS-Proteine im Rahmen von proinflammatorischen Situationen (Federici et al. 2002). Außerdem könnte die zum Teil zu beobachtende schlechte Ansprechbarkeit auf Interferon bei Patienten mit einer Hepatitis C Virus (HCV) Infektion oder mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) mit SOCS-Proteinen assoziiert sein (Sakai et al. 2002; Huang et al. 2007). Die meisten humanen hepatozellulären Karzinome (HCCs) werden durch eine HCV-Infektion hervorgerufen. Die Expression des SOCS1-Proteins ist in diesen Tumoren oft durch Hypermethylation der CpG-Inseln im SOCS1-Promotor herunterreguliert (Yoshikawa et al. 2001; Yoshimura 2006). Einzel-Nukleotid Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs) in der SOCS1-Sequenz und ein verstärktes SOCS3-mRNA-Niveau in T-Zellen wurden mit Asthma assoziiert (Seki et al. 2003; Harada et al. 2007).

1.5 Wissenschaftliche Fragestellung

SOCS-Proteine werden in der Literatur als induzierbare, negativ wirkende Regulatoren von Zytokin-vermittelten Aktivierungssignalen bezeichnet. Bislang wurde davon ausgegangen, dass diese Proteine ihren inhibitorischen Einfluss sehr weit proximal im JAK/STAT-Signalweg am Rezeptorkomplex ausüben. Dabei soll das SOCS1-Protein direkt an Rezeptor-gebundene Janus-Kinasen binden und dadurch deren Kinase-Aktivität inhibieren. Im Gegensatz dazu interagiert das SOCS3-Protein mit phosphorylierten Tyrosin-Resten in den Rezeptorketten und inhibiert dadurch die Aktivität der Janus-Kinasen. Die hemmende Wirkung des CIS-Proteins wird wahrscheinlich durch Kompetition mit STAT-Molekülen hervorgerufen. Dabei bindet das CIS-Protein über die SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosin-Reste in den Rezeptorketten und verhindert dadurch die Rekrutierung von STAT-Molekülen an den Rezeptor. Neuere Daten weisen jedoch darauf hin, dass diese inhibitorische Funktion möglicherweise auch im Toll-like Rezeptor-Signalweg eine besondere Rolle spielt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von SOCS-Proteinen (SOCS1, SOCS2, SOCS3, CIS) für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch prototypische TLR-

abhängige Stimuli untersucht werden. Dazu sollte zunächst untersucht werden, wie SOCS-Proteine nach TLR-Aktivierung induziert werden. Es sollten Peritonealmakrophagen aus MyD88- und Wildtyp-Mäusen generiert und mit TLR-Liganden stimuliert werden, um die Abhängigkeit vom MyD88-abhängigen Signalweg zu testen. Außerdem sollte untersucht werden, ob SOCS-Transkription direkt durch TLR-Stimulation induziert wird. Entsprechend neueren Befunden zur TLR-Signaltransduktion sollten SOCS-Proteine weiterhin in ihrer Wirkung auf direkte Zielgene nach TLR-Stimulation (MAPK-, NFκB-abhängig) und auf eine Funktion im indirekten IFN-β/STAT1-abhängigen Weg untersucht werden.

Der zweite Teil der Arbeit sollte sich mit der zellulären Verteilung der drei wichtigsten SOCS-Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS beschäftigen. Dazu sollten Fusionsproteine bestehend aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und den verschiedenen SOCS-Proteinen generiert werden. Diese sollten in verschiedenen Zellen hinsichtlich Lokalisation und Veränderung nach Stimulation untersucht werden. Überraschenderweise zeigte sich für das SOCS1-Protein eine unerwartete Expression im Nukleus, so dass im Weiteren die Mechanismen untersucht werden sollten, welche zu der beobachteten subzellulären Expression beitragen. Dazu wurden verschiedene Mutanten des SOCS1-Proteins generiert. Schließlich sollten die verschiedenen Mutanten hinsichtlich ihrer Wirkung im JAK/STAT-Signalweg untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Abzug	Variolab Mobilien W90, Waldner-Laboreinrichtungen GmbH, Wangen
Agarosegel-Elektrophoresesystem	PerfectBlue™ Mini S, Peqlab, Erlangen
Bakterienschüttler	Inkubator 1000, Unimax 1010 Schüttler, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
beheizbare Kammer	POC (perfusion, open & closed cultivation) mini-Chamber-System, PeCon GmbH, Erbach
Blot-Kammer	PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S, Peqlab, Erlangen
Brutschränke	1. BBD 6220, Heraeus Instruments, Hanau 2. Begasungsbrutschrank B 5060 EK/CO_2, Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™, BD Biosciences, Heidelberg
Flockeneisbereiter	Scotsman® AF-30, ENODIS Deutschland GmbH, Herborn
Geldokumentationssysteme	1. Chemi-Smart 5000, Peqlab, Erlangen 2. Infinity Video-Dokumentationssystem, Modell 3000, Peqlab, Erlangen
Heizblock	Accu Block™ Digital Dry Bath, Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Kühl- und Gefriergeräte	1. diverse Geräte, Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen 2. HERAfreeze® (-80°C), Heraeus Instruments, Hanau
Laborgasbrenner	Gasprofi 2^{SCS}, WLD-TEC GmbH, Göttingen
Magnetrührer (beheizbar)	IKA® RCT basic, IKA®-Labortechnik, Staufen i.Br.
Mikroskope	1. Auflichtmikroskop, Leica DMLS, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar 2. Fluoreszenz-Inversmikroskop, Leica DMI 6000B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar 3. Inversmikroskop, Axiovert 25 CFL, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena 4. LSM 510 Meta (Laserscanmikroskop), Carl Zeiss Microimaging, Göttingen

Mikrotiterplatten-Photometer	SUNRISE Absorbance Reader, Tecan, Salzburg, Österreich
Mikrowellengerät	R-234, Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Minimembran-Vakuumpumpe	Laboport® N 811 KN.18, KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Netzgerät	Consort Power Supply E 835, Peqlab, Erlangen
pH-Messgerät	SevenEasy™, Mettler Toledo GmbH, Gießen
Pipettierhilfen	Pipetboy acu, Integra Biosciences AG, Chur, Schweiz
Plattenluminometer	Chameleon™ II Multilabel Platereader, Hidex Oy, Turku, Finnland
Schüttler	1. Mini Rocker MR-1, Peqlab, Erlangen 2. RS-24 (Überkopfschüttler), Lab4You GmbH, Berlin 3. MS 1 Minishaker (Vortexer), IKA® Works Inc., Wilmington, USA
SDS-PAGE System	PerfectBlue™ Twin S, Peqlab, Erlangen
Sicherheitswerkbänke	1. HERAsafe®, Klasse II, Heraeus Instruments, Hanau 2. HB 2448, Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler	1. quantitative RT-PCR: 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt 2. Primus 25 advanced®, Peqlab, Erlangen 3. Primus 96 advanced® Gradient, Peqlab, Erlangen
UV/Vis-Spektralphotometer	NanoDrop® ND-1000, Peqlab, Erlangen
UV-Leuchttisch	ECX-26M, Peqlab, Erlangen
Waage	EW600-2M, Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	WB/OB 22, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Zählkammer	Neubauer 0,0025 mm^2/0,1 mm, Brand GmbH, Schwerin
Zentrifugen	1. Multifuge 3 S-R, Heraeus Instruments, Hanau 2. Biofuge stratos, Heraeus Instruments, Hanau 3. Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Hanau 4. Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Blot-Membran	Immobilon-P Transfer Membran, PVDF, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Schwalbach
Blotting-Papier	Whatman® Schleicher & Schuell GB003, Whatman GmbH, Dassel
Deckgläser	1. rund, ø 12 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe 2. rund, ø 30 mm x 0,17 mm, PeCon GmbH, Erbach
Einfrierröhrchen	CryoTubes™, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Einmal-Impfösen	Looplast®, LP ITALIANA SPA, Milan, Italien
FACS-Röhrchen	BD Falcon™ 5 ml Rundboden-Röhrchen (Polystyrol), BD Biosciences, Heidelberg
Flachboden-Platte	PS-Microplate, 96-well, nicht steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kanülen	27G, 0,4mm x 19 mm, BD Biosciences, Heidelberg
Lumineszenz-Platten	CulturPlate™, weiß, 96-well, steril, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Objektträger	beidseitiger Mattrand, Süße GmbH, Gudensberg
Parafilm	American National Can™, Chicago, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Platten	Thermo-Fast® 96 Detection Plate, ABgene House, Epsom, UK
PCR-Platten-Abdeckfolien	ABsolute QPCR Seal, ABgene House, Epsom, UK
Petrischalen	94 mm x 16 mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	1. TipOne® (0,1-100 µl; 1-200 µl; 101-1000 µl), Pipette Tips, Starlab GmbH, Ahrensburg 2. TipOne® (0,1-100 µl; 1-200 µl; 101-1000 µl), Filter Tips, Starlab GmbH, Ahrensburg
Reaktionsgefäße	1. Safe-Lock (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml), Eppendorf AG, Hamburg 2. PP-PCR-Gefäße (0,2 ml; 0,5 ml), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Skalpelle	disposable Scalpel, Feather Safety Razor CO., Ltd., Osaka, Japan
Spritzen	BD Discardit II, 5 ml, BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter	Millex®-GS 0,22 µm, Millipore, Billerica, USA
Transwelleinsätze/Platten	Costar® 6,5 mm Transwell, 0,4 µm Porengröße, klares Polyester, 24-well, Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflaschen	Cellstar® 25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2, PS, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Cellstar® 6-, 12-, 24-well, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturröhrchen	1. Cellstar® 15 ml und 50 ml (Falcon-Röhrchen), PP, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen 2. PP-tube, 5 ml, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	144 mm x 21 mm (145 cm^2), Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellschaber	Disposable Cell Scraper, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Gebrauchsfertige Kits

BCA™ Protein Assay Reagent Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Cryobank™ System	Mast Diagnostica Laboratoriums-Präparate GmbH, Reinfeld
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
High Speed Maxi Kit	Qiagen, Hilden
High Speed Midi Kit	Qiagen, Hilden
Immobilon™ Western Chemilumineszenz HRP Substrat	Millipore, Schwalbach
Luminescence Reporter Gene Assay System (LucLite®)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
NEB 5-alpha	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
qPCR™ Core Kit	Eurogentec, Belgien
QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
TOP10 One Shot™ Kit	Invitrogen™, Karlsruhe

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

2.1.4.1 Allgemeine Chemikalien, Biochemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und hatten den Reinheitsgrad „reinst“ oder „pro analysi“.

Aceton	Riedel-de Haën AG, Seelze
Acrylamid rotiphenol	Roth, Karlsruhe
Agar Bacteriological	Agar No. 1, Oxoid GmbH, Wesel
Agarose ultra pure	Gibco BRL, Life Technologies™, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Annealing-Puffer (10x)	Imgenex Corporation, San Diego, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad iniectabilia (10 ml, 1000 ml)	Braun, Melsungen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ciprobay® Infusionslösung (200 mg/100 ml)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes Inc., Eugene, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, 1x)	Biochrom AG, Berlin
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACSClean™	BD Biosciences, Heidelberg
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)[1]	Biowest, Nuaillé, Frankreich
Gel-Ladepuffer (6x) für Agarosegele	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Geneticin (G418, 50 mg/ml)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Igepal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Kanamycin	Invitrogen™, Karlsruhe
LB Broth Pulver	Invitrogen™, Karlsruhe
Leupeptin (-hydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin, 200mM (100x)	Biochrom AG, Berlin
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen™, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2x6H_2O$)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Mounting Medium	AF1, Citifluor Ltd., London, UK
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natronlauge (1 M)	Merck, Darmstadt

[1] FCS Chargennummer: S04224S1810; Endotoxingehalt: 0,2 EU/ml

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium with GlutaMAX™ I (1x)	Invitrogen™, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (1x) für Zellkultur	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Merck, Darmstadt
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure (37%)	Merck, Darmstadt
N,N,N´,N´-Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Thioglykolat	BD Pharmingen, Heidelberg
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4.2 Wasser

Entscheidend für die Durchführung von Stimulationsexperimenten mit mikrobiellen Liganden ist die Abwesenheit von Endotoxin. Demzufolge wurden alle Lösungen und Stimulanzien für die Zellkultur mit pyrogen-freiem Wasser für Injektionszwecke (Braun, Melsungen) angesetzt.

2.1.5 Lösungen

	Konzentration	Lösungsmittel	Lagerung
Aprotinin	1 mg/ml	Aqua dest.	-20°C
BSA	2 mg/ml	Aqua dest.	-20°C
DAPI	14,3 mM	Aqua dest.	-20°C
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Aqua dest.	4°C
Kanamycin	50 mg/ml	Aqua dest., steril filtriert	-20°C
Leupeptin	1 mg/ml	Aqua dest.	-20°C
β-Mercaptoethanol	10 mM	PBS, steril filtriert	-20°C

Na_3VO_4	200 mM	Aqua dest.[2]	-20°C
NaF	200 mM	Aqua dest.	Raumtemperatur
Paraformaldehyd	4% (w/v)	PBS, gelöst bei 56°C	-20°C
Pepstatin	1 mg/ml	Methanol	-20°C
PMSF	200 mM	Isopropanol	4°C
Poly-D-Lysin	0,1 mg/ml	Aqua dest.	-20°C
Thioglykolat	4% (w/v)	Aqua dest., autoklaviert	4°C, lichtgeschützt
Trypanblau	2 mg/ml	PBS, steril filtriert	Raumtemperatur

2.1.6 Puffer

Western Blot

RIPA-Lysepuffer

Tris-HCl, pH 7,4	50	mM
Igepal	1	% (v/v)
Natriumdeoxycholat	0,25	% (v/v)
NaCl	150	mM
EDTA	1	mM

Komplementierung des Puffers direkt vor Gebrauch mit:

je 1 µg/ml	Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin [Protease-Inhibitoren]
je 1 mM	Na_3VO_4, NaF [Phosphatase-Inhibitoren], PMSF [Protease-Inhibitor]

SDS-Laufpuffer (10 min entgast)

Tris-Base, pH 8,3	25	mM
Glycin	192	mM
SDS	0,1	% (w/v)

SDS-Blotpuffer (10 min entgast)

Tris-Base, pH 8,3	25	mM
Glycin	192	mM
Methanol	10	% (v/v)

4x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	200	mM
β-Mercaptoethanol	20	% (v/v)
SDS	8	% (w/v)
Glycerol	40	% (v/v)
Bromphenolblau 1% (w/v)	0,04	% (w/v)

Stripping-Puffer

Tris-HCl, pH 6,7	62,5	mM
β-Mercaptoethanol	100	mM
SDS	2	% (w/v)

[2] Aktivierung von Natriumorthovanadat: Na_3VO_4 wurde in einer Konzentration von 200 mM in Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 10 eingestellt (Gelbfärbung). Die Lösung wurde gekocht bis sie klar wurde und auf Zimmertemperatur abgekühlt. pH-Wert-Einstellung und Aufkochen der Lösung wurden so oft wiederholt bis sich der pH-Wert bei 10 stabilisiert hatte und die Lösung farblos blieb.

2x SDS-Sammelgelpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	250	mM
SDS	0,2	% (w/v)

3x SDS-Trenngelpuffer

Tris-HCl, pH 8,8	1,125	M
SDS	0,3	% (w/v)

Blockpuffer / Antikörper-Verdünnungspuffer

BSA	3	% (w/v)
Tween 20	0,1	% (v/v)
in 1x TBS		

Waschpuffer

Tween 20	0,1	% (v/v)
in 1x TBS		

10x TBS (Tris buffered saline)

Tris-HCl, pH 8,0	100	mM
NaCl	1,5	M

Zellfraktionierung

hypotoner Lysepuffer

Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
NaCl	10	mM
$MgCl_2$	3	mM
EDTA	1	mM
Dithiothreitol	1	mM

nukleärer Isolationspuffer

Tris-HCl, pH 7,5	10	mM
NaCl	10	mM
$MgCl_2$	3	mM
EDTA	1	mM
Dithiothreitol	1	mM
Igepal	0,5	% (v/v)

2%-iger Triton-haltiger nukleärer Isolationspuffer

Tris-HCl, pH 7,5	20	mM
NaCl	280	mM
EDTA	1	mM
Dithiothreitol	1	mM
Triton X-100	2	% (v/v)

Komplementierung aller Zellfraktionierungspuffer direkt vor Gebrauch mit:

je 5 µg/ml	Aprotinin, Leupeptin
3 µg/ml	Pepstatin
1 mM	Na_3VO_4

zusätzlich in den 2%-igen Triton-haltigen nukleären Isolationspuffer:

10 mM	NaF

diverse Puffer

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer

Tris-Acetat, pH 8,0	2	M
EDTA	100	mM

TE (Tris-EDTA) Puffer

Tris-HCl, pH 8,0	10	mM
EDTA	1	mM

2.1.7 Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmidname	Basisvektor	Insert	Beschreibung	Herkunft
pEF-FLAG-I/ mSOCS1	pEF-BOS (Mizushima and Nagata 1990)	Flag Epitop (N-terminal) und murines SOCS1	Expressionsplasmid für das Fusionsprotein Flag-mSOCS1 unter der Kontrolle des EF1α Promotors	D. J. Hilton[1], Victoria, Australien
pEF-FLAG-I/ mSOCS3	pEF-BOS (Mizushima and Nagata 1990)	Flag Epitop (N-terminal) und murines SOCS3	Expressionsplasmid für das Fusionsprotein Flag-mSOCS3 unter der Kontrolle des EF1α Promotors	D. J. Hilton[1], Victoria, Australien
pcDNA3/ mCIS1	pcDNA3 (Invitrogen)	c-myc Epitop (N-terminal) und murines CIS	Expressionsplasmid für das Fusionsprotein c-myc-mCIS unter der Kontrolle des CMV Promotors	A. Yoshimura[2], Kurume, Japan
pBS-hSOCS1	pBlueskript Sk(+)	humanes SOCS1	Klonierungsplasmid	D. J. Hilton[1], Victoria, Australien
pEF-FLAG-I/ hSOCS3	pEF-BOS (Mizushima and Nagata 1990)	Flag Epitop (N-terminal) und humanes SOCS3	Expressionsplasmid für das Fusionsprotein Flag-hSOCS3 unter der Kontrolle des EF1α Promotors	D. J. Hilton[1], Victoria, Australien
pcDNA3/ hCIS	pcDNA3 (Invitrogen)	c-myc Epitop (N-terminal) und humanes CIS	Expressionsplasmid für das Fusionsprotein c-myc-hCIS unter der Kontrolle des CMV Promotors	A. Yoshimura[2], Kurume, Japan
pISRE-Luc	pFR-Luc (Stratagene)	Firefly-Luciferase	Reporterplasmid für die Expression eines Luciferase-Gens unter der Kontrolle eines Minimal-promotors (TATA-Box) mit fünf ISRE Elementen (STAT1/STAT2/IRF9-abhängige Bindestellen)	Stratagen, Amsterdam, Niederlande
pEGFP-C1	pEGFP-C1 (BD Clontech)	GFP (liegt N-terminal von der multiplen Klonierungsstelle)	Expressionsplasmid für das GFP Protein unter der Kontrolle eines CMV Promotors	BD Clontech, Heidelberg
pEGFP-N1	pEGFP-N1 (BD Clontech)	GFP (liegt C-terminal von der multiplen Klonierungsstelle)	Expressionsplasmid für das GFP Protein unter der Kontrolle eines CMV Promotors	BD Clontech, Heidelberg

[1] The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia
[2] Division of Molecular and Cellular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Fusionsproteine bestehend aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und den SOCS-Proteinen SOCS1, SOCS3 oder CIS hergestellt. Dazu wurde GFP entweder C- oder N-terminal an die murinen und humanen SOCS-Proteine fusioniert (2.2.2.1).

Nomenklatur der hergestellten Plasmide:

pEGFP-C1[3]-h/m[4]-X[5]; pEGFP-N1[3]-h/m[4]-X[5]

[3] C1: NH_2-GFP-SOCS-COOH; N1: NH_2-SOCS-GFP-COOH
[4] h: humane oder m: murine Sequenz
[5] X: SOCS1, SOCS3 oder CIS

Weiterhin wurden verschiedene Mutationen eingefügt in:

pEGFP-C1-hSOCS1 (2.2.2.2)

F58A; R104K; P165X; R172X; 1R/A (R170A); 2R/A (R170A, R169A); 3R/A (R170A, R169A, R167A); 4R/A (R170A, R169A, R167A, R160A); 5R/A (R170A, R169A, R167A, R160A, R159A); 6R/A (R170A, R169A, R167A, R160A, R159A, R172A); hS1/Del [S1(Δ158-173)]; hS1/Del+hS3 [S1(Δ158-173)+S3(175-188)]

pEGFP-C1-hCIS (2.2.2.3)

hCIS/A204S; hCIS/NLS (hCIS/A204S+NLS [S1(159-173)])

2.1.8 Primer, Sonden

Für die Klonierung der verschiedenen SOCS-Proteine in die Leervektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 wurden Standardmethoden zur Primerentwicklung benutzt. Die Primerlänge für den komplementären Bereich lag zwischen 16 und 22 Basenpaaren (bp). Die Primer wurden an ihrem 5´-Ende um eine Endonukleaseschnittstelle erweitert. Diese wurde zusätzlich mit vier Nukleotiden zum optimalen Schneiden der Restriktionsenzyme während der Klonierung und zum Teil mit ein oder zwei weiteren Nukleotiden zum Verhindern eines Leseraster-Wechsels (*frame shift*) ergänzt. Dies verlängerte den Primer um 10-12 bp. Am 3´-Terminus jedes Primers lagen optimalerweise ein oder mehrere G- oder C-Nukleotide. Es wurde auf einen ausgeglichenen G/C- zu A/T-Gehalt in der bindenden Region der Primer geachtet. Die Schmelztemperatur für beide Primer wurde annährend gleich gewählt und lag zwischen 55 und 62°C. Außerdem wurde darauf geachtet, dass keine Dimerbildung mit sich selbst oder mit dem Gegenstrangprimer möglich war. Haarnadelstrukturen sowie lange G/C- oder poly(A)-Abschnitte in den Primern wurden ebenso vermieden.

Für Mutationsprimer nach der QuikChange XL Methode (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurde eine Gesamtlänge zwischen 29 und 45 bp (N) verwendet, die Mutationen lagen in der Mitte der komplementären Primer und die Schmelztemperatur der Primer war größer oder annähernd 78°C. Zur Berechnung der Schmelztemperaturen T_m wurde folgende Formel verwendet:

$$T_m = 81{,}5 + 0{,}41 \cdot (\%GC) - 675/N - \%Fehlpaarung \qquad (1.)$$

Bei einer Deletion oder Insertion lag der entsprechende Bereich in der Mitte der Primer und wurde von etwa 10-15 komplementären Nukleotiden auf beiden Seiten flankiert. In diesem Fall wurde zur Kalkulation der Schmelztemperatur der Primer (42-59 bp) die folgende Formel (2.) verwendet. Dabei schließt N (Anzahl der bp) nicht die deletierten oder inserierten Basenpaare ein.

$$T_m = 81{,}5 + 0{,}41 \cdot (\%GC) - 675/N \qquad (2.)$$

Primer für die quantitative RT-PCR wurden mittels des über das Internet zugänglichen Primer3-Programms (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) unter Berücksichtigung der

Exon/Intron-Strukturen entworfen. Es wurden Intron-überspannende Primer verwendet, sodass kein genomisches Amplifikat entstehen kann. Bei einem monoexonischen Gen wurde ein ausreichender DNA-Verdau sichergestellt, um die Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden. Zur Überprüfung der Freiheit von genomischer DNA wurde eine no-RT Kontrolle mitgeführt. Diese enthielt keine reverse Transkriptase im Reaktionsansatz. Weiterhin wurde nach der quantitativen RT-PCR mittels eines DNA-Agarosegels überprüft, ob die PCR spezifisch und somit auch nur ein Fragment in der zu erwartenden Größe im Gel sichtbar war. Außerdem wurde bei der Generierung beider Primer auf einen annähernd gleichen Schmelzpunkt und auf einen ausgeglichenen G/C- zu A/T-Gehalt geachtet. Weiterhin sollten die Primer mindestens 20 bp lang sein, damit eine ausreichende Spezifität zur gesuchten Zielsequenz vorliegt. Die Spezifität der Primer wurde mitttels BLAST (*basic local alignment search tool*; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) überprüft.

Lyophilisierte Primer (MWG-Biotech AG, Martinsried) wurden im Maßstab 0,01 µmol, Reinheit HPSF, bestellt, in Aqua dest. gelöst und auf eine Endkonzentration von 50 pmol/µl (Primer für die Klonierung in pEGFP-C1 und pEGFP-N1, quantitative RT-PCR und Sequenzierprimer), 100 ng/µl (Primer für QuikChange XL Methode) oder 1 µg/µl (Primer für Insertion der NLS in pEGFP-C1-hCIS) eingestellt. Die ebenfalls lyophilisierten Sonden (Eurogentec, Belgien) für die quantitative RT-PCR wurden in 0,1x TE-Puffer gelöst und auf 10 pmol/µl eingestellt. Alle Sonden waren 5´-FAM (6-Carboxyfluorescein) und 3´-TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) markiert. Primer und Sonden wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2-1, Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Primersequenzen für Klonierungen von murinem und humanem SOCS1, SOCS3 und CIS in pEGFP-C1 und pEGFP-N1

Plasmidname	Primer	Sequenz [5´-3´]	Schnittstelle
pEGFP-C1-mSOCS1	mSOCS1_fw cl C	AGC TCT CGA GGA ATG GTA GCA CGC AAC CAG GTG	XhoI
	mSOCS1_rv cl C	AGC TGG ATC CTC AGA TCT GGA AGG GGA A	BamHI
pEGFP-C1-mSOCS3	mSOCS3_fw cl C	AGC TCT CGA GGA GTC ACC CAC AGC AAG TTT	XhoI
	mSOCS3_rv cl C	AGC TGG ATC CTT AAA GTG GAG CAT CAT A	BamHI
pEGFP-C1-mCIS	mCIS_fw cl C	AGC TAG ATC TTC TTG TCC TTT GCT GGC TGT G	BglII
	mCIS_rv cl C	AGC TGT CGA CTC AGA GTT GGA AGG GGT ACT G	SalI
pEGFP-C1-hSOCS1	hSOCS1_fw cl C	AGC TCT CGA GGA ATG GTA GCA CAC AAC CAG G	XhoI
	hSOCS1_rv cl C	AGC TGG ATC CTC AAA TCT GGA AGG GGA A	BamHI
pEGFP-C1-hSOCS3	hSOCS3_fw cl C	AGC TCT CGA GGA ATG GTC ACC CAC AGC AAG	XhoI
	hSOCS3_rv cl C	AGC TGG ATC CTT AAA GCG GGG CAT CG	BamHI
pEGFP-C1-hCIS	hCIS_fw cl C	AGC TAG ATC TGT CCT CTG CGT TCA GGG AC	BglII
	hCIS_rv cl C	AGC TGT CGA CTC AGA GCT GGA AGG GGT ACT	SalI
pEGFP-N1-mSOCS1	mSOCS1_fw cl N	AGC TCT CGA GAT GGT AGC ACG CAA CCA GGT G	XhoI
	mSOCS1_rv cl N	AGC TGG ATC CGC GAT CTG GAA GGG GAA GGA ACT	BamHI

pEGFP-N1-mSOCS3	hmSOCS3_fw cl N	AGC TCT CGA GAT GGT CAC CCA CAG CAA GTT TC	XhoI
	mSOCS3_rv cl N	AGC TGG ATC CGC AAG TGG AGC ATC ATA CTG ATC C	BamHI
pEGFP-N1-mCIS	mCIS_fw cl N	AGC TAG ATC TGA TGT CTT GTC CTT TGC TGG CTG	BglII
	mCIS_rv cl N	AGC TGT CGA CCC GAG TTG GAA GGG GTA CTG TC	SalI
pEGFP-N1-hSOCS1	hSOCS1_fw cl N	AGC TCT CGA GAT GGT AGC ACA CAA CCA GGT G	XhoI
	hSOCS1_rv cl N	AGC TGG ATC CGC AAT CTG GAA GGG GAA GGA GCT	BamHI
pEGFP-N1-hSOCS3	hmSOCS3_fw cl N	AGC TCT CGA GAT GGT CAC CCA CAG CAA GTT TC	XhoI
	hSOCS3_rv cl N	AGC TGG ATC CGC AAG CGG GGC ATC GTA CTG G	BamHI
pEGFP-N1-hCIS	hCIS_fw cl N	AGC TAG ATC TGA TGG TCC TCT GCG TTC AGG G	BglII
	hCIS_rv cl N	AGC TGT CGA CCC GAG CTG GAA GGG GTA CTG TC	SalI

fw: Vorwärtsprimer; rv: Rückwärtsprimer; unterstrichen: Restriktionsenzymschnittstellen

Tabelle 2-2: Primersequenzen für Mutationen und Sequenzierprimer

Plasmidname	Primer	Sequenz [5´-3´]
Primer zur Korrektur von missense-Mutationen im Rahmen der Klonierungen von SOCS1, SOCS3 und CIS in pEGFP-C1 und pEGFP-N1		
pEGFP-C1-hSOCS1	hSOCS1-C_mut_fw	CGT GCC CCG CGG TCC CGG CCC CGG CCC CCG GCG ACA CGC ACT TCC
	hSOCS1-C_mut_rv	GGA AGT GCG TGT CGC CGG GGG CCG GGG CCG GGA CCG CGG GGC ACG
pEGFP-C1-hSOCS3	hSOCS3muta_fw	CGT GCT CAA GCT GGT GTA CCA CTA CAT GCC G
	hSOCS3muta_rv	CGG CAT GTA GTG GTA CAC CAG CTT GAG CAC G
pEGFP-N1-mSOCS1	mS1/1-N-mut_fw	TCA CGC TGA GCG CGA AGA AGC AGT TCC GTT GGC GAC TGT CGC G
	mS1/1-N-mut_rv	CGC GAC AGT CGC CAA CGG AAC TGC TTC TTC GCG CTC AGC GTG A
pEGFP-N1-mSOCS3	mS3/2-N-mut_fw	ATA CTG ATC CAG GAA CTC CCG AAT GGG TCC AGG C
	mS3/2-N-mut_rv	GCC TGG ACC CAT TCG GGA GTT CCT GGA TCA GTA T
pEGFP-N1-hCIS	hCIS/2-N-mut:TS_fw	GTT GCA GGC TGC GGG CGC TGC TTC TGC GTA C
	hCIS/2-N-mut:TS_rv	GTA CGC AGA AGC AGC GCC CGC AGC CTG CAA C
	hCIS/2-N-mut:GS_fw	AGA CGG AAG CTG GAG TCA GCA TAC TCA ATG CG
	hCIS/2-N-mut:GS_rv	CGC ATT GAG TAT GCT GAC TCC AGC TTC CGT CT
Primer für Mutationen, Deletionen und Insertionen in pEGFP-C1-hSOCS1		
pEGFP-C1-F58A	F58A_for	CGC ACT TCC GCA CAG CCC GTT CGC ACG CC
	F58A_rev	GGC GTG CGA ACG GGC TGT GCG GAA GTG CG
pEGFP-C1-R104K	R104K_for	GGG CAC CTT CCT GGT GAA AGA CAG CCG CCA GCG AAC
	R104K_rev	GTT CGC TGG CGG CTG TCT TTC ACC AGG AAG GTG CCC
pEGFP-C1-P165X	P165-NLS_fw	GCA TGC TGG GGG CCT AGC TGC GCC AGC GCC G
	P165-NLS_rv	CGG CGC TGG CGC AGC TAG GCC CCC AGC ATG C
pEGFP-C1-R172X	iSB-Del_for	CCA GCG CCG CGT GTG ACC GCT GCA GGA GC
	iSB-Del_rev	GCT CCT GCA GCG GTC ACA CGC GGC GCT GG
pEGFP-C1-1RA	1RA-NLS_fw	GCT GCG CCA GCG CGC CGT GCG GCC GCT GCA
	1RA-NLS_rv	TGC AGC GGC CGC ACG GCG CGC TGG CGC AGC
pEGFP-C1-2RA	2RA-NLS_fw	CCC CGC TGC GCC AGG CCG CCG TGC GGC CGC T
	2RA-NLS_rv	AGC GGC CGC ACG GCG GCC TGG CGC AGC GGG G
pEGFP-C1-3RA	3RA-NLS_fw	TGG GGG CCC CGC TGG CCC AGG CCG CCG TGC G
	3RA-NLS_rv	CGC ACG GCG GCC TGG GCC AGC GGG GCC CCC A
pEGFP-C1-4RA	4RA-NLS_fw	TGG CGG CGC CGC GCG CCA TGC TGG GGG CCC
	4RA-NLS_rv	GGG CCC CCA GCA TGG CGC GCG GCG CCG CCA
pEGFP-C1-5RA	5RA-NLS_fw	ACG TGG CGG CGC CGG CCG CCA TGC TGG GGG
	5RA-NLS_rv	CCC CCA GCA TGG CGG CCG GCG CCG CCA CGT

pEGFP-C1-6RA	6RA-NLS_fw	CCA GGC CGC CGT GGC CCC GCT GCA GGA GC
	6RA-NLS_rv	GCT CCT GCA GCG GGG CCA CGG CGG CCT GG
pEGFP-C1-hS1/Del	1NLS-Del_fw	CTG GAG CAC TAC GTG GCG GCG CTG CAG GAG CTG TGC CGC CAG
	1NLS-Del_rv	CTG GCG GCA CAG CTC CTG CAG CGC CGC CAC GTA GTG CTC CAG
pEGFP-C1-hS1/Del+hS3	hS1/Del+hS3_fw	GGT GTT GAG CCG GCC CCC TCT CCT CCA ACG TGG CCA CTC TGC AGG AGC TGT GCC GCC AG
	hS1/Del+hS3_rv	GCC ACG TTG GAG GAG AGG GGC CGG CTC AAC ACC AGG GGC GCC GCC ACG TAG TGC TCC AG
Primer für Insertion der NLS in pEGFP-C1-hCIS		
pEGFP-C1-hCIS/A204S	hCIS-Mut_fw	cct cca cca gcc act agt gta cac cta aaa ctg g
	hCIS-Mut_rv	cca gtt tta ggt gta cac tag tgg ctg gtg gag g
pEGFP-C1-hCIS/NLS	SpeI-fw	CTA GTC CGC GCC GCA TGC TGG GGG CCC CGC TGC GCC AGC GCC GCG TGC GGC CGA
	SpeI-rv	CTA GTC GGC CGC ACG CGG CGC TGG CGC AGC GGG GCC CCC AGC ATG CGG
Sequenzierprimer		
	pEGFP-C1_sqz_fw	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G
	pEGFP-N1_rv	GTC CAG CTC GAC CAG GAT G
	(Standardprimer MWG)	

fw, for: Vorwärtsprimer; rv, rev: Rückwärtsprimer; unterstrichen: Restriktionsenzymschnittstellen; grau unterlegt: Mutationen und Insertionen

Tabelle 2-3: Primer und Sonden für quantitative RT-PCR

Primer[1]		Sequenz [5´-3´]	Position	Amplifikat cDNA	Amplifikat genomische DNA	Datenbank[3]
β-Aktin	fw	CCC TGT GCT GCT CAC CGA	383-400			
	rv	ACA GTG TGG GTG ACC CCG TC	568-549	186 bp	186bp	NM_007393
	pr	CCC CTG AAC CCT AAG GCC AAC CG	405-427			
mTNF-α	fw	AAA ATT CGA GTG ACA AGC CTG TAG	397-420			
	rv	CCT TGA AGA GAA CCT GGG AGT AG	576-554	180 bp	–[2]	M11731
	pr	CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA	423-448			
mSOCS1	fw	CAC CTT CTT GGT GCG CG	418-434			
	rv	CGC CAC GTA GTG CTC CAG	606-589	189 bp	189bp	U88325
	pr	TCG CCA ACG GAA CTG CTT CTT CG	439-461			
mSOCS2	fw	AGG CCC AGA AGC CCC AC	314-430			
	rv	GTT GGT AAA GGC AGT CCC CA	554-535	241 bp	241 bp	U88327
	pr	AAT GGG ACT GTT CAC CTG TAC CTG ACC AAA	433-456			
mSOCS3	fw	ACC CAC AGC AAG TTT CCC G	24-42			
	rv	AGT AGA ATC CGC TCT CCT GCA G	159-138	136 bp	136bp	U88328
	pr	TTG CGC ACG GCG TTC ACC AC	146-127			
mCIS	fw	GAA CCG AAG GTG CTA GAC CCT	313-351			
	rv	TGT ACC CTC CGG CAT CTT CT	471-452	159 bp	159bp	D31943
	pr	ATC TGC TGT GCA TAG CCA AGA CGT TCT CC	359-387			
mIP-10	fw	GGT CTG AGT GGG ACT CAA GG	83-102			
	rv	GTG GCA ATG ATC TCA ACA CG	234-215	152 bp	–[2]	NM_021274
	pr	TGC AAC TGC ATC CAT ATC GAT GAC G	128-152			

mIFN-β	fw	CCC TAT GGA GAT GAC GGA GA	197-216			
	rv	CTG TCT GCT GGT GGA GTT CA	357-338	161 bp	–[2]	NM_010510
	pr	TGC CTT TGC CAT CCA AGA GAT GCT	236-259			

[1] fw: Vorwärtsprimer, rv: Rückwärtsprimer, pr: Sonde für quantitative RT-PCR,
[2] kein Amplifikat, da Exon/Intron-Struktur berücksichtigt wurde bzw. das mögliche genomische Amplifikat zu groß für einen Nachweis ist
[3] Zugangsnummer der Sequenz, NCBI: National Center for Biotechnology Information

2.1.9 Marker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (100-10000 bp)	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.10 Enzyme

AccuTaq LA DNA Polymerase (5 U/µl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP, 1 U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen, diverse	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase (400 U/µl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.11 Antikörper

Immunzytochemie

anti-Flag M2, monoklonal (FITC[6] gekoppelt)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-c-myc, polyklonal (FITC[6] gekoppelt)	Cell Signaling Technology™, Frankfurt/Main
anti-Spleißfaktor SC-35, monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
rabbit anti-mouse Ig/TRITC[7], polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Immunpräzipitation

anti-SOCS1 monoklonale Antikörper (2E1/2D4)	D. J. Hilton[8], Victoria, Australien
anti-SOCS3 polyklonales Serum	D. J. Hilton[8], Victoria, Australien

Western Blot

GFP (FL) HRP[9]	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
purified mouse anti-Lamin A/C	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
mouse anti-GAPDH	Chemicon International, Ltd., Hampshire, UK
anti-human JAB/SOCS-1 (J192), rabbit IgG	Immuno-Biological Laboratories, Hamburg
1B2 (SOCS-3) Antikörper	D. J. Hilton[8], Victoria, Australien

[6] FITC: Fluorescein Isothiocyanate
[7] TRITC: Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
[8] The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia
[9] HRP: Horseradish Peroxidase = Meerrettich-Peroxidase

anti-mouse IgG (H&L) HRP-gekoppelt	Cell Signaling Technology™, Frankfurt/Main
anti-rabbit IgG (H&L) HRP-gekoppelt	Cell Signaling Technology™, Frankfurt/Main
donkey anti-goat IgG HRP-gekoppelt	Dianova GmbH, Hamburg
Streptavidin-HRP	Chemicon International, Ltd., Hampshire, UK
sheep anti-mouse IgG-HRP	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Durchflusszytometrie	
anti-STAT1 (pY701) Alexa Fluor® 647	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

2.1.12 Stimulanzien

Lipopolysaccharid (LPS)

Gram-negative Bakterien besitzen als Bestandteil ihrer Zellwand Lipopolysaccharid, welches aus einem Lipid A-Anteil und einer für den jeweiligen Bakterienstamm spezifischen Polysaccharidkette zusammengesetzt ist. Aufgereinigtes LPS stimuliert TLR4 (Medzhitov et al. 1997; Poltorak et al. 1998; Hoshino et al. 1999). Das hier verwendete hochreine S-LPS wurde aus *Salmonella minnesota* (HL63, smooth-Form) gewonnen und war eine Überlassung von U. Seydel, Forschungszentrum Borstel. S-LPS wurde in Aqua dest. gelöst und als Stammlösung von 100 µg/ml aliquotiert bei -20°C gelagert.

Pam_3Cys-Ser-$(Lys)_4$ [Pam_3CSK_4]

$Pam_3CysSerLys_4$ (Pam_3CSK_4) wurde von EMC Microcollections GmbH, Tübingen bezogen und ist ein synthetisches triacyliertes Lipopeptid, welches dem acetylierten Aminoterminus bakterieller Lipopeptide entspricht. Es stimuliert das Heterodimer aus TLR2 und TLR1. Pam_3CSK_4 wurde als Stammlösung von 1 mg/ml in Aqua dest. angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Lipoteichonsäure (LTA)

Lipoteichonsäure ist ein Bestandteil der Zellwand von grampositiven Bakterien und wirkt als TLR2-Stimulus. LTA wurde freundlicherweise von S. Morath, Konstanz, zur Verfügung gestellt. LTA wurde aus *Staphylococcus aureus* isoliert, massenspektroskopisch auf Reinheit überprüft und auf Endotoxinfreiheit getestet (Morath et al. 2001). LTA wurde als Stammlösung von 10 mg/ml in Aqua dest. angesetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Polyinosinic-polycytidylic acid [Poly(I:C)]

Poly(I:C) wurde von Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen und ist ein synthetisches Analogon zu dsRNA. Poly(I:C) stimuliert TLR3 (Alexopoulou et al. 2001). Es wurde eine Stammlösung von 5 mg/ml in in Aqua dest. angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

CpG-Oligodesoxynukleotid (CpG-ODN

Das verwendete CpG-ODN 1668-PTO (5´-TCCATGACGTTCCTGATGCT-3´; stimulatives CpG-Motiv unterstrichen) wurde von TIB Molbiol, Berlin in einem Synthesemaßstab von 2 µmol komplett Phosphothioat-modifiziert und endotoxinfrei bezogen, in Aqua dest. gelöst (Stammlösung: 250 µM), steril filtriert und aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. CpG-Oligodesoxynukleotide besitzen ein zentrales immunstimulatorisches Motiv „Purin-Purin-CpG-Pyrimidin-Pyrimidin“, das den TLR9 stimuliert und sind durch Phosphothioat-Modifikationen im Rückgrat (PTO = Substitution eines Sauerstoffs in nicht-bindender Stellung durch Schwefel) so verändert, dass sie eine größere Stabilität besitzen (Krieg et al. 1996; Liang et al. 2000).

Rekombinante Zytokine

Rekombinantes humanes Interferon-α (IFN-α) wurde lyophilisiert von ImmunoTools GmbH, Friesoythe bestellt und mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 100 µg/ml eingestellt. Lyophilisiertes rekombinantes murines Interferon-γ (IFN-γ) von tebu-bio, Offenbach wurde in PBS gelöst und als Stammlösung von 50 µg/ml gelöst. Die Zytokine wurden aliquotiert bei -80°C gelagert.

2.1.13 Mauslinien

Für die verschiedenen Versuche wurden 6-12 Wochen alte C57BL/6-, C3H/HeJ-, C3H/HeN (Harlan-Winkelmann, Borchen) und MyD88-defiziente (A. Gessner, Erlangen) Mäuse verwendet, die unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen gehalten wurden. Die Tiere wurden in Polykarbonkäfigen des Typs II auf staubfreiem Weichholzgranulat bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5% gehalten mit einer Belichtungszeit von 7.00 bis 19.00 MEZ. Die kontinuierliche Fütterung fand mit einer pelletierten, autoklavierten Alleindiät und sterilem Leitungswasser über Tränkflaschen statt. Die Tierhaltung erfolgte hinter Infektionsbarrieren und einer monatlichen Kontrolle auf das Freisein von Erregern entsprechend der Liste GV-SOLAS 1995. Genehmigungen zur Tötung von Mäusen und Organentnahme lagen vor, die Experimente wurden ordnungsgemäß aufgezeichnet und über den Tierschutzbeauftragten dem Regierungspräsidium in Tübingen gemeldet.

2.1.14 Wachstumsmedien

2.1.14.1 Wachstumsmedien für Säugerzellen

Inaktivierung von FCS

Die Hitzeinaktivierung von FCS dient dazu, die im Serum enthaltenen Komplementproteine zu inaktivieren. Dazu wurde steriles FCS bei 56°C für 1 h im Wasserbad inaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

RPMI 1640

Vor Gebrauch wurde das Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin (aus 100x Stammlösung, entspricht 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin im Medium), 10% inaktiviertem FCS und β-Mercaptoethanol (50 µM) supplementiert.

DMEM

Vor Gebrauch wurde das Medium mit folgenden Komponenten versetzt: 1% Penicillin/ Streptomycin (aus 100x Stammlösung, entspricht 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin im Medium) und 10 % inaktiviertes FCS.

2.1.14.2 Wachstumsmedien für Bakterienzellen

LB-Medium und Selektivplatten

Escherichia coli Bakterien wurden zur Anzucht in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) kultiviert. Dazu wurden 20 g LB Broth Pulver in 1.000 ml Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min). Zum Herstellen von LB-Bouillon-Selektivplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 14,8 g/l Agar-Agar und nach dem Autoklavieren und Abkühlen Kanamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml) zugesetzt, bevor die Selektivplatten in Petrischalen gegossen wurden.

2.1.15 Zellen

2.1.15.1 Eukaryotische Zellen

HEK 293

Hierbei handelt es sich um eine humane Fibroblasten-Zelllinie (HEK: human embryonic kidney cells), die durch Transformation von embryonalen Nierenepithelzellen mittels Adenovirus Typ 5 gewonnen wurde (Graham et al. 1977). HEK 293 Zellen (erhalten von der AG Neumaier, Institut für klinische Chemie, Mannheim) wurden in vollständig komplementiertem DMEM kultiviert.

NIH (National Institute of Health) 3T3

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie mit hoher Kontaktinhibition, die sich von primären NIH Swiss Maus Embryonalzellen durch mehrmalige Passage ableiten (Überlassung von Uta Bauer, IMT, Marburg). Die Zellen wurden in vollständig komplementiertem DMEM gehalten.

RAW 264.7

Bei dieser Tumorzelllinie (LGC Promochem, Wesel, ATCC Nr. TIB-71) handelt es sich um murine Makrophagen, die aus einem Tumor, der in männlichen Balb/c-Mäusen mittels Abelson Maus Leukämie Virus induziert wurde, gewonnen wurden. Die Kultivierung erfolgte in vollständig komplementiertem RPMI 1640.

HeLa

Diese Zelllinie wurde 1951 aus einem Zervixkarzinom einer Patientin gewonnen. Sie war die erste aneuploide, epithelähnliche Zelllinie, die aus menschlichem Material gewonnen und kontinuierlich kultiviert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück. Die verwendeten Zellen (Überlassung von Christoffer Gebhardt, DKFZ, Heidelberg) wurden in vollständig komplementiertem DMEM gehalten.

Peritoneale Makrophagen (PEC = peritoneal exsudate cells)

Die Zellen wurden mittels Lavage aus Wildtyp- (C57BL/6), MyD88$^{-/-}$, C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mäusen isoliert. Dazu wurde den Mäusen 1,5 ml 4%ige Thioglykolat-Lösung (2.1.5) intraperitoneal injiziert. Am dritten Tag post injectionem wurde eine Peritoneallavage mit 10 ml eiskaltem PBS durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in RPMI/10% FCS kultiviert. Nicht adhärente Zellen wurden nach 4 h Inkubation durch Spülen entfernt.

2.1.15.2 Prokaryotische Zellen

Zur Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien von Invitrogen (Karlsruhe): TOP10 One Shot™ [Genotyp: F$^-$ *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G] und New England Biolabs (Frankfurt/Main): NEB 5-alpha [Genotyp: F' *pro*A$^+$B$^+$ *lac*I^q (Δ*lac*Z)M15 *zzf::Tn*10 (Tet^R)/*fhu*A2Δ*(arg*F-*lacZ)*U169 (Φ80 Δ(*lac*Z)M15) *gln*V44 *gyr*A96 (Nal^R) *rec*A1 *rel*A1 *end*A1 *thi*-1 *hsd*R17] verwendet. Diese *E. coli* Bakterien stellen Sicherheits- bzw. Laborstämme dar, die bei Invitrogen auf *E. coli* DH10B und bei New England Biolabs auf *E. coli* K12 basieren. Es handelt sich hierbei um gentechnisch veränderte Organismen (GVO), die aufgrund von genetischen Defiziten keine spezifischen Pathogenitätsmerkmale besitzen und in die Risikogruppe 1 eingeordnet werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

2.2.1.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zelllinien können in flüssigem Stickstoff über einen langen Zeitraum und weitestgehend unter Beibehaltung ihrer Vitalität gelagert werden. Hierzu wurden 5 x 10^6 Zellen in 500 µl Zellkulturmedium 1:2 (v/v) mit 500 µl kaltem Einfriermedium, bestehend aus 20% DMSO, 60% FCS und 20% Zellkulturmedium, versetzt und in Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden schnell auf 0°C heruntergekühlt, da DMSO bei höheren Temperaturen und ab einer Konzentration von 4% zytotoxisch wirkt. Die weitere Abkühlung erfolgt stufenweise, so dass intrazelluläres Wasser mittels Osmose austreten kann. Daher wurden die Zellen zunächst für 2 h bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.
Um die Zellvitalität der eingefrorenen Zellen während des Auftauvorgangs zu erhalten, ist es wichtig, einen osmotischen Schock zu vermeiden. Hierzu wurden die Zellen sehr schnell aufgetaut und in einem Zellkulturröhrchen langsam zu frischem Medium pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1.300 rpm für 5 min (Multifuge 3 S-R) wurden die Zellen erneut in Medium resuspendiert und in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt.

2.2.1.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Alle eukaryoten Zellen wurden in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Zur Erhaltung der Zellen wurden diese je nach Konfluenzgrad alle 3-5 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium von HEK 293, NIH/3T3 und HeLa Zellen abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um das Medium komplett zu entfernen. Dann wurden die Zellen für wenige Minuten bei Raumtemperatur mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung (10x Trypsin/EDTA in PBS verdünnt; entpricht 0,5 mg/ml Trypsin; 0,22 mg/ml EDTA in Lösung) behandelt bis sich diese vom Flachboden der Zellkulturflasche ablösten. Trypsin spaltet dabei Adhäsionsproteine und durch EDTA werden Calcium-Ionen komplexiert, die für das Bestehen von Zell-Matrix-Verbindungen nötig sind. Der Lösungsvorgang wurde durch leichtes Klopfen mechanisch unterstützt. Die Zellen wurden mit PBS/2% FCS abgespült, damit die im FCS enthaltenen Inhibitoren das Trypsin inaktivieren und in ein Zellkulturröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1.300 rpm für 5 min (Multifuge 3 S-R) und einmaligem Waschen in PBS/2% FCS, wurden die Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert, 1:10 in Zellkulturflaschen passagiert und weiter kultiviert. RAW 264.7 Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der

Zellkulturflasche gelöst. Nach Zentrifugation (1.300 rpm, 5 min, Multifuge 3 S-R) wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung ebenfalls 1:10 ausgesät. Die Expansion der Zellen erfolgte in 25 cm², 75 cm² bzw. 175 cm² Zellkulturflaschen. Zusätzlich wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mittels DAPI-Färbung auf Mycoplasmen-Freiheit getestet.

2.2.1.1.3 Test auf Kontamination mit Mycoplasmen in der Zellkultur

Mycoplasmen sind die kleinsten prokaryotischen Zellen. Sie sind in ihrer Form variabel und ihre Größe schwankt zwischen 0,22 und 2 µm. Sie führen bei einer Kontamination von Zellkulturen zu Veränderungen des Wachstums, des Stoffwechsels, der Morphologie und der Lebensfähigkeit der Zellen, so dass Experimente mit Zellkulturen unzuverlässig werden können (McGarrity et al. 1984). Verunreinigungen durch Mycoplasmen können lange Zeit unbemerkt bleiben, da sie auch mikroskopisch nicht unbedingt zu sichtbaren Veränderungen führen. Deswegen ist ein regelmäßiger Mycoplasmen-Test unerlässlich (Hay et al. 1989).
Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu die Zellen mittels DAPI-Färbung auf Mycoplasmen-Freiheit getestet. Hierbei handelt es sich um einen blau fluoreszierenden Nukleinsäure-Farbstoff, der spezifisch an DNA bindet. Die Zellen wurden dafür in einer Zellkulturplatte (6-well Format) so ausgesät, dass sie nach einer Inkubation von 18-24 h 50-70% Konfluenz aufwiesen. Anschließend wurde eine DNA-Färbung mit gleichzeitiger Fixierung der Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 3 µM DAPI/Ethanol-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Mounting Medium AF1 eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mit dem Leica DMI 6000B Fluoreszenz-Inversmikroskop. Dafür wurde der Filterblock A4 für DAPI (Exzitationsfilter 360/40; dichromatischer Spiegel 400; Suppressionsfilter 470/40) genutzt. Als Anregungsquelle diente eine 100 W Quecksilber-Lampe.
Mycoplasmenfreie-Kulturen zeigten bei diesem Test nur eine nukleäre Fluoreszenz, wohingegen Mycoplasmen-infizierte Zellen zusätzlich noch eine extranukleäre Fluoreszenz in Form von gleichmäßig geformten, kleinen, hell leuchtenden Punkten oder Ansammlungen von solchen aufwiesen. Mitochondriale DNA wird mit DAPI kaum sichtbar angefärbt. Bei eventuell vorhandener Mycoplasmen-Kontamination wurden die Zellen für 2-3 Wochen mit Ciprofloxacin (10 µg/ml) behandelt. Der Erfolg der Behandlung wurde mit einem erneuten Mycoplasmen-Test überprüft.

2.2.1.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden die Zellen in einem definierten Volumen Medium resuspendiert und mit

dem Vitalfarbstoff Trypanblau (2 mg/ml) 1:10 gefärbt. Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer, die mit dem Hämazytometerglas dicht abgedeckt war (Interferenzlinien am Seitensteg), im Mikroskop (Auflichtmikroskop, Leica DMLS, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) ausgezählt. Trypanblau gehört zu den Azofarbstoffen. Das Farbstoff-Anion dringt über die geschädigte Zellmembran in die Zelle ein und bindet an zytosolische Proteine. Dadurch erscheinen tote Zellen lichtmikroskopisch blau, während die überlebenden Zellen farblos bleiben. Die Anzahl avitaler Zellen sollte nicht mehr als 3% der Gesamtzellzahl betragen. Auf der Kammer sind 9 Großquadrate aus jeweils 16 Kleinquadraten (0,0025 mm^2) zu sehen. Das Volumen über einem Großquadrat beträgt 0,1 mm^3. Die Zellzahl pro Milliliter berechnet sich damit:

$$N[Zellen/ml] = \frac{\sum Zellen\ aus\ 4\ Großquadraten}{4} \times Verdünnungsfaktor \times 10^4\ /[ml]$$

2.2.1.2 Kultivierung prokaryoter Zellen

2.2.1.2.1 Einfrieren und Auftauen von Bakterien

Das Cryobank™ System ermöglicht die einfache Lagerung und sichere Rekultivierung von Mikroorganismen. Die sterilen Einfrierröhrchen enthalten hypertonisches Einfriermedium und 25 chemisch behandelte Kügelchen, an deren porösen Oberfläche sich die Mikroorganismen binden. Das Einfrierröhrchen wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet, mit den entsprechenden Keimen (aus Flüssigkultur oder Ösenabstrich von Selektivplatte) beimpft und 4-5 mal vorsichtig invertiert, bevor das Einfriermedium vollständig mit einer Pipette entfernt wurde. Anschließend wurde das Einfrierröhrchen bei -80°C gelagert. Zur Rekultivierung wurde ein Kügelchen aus dem Einfrierröhrchen unter sterilen Bedingungen entnommen und auf einer Selektivplatte ausgerollt oder direkt in ein Zellkulturröhrchen mit selektivem LB-Medium gegeben (2.2.1.2.2). Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im Brutschrank oder im Bakterienschüttler.

2.2.1.2.2 Anzucht von Bakterien

Das Volumen der benötigten Bakterienkultur ist abhängig von der Kopienzahl des Plasmids, dem Bakterienstamm sowie dem verwendeten Medium. Generell wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer frisch ausgestrichenen Selektivplatte oder ein mit Bakterien-behaftetes Kügelchen aus einem Einfrierröhrchen in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum verwendet. Nach 6-8 h Inkubation unter intensivem Schütteln (ca. 250 rpm, Bakterienschüttler) hat diese Vorkultur die späte logarithmische Phase erreicht und konnte nun 1:500 in frisch angesetztem selektivem LB-Medium verdünnt werden. Anschließend wurde diese Hauptkultur für weitere

16-20 h unter Schütteln bis zum Erreichen der frühen stationären Phase inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend bei 4.000 rpm und 4°C für 20 min (Multifuge 3 S-R) sedimentiert. Die so erhaltenen Bakterien konnten nun für eine Isolierung von Plasmid-DNA (2.2.2.1.8) eingesetzt werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Klonierung der SOCS-Gene in pEGFP-C1 und pEGFP-N1

2.2.2.1.1 Amplifikation von SOCS1-, SOCS3- und CIS-Sequenzen mittels PCR

Bei der PCR (*polymerase chain reaction*) handelt es sich um eine zyklische Neusynthese und exponentielle Amplifikation von DNA *in vitro*. Für jede Reaktion werden zwei verschiedene Primer verwendet, die an jeweils einen DNA-Strang hybridisieren. Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert von deren 3´-Ende aus einen neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl des gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Entsprechend der Klonierungsstrategie können die Primer im 5´-Bereich zusätzliche Sequenzen für Schnittstellen von Restriktionsenzymen enthalten (Abbildung 2-1).

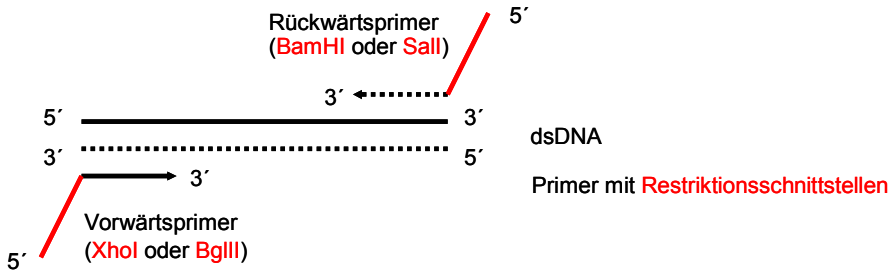

Abbildung 2-1: Prinzip einer PCR
Ein DNA-Abschnitt soll mittels PCR amplifiziert werden. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA und Hybridisierung der Primer an die Zielsequenz erfolgt die Synthese des gewünschten DNA-Fragments in 5´-3´-Richtung. Zur Generierung von Restriktionsenzym-zugänglichen Enden wurden entsprechende verlängerte Primer synthetisiert.

Um eine Klonierung der SOCS-Gene in die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 zu ermöglichen, wurde eine PCR-Reaktion, ausgehend von Expressionsplasmiden, welche die komplette kodierende Sequenz umfassten, durchgeführt. Die verwendeten Primer führten dabei zur Generierung von 5´-XhoI- und 3´-BamHI- oder 5´-BglII- und 3´-SalI-Schnittstellen (Tabelle 2-4).

Tabelle 2-4: Primer zur Klonierung der SOCS-Gene in pEGFP-C1 und pEGFP-N1 (Sequenzen siehe Tabelle 2-1)

Zielvektor	DNA-Matrize (Expressionsplasmid)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
pEGFP-C1	pEF-FLAG-I/mSOCS1	mSOCS1_fw cl C	mSOCS1_rv cl C
	pEF-FLAG-I/mSOCS3	mSOCS3_fw cl C	mSOCS3_rv cl C
	pcDNA3/mCIS1	mCIS_rv cl C	mCIS_fw cl C
	pBS-hSOCS1	hSOCS1_fw cl C	hSOCS1_rv cl C
	pEF-FLAG-I/hSOCS3	hSOCS3_fw cl C	hSOCS3_rv cl C
	pcDNA3/hCIS	hCIS_fw cl C	hCIS_rv cl C
pEGFP-N1	pEF-FLAG-I/mSOCS1	mSOCS1_fw cl N	mSOCS1_rv cl N
	pEF-FLAG-I/mSOCS3	hmSOCS3_fw cl N	mSOCS3_rv cl N
	pcDNA3/mCIS1	mCIS_fw cl N	mCIS_rv cl N
	pBS-hSOCS1	hSOCS1_fw cl N	hSOCS1_rv cl N
	pEF-FLAG-I/hSOCS3	hmSOCS3_fw cl N	hSOCS3_rv cl N
	pcDNA3/hCIS	hCIS_fw cl N	hCIS_rv cl N

Für die Amplifikation der murinen und humanen SOCS1-, SOCS3- und CIS-Gene wurden, aufgrund von Schwierigkeiten bei der PCR-Reaktion, verschiedene Polymerasen verwendet sowie unterschiedliche Reaktionsbedingungen gewählt, die in Tabelle 2-5 zusammengefasst sind. Allgemein setzten sich die Reaktionsansätze wie folgt zusammen:

PCR-Reaktion mittels Taq DNA Polymerase: 1x konzentrierter Taq Puffer [10x] mit 1,5 mM Mg^{2+} für Taq DNA Polymerase, 1x konzentrierter Master-Taq [5x], 200 µM dNTP Gemisch [aus 10 mM Stocklösung], 10-200 ng DNA-Matrize (Expressionsplasmid), 500 nM Vorwärts- und Rückwärtsprimer [aus 50 pmol/µl Stocklösung], 1,5 U Taq DNA Polymerase, aufgefüllt mit Aqua dest. auf 50 µl Endvolumen.

PCR-Reaktion mittels AccuTaq LA DNA Polymerase: 1x konzentrierter PCR-Puffer [10x] für AccuTaq LA DNA Polymerase, 1,5 mM $Mg(OAc)_2$ [25mM], 500 µM dNTP Gemisch [aus 10 mM Stocklösung], 10-200 ng DNA-Matrize (Expressionsplasmid), 2% DMSO, 500 nM Vorwärts- und Rückwärtsprimer [aus 50 pmol/µl Stocklösung], 2,5 U AccuTaq LA DNA Polymerase Mix, aufgefüllt mit Aqua dest. 50 µl Endvolumen.

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte durch eine Auftrennung in einem analytischen DNA-Agarosegel (2.2.2.1.2) mit 5 µl des Reaktionsansatzes. Die DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (2.2.2.1.5) oder über ein präparatives DNA-Agarosegel mit anschließender Gelextraktion (2.2.2.1.3) gereinigt.

Tabelle 2-5: Reaktionsbedingungen und verwendete Polymerasen für die Amplifikation der SOCS-Gene

hergestelltes Plasmid	Polymerase	Reaktionsbedingungen
pEGFP-C1-mSOCS3	Taq DNA-Polymerase	initiale Denaturierung: 95°C, 3min
pEGFP-C1-hSOCS3		Denaturierung: 95°C, 15s
pEGFP-C1-hCIS		Primer-Anlagerung: 60°C, 15s } 30 Zyklen
pEGFP-N1-mCIS		Synthese: 72°C, 1min
pEGFP-N1-hSOCS3		Auffüllreaktion: 72°C, 3min
		Abkühlung: 4°C, unbegrenzt
pEGFP-C1-mSOCS1	Taq DNA-Polymerase	initiale Denaturierung: 95°C, 3min
pEGFP-C1-mCIS		Denaturierung: 95°C, 15s
		Primer-Anlagerung: 60°C, 30s } 5 Zyklen
		Synthese: 72°C, 1min
		Denaturierung: 95°C, 15s
		Primer-Anlagerung: 58°C, 30s } 10 Zyklen
		Synthese: 72°C, 1min
		Denaturierung: 95°C, 15s
		Primer-Anlagerung: 55°C, 30s } 15 Zyklen
		Synthese: 72°C, 1min
		Auffüllreaktion: 72°C, 5min
		Abkühlung: 4°C, unbegrenzt
pEGFP-C1-hSOCS1	AccuTaq LA DNA Polymerase	initiale Denaturierung: 98°C, 3min
pEGFP-N1-mSOCS1		Denaturierung: 98°C, 30s
pEGFP-N1-mSOCS3		Primer-Anlagerung: 60°C, 30s } 5 Zyklen
pEGFP-N1-hSOCS1		Synthese: 70°C, 3min
pEGFP-N1-hCIS		Denaturierung: 98°C, 30s
		Primer-Anlagerung: 58°C, 30s } 10 Zyklen
		Synthese: 70°C, 3min
		Denaturierung: 98°C, 30s
		Primer-Anlagerung: 55°C, 30s } 15 Zyklen
		Synthese: 70°C, 3min
		Auffüllreaktion: 70°C, 10min
		Abkühlung: 4°C, unbegrenzt

2.2.2.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können unter nativen Bedingungen aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen entsprechend ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt werden. Unter Verwendung des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid und von UV-Licht

werden die Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht. Präparative Agarosegele dienen der Reinigung, analytische Gele der Größenbestimmung von Nukleinsäuren nach enzymatischen Reaktionen oder einer PCR. Die Gele unterscheiden sich im einzusetzenden Probenvolumen.
Agarose wurde durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst (1-2%-ige Gele, je nach Größe des zu erwartenden DNA-Fragments) und in ein entsprechendes Agarosegel-Elektrophoresesystem gegossen. Bei analytischen Gelen wurden die DNA-Proben (5 µl der PCR oder des Endonuklease-verdaus) mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard (2.1.9) in dem ausgekühlten Agarosegel bei 120 V in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 20-30 min in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend im Wasserbad ebenfalls für 20-30 min gewaschen. DNA wurde unter UV-Beleuchtung (Wellenlänge 254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis auf einem Foto dokumentiert (Infinity Video-Dokumentationssystem, Modell 3000, Peqlab, Erlangen).
Bei präparativen Gelen entsprachen die Aufbau- und Elektrophoresebedingungen denen analytischer DNA-Agarosegele, jedoch lag das Probevolumen bei 40 µl verteilt auf mehrere Gel-Taschen. Nach Anfärbung der DNA in Ethidiumbromidlösung wurden die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Leuchttisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit isoliert (2.2.2.1.3).

2.2.2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung. Das Kit ermöglicht die Extraktion und Reinigung von 70 bp bis 10 kbp großen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Je Säule kann bis zu 10 µg DNA gebunden werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA wurden die gewünschten Fragmente unter langwelligem UV-Licht (λ=312 nm) auf einem UV-Leuchttisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Nach Zugabe eines Puffers mit hoher Salzkonzentration wurde das DNA-haltige Agarosestück unter Wärmezufuhr (50°C) verflüssigt. Die Lösung wurde in eine Minisäule mit einer Silica-Membran gegeben, an die die DNA bindet. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte wurden Verunreinigungen wie Primer, Salze, Enzyme und unspezifische Nebenprodukte herausgewaschen. Die gereinigte DNA wurde mit 30 µl Elutions-puffer eluiert.

2.2.2.1.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind prokaryotische Endonukleasen, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA erkennen und abbauen können. Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen sind meistens vier- bis achtbasige, oft palindromische Sequenzen. Dabei spalten sie die Phospho-

diesterbindungen beider Einzelstränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch. Bei der restriktionsenzymatischen Spaltung von DNA werden Typ-II-Restriktionsendonukleasen ohne Methylase-Aktivität eingesetzt, die im Bereich der Erkennungssequenz schneiden und je nach Enzym kohäsive Enden mit 5'-Überhang, kohäsive Enden mit 3'-Überhang oder glatte Enden erzeugen. Die Enzyme werden zur analytischen Kontrolle rekombinanter Plasmide oder zum präparativen Verdau von Vektor und Insert vor einer Ligation eingesetzt.

Die in 2.2.2.1.1 hergestellten und gereinigten (2.2.2.1.3, 2.2.2.1.5) SOCS-PCR-Produkte mit XhoI- und BamHI- oder BglII- und SalI-Schnittstellen wurden mit XhoI und BamHI bzw. BglII und SalI in den entsprechenden Reaktionspuffern für einen Doppelverdau nach Angaben des Herstellers geschnitten. Die Inkubation des 50µl umfassenden Reaktionsansatzes [28 µl gereinigtes PCR-Produkt, 10x Reaktionspuffer (für XhoI/BamHI-Verdau: 2x Tango-Puffer; für BglII/SalI-Verdau: O-Puffer), Enzym (je 10 U BglII und SalI bzw. 20 U BamHI und 10 U XhoI), aufgefüllt mit Aqua dest. auf 50 µl Endvolumen] erfolgte bei 37°C für 4 h, mit anschließender 20-minütiger Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80°C. Beide Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 wurden in zwei getrennten 50µl-Ansätzen [5 µg Vektor; die restlichen Zusätze entsprachen dem Verdau von den SOCS-PCR-Produkten] jeweils mit XhoI und BamHI bzw. BglII und SalI in den entsprechenden Reaktionspuffern für Doppelverdau für 4 h bei 37°C geschnitten. DNA konnte gleichzeitig mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten werden, da diese hinsichtlich Temperatur- und Reaktionsbedingungen kompatibel waren.

Der Verdau wurde mit Hilfe eines analytischen Agarosegels überprüft (2.2.2.1.2). Da die DNA in weiteren Reaktionen verwendet werden sollte, mussten Enzym- und Pufferrückstände sowie kleine DNA-Fragmente mit dem QIAquick PCR Purification Kit entfernt werden (2.2.2.1.5).

2.2.2.1.5 Reinigung von Nukleinsäuren

PCR-Ansätze enthalten neben den gewünschten DNA-Fragmenten noch Primer und Nukleotide. Auch nach Restriktionsverdau von PCR-Amplifikaten befinden sich im Reaktionsansatz Fragmente vom 5´- und 3´-Terminus sowie störende Salze. Diese Bestandteile wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits entfernt. Dieses Kit ermöglicht die Aufreinigung von einzel- und doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 100 bp bis 10 kbp über eine Minisäule. Die Bindungskapazität einer Minisäule beträgt bis zu 10 µg DNA. Die Proben (geschnittene SOCS-Amplifikate, geschnittene Vektoren) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Dabei wurde die selektive Bindung von DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und bei neutralem pH-Wert an eine Silika-Gel-Matix ausgenutzt, während Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen die Membran ungehindert passieren und durch mehrere aufeinanderfolgende Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt wurden. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen und vermessen (2.2.2.1.9).

2.2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen verknüpfen die freie 5´-Phosphatgruppe eines DNA-Stranges mit der freien 3´-Hydroxygruppe eines zweiten Stranges in Form einer Phosphodiesterbindung. Ein über PCR und/oder Restriktionsendonukleaseverdau (2.2.2.1.1, 2.2.2.1.4) erhaltenes Insert wird so in einen linearisierten und gegebenenfalls dephosphorylierten Vektor ligiert.
Hier wurden die mit Restriktionsenzymen verdauten PCR-Produkte für SOCS1, SOCS3 und CIS mittels Ligation in die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 inseriert. In einem 40 µl-Ansatz wurden 125 ng Amplifikat und 25 ng linearisierter Vektor unter Zugabe von 800 U T4 DNA-Ligase im entsprechenden Puffer nach Angaben des Herstellers ligiert. Die Ligation wurde über Nacht bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 21°C, 1 h; Abkühlung 1°C/h bis 16°C; 16°C, 10 h; 4°C unbegrenzt.

2.2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Rekombinante Plasmide können in Bakterienzellen quantitativ vermehrt werden. Dazu wurde das TOP10 One Shot™ Kit, Invitrogen oder NEB-5 alpha Bakterien, New England Biolabs verwendet. Die bereits im kompetenten Zustand vorliegenden Bakterien wurden nach Angaben des Herstellers mit Plasmiden transformiert, auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien verfügten durch die aufgenommenen Plasmide über ein Kanamycin-Resistenz-Gen und konnten deshalb über die entsprechenden Agarplatten selektioniert werden.

2.2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

<u>Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab</u>
Mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit wurden Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab durchgeführt. Dieses Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse für den Aufschluss der Bakterien und macht sich die Eigenschaft von DNA zunutze, in Anwesenheit eines hohen Salzgehaltes an eine Silica-Matrix zu binden. Einzelne Bakterienkolonien wurden dafür in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum aufgenommen und über Nacht in einem Bakterienschüttler bei ca. 250 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension pelletiert (4.000 rpm, 15 min, 4°C; Multifuge 3 S-R). Das weitere Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde bakterielle RNA bereits während der alkalischen Lyse durch die im Resuspendierungspuffer anwesende RNase A abgebaut. Plasmid-DNA wurde über Säulen, die mit einer Silica-Matrix in Membran-Format ausgestattet waren und mehreren Zentrifugationsschritten aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen. Zur Analyse der Plasmid-DNA wurden 5 µl des gewonnenen Eluats mit geeigneten Restriktions-

endonukleasen geschnitten (2.2.2.1.4) und in einem analytischen DNA-Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.1.2). Auf der Basis eines positiven Bakterienklons, der nach Kontrollverdau der Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen die vorhergesagten Fragmente zeigte, wurde die Präparation durch Sequenzierung (2.2.2.1.10) des Plasmids überprüft.

Plasmidpräparationen im großen Maßstab

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde unter Verwendung des High Speed Midi Kits oder High Speed Maxi Kits eine Plasmidpräparation im großen Maßstab nach Angaben des Herstellers angefertigt. Zur Anzucht wurden 150 ml bzw. 250 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum und 300 µl bzw. 500 µl einer Vorkultur des gewünschten Klons inokuliert und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler (ca. 250 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien pelletiert (4.000 rpm, 20 min, 4°C; Multifuge 3 S-R). Die Isolierung des Plasmids aus transformierten Bakterien beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Reinigung über Anionenaustauschersäulen. Die DNA wurde dabei unter geeigneten Niedrigsalz- und pH-Bedingungen an eine Anionenaustauschersäule gebunden. In einem Waschschritt bei mittlerer Salzkonzentration wurden RNA, Proteine, Farbstoffe und niedermolekulare Verunreinigungen entfernt. Die Plasmid-DNA wurde dann in einem Hochsalz-Puffer von der Anionenaustauschersäule eluiert. Die anschließende Isopropanol-Fällung diente dem gleichzeitigen Konzentrieren und Entsalzen. Die Plasmid-DNA wurde in einem letzten Schritt in einem Filter aufgefangen und nach einmaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol in 500 µl Elutionspuffer aufgenommen und photometrisch (2.2.2.1.9) vermessen.

2.2.2.1.9 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Plasmiden

Die Konzentration von DNA und RNA wurde mit dem NanoDrop® ND-1000 UV/VIS-Spektralphotometer gemessen. Dabei wird unter Bestrahlung mit einer Xenon-Blitzlampe das Absorptionsspektrum von 220 bis 750 nm gemessen. Die aromatischen Ringe der DNA haben die Eigenschaft, UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von λ=260 nm zu absorbieren. Gemessen wird die Extinktion E, die dem negativen Logarithmus der Transmission T entspricht, wobei die Transmission der Quotient aus einfallender Lichtintensität I_0 und durchdringender Lichtintensität I ist. Die Extinktion ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz abhängig vom spezifischen Extinktionskoeffizienten E_λ der Substanz (hier DNA), der Schichtdicke D und der Konzentration C.

$$E = -\log T$$

$$T = \frac{I_0}{I}$$

$$E = E_\lambda \ x \ C \ x \ D$$

Der Quotient aus E_{260}/E_{280} gibt Aufschluss über die Reinheit der Präparation. Proteinkontaminationen detektiert man durch die Absorption bei 280 nm. Bei Werten unter 1,8 sind Proteinverunreinigungen enthalten. DNA- und RNA-Anteil können nicht unterschieden werden.

2.2.2.1.10 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten kommerziell bei MWG-Biotech AG, Martinsried. Hierzu wurden 3 µg DNA in 20 µl TE-Puffer, pH 8,0 (5 mM) mit den entsprechenden Sequenzierprimern (pEGFP-C1_sqz_fw für pEGFP-C1 Konstrukte und pEGFP-N1_rv für pEGFP-N1 Konstrukte; Sequenzen siehe Tabelle 2-1) analysiert.

Für die Auswertung der Sequenzdaten wurde das Programm ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) genutzt. Hierbei wurden die erhaltenen Sequenzdaten mit veröffentlichten Sequenzen für die murinen und humanen SOCS1-, SOCS3- und CIS-Proteine[10], die in der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) zur Verfügung stehen, verglichen. Aufgrund von vorhandenen *Missense*-Mutationen (Falsch-Sinn Mutationen: im Gen-Produkt wird eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht) bei einem Teil der Plasmide wurde anschließend eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt.

2.2.2.2 Gezielte Mutation durch ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wurden vorhandene Missense-Mutationen entfernt, Aminosäuren gezielt mutiert und dadurch zum Teil verkürzte Proteine generiert. Ebenso wurden definierte Bereiche im SOCS1-Protein deletiert bzw. inseriert. Diese Mutationen beruhen auf dem PCR-basierten Prinzip des QuikChange® XL Site-directed Mutagenesis Kits.

Hierbei diente doppelsträngige DNA mit dem zu mutierenden Insert als Matrize. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden soll, wurde denaturiert und die Primer (Tabelle 2-6) mit der enthaltenen Mutation hybridisierten. Mit Hilfe der *PfuTurbo*® DNA-Polymerase und in Anwesenheit eines dNTP Gemisches wurden unmethylierte DNA-Stränge synthetisiert, welche über die entsprechende Mutation verfügten. Auf diese Weise entstanden durch mehrfache Wiederholungen zahlreiche Kopien mit der gewünschten Mutation. Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym DpnI. Dieses erkennt und schneidet die durch die bakterielle *dam*-Methylase methylierten und hemimethylierten parentalen Plasmide (5´-G^{m6}ATC-3´). Die synthetisch aus der PCR hervorgegangenen Produkte sind nicht methyliert und werden somit nicht geschnitten. Das Reaktionsprodukt wurde in chemisch

[10] murin: SOCS1 (gi 2245381); SOCS3 (gi 31982458); CIS (gi 18380949)
human: SOCS1 (gi 2245383); SOCS3 (gi 21536311); CIS (gi 21594866)

kompetente *E. coli* Bakterien (NEB-5 alpha: hS1/Del+hS3, TOP10 One Shot™: restlichen Mutanten) transformiert und auf LB-Kanamycin-Agarplatten selektioniert. Zur Analyse der klonierten Konstrukte wurden Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab hergestellt. Die DNA wurde vermessen und mittels Sequenzierung (Sequenzierprimer: Tabelle 2-1) verifiziert.

Für die ortsgerichtete Mutagenese setzten sich die PCR-Ansätze aus 125 ng der jeweiligen Primer, 10 ng Plasmid-DNA, 1 µl dNTP Gemisch, 3 µl QuikSolution, 2,5 U *PfuTurbo* [2,5 U/µl] DNA-Polymerase und dem 10x Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammen. Die PCR-Reaktion wurde bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: Denaturierung bei 95°C für 1 min, gefolgt von 18 Zyklen bestehend aus 50 s Denaturierung bei 95°C, Anlagerung der Primer bei 60°C für 50 s und Synthese bei 68°C für 1 min/kb. Die finale Elongationszeit bei 68°C betrug 7 min. Anschließend wurden die PCR-Ansätze auf 4°C abgekühlt.

Die Expression der SOCS-Proteine wurde nach Transfektion der Plasmide in HEK 293 Zellen mittels Western Blot Analyse kontrolliert.

Tabelle 2-6: Mutagenese-Primer zur Korrektur von missense-Mutationen und gezielten Mutationen, Deletionen und Insertionen in pEGFP-C1-hSOCS1 (Sequenzen unter 2.1.8)

DNA-Matrize	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	resultierendes Plasmid
Primer zur Korrektur von missense-Mutationen			
pEGFP-C1-hSOCS1	hSOCS1-C_mut_fw	hSOCS1-C_mut_rv	
pEGFP-C1-hSOCS3	hSOCS3muta_fw	hSOCS3muta_rv	
pEGFP-N1-mSOCS1	mS1/1-N-mut_fw	mS1/1-N-mut_rv	
pEGFP-N1-mSOCS3	mS3/2-N-mut_fw	mS3/2-N-mut_rv	
pEGFP-N1-hCIS	hCIS/2-N-mut:TS_fw	hCIS/2-N-mut:TS_rv	
	hCIS/2-N-mut:GS_fw	hCIS/2-N-mut:GS_rv	
Primer für gezielte Mutationen, Deletionen und Insertionen in pEGFP-C1-hSOCS1			
pEGFP-C1-hSOCS1	F58A_for	F58A_rev	pEGFP-C1-S1/F58A
pEGFP-C1-hSOCS1	R104K_for	R104K_rev	pEGFP-C1-S1/R104K
pEGFP-C1-hSOCS1	P165-NLS_fw	P165-NLS_rv	pEGFP-C1-S1/P165X
pEGFP-C1-hSOCS1	iSB-Del_for	iSB-Del_rev	pEGFP-C1-S1/R172X
pEGFP-C1-hSOCS1	1RA-NLS_fw	1RA-NLS_rv	pEGFP-C1-S1/1RA
pEGFP-C1-S1/1RA	2RA-NLS_fw	2RA-NLS_rv	pEGFP-C1-S1/2RA
pEGFP-C1-S1/2RA	3RA-NLS_fw	3RA-NLS_rv	pEGFP-C1-S1/3RA
pEGFP-C1-S1/3RA	4RA-NLS_fw	4RA-NLS_rv	pEGFP-C1-S1/4RA
pEGFP-C1-S1/4RA	5RA-NLS_fw	5RA-NLS_rv	pEGFP-C1-S1/5RA
pEGFP-C1-S1/5RA	6RA-NLS_fw	6RA-NLS_rv	pEGFP-C1-S1/6RA
pEGFP-C1-hSOCS1	1NLS-Del_fw	1NLS-Del_rv	pEGFP-C1-S1(Δ158-173)
pEGFP-C1-S1(Δ158-173)	hS1/Del+hS3_fw	hS1/Del+hS3_rv	pEGFP-C1-S1(Δ158-173) + S3(175-188)

2.2.2.3 Modifikation durch Einfügen von Oligonukleotiden

Für die Insertion von 16 Aminosäuren in das humane CIS-Protein wurde folgende Klonierungsstrategie gewählt. Als erstes wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SpeI zwischen SH2-Domäne und SOCS-Box des CIS-Proteins mittels ortsgerichteter Mutagenese generiert. Anschließend wurden die Aminosäuren der NLS in Form eines doppelsträngigen, phosphorylierten Oligonukleotids, welches SpeI-Schnittstellen an den Enden trug, in das mit SpeI-geschnittene dephosphorylierte pEGFP-C1-hCIS Plasmid ligiert.

2.2.2.3.1 Generierung einer Restriktionsenzymschnittstelle im humanen CIS-Protein

Für die Generierung einer zusätzlichen Restriktionsenzymschnittstelle für das Enzym SpeI im humanen GFP-markierten CIS-Plasmid wurde Alanin (GCT) an Position 204 nach Serin (AGT) mutiert. Dazu wurden zwei Nukleotide durch gezielte Mutation mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese (2.2.2.2) verändert. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 2-7 aufgeführt. Die Mutation wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Tabelle 2-7: Mutagenese-Primer für Klonierung der NLS in pEGFP-hCIS (Primersequenzen unter 2.1.8)

DNA-Matrize	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	resultierendes Plasmid
Primer zur Generierung einer SpeI-Restriktionsenzymschnittstelle			
pEGFP-C1-hCIS	hCIS-Mut_fw	hCIS-Mut_rv	pEGFP-C1-hCIS/Mut
Oligonukleotide für Insertion der NLS in pEGFP-C1-hCIS			
pEGFP-C1-hCIS/Mut	SpeI-fw	SpeI-rv	pEGFP-C1-hCIS/NLS

2.2.2.3.2 Insertionen in das humane CIS-Protein

Es wurden zwei komplementäre Oligonukleotide generiert, die die Nukleotidsequenz der zu inserierenden Aminosäuren umfasste und am 5`- und 3´-Terminus zusätzlich die SpeI-Restriktionsenzymschnittstellen sowie 5´-Phosphat-Reste trugen.

Die Oligonukleotide (Tabelle 2-7) wurden in Aqua dest. gelöst und auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Anschließend wurde je 1 µg der Oligonukleotide zusammen mit 2 µl Annealing-Puffer (10x) in einem 20 µl-Ansatz aneinandergelagert. Dies erfolgte bei folgenden Reaktionsbedingungen: 95°C für 10 min, Abkühlung 3°C/min bis 4°C.

Anschließend wurde das Plasmid pEGFP-C1-hCIS (3 µg) mit SpeI in einem 50 µl-Ansatz nach Angaben des Herstellers für 2 h bei 37°C geschnitten. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C. Der Verdau wurde mit Hilfe eines analytischen Agarosegels überprüft (2.2.2.1.2).

Um die Religation des linearisierten Vektors nach Verdau mit nur einem Restriktionsenzym zu verhindern, wurde die 5´-Phosphatgruppe des verdauten Plasmids durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase („Calf Intestine Alkaline Phosphatase“, CIAP) entfernt. Dies erfolgte in einem Ansatz mit 50 µl des geschnittenen pEGFP-C1-hCIS Vektors und 2 U CIAP. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Eine anschließende Inkubation von 15 min bei 85°C denaturierte das Enzym. Die alkalische Phosphatase ist in den meisten Restriktionsenzympuffern aktiv und konnte daher sofort nach dem Verdau zum Ansatz hinzugegeben werden. Bevor die Vektor-DNA in die Ligation eingesetzt wurde, erfolgte eine Reinigung des geschnittenen Vektors mit dem QIAquick PCR Purification Kit (2.2.2.1.5), um das Enzym zu entfernen.
Nach Ligation (2.2.2.1.6), Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien (TOP10 One Shot™ Kit, 2.2.2.1.7) und Isolierung der Plasmid-DNA (2.2.2.1.8) wurde nach Bestimmung der DNA-Konzentration (2.2.2.1.9) die Klonierung mittels Sequenzierung (2.2.2.1.10) verifiziert.

2.2.2.4 Transiente Transfektion eukaryoter Zelllinien

Bei der Transfektion gelangt nur ein Teil der eingesetzten DNA-Moleküle in den Zellkern. Die Plasmid-kodierten Gene werden dort exprimiert. Die Lebensdauer der aufgenommenen DNA ist immer auf wenige Tage beschränkt, danach ist die fremde DNA vollständig abgebaut, man spricht daher von transienter Transfektion. In seltenen Fällen (bei einer von ca. 10^4 Zellen) wird die aufgenommene DNA in das Genom der Zelle integriert (stabile Transfektion).
Die hier angewandte transiente Transfektionsmethode von eukaryotischen HEK 293, NIH/3T3 und RAW 264.7 Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit dem kationischen Lipid Lipofectamin™ 2000 nach dem unten aufgeführten Protokoll (Tabelle 2-8). Die zu transfizierenden Zellen wurden dazu am Tag vor der Transfektion in Antibiotika-freiem Medium so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 60-70 % aufwiesen. Für die Transfektion wurden zuerst zwei Ansätze (zum einen der die Plasmid-DNA enthaltende Ansatz, zum anderen der das Lipofectamin™ 2000 Reagenz enthaltende Ansatz) in entsprechenden Reaktionsgefäßen in OptiMEM (chemisch definiertes Medium mit reduziertem Serum-Anteil) wie folgt hergestellt:

Tabelle 2-8: Lipofectamin ™ 2000 Reaktionsansansätze in verschiedenen Kulturgefäßen

Kulturgefäß	Plasmid-DNA-Ansatz		Lipofectamin™ 2000 Ansatz	
	DNA-Menge (µg)	OptiMEM (µl)	Lipofectamin (µl)	OptiMEM (µl)
24-well Platte	0,8	50	0,8	50
12-well Platte	1,6	100	1,6	100
6-well Platte	4,0	250	4,0	250

Die Ansätze wurden jeweils durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und der Lipofectamin™ 2000 Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Lipofectamin™ 2000 Ansatz zum Plasmid-Ansatz pipettiert, vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Lipofectamin-Gemisch vorsichtig auf die Zellen getropft und die Platten geschwenkt. Die Transfektion von NIH/3T3 Zellen erfolgte in Serum- und Antibiotika-freiem Medium. Dazu wurden die Zellen kurz vor der Transfektion einmal mit Serum- und Antibiotika-freiem Medium gewaschen und die benötigte Menge Serum- und Antibiotika-freies Medium in die Zellkulturplatten vorgelegt (24-well Platte: 500 µl, 12-well Platte: 1 ml, 6-well Platte: 2 ml). 4-5 h nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch Serum-haltiges Medium ersetzt. Die Inkubation aller Zellen erfolgte bei 37°C über Nacht. Am anderen Tag wurden die Zellen je nach Versuchsansatz weiterverarbeitet.

2.2.2.5 Quantitative RT-PCR

2.2.2.5.1 RNA-Aufreinigung

Für die RNA-Isolierung wurde das High Pure RNA Isolation Kit verwendet, welches einen DNAse I Verdau beinhaltet. Die Aufreinigung erfolgte über die Absorption von Nukleinsäuren an eine Glasfaser/Silica-Oberfläche in Anwesenheit eines chaotropen Salzes. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen. Der DNaseI-Verdau erfolgte für 30 min und zur Elution wurden 30 µl Elutionspuffer verwendet. Die aufgereinigte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.5.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Zu Beginn wurde die RNA photometrisch vermessen und 1,5 µg Gesamt-RNA in die Synthese-reaktion eingesetzt. Diese erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers unter Verwendung von Oligo$(dT)_{18}$-Primern, wobei ausschließlich mRNA mit einer Poly A-Sequenz am 3´-Ende in cDNA umgeschrieben wird. Die Synthesereaktion erfolgte in einem Cycler, die erhaltene cDNA wurde 1:4 mit Aqua dest. verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.5.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) ist eine Methode, die unter anderem für Genexpressionsanalysen und DNA-Quantifizierungen genutzt werden kann. Verwendet wurde hierzu das 7900HT Fast Real-Time PCR System.

Die Technologie nutzt die 5´-3´-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aus, um kontinuierlich die Akkumulation von PCR-Produkten während des gesamten PCR-Prozesses zu detektieren und ermöglicht so eine einfache Quantifizierung. Hierfür wird eine zweifach markierte fluorogene Oligodeoxynukleotid-Sonde verwendet. Die Sonde besteht aus einem kurzen Oligodeoxynukleotid, das mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert ist. Am 5´-Ende trägt die Sonde den Reporter-Farbstoff (FAM, 6-Carboxyfluorescein) und am 3´-Ende, über ein Linker-Arm-Nukleotid gebunden, den Quencher-Farbstoff (TAMRA, 6-Carboxytetramethylrhodamin). Das 3´-Ende der Sonde ist durch eine Phosphatgruppe blockiert, damit es nicht als Primer fungieren kann. Die Sequenz dieser Sonde ist zu einer internen Zielsequenz des Amplifikats komplementär. Wird die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) angeregt, so wird die Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffs durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) durch den Quencher-Farbstoff unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Primer und Sonde an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase trifft nun die Taq-Polymerase auf die Sonde und schneidet diese durch ihre Exonukleasefunktion. Dadurch wird die räumliche Nähe und damit auch der FRET zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff aufgehoben. Das dabei resultierende Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht optimal bindende Sonden verdrängt werden. Des Weiteren ist das Fluoreszenzsignal ein direktes Maß für die Menge des entstehenden Amplifikats. Das PCR-Gerät misst nach jedem PCR Zyklus das emittierte Spektrum. Damit wird es möglich, die Analysen nicht als Endpunkt-Messung durchzuführen, sondern den Verlauf der PCR in Echtzeit (*real-time*) zu verfolgen. Mittels entsprechender Software werden die anteiligen Reinfarbenkomponenten aus dem aufgenommenen Fluoreszenzprofil errechnet. Die Menge an normalisierter Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs wird damit kalkuliert. Die Ergebnisse werden dann gegen die PCR-Zykluszahl aufgetragen, wodurch die PCR-Amplifikation kontinuierlich verfolgt werden kann. Um die Quantifizierung der initialen Ziel-DNA in jeder PCR-Reaktion zu ermöglichen, wird ein Fluoreszenz-Schwellenwert angegeben. Damit ist die Bestimmung des Zeitpunktes möglich, an dem der Amplifikations-Plot einer jeden Probe diesen Schwellenwert überschreitet (definiert als *threshold cycle number*, C_t). Unterschiede im C_t-Wert werden genutzt, um die relative Menge der PCR-Zielsequenz in jeder Probe zu quantifizieren.

Die Auswertung der Daten erfolgte anhand der Bestimmung der relativen Expression (rE), bei der Zielsequenzen relativ zu einer endogenen Referenz bestimmt wurden. Hierbei wurde für die zu bestimmenden Transkripte der jeweilige C_t-Wert ermittelt. Anschließend erfolgte eine Normalisierung auf eine endogene, nicht-regulierte (konstitutiv exprimierte) Amplifikationskontrolle (*housekeeping*-Gen), welche Unterschiede in der Menge der Gesamt-RNA kompensiert. Für Nachweise im murinen System wurde hierfür β-Aktin gewählt. Die Normalisierung erfolgte mittels Differenzbildung der Schwellenwerte von Zielsequenz und *housekeeping*-Gen und ergab den ΔC_t-Wert:

$$\Delta C_t = C_t \text{ (Zielsequenz)} - C_t \text{ (}\textit{houskeeping}\text{-Gen)}$$

Anschließend wurde der ΔC_t-Wert, der eine Aussage über die Menge an Zielsequenz im Vergleich zur endogenen Referenz innerhalb einer Probe macht, wie folgt als relative Expression (rE)[11] ausgewertet:

$$rE = 1/(2^{\Delta ct})$$

Die Komponenten des qPCR Core Kits wurden nach Angaben des Herstellers rekonstituiert. Die 25 µl-Ansätze wurden gemäß Standardprotokoll mit 2,5 µl cDNA (1:4 in Aqua dest. verdünnt), je 12,5 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 3,7 pmol Sonde und 5 mM $MgCl_2$ in Doppelbestimmung bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 95°C 10 min (Hitzeaktivierung der Taq Polymerase); 40x (95°C 15 s, 60°C 1 min).

Die Spezifität der quantitativen RT-PCR wurde mittels no RT-Kontrolle (*no reverse transcriptase*; Auslassen der reversen Transkriptase bei der cDNA-Synthese) und NTC-Kontrolle (*no template*; Auslassen der Matrize in der PCR) überprüft.

2.2.3 Biochemische und immunologische Methoden

2.2.3.1 Western Blot Analyse

Die dazu verwendeten Puffer sind unter 2.1.6 beschrieben.

2.2.3.1.1 Herstellung von Proteinlysat

Je nach Versuchsansatz wurde die entsprechende Anzahl Zellen in Zellkulturplatten ausgesät, transfiziert und/oder stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor sie in 200-500 µl frisch komplementiertem RIPA-Lysepuffer (2.1.6) aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurden. Die Lyse der Zellen erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis mit zwischenzeitlicher Durchmischung. Danach wurde das Lysat für 15 min bei 14.000 g und 4°C (Biofuge stratos) zentrifugiert, um die Proteine von Membranen und Zelldetritus zu reinigen. Der klare Überstand wurde in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde in den Lysaten die Proteinmenge mittels BCA-Proteinassay bestimmt. Die restlichen Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.1.2 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Der Bicinchoninsäure- (BCA-) Assay ist eine Methode, um Proteinkonzentrationen zu ermitteln. Dabei wird BCA als Detektionssystem mit dem Biuret-Assay, bei dem gelöstes Biuret (Carbamoylharnstoff) und Kupfersulfat in alkalischem, wässrigem Milieu einen rotvioletten Farbkomplex

[11] $rE = 1/[(1+E)^{\Delta ct}]$; wobei bei einer optimalen Effizienz E=1 ist, das heißt $rE = 1/(2^{\Delta ct})$

bilden, kombiniert. Bei der Reaktion werden Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen (CO-NH) mit Cu^{2+} komplexiert. Dabei kommt es zur teilweisen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+}. Diese Reaktion ist spektralphotometrisch unempfindlich. Cu^{+}-Ionen reagieren allerdings mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem spektralphotometrisch empfindlichen BCA-Cu^{+}-Komplex, der bei einer Absorption von 562 nm gemessen werden kann. Die Absorption kann nicht direkt eine Aussage über die Konzentration geben, da Cu^{+}-Ionen nur teilweise reduziert werden bzw. nicht alle Cu^{+}-Ionen einen BCA-Cu^{+}-Komplex bilden. Um aber die Konzentration dennoch bestimmen zu können, wird zunächst eine Eichgerade über bekannte Proteinkonzentrationen erstellt. Die gemessene Absorption und anschließende Zuordnung gibt dann eine eindeutige Aussage über die Konzentration des Proteins im Lysat.
Zu 20 µl Probe (1:4 mit PBS verdünnt) wurden 180 µl frisch angesetzte BCA/Kupfersulfat-Lösung in einer 96-well Flachbodenplatte gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der kolorimetrische Nachweis von Proteinen erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 550 nm. Unter Verwendung einer Standardreihe mit BSA (Ausgangskonzentration: 2 mg/ml) wurden die Konzentrationen mit Hilfe des Auswerteprogramms „Magellan V 5.0“ (Tecan, Salzburg, Österreich) berechnet. Die Standardbestimmung wurde nach der Vier-Parameter-Methode durchgeführt.

2.2.3.1.3 SDS-PAGE

Mit einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate poly-acrylamid gel-electrophoresis*) können Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichts während ihrer Wanderung durch eine Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Dabei erhalten alle Proteine durch den Zusatz des stark anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat eine negative Ladung, sodass negativ geladene SDS-Protein-Komplexe proportional zum Molekulargewicht entstehen. SDS eliminiert außerdem alle nichtkovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein. Niedermolekulare Thiole wie β-Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirken eine Reduktion von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Demzufolge verlieren die Charakteristika Ladung und Tertiärstruktur bei der gelelektrophoretischen Auftrennung ihren Einfluss, sodass die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der SDS-Protein-Komplexe ist dabei ungefähr dem Logarithmus ihrer Molekularmasse proportional.
Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12%- oder 15%-igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel nach Laemmli (Laemmli 1970). Die aufzutrennenden Proteingemische wurden 4:1 mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Dabei wurden pro Spur 10-20 µg Protein im Volumen von 25 µl aufgetragen. Neben den Proben wurde ein Größenmarker (2.1.9), der aus Proteinen definierter Molekulargewichte bestand, mitgeführt.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei 140 V in einem vertikalen Gelelektrophorese- (SDS-PAGE-) System in SDS-Laufpuffer.

2.2.3.1.4 Western Blot (Elektrotransfer von Proteinen)

Anschließend wurden die Proteine aus dem SDS-Gel in einem Nassblotverfahren auf eine Polyvinyldifluorid- (PVDF-) Membran transferiert, die zur Aktivierung erst kurz in Methanol und anschließend in SDS-Blotpuffer geschwenkt wurde. Für den Transfer wurden Blotting-Papiere und die PVDF-Membran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und in die Blot-Kammer wie folgt angeordnet: Anode (+) → zwei mit SDS-Blotpuffer angefeuchtete Schwämme → zwei mit SDS-Blotpuffer angefeuchtete Blotting-Papiere → vorbehandelte Membran (siehe oben) → Trenngel → zwei mit SDS-Blotpuffer angefeuchtete Blotting-Papiere → ein mit SDS-Blotpuffer angefeuchteter Schwamm → Kathode (-). Die Übertragung der Proteine erfolgte unter Kühlung der Blot-Kammer bei 200 mA für 1 h.

2.2.3.1.5 Immunblot (Immunanfärbung nach Western Blot)

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2 h in Blockpuffer bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem Protein-spezifischen Erstantikörper in Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnt inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran (je 5 min) in Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde die Membran 1 h mit einem HRP- (*Horseradish Peroxidase*-) gekoppelten Zweitantikörper in Antikörper-Verdünnungspuffer bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal je 5 min in Waschpuffer gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mittels Chemilumineszenz mit ECL-Reagenz nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden zwei verschiedene Reagenzien verwendet. Der Nachweis von endogenen SOCS-Proteinen aus nukleären und zytosolischen Extrakten erfolgte mit SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate. Dieses Reagenz enthält zusätzlich eine Verstärker-Substanz (*Enhancer*), die das Lichtsignal intensiviert und die Emissionsdauer erhöht. Somit können auch sehr geringe Mengen Protein detektiert werden. Ansonsten wurde Immobilon™ Western Chemilumineszenz HRP Substrat verwendet. Die Expositionszeiten wurden für eine optimale Entwicklung variiert. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des Geldokumentationssystems Chemi-Smart 5000, Peqlab, Erlangen detektiert und mit der Chemi-Capt Software Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell digitalisiert aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Bio-1D Software von Vilber Lourmat.

2.2.3.1.6 Strippen von PVDF-Membranen

Sollte nach der ersten Nachweisreaktion die Detektion von weiteren Proteinen erfolgen, wurde die PVDF-Membran nach der ECL-Entwicklung dreimal mit Waschpuffer für 5 min gewaschen und anschließend für 30 min bei 50°C in einer Glas-Petrischale auf einer Heizplatte unter dem Abzug in Stripping-Puffer inkubiert, um die gebundenen Antikörper zu entfernen (*strippen*). Danach wurde die Membran erneut dreimal je 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Überprüfung, ob die Antikörper entfernt wurden, erfolgte eine erneute Inkubation der PVDF-Membran mit ECL-Reagenz und deren Entwicklung für 30 min. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen und es konnte mit Schritt 2.2.3.1.5 weiter verfahren werden.

2.2.3.2 Immunzytochemie

Zur Beurteilung der Lokalisation der verschiedenen SOCS-Proteine wurde eine Immunfluoreszenzdarstellung durchgeführt. Dazu wurden sterile Deckgläser (ø 12 mm) in die Vertiefungen einer 24-well Zellkulturplatte gelegt, mit 270 µl Poly-D-Lysin-Lösung pro Deckglas bedeckt und mindestens 3 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Poly-D-Lysin mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Deckgläser wurden dreimal mit sterilem Aqua dest. gewaschen. Danach wurden die Zellen ($0{,}2x10^6$ HEK 293; $0{,}1x10^6$ NIH/3T3; $0{,}15x10^6$ HeLa; $0{,}12x10^6$ RAW 264.7) in 500 µl Antibiotika-freiem Medium ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen (2.2.2.4) mit den verschiedenen SOCS-Plasmiden, die entweder GFP-markiert waren oder andere Nachweisepitope trugen.

Die GFP-markierten SOCS-Konstrukte konnten bereits 24 h nach der Transfektion direkt mikroskopisch hinsichtlich der Lokalisation beurteilt werden. Zur besseren Beurteilung der Lokalisation wurde noch eine Kernfärbung angeschlossen. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit DAPI-Lösung (3 µM) verdünnt in Ethanol für 30 min bei Raumtemperatur gefärbt und gleichzeitig fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS wurden die Deckgläser mit den Zellen auf einen Objektträger übertragen und mit dem Mounting Medium AF1 eingebettet.

Für den Nachweis der myc- bzw. flag-markierten SOCS-Proteine im Fluoreszenzmikroskop wurde eine direkte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Zellen wurden 18-24 h nach Transfektion einmal mit TBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 90%-igem Methanol (-20°C) für 20 min bei -20°C. Anschließend wurden die Zellen mit TBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen für Antikörper mit 10% (v/v) Ziegenserum in TBS für 45 min bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden die Zellen viermal mit TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit den primären Antikörpern über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Dazu wurde der anti-flag Antikörper 1:100 in TBS verdünnt und der anti-myc Antikörper 1:1000 in TBS/3%BSA. Am nächsten Tag

wurden die Kerne nach einmaligem Waschen der Zellen mit TBS mittels DAPI-Lösung (3 µM in TBS) für 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem letzten Waschschritt mit TBS wurden die Zellen mit einem Mounting Medium eingedeckt und gegen Ausbleichen geschützt.

Für die Darstellung des Spleißfaktors SC-35 im Fluoreszenzmikroskop wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 18-24 h nach Transfektion einmal mit PBS gewaschen bevor sie für 10 min bei Raumtemperatur in 2%-iger Paraformaldehyd-Lösung mit 0,2% Triton X-100 fixiert wurden. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit Aceton für 5 min bei -20°C. Danach wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit anti-Spleißfaktor 1:2000 in PBS gefärbt. Daran schlossen sich erneut drei Waschschritte für je 5 min mit PBS an. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Zweitantikörper polyklonal rabbit anti-mouse Ig/TRITC 1:30 in PBS für 30 min im Dunkeln gefärbt. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschritten in PBS erfolgte die DAPI-Färbung (3µM in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurden die Zellen zweimal kurz in PBS gewaschen und in Mounting Medium eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Leica DMI 6000B Fluoreszenz-Inversmikroskop mit einem HCX PL APO 63x/1.4 Ölimmersionsobjektiv. Bilder wurden mit der Leica DFC 350 FX Kamera aufgenommen und mit der Leica Application Suite Advanced Fluorescence 1.6.1 Software ausgewertet. Dazu wurden die Filterblöcke A4 für DAPI (Exzitationsfilter 360/40; dichromatischer Spiegel 400; Suppressionsfilter 470/40), YFP für GFP bzw. FITC (500/20; 515; 535/30) und DSRed für TRITC (580/20; 595; 630/55) genutzt. Als Anregungsquelle diente eine 100 W Quecksilber-Lampe. Generell wurde der automatische Belichtungsmodus gewählt. Eine Ausnahme stellten Überbelichtungsexperimente dar. Hierbei wurden die Komponenten verstärkt, um eine schwache Fluoreszenz besser hervorzuheben. Die Darstellung erfolgte im Falschfarbenmodus.

Zur Beobachtung von lebenden Zellen wurden sterile Deckgläser (ø 30 mm) in Vertiefungen einer 6-well Zellkulturplatte gelegt, mit 700 µl Poly-D-Lysin-Lösung pro Deckglas bedeckt und 3 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Poly-D-Lysin mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Deckgläser dreimal mit sterilem Aqua dest. gewaschen wurden, erfolgte die Zellaussaat von $1x10^6$ HEK 293 Zellen in 2 ml Antibiotika-freiem Medium. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen (2.2.2.4) mit dem humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Konstrukt. Nach Inkubation der Zellen über Nacht wurde die grüne Fluoreszenz in den Zellen in einer beheizbaren Kammer (POCmini-Chamber-System) mit dem Laserscanmikroskop LSM 510 Meta visualisiert. Dazu wurde die Laserlinie 488 nm, das Plan-Apochromat 63x/1.4 Ölimmersions-objektiv sowie die Standard FITC/GFP Filterkombination (LP-Filter 505[12], HFT 488[13]) verwendet. Für die Stimulationsexperimente wurden HEK 293 Zellen mit 100 ng/ml humanem IFN-α

[12] LP-Filter (Langpass-Filter, Emissionsfilter) legen den Fluoreszenz-Wellenlängenbereich für den jeweiligen Kanal fest. Sie lassen das Licht, das über ihrer Kennzahl liegt durch (Detektion) und reflektieren das Licht mit geringerer Wellenlänge.

[13] HFT (Hauptfarbteiler) dienen der Trennung von Anregung und Emission.

stimuliert, über einen bestimmten Zeitraum beobachtet und in definierten Abständen Bilder mit einer konfokalen Blende von 96 µm aufgenommen. Für die Bleichexperimente wurden definierte Regionen (ROIs: Regions of Interest) im Zellkern von transfizierten Zellen am Bildschirm ausgewählt und markiert. Unmittelbar vor und nach dem Bleichen dieser Regionen mit dem Laser wurden Bilder mit einer konfokalen Blende von 200 µm über die internen Detektoren (PMTs: Photomultiplier Tubes = Sekundärelektronenvervielfacher) aufgenommen und mit der LSM Software Version 3.0 ausgewertet.

2.2.3.3 Zellfraktionierung von transfizierten HEK 293 Zellen

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse hinsichtlich der Lokalisation der verschiedenen SOCS-Proteine in der Zelle wurden mit Hilfe einer Zellfraktionierung transfizierter HEK 293 Zellen überprüft. Durch den Einsatz von hypotonen Puffern und diffentiellen Zentrifugationsschritten von Zellhomogenaten wurden die einzelnen Zellbestandteile aufgetrennt.
Dazu wurden $3x10^6$ HEK 293 Zellen pro Ansatz in einer 6-well Zellkulturplatte (verteilt auf drei 6-wells) ausgesät und entsprechend 2.2.2.4 transfiziert. Nach über Nacht Inkubation wurden die Zellen fraktioniert. Die Zellen wurden als erstes einmal mit PBS gewaschen, bevor sie in 750 µl hypotonem Lysepuffer aufgenommen wurden. Nachdem die Zellen für 30 min auf Eis inkubierten und zwischendurch bei hoher Geschwindigkeit für 15 s auf dem Vortexer gut gemischt wurden, erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 25 x g (Biofuge stratos). Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 15 min bei 4°C und 25 x g zentrifugiert. Der aus dem letzten Zentrifugationsschritt gewonnene Überstand diente zur Aufreinigung der zytosolischen Fraktion. Dazu wurde der Überstand für 10 min bei 4°C und 12.500 x g (Biofuge stratos) zentrifugiert. Die zytosolische Fraktion (Überstand) musste vor der Western Blot Analyse noch mit 4x SDS-Probenpuffer 1:4 verdünnt werden. Die nukleären Zellpellets aus den beiden Zentrifugationsschritten mit 25 x g wurden anschließend in 750 µl nukleären Isolationspuffer aufgenommen, für 5 min auf Eis inkubiert, um die Membrankontaminationen aufzulösen, und anschließend für 15 min bei 4°C und 25 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das nukleäre Zellpellet erneut in 750 µl nukleären Isolationspuffer resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4°C und 25 x g zentrifugiert. Das Pellet (gereinigte Nuklei) wurde in 750 µl eines 2%-igen Triton-haltigen nukleären Isolationspuffers aufgenommen und für 10 min bei 4°C und 12.500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, im Heizblock bei 95°C für ca. 10 min denaturiert mit zwischenzeitlicher Durchmischung auf dem Vortexer bei hoher Geschwindigkeit und direkt im Western Blot (2.2.3.1) zur Analyse eingesetzt.

2.2.3.4 Endogener SOCS-Nachweis aus RAW 264.7 Zellen

Endogene SOCS-Proteine werden in unstimulierten Immunzellen nicht oder nur geringfügig exprimiert. Erst nach Stimulation kommt es zur Induktion der Proteinsynthese. Das SOCS1-Protein hat außerdem eine kurze Halbwertszeit und wird demzufolge schnell wieder abgebaut. Um dennoch die Proteine detektieren zu können, wurde vor der Western Blot Analyse eine Immunpräzipitation durchgeführt, um das jeweilige Protein in den Lysaten anzureichern.

2.2.3.4.1 Endogener SOCS-Nachweis aus Gesamtzellextrakten mit anschließender Immunpräzipitation

Der Nachweis von endogenen SOCS-Proteinen aus Gesamtzellextrakten erfolgte aus RAW 264.7 Makrophagen. Dazu wurden $18x10^6$ RAW 264.7 Zellen pro Ansatz in einer 6-well Zellkulturplatte (verteilt auf drei 6-wells) ausgesät und nach 18-24 h mit murinem IFN-γ zur Induktion des SOCS1-Proteins oder LPS zur Induktion des SOCS3-Proteins für 4 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in je 600 µl RIPA-Puffer lysiert und entsprechend 2.2.3.1.1 aufgearbeitet. Aus diesen Lysaten wurde anschließend eine Immunpräzipitation durchgeführt.
Unter Immunpräzipitation versteht man die Anreicherung eines Antigens und gegebenenfalls dessen Interaktionspartner über einen spezifischen Antikörper. Durch Bindung des konstanten Teils (Fc-Teil) des Antikörpers an Protein A oder Protein G können die Antigen-Antikörper-Komplexe aus einem Gewebehomogenat oder Zelllysat aufgereinigt werden. Der Nachweis der Proteine erfolgt im Western Blot.
Dazu wurden die Lysate mit 6 µl anti-SOCS1 monoklonalen Antikörpern (2E1/2D4) oder 3 µl anti-SOCS3 polyklonalem Serum für 30 min auf Eis inkubiert bevor 40 µl Protein A-Agarose zu jedem Ansatz gegeben wurde. Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet an die konstanten Ketten (Fc-Teil) von IgG-Antikörpern mit hoher Affinität. Die Antigenbindestellen sind somit frei zugänglich. Durch diese gerichtete Bindung der Antikörper an Protein A wird die Sensitivität und Ausbeute deutlich erhöht. Während einer Inkubation von 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler konnten die mit Antikörpern beschichteten Protein A-Agarose-Kügelchen spezifisch mit Antikörpern im Lysat reagieren. Anschließend wurden die Protein A-Agarose Kügelchen bei 13.000 g, 4°C für 2 min (Biofuge stratos) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Kügelchen dreimal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, um andere Proteine und Zellbestandteile zu entfernen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch Kochen (95°C, 5-10 min) in 40 µl 2x SDS-Probenpuffer von der Matrix abgelöst und im Western Blot in einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel (2.2.3.1.3) analysiert.

2.2.3.4.2 Endogener SOCS-Nachweis nach Zellfraktionierung mit anschließender Immunpräzipitation

Für den Nachweis von endogenen SOCS-Proteinen aus zytosolischen und nukleären Extrakten wurden pro Ansatz $53x10^6$ RAW 264.7 Zellen (verteilt auf zwei Zellkulturschalen: 144 mm x 21 mm; 145 cm^2) ausgesät und nach 18-24 h mit murinem IFN-γ zur Induktion des SOCS1-Proteins stimuliert. Die Makrophagen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst, in ein Zellkulturröhrchen überführt und zentrifugiert (1.300 rpm, 5 min, 4°C; Multifuge 3 S-R). Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zellfraktionierung. Für die Lyse der Zellen wurde 1 ml hypotoner Lysepuffer verwendet. Nachdem die Zellen für 30 min auf Eis inkubierten, alle 10 min zweimal je 15 s auf dem Vortexer gut gemischt wurden, erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 25 x g (Biofuge stratos). Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 15 min bei 4°C und 25 x g zentrifugiert. Der aus dem letzten Zentrifugationsschritt gewonnene Überstand diente zur Aufreinigung der zytosolischen Fraktion. Dazu wurde der Überstand für 10 min bei 4°C und 12.500 x g (Biofuge stratos) zentrifugiert. Die zytosolische Fraktion (Überstand) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der NaCl-Gehalt der zytosolischen Fraktion (10 mM) durch Zugabe von 140 µl einer 1 M NaCl-Lösung auf eine annähernd physiologische Salzkonzentration von ca. 150 mM für die folgende Immunpräzipitation eingestellt. Die nukleären Zellpellets aus den beiden Zentrifugationsschritten mit 25 x g wurden anschließend in 1 ml nukleären Isolationspuffer aufgenommen, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 25 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet erneut in 1 ml nukleären Isolationspuffer resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4°C und 25 x g zentrifugiert. Der ganze Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, bevor die gereinigten Nuklei in 500 µl 2%-igen Triton-haltigen nukleären Isolationspuffers resuspendiert wurden, für 30 min auf Eis inkubierten und alle 10 min zweimal für je 15 s bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortexer gemischt wurden. Anschließend wurde auch hier der NaCl-Gehalt der nukleären Fraktion (280 mM) etwa einer physiologischen Salzkonzentration angepasst. Dazu wurden 500 µl A. dest. komplementiert mit den entsprechenden Inhibitoren zur nukleären Fraktion gegeben. Somit lag der NaCl-Gehalt in der nukleären Fraktion etwa bei 140 mM. Aus diesen zytosolischen und nukleären Extrakten wurde anschließend eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden die Extrakte mit 6 µl anti-SOCS1 monoklonalen Antikörpern (2E1/2D4) für 30 min auf Eis inkubiert bevor 60 µl Protein A-Agarose zu jedem Ansatz gegeben wurde. Während einer Inkubation von 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler konnten die mit Antikörpern beschichteten Protein A-Agarose-Kügelchen spezifisch mit Antikörpern in den Extrakten reagieren. Anschließend wurden die Protein A-Agarose Kügelchen bei 13.000 g, 4°C für 2 min (Biofuge stratos) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Kügelchen der zytosolischen Extrakte dreimal mit 850 µl

komplementiertem RIPA-Puffer bzw. die Kügelchen der nukleären Extrakte dreimal mit 850 µl komplementiertem 2%-igen Triton-haltigen nukleären Isolationspuffer (1:2 in Aqua dest. verdünnt) gewaschen, um andere Proteine und Zellbestandteile zu entfernen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch Kochen (95°C, 5-10 min) in 60 µl 2x SDS-Probenpuffer von der Matrix abgelöst und im Western Blot in einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel (2.2.3.1.3) analysiert.

2.2.3.5 Luciferase Reportergen-Assay

Reportergene sind ein wichtiges Instrument zur Analyse regulatorisch aktiver Promotor- und *Enhancer*-Bereiche. Beim Luciferasesystem dient ein Biolumineszenz-hervorrufendes Gen als Reporter. Wird Luciferase in transfizierten Zellen als Reportergenprodukt hergestellt, kann die Aktivität des Enzyms *in vitro* durch eine Biolumineszenzreaktion in Zelllysaten gemessen werden. Luciferase wandelt dabei Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} in Oxyluciferin und CO_2 um. Bei dieser Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 562 nm emittiert, das in einem Luminometer gemessen werden kann. Da die gemessene Lichtemission proportional zur Menge an Luciferase im Zelllysat ist, kann indirekt auf die Transkriptionsrate des Luciferase-reportergens geschlossen werden.

Im ISRE- (*interferon stimulated response element*) Luciferase-Reporterplasmid steht das Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors (TATA-Box) mit fünf STAT1/STAT2/IRF9-abhängigen Bindestellen (ISRE-Elemente). Nach Transfektion des Reporter-plasmids und Stimulation mit Typ I IFN werden die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT2 und IRF9 hochreguliert und translozieren in den Kern, binden an den entsprechenden Promotorbereich im Reporterplasmid und induzieren dadurch die Bildung von Luciferase.

Die in einer 24-well Zellkulturplatte als Duplikate transient transfizierten HEK 293 Zellen (0,6 µg Expressionsplasmid, 0,3 µg Reporterplasmid) wurden nach 6 h Stimulation mit 100 ng/ml humanem IFN-α einmal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl PBS und 100 µl Luciferase-Substrat wurden die Zellen lysiert. 170 µl dieses Gemisches wurden in eine Lumineszenz-Platte übertragen und im Plattenluminometer (Chameleon™ II Multilabel Platereader) über den Modus Lumineszenz, direkter Messmodus (ohne Filter) und Einzelmessung für 20 s vermessen. Die Messung war möglich, da ein initiales Luciferase-Signal mit extrem kurzer Halbwertszeit (flash-type) in dem hier verwendeten Substratsystem so verändert wird, dass ein länger messbares Signal mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden entsteht (glow-type). Die Daten wurden mit der MikroWin 2000 Hidex Software ausgewertet. Anschließend wurde die Quotient von stimulierten und unstimulierten Zellen berechnet und der Leervektor (pEGFP-C1) wurde auf 100% gesetzt.

2.2.3.6 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln, wie z.B. Zellen, in einem Flüssigkeitsstrom und kann dazu verwendet werden, bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Dafür stehen dem Durchfluss-zytometer elektronische, mechanische und optische Komponenten zur Verfügung: das Flusssystem, das optische System und das Detektionssystem, womit eine multiparametrische Messung und Analyse bezüglich der Fluoreszenzmarkierung, Größe und Granularität jeder Zelle ermöglicht wird. Die Zellsuspension wird zunächst mittels Druck in die Messkanüle gedrückt und durch eine trichterartige Verengung beschleunigt, wodurch sich die Zellen in einem feinen Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander anordnen (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen passieren dann einzeln in schneller Abfolge den Lichtgang eines oder mehrerer Laser. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichts, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) mit der Größe der Zellen korreliert und das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward scatter*) ein Maß für die Zellgranularität bzw. das Plasma-Kern-Verhältnis der Zellen darstellt. Als weiterer Parameter kann die Fluoreszenz bestimmt werden. Dazu werden die Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Der Laserstrahl regt die jeweiligen Fluorochrome bzw. deren Elektronenenergieniveau an und beim Abfallen auf das Ursprungsniveau wird Licht einer charakteristischen Wellenlänge (Stokesverschiebung) emittiert. Im BD FACSCanto™ System stehen hierfür zwei Laser (Helium-Neon Laser 633 nm und Coherent Saphire Laser 488 nm) und sechs Kanäle (FL1-FL6) zur Verfügung. Je nach verwendetem Laser wird das emittierte Licht über Glasfaserkabel in ein Trigon-PMT[14] Array (HeNe Laser) oder Oktagon-PMT Array (Saphire Laser) übertragen und durch das optische System in seine spektralen Komponenten zerlegt und so gemessen, dass das schwächste Signal (Licht mit der längsten Wellen-länge) zuerst detektiert werden kann, was ingesamt die Sensitivität erhöht. Das spektralgetrennte Licht wird gemessen, mit nachgeschalteten elektronischen Komponenten verstärkt und in ein digitales Messsignal umgewandelt. Die Datendarstellung und -auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm FACS Diva V 4.1.2.

2.2.3.6.1 Intrazelluläre Färbung von Tyrosin-phosphoryliertem STAT1

Mittels intrazellulärer Färbung wurde die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Proteins STAT1 nach IFN-α Stimulation untersucht. Dazu wurden $0{,}4 \times 10^6$ HEK 293 Zellen im 12-well Format ausgesät und entsprechend 2.2.2.4 mit verschiedenen SOCS-Konstrukten transfiziert. Nach 18-24 h wurden die Zellen mittels 1x Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst, in

[14] PMT: Photomultiplier Tube, Photoelektronenvervielfacher

ein Zellkulturröhrchen übertragen, zentrifugiert (1.300 rpm, 5 min, 4°C; Multifuge 3 S-R) und einmal mit PBS/2% FCS gewaschen. Die Zellen von jedem Transfektionsansatz wurden anschließend in drei (nicht-transfizierte Zellen und mit pEGFP-C1-transfizierte Zellen) oder in zwei (Zellen, die mit den verschiedenen SOCS-Konstrukten transfiziert wurden) FACS-Röhrchen in je 400 µl Medium überführt und mit 100 ng/ml humanem IFN-α für 40 min bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen mit 1 ml PBS aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dekandiert und die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen, bevor sie anschließend mit 500 µl 4% PFA/PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem 90% Methanol versetzt und über Nacht bei -20°C permeabilisiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS/2% FCS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand dekantiert und das Restvolumen auf 100 µl eingestellt. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 8 µl Phospho-spezifischem anti-STAT1 (pY701) Alexa Fluor® 647 Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wurden die Röhrchen mit PBS/2% FCS aufgefüllt, zentrifugiert und zweimal mit PBS/2% FCS gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl PBS/2% FCS aufgenommen und mittels Durchfluss-zytometrie hinsichtlich STAT1 Tyrosin-Phosphorylierung vermessen. Dazu wurde für die An-regung der grün fluoreszierenden Zellen (GFP) die Laser-Linie 488 nm [Absorptionsmaximum: 495 nm, Emissionsmaximum: 519 nm, Detektor: D (Octagon-Array)] und für den Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung im STAT1-Protein über einen Alexa Fluor® 647 gekoppelten Antikörper die Laser-Linie 653 nm [Absorptionsmaximum: 650 nm, Emissionsmaximum: 660 nm, Detektor: B (Trigon-Array)] verwendet. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) die lebenden Zellen am Bildschirm regional eingegrenzt wurden (*Gating*). Innerhalb dieser Region wurden 20.000 grün fluoreszierende Zellen hinsichtlich STAT1 Tyrosin-Phosphorylierung untersucht. Anschließend wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) auf den grün fluoreszierenden Zellen von stimulierten und nicht stimulierten Zellen im APC-(Allophycocyanin-) Kanal bestimmt und die Differenz daraus berechnet. Der Leervektor (pEGFP-C1) wurde auf 100% gesetzt.

3 Ergebnisse

In einem ersten Teil wurde in Fortführung vorheriger Arbeiten der Arbeitsgruppe die Rolle von SOCS-Proteinen für die Regulation des TLR-Signalwegs untersucht. Der zweite Teil befasst sich mit der subzellulären Lokalisation der SOCS-Proteine.

3.1 Mechanismen der TLR-vermittelten SOCS-Induktion

SOCS-Proteine werden in ruhenden, unstimulierten Zellen im Regelfall nicht oder nur geringfügig exprimiert. Nach Stimulation von Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren sowie von Toll-like Rezeptoren (TLRs) erfolgt die Induktion der SOCS-Proteine. Allerdings ist der genaue Mechanismus der SOCS-Induktion nach TLR-Stimulation noch umstritten. Zur Klärung dieser Frage wurden zunächst Versuche mit MyD88-gendefizienten Mäusen durchgeführt. MyD88 ist ein zentrales Adaptermolekül im TLR-Signalweg. Eine Defizienz geht mit fehlender (TLR2, TLR9) oder verminderter (TLR3, TLR4) Induktion von direkten Zielgenen (z.B. TNF-α) einher.
Peritonealmakrophagen aus MyD88-gendefizienten Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Mäusen wurden mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert und hinsichtlich der SOCS-Expression mittels quantitativer RT-PCR relativ zur endogenen Kontrolle β-Aktin untersucht.

In Abbildung 3-1A ist zunächst zu erkennen, das die Induktion der Gene SOCS3 und CIS nach Stimulation mit allen getesteten TLR-Liganden komplett MyD88-abhängig war. Außerdem zeigte die Stimulation der Peritonealmakrophagen mit den verschiedenen Stimuli eine ähnliche Induktion der SOCS3-mRNA. Dagegen erfolgte eine Induktion der CIS-mRNA vor allem nach Stimulation mit LPS und LTA. Die Induktion der SOCS1-mRNA war nach Stimulation mit CpG-ODN und LTA komplett von MyD88 abhängig. Die SOCS1-Induktion war allerdings nach LPS- und Poly(I:C)-Stimulation in den MyD88-gendefizienten Mäusen noch partiell erhalten. Weiterführende Arbeiten zeigten, dass die Induktion des SOCS1-Proteins nach LPS- und Poly(I:C)-Stimulation von dem Adaptermolekül TRIF abhängig waren.
Damit konnte gezeigt werden, dass, je nach verwendeten TLR-Stimulus und untersuchten SOCS-Protein, die Induktion der SOCS-Proteine differentiell von MyD88 abhängig war.

Es ist bekannt, dass nach LPS-Stimulation Typ I Interferone induziert werden, die anschließend in einem auto-/parakrinen Signalweg über Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs die Expression von SOCS-Proteinen induzieren können. Als nächstes sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss sezernierte Typ I Interferone nach TLR-Stimulation auf die Induktion von SOCS-Proteinen, im speziellen auf das SOCS1-Protein, ausüben.
Dazu wurden in einem *transwell*-System Peritonealmakrophagen aus LPS-responsiven C3H/HeN-Mäusen im unteren Kompartiment bzw. aus LPS-nicht-responsiven C3H/HeJ-Mäusen im oberen

Kompartiment ausgesät. Unter Zugabe von LPS oder CpG-ODN in das obere Kompartiment, die anschließend durch die *transwell*-Membran diffundieren können, wurden beide Zelltypen stimuliert. Mittels quantitativer RT-PCR wurden die Zellen auf Expression von SOCS1-, TNF-α- und IP-10-mRNA relativ zur endogenen Kontrolle β-Aktin untersucht.

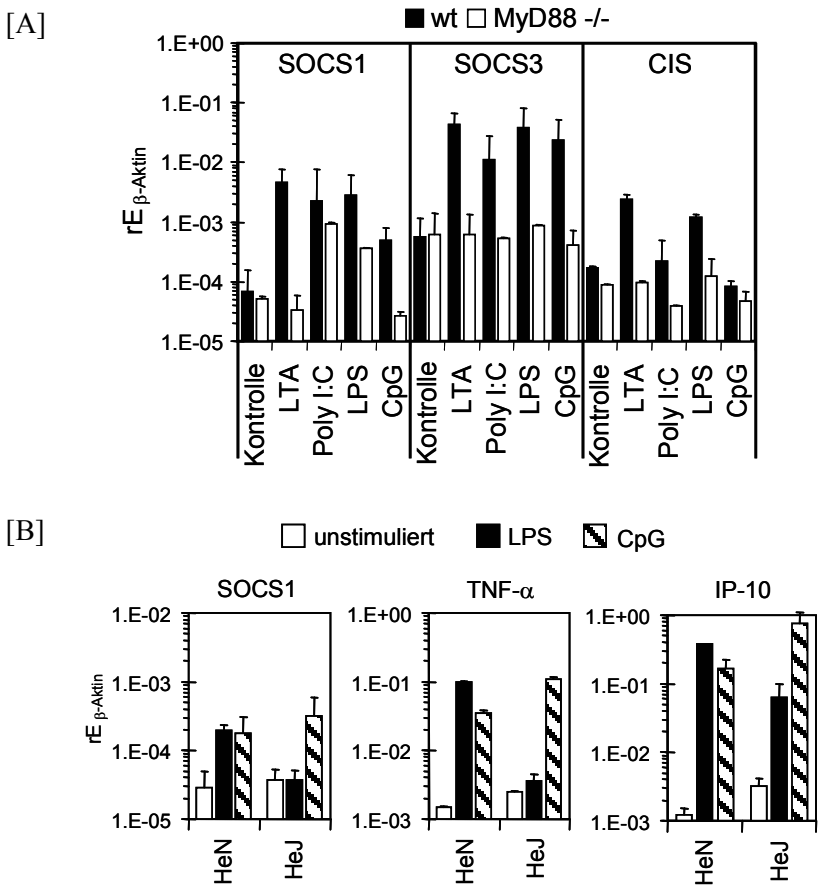

Abbildung 3-1: TLR-vermittelte SOCS-Induktion erfolgt auf direktem Weg mit unterschiedlicher MyD88-Abhängigkeit
[A] Peritonealmakrophagen aus Wildtyp- (C57BL/6) und MyD88$^{-/-}$ Mäusen wurden mit 10 µg/ml LTA, 5 µg/ml Poly(I:C), 100 ng/ml CpG-ODN oder 100 ng/ml LPS für 5 h stimuliert. Die Genexpression der angegebenen Zielgene wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt ist die relative Expression (rE) in Relation zur Expression von β-Aktin. (n = 2, Mittelwert + Standardabweichung); [B] Peritoneal-makrophagen von C3H/HeJ- und C3H/HeN-Mäusen wurden im *transwell*-System mit LPS oder CpG-ODN (wie unter A) stimuliert. Das Expressionsniveau der Gene SOCS1, TNF-α und IP-10 wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und in Relation zur endogenen Kontrolle β-Aktin als relative Expression (rE) dargestellt.

Es konnte gezeigt werden (Abbildung 3-1B), dass nach LPS-Stimulation die Induktion der mRNA des direkten TLR-abhängigen Zielgens TNF-α nur in den C3H/HeN-Makrophagen nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte die IP-10-mRNA, die indirekt über die Sekretion von Typ I Interferonen induziert wird, eine verstärkte Expression in beiden Makrophagenpopulationen. Die SOCS1-mRNA wurde nach LPS-Stimulation, ebenfalls wie TNF-α, nur in den LPS-responsiven Makrophagen induziert. Somit konnte der Einfluss von sezernierten Typ I Interferonen

für die Expression des SOCS1-Gens ausgeschlossen werden. Die Stimulation mit CpG-ODN diente als Kontrolle und führte in beiden Zelltypen zur Induktion der untersuchten Gene. Eine Bestätigung dieser Befunde erfolgte durch Verwendung von Mäusen mit eine Rezeptordefizienz für IFN-α ($IFNAR^{-/-}$) in der Arbeitsgruppe (Daten nicht gezeigt).

3.2 Aktivierung des indirekten Typ I Interferon-abhängigen Signalwegs nach TLR-Stimulation

In der Literatur gibt es immer noch kontroverse Daten für die Induktion von IFN-β nach Stimulation mit verschiedenen TLR-abhängigen Liganden. Demzufolge wurde als nächstes untersucht, welche prototypischen TLR-Liganden in der Lage sind, die Expression von IFN-β zu induzieren.

Dazu wurden Peritonealmakrophagen aus C57Bl/6-Mäusen mit CpG-ODN (TLR9), LPS (TLR4), Poly(I:C) (TLR3), LTA (TLR2) und Pam_3CSK_4 (TLR1+2) stimuliert und die mRNA von IFN-β, dem IFN-β-abhängigen Gen IP-10 sowie dem direkten Zielgen des TLR-Signalwegs TNF-α mittels quantitativer RT-PCR relativ zur endogenen Kontrolle β-Aktin untersucht.

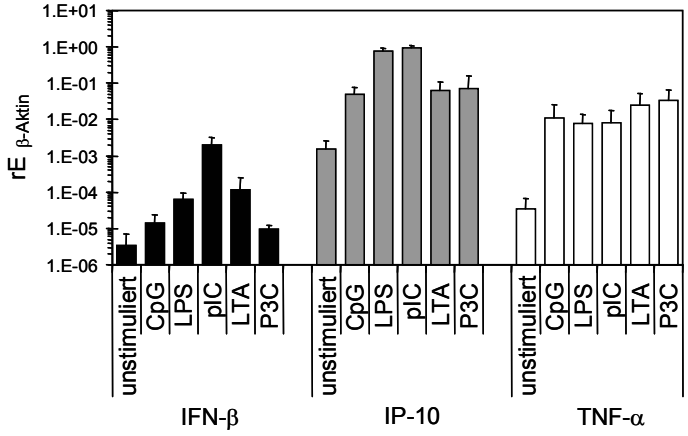

Abbildung 3-2: Aktivierung des indirekten Typ I Interferon-abhängigen Signalwegs nach TLR-Stimulation
Peritonealmakrophagen von C57BL/6-Mäusen wurden für 6 h stimuliert mit 300 nM CpG-ODN, 100 ng/ml LPS, 5 µg/ml Poly(I:C), 10 µg/ml LTA oder 10 µg/ml Pam_3CSK_4. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Genexpression von IFN-β, IP-10 und TNF-α in Relation zur endogenen Kontrolle β-Aktin bestimmt (n = 3, Mittelwert + Standardabweichung).

Aus Abbildung 3-2 ist ersichtlich, dass alle getesteten TLR-Liganden in der Lage waren, IFN-β- sowie IP-10-mRNA zu induzieren und somit in der Lage sind, den indirekten, IFN-β-abhängigen Signalweg zu aktivieren. Die Konzentration der Stimuli wurde so ausgewählt, dass die Induktion der TNF-α-mRNA annähernd gleich war. Weiterhin ließ sich zeigen, dass Poly(I:C) die IFN-β-

mRNA am effizientesten induzieren konnte und LPS sowie Poly(I:C) die stärksten Induktoren für die Transkription des IP-10-Gens darstellten.

3.3 Induzierte SOCS-Proteine inhibieren indirekte Zielgene nach TLR-Stimulation

Um zu untersuchen, ob und welchen Einfluss SOCS-Proteine auf den TLR-Signalweg ausüben, wurden Makrophagen mit stabiler SOCS-Überexpression generiert. Dazu wurden RAW264.7-Makrophagen mit SOCS1-, SOCS2-, SOCS3- und CIS-Expressionsplasmiden sowie einem Leervektor parallel mit einem G418-Resistenz-kodierenden Plasmid transfiziert und unter Selektionsbedingungen kloniert. Ausgewählte Einzelklone wurden mittels quantitativer RT-PCR auf Überexpression der jeweiligen SOCS-Transkripte getestet. Positive Klone wurden nochmals subkloniert und erneut hinsichtlich der spezifischen SOCS-Expression mittels quantitativer RT-PCR verifiziert (Baetz 2003).

Um nun die Frage zu klären, ob SOCS-Proteine neben ihrer inhibitorischen Funktion im JAK/STAT-Signalweg auch TLR-Signalwege direkt beeinflussen können, wurden diese SOCS-überexprimierenden RAW264.7-Makrophagen auf Effektorfunktionen nach Stimulation mit TLR-abhängigen Agonisten getestet. Dazu wurden die stabil transfizierten SOCS-überexprimierenden Zellen mit CpG-ODN oder LPS stimuliert. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Expression des direkten Zielgens TNF-α und des indirekten Zielgens IP-10 in Relation zur endogenen Kontrolle β-Aktin bestimmt.

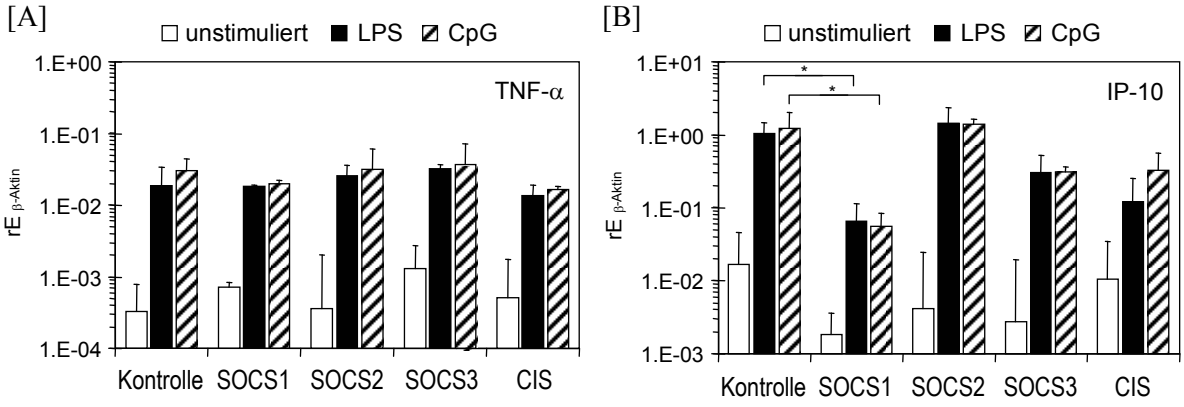

Abbildung 3-3: SOCS1-Expression inhibiert die Induktion der IP-10-mRNA nach TLR-Stimulation
Stabil transfizierte SOCS-überexprimierende RAW 264.7 Makrophagen wurden für 5 h mit 100 ng/ml LPS oder 1 µM CpG-ODN stimuliert. Die Genexpression von TNF-α und IP-10 wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf die endogene Kontrolle β-Aktin normalisiert (*, $p < 0{,}05$; n = 2; Mittelwert + Standardabweichung).

Aus Abbildung 3-3 ist ersichtlich, dass die Induktion der TNF-α-mRNA weder nach CpG- noch nach LPS-Stimulation durch die verschiedenen SOCS-Proteine signifikant inhibiert wurde.

Allerdings war die Induktion der IP-10-mRNA nach LPS- und CpG-Stimulation in den SOCS1-überexprimierenden Makrophagen signifikant erniedrigt. Die Wirkung der Proteine SOCS3 und CIS war nach LPS- und CpG-Stimulation weniger effektiv.
Die Daten der quantitativen RT-PCR konnten auf Proteinebene mittels Messung der TNF-α- und IP-10-Sekretion im ELISA verifiziert werden (Baetz 2003).
In Vorbefunden (Baetz 2003) war weiterhin mittels Western Blot Analyse gezeigt worden, dass in den SOCS-überexprimierenden Makrophagen nach Stimulation des TLR-Signalwegs mit LPS oder CpG-ODN die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK durch die verschiedenen SOCS-Proteine nicht beeinflusst wurde.
Allerdings zeigte sich in diesen Zellen, die für eine längere Zeit mit CpG-ODN oder LPS stimuliert wurden, eine Aktivierung des indirekten Typ I Interferon-abhängigen Signalwegs. Diese Aktivierung war in den SOCS1-überexprimierenden Zellen gehemmt. Somit konnte gezeigt werden, dass das SOCS1-Protein und in einem geringeren Umfang auch das SOCS3- und CIS-Protein die TLR-vermittelte STAT1-Aktivierung inhibierten.
Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass SOCS-Proteine nach TLR-Stimulation auf direktem Weg induziert werden, wobei die Expression eine differentielle Abhängigkeit von MyD88 erfordert. Es zeigte sich, dass die Expression des SOCS3- und CIS-Proteins komplett vom Adaptermolekül MyD88 abhängig war. Die Induktion des SOCS1-Proteins zeigte dagegen eine differentielle Abhängigkeit. Während die Aktivierung des SOCS1-Proteins nach Stimulation des TLR9 und TLR2 eine komplette Abhängigkeit von MyD88 zeigte, war diese nach LPS- und Poly(I:C)-Stimulation in den MyD88-gendefizienten Mäusen noch partiell erhalten (TRIF-abhängig). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die TLR-induzierten SOCS-Proteine den direkten TLR-Signalweg, genauer über Induktion von TNF-α, nicht beeinflussten, sondern ihre inhibitorische Wirkung auf den indirekten, IFN-β-abhängigen Signalweg ausübten (IP-10).
Aufgrund dieser Daten sollte im Folgenden die räumliche Verteilung der SOCS-Proteine in der Zelle genauer untersucht werden, um einen näheren Einblick in die Wirkungsweise dieser Proteine zu gelangen.

3.4 Lokalisation von SOCS-Proteinen in HEK 293 Zellen

Die nach Stimulation von Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren sowie von Toll-like Rezeptoren induzierten SOCS-Proteine inhibieren im Sinne einer negativen *Feedback*-Regulation den JAK/STAT-Signalweg und terminieren damit die Signaltransduktion und Aktivität der entsprechenden Zytokine, Stimulanzien und Rezeptoren. Der exakte Mechanismus dieser Inhibition ist noch nicht genau verstanden, aber es wird angenommen, dass SOCS-Proteine den Signalweg am Rezeptor (SOCS3-Protein), an den JAK-Proteinen selbst (SOCS1-Protein) oder durch Kompetition mit STAT-Molekülen (CIS-Protein) inhibieren.

3.4.1 Klonierung von GFP-markierten SOCS-Fusionsproteinen

Aufgrund dieser Kenntnis sollte als erstes die Lokalisation von verschiedenen Mitgliedern der SOCS-Familie in der Zelle untersucht werden. Dafür wurden Fusionsproteine bestehend aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem jeweiligen SOCS-Protein generiert (Abbildung 3-4). Ausgehend von SOCS-Expressionsplasmiden, welche die komplette kodierende Sequenz umfassten, wurde die Sequenz des murinen und humanen SOCS1-, SOCS3- und CIS-Proteins mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Entsprechend der Klonierungsstrategie wurden dazu Primer verwendet, die am 5´- und 3´-Ende zusätzliche Sequenzen für Schnittstellen von Restriktionsenzymen enthielten. Anschließend wurden die PCR-Produkte über die generierten Restriktionsenzymschnittstellen sowohl in den Vektor pEGFP-C1 als auch in den Vektor pEGFP-N1 kloniert (vgl. Kap. 2.2.2.1; Nomenklatur 2.1.7). Die komplette kodierende Sequenz der Fusionsproteine bestehend aus dem GFP-Protein und dem jeweiligen SOCS-Protein wurde mittels Sequenzierung überprüft. Für die Auswertung der Sequenzdaten wurde das Programm ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) genutzt. Hierbei wurden die erhaltenen Sequenzdaten mit veröffentlichten Sequenzen für die murinen und humanen SOCS1-, SOCS3- und CIS-Proteine[15], die in der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) zur Verfügung stehen, sowie mit der GFP-Sequenz, die der Internet-Seite der Firma BD Clontech (http://www.clontech.com/) entnommen wurde, verglichen. Vorhandene Missense-Mutationen, wie sie in der kodierenden Region für die Fusionsproteine der Konstrukte pEGFP-N1-mSOCS1, pEGFP-N1-mSOCS3, pEGFP-N1-hCIS, pEGFP-C1-hSOCS1 und pEGFP-C1-hSOCS3 auftraten, wurden mittels zielgerichteter Mutagenese entfernt. Dazu wurde das PCR-basierte Prinzip des QuikChange® XL Site-directed Mutagenesis Kits angewandt. Dagegen wurden stumme Mutationen im kodierenden Bereich der Plasmide pEGFP-C1-mSOCS1, pEGFP-C1-hCIS, pEGFP-N1-mSOCS1, pEGFP-N1-mCIS und pEGFP-N1-hSOCS3, die zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz führen, unberücksichtigt gelassen.

Die generierten Konstrukte kodieren Fusionsproteine bestehend aus dem jeweiligen SOCS-Protein und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP). Letzteres befindet sich entweder N-terminal (im Vektor pEGFP-C1) oder C-terminal (im Vektor pEGFP-N1) des jeweiligen SOCS-Proteins (Nomenklatur vgl. 2.1.7). Das Gen des GFP-Proteins (Tsien 1998; Ormo et al. 1996; Li et al. 1997) stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*. Bei dem hier verwendeten GFP-Protein handelte es sich allerdings um ein mutiertes GFP-Protein (EGFP), das aufgrund seines veränderten Exzitationsmaximums eine verstärkte Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp GFP-Protein aufweist. Dadurch ist es hervorragend geeignet für Fluoreszenzmikroskopie sowie Analysen mit dem Durchflusszytometer.

---

[15] murin: SOCS1 (gi 2245381); SOCS3 (gi 31982458); CIS (gi 18380949)
human: SOCS1 (gi 2245383); SOCS3 (gi 21536311); CIS (gi 21594866)

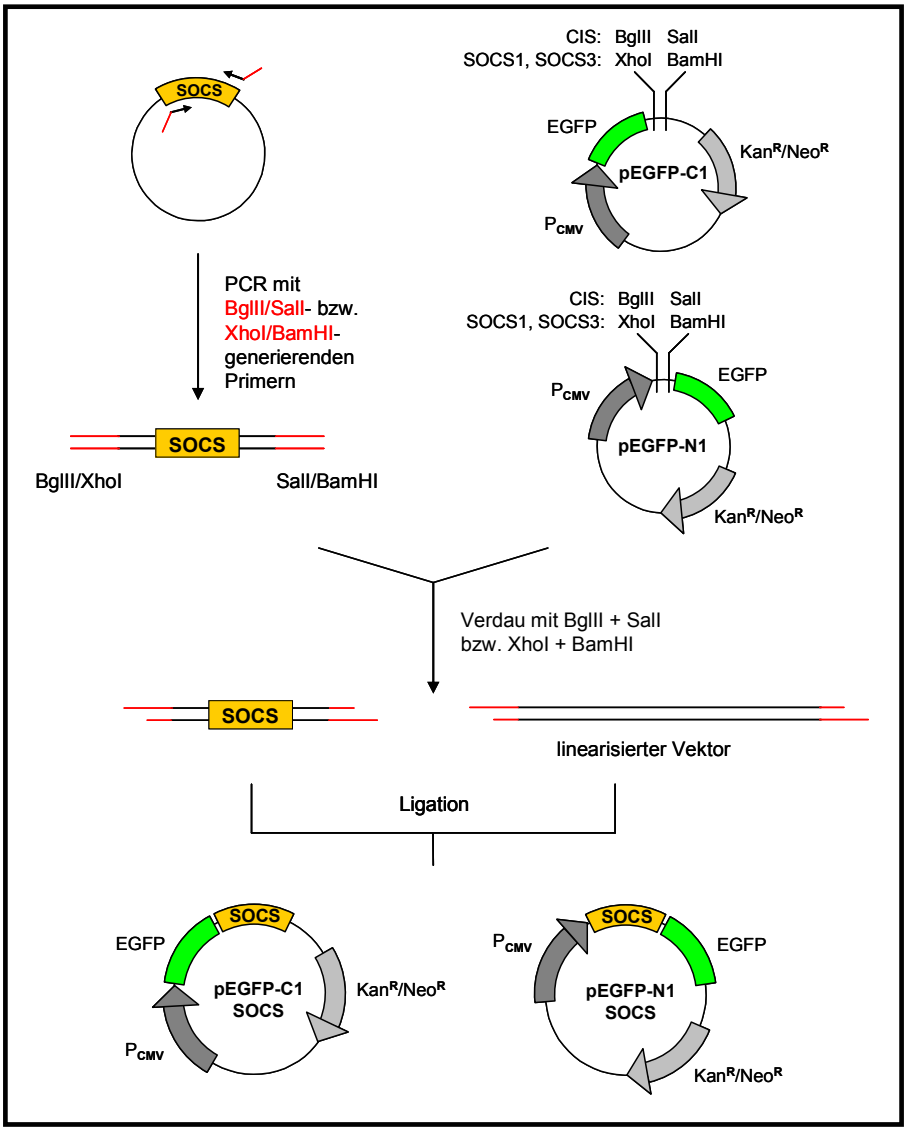

Abbildung 3-4: Klonierung der SOCS-Expressionskassetten in die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1
Die SOCS-Gene SOCS1, SOCS3 und CIS wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurden Primer generiert, die im 5´-Bereich Sequenzen für Schnittstellen von Restriktionsenzymen enthielten. Die PCR-Produkte sowie die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N1 wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend wurden die geschnittenen PCR-Produkte und die linearisierten Vektoren miteinander ligiert. Abkürzungen: P_{CMV}: CMV-Promotor; EGFP: *enhanced* grün fluoreszierendes Protein, Kan^R/Neo^R: Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen

3.4.2 Lokalisationsanalysen von GFP-markierten SOCS-Fusionsproteinen in HEK 293 Zellen

Für die Lokalisationsstudien wurden HEK 293 Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine immortalisierte embryonale Nierenepithelzelllinie, die mit dem kationischen Transfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 leicht zu transfizieren war und eine hohe Transfektionseffizienz von bis zu 80% zeigte.

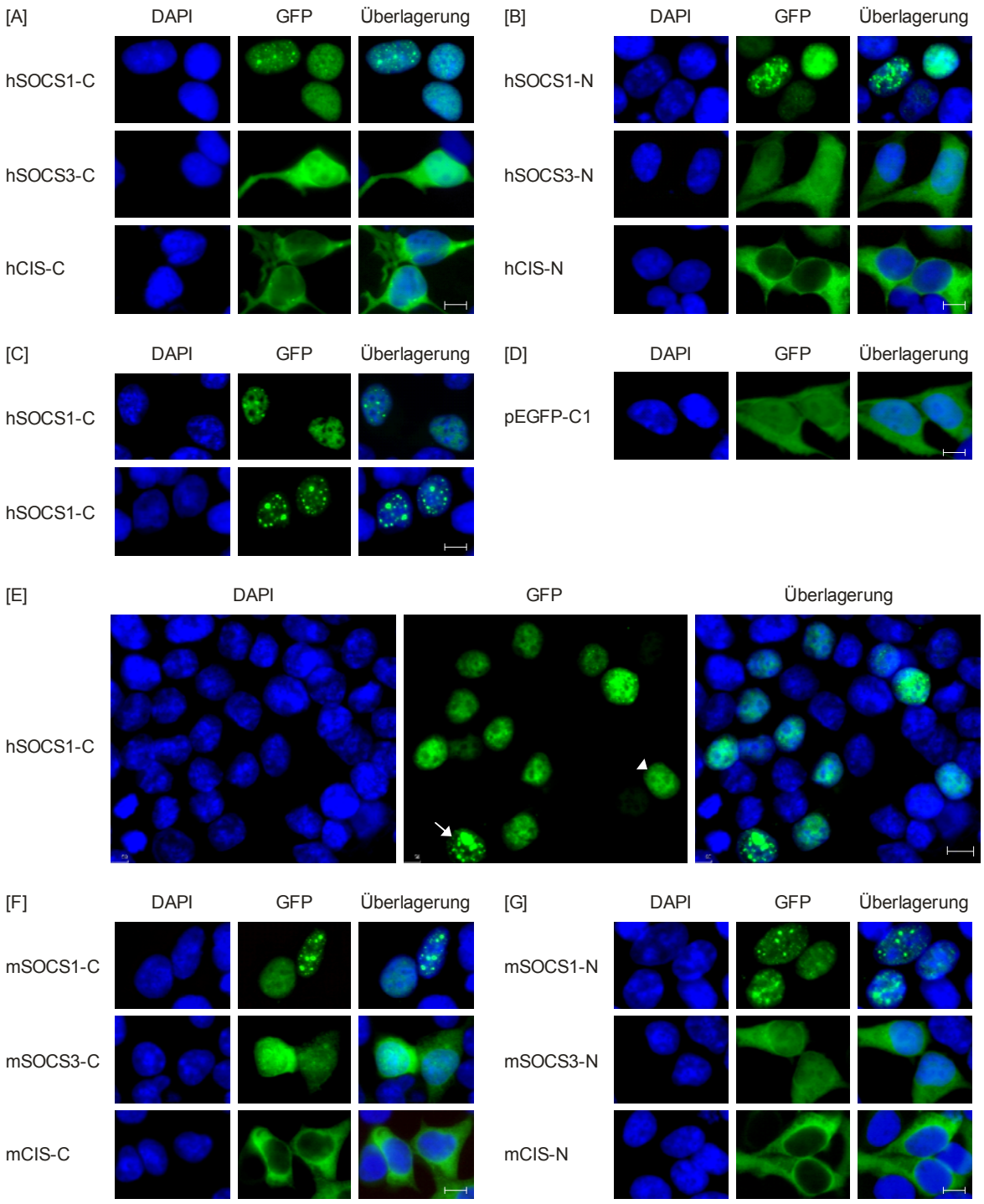

Abbildung 3-5: Lokalisation der humanen und murinen N- und C-terminal GFP-markierten SOCS1-, SOCS3- und CIS-Proteine in HEK 293 Zellen

Auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäte HEK 293 Zellen wurden mit den angegebenen SOCS-Plasmiden (nähere Erläuterung im Text) mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. Die Zellkerne wurden mit dem DAPI-Farbstoff markiert und die Zellen dabei gleichzeitig mit Ethanol fixiert. Die nukleo-zytoplasmatische Verteilung der SOCS-Proteine wurde anhand der GFP-Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert und ist für repräsentative Zellen dargestellt. Pfeil: gesprenkelte GFP-Fluoreszenz, Pfeilspitze: homogene GFP-Fluoreszenz; Maßstab = 10µm.

Die auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern kultivierten HEK 293 Zellen wurden mit den murinen und humanen N- und C-terminal GFP-markierten SOCS-Plasmiden (Nomenklatur vgl. 2.1.7) transient transfiziert. Nach einer Inkubation von 18-24 h erfolgte eine Kernfärbung mit dem blau fluoreszierenden Nukleinsäure-Farbstoff DAPI, um die Lokalisation der SOCS-Proteine in der Zelle besser bestimmen zu können. Die Zellen wurden gleichzeitig mit Ethanol fixiert, mit Mounting Medium eingedeckt und anschließend im Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich des Expressionsmusters der verschiedenen GFP-SOCS-Fusionsproteine beurteilt.
Ein Vergleich der einzelnen Mitglieder der SOCS-Familie in Form der verschiedenen GFP-markierten SOCS-Fusionsproteine zeigte hinsichtlich der Lokalisation deutliche Unterschiede in der nukleo-zytoplasmatischen Verteilung (Abbildung 3-5, A-G).

In [A] sind die humanen N-terminal GFP-markierten SOCS-Fusionsproteine dargestellt. Es ist erkennbar, dass das GFP-hCIS-Fusionsprotein überwiegend im Zytoplasma der Zelle lokalisiert war, das GFP-hSOCS3-Protein zeigte eine ubiquitäre Verteilung in der gesamten Zelle und das humane GFP-gekoppelte SOCS1-Protein konnte überraschenderweise im Zellkern nachgewiesen werden. Dabei war das GFP-markierte SOCS1-Protein meist homogen zum Teil mit Nucleoli-ähnlichen Aussparungen im Nukleus verteilt. In einigen mit dem GFP-hSOCS1-Konstrukt transient transfizierten Zellen konnte eine gesprenkelte nukleäre GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Diese beiden Erscheinungsformen für das humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Fusionsprotein wurde in [C] an repräsentativen Zellen noch einmal explizit dargestellt. [E] zeigt ein Übersichtsbild von HEK 293 Zellen, die mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid transient transfiziert wurden. Das humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Protein liegt hier entweder homogen (Pfeilspitze) im Zellkern vor oder in Form von einer gesprenkelten nukleären GFP-Fluoreszenz (Pfeil).

Die gleiche Lokalisation für das SOCS1-, SOCS3- und CIS-Protein konnte auch mit den humanen C-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten [B] sowie mit den murinen N- [F] und murinen C-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten [G] beobachtet werden. Somit konnte sowohl die unterschiedliche Position des GFP-Proteins als auch die unterschiedliche murine und humane SOCS-Sequenz als Grund für die differente Lokalisation der verschiedenen GFP-SOCS-Fusionsproteine ausgeschlossen werden.

Der bidirektionale Austausch von Makromolekülen zwischen Nukleus und Zytoplasma erfolgt durch den Kernporenkomplex, welcher sich in der Kernmembran befindet. Der Kernporenkomplex bildet einen wässrigen Kanal, welcher für die meisten Proteine, die Grenze liegt bei etwa 40 kDa oder einem Durchmesser von circa 9 nm, über Diffusion frei passiert werden kann (Paine et al. 1975; Keminer and Peters 1999). Dennoch werden auch Moleküle, die sich weit unter diesem Größenniveau befinden, wie beispielsweise t-RNAs oder Histone (Zasloff 1983; Breeuwer and Goldfarb 1990), über Transportrezeptoren befördert, um den Prozess zu beschleunigen.

Das GFP-Protein, welches eine Masse von ungefähr 28 kDa besitzt, kann den Kernporenkomplex ungehindert passieren und war somit homogen in der Zelle verteilt [D; transiente Transfektion mit pEGFP-C1]. Die drei verschiedenen GFP-SOCS-Fusionsproteine waren annähernd gleich groß (GFP-hSOCS1: 51,2 kDa, GFP-hSOCS3: 52,4 kDa, GFP-hCIS: 56 kDa), so dass die Größe der Fusionsproteine als möglicher Grund für den Lokalisationsunterschied eher unwahrscheinlich ist. Laut Literaturangaben kann keines der Fusionsproteine aufgrund der Größe den Kernporenkomplex durch freie Diffusion passieren.

Die Lokalisation für das SOCS1-Protein war überraschend, da aufgrund des bisherigen Kenntnisstands davon ausgegangen wurde, dass das SOCS1-Protein den JAK/STAT-Signalweg an den JAK-Proteinen, die sich am Rezeptor befinden, inhibieren sollte. Daher war eher eine zytoplasmatische Lokalisation oder eine membranäre Färbung zu erwarten. Um die Lokalisation des SOCS1-Proteins noch näher zu untersuchen, wurden die in Abbildung 3-5 mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Konstrukt transient transfizierten HEK 293 Zellen noch einmal unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Überbelichtung visualisiert. Dabei wurde die Intensität der GFP-Fluoreszenz verstärkt dargestellt, so dass auch schwächer exprimiertes Protein sichtbar gemacht werden konnte (Abbildung 3-6).

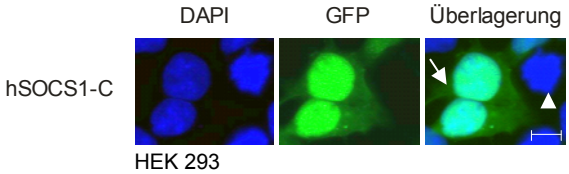

Abbildung 3-6: Humanes N-terminal GFP-markiertes SOCS1-Fusionsprotein wird überwiegend im Nukleus von transient transfizierten HEK 293 Zellen exprimiert
HEK 293 Zellen wurden mit pEGFP-C1-hSOCS1-Konstrukt mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. Nach Färbung der Zellkerne bei gleichzeitiger Fixierung der Zellen mittels DAPI/Ethanol-Lösung wurde die nukleo-zytoplasmatische Verteilung des humanen GFP-SOCS1-Fusionsproteins nach Überbelichtung durch GFP-Autofluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert und anhand von repräsentativen Zellen dargestellt. Pfeil: transfizierte Zelle; Pfeilspitze: nicht-transfizierte Zelle; Maßstab = 10µm.

Aus Abbildung 3-6 ist ersichtlich, dass mit diesem Versuchsansatz das humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Fusionsprotein auch im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte (Pfeil). Die Fluoreszenz des Proteins im Zytoplasma war zwar nur marginal vorhanden, konnte aber deutlich von nicht-transfizierten Zellen, bei denen weder eine Fluoreszenz im Nukleus noch im Zytoplasma vorhanden war, abgegrenzt werden (Pfeilspitze). Die prominente Expression des humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Proteins beschränkte sich deutlich auf den Zellkern.

Wie bereits erwähnt, konnte man in einigen HEK 293 Zellen, die mit den murinen oder humanen C- oder N-terminal GFP-markierten SOCS1-Plasmiden transient transfiziert wurden, neben der homogenen Verteilung des SOCS1-Proteins im Zellkern auch eine gesprenkelte nukleäre GFP-Fluoreszenz erkennen. Es stellte sich nun die Frage, ob in diesem Fall das SOCS1-Protein mit bestimmten nukleären Strukturen im Zellkern interagiert, die einen möglichen Hinweis darauf geben, warum das GFP-SOCS1-Fusionsprotein überwiegend im Nukleus exprimiert wird.
Der Zellkern beherbergt verschiedene Substrukturen, die für Funktionen wie Transkription, das Spleißen von prä-mRNA sowie Ribosomen-Zusammensetzung verantwortlich sind. Charakteristischerweise sind diese Strukturen nicht von Membranen umgeben, wie es gewöhnlich für zytoplasmatische Organellen der Fall ist. Die am besten untersuchten subnukleären Kompartimente sind die Nukleoli, das in chromosomalen Territorien organisierte Chromatin und die Spleißfaktor-Kompartimente (s*plicing factor compartments*, SFCs). Darüber hinaus gibt es Befunde zu *Cajal bodies,* PML-Körperchen (*promyelocytic leukaemia bodies*) sowie eine ständig steigende Anzahl von nukleären Domänen und nukleären Körperchen, deren Funktionen größtenteils noch ungeklärt sind. Hierzu zählen die OPT (*Oct1/PTF/transcription*) Domäne, PcG (*polycomb group proteins*) *bodies*, GEMs (*Gemini of Cajal bodies*), PNC (*perinucleolar compartment*) und *Cleavage bodies* (Dundr and Misteli 2001).
Aufgrund der Tatsache, dass der Spleißfaktor SC-35 (*Splicing Component*, 35 kDa) im Nukleus auch ein ähnlich gesprenkeltes Expressionsmuster zeigte (Spector et al. 1991; O'Keefe et al. 1994), sollte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung überprüft werden, ob die gesprenkelte nukleäre GFP-Fluoreszenz des SOCS1-Proteins mit dem Spleißfaktor SC-35 kolokalisiert. Der Spleißfaktor SC-35 interagiert mit den Interchromatin-Granula und den Perichromatin-Fibrillen, die ein Reservoir für Spleißfaktoren darstellen und am Zusammenbau der Spleißosomen oder am RNA-Spleißen direkt beteiligt sind.
Für diesen Versuchsansatz wurden auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäte HEK 293 Zellen mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Konstrukt transient transfiziert und mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen SC-35 gefärbt. Die Zellkerne wurde mit dem DNA-Farbstoff DAPI sichtbar gemacht. In Abbildung 3-7 ist das Ergebnis anhand von repräsentativen Zellen dargestellt.

Aus Abbildung 3-7 geht hervor, dass die gesprenkelte nukleäre Expression des humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Proteins in einigen Zellen mit dem Expressionsmuster des Spleißfaktors SC-35 kolokalisierte (Pfeil: Überlagerung). In anderen Zellen war dagegen keine Kolokalisation des GFP-SOCS1-Fusionsproteins mit SC-35 erkennbar (Pfeilspitze: grüne Fluoreszenz). Dieses diskrepante Ergebnis könnte zum einen vom Zustand der Zelle abhängig sein. Zum anderen könnte aber auch die Darstellung mit dem Fluoreszenzmikroskop, bei der nur Kolokalisation, nicht FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) gemessen wird, eine Rolle

spielen. Aus diesen Daten ergab sich somit kein Hinweis, ob das humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Fusionsprotein mit der Interchromatin-Granula interagiert. Die weiteren publizierten Kernstrukturen entsprachen nicht dem vorliegenden gesprenkelten Muster des SOCS1-Fusionsproteins im Nukleus, so dass die genauere Spezifizierung dieser Strukturen noch ungeklärt bleibt.

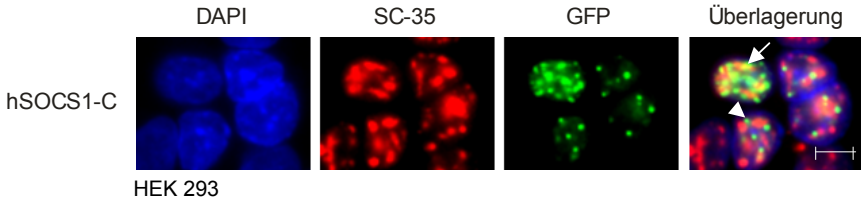

Abbildung 3-7: Indirekte Immunfluoreszenz gegen SC-35 in HEK 293 Zellen nach Transfektion mit dem humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Konstrukt
HEK 293 Zellen wurden mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. 18-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2%-iger Paraformaldehyd-Lösung und 0,2% Triton X-100 fixiert und mit Aceton permeabilisiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde SC-35 mit einem monoklonalen Antikörper angefärbt. Die Markierung der Kerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff DAPI. Maßstab = 10µm. (Pfeil: Kolokalisation; Pfeilspitze: keine Kolokalisation)

Anschließend wurden Bleichexperimente in lebenden Zellen mit dem konfokalen Laserscan-mikroskop durchgeführt. Dazu wurden die auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäten HEK 293 Zellen mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid transient transfiziert und in einer beheizbaren Kammer bei 37°C mit dem Laserscanmikroskop beobachtet. Definierte Bereiche im Zellkern, die sowohl die homogene Fluoreszenz als auch die gesprenkelte nukleäre Expression des humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Fusionsproteins einschlossen, wurden visuell am Bildschirm markiert (ROIs: Regions of Interest) und anschließend mit dem Laser gebleicht. Unmittelbar vor und nach dem Bleichen mit dem Laser wurden Bilder aufgenommen (Abbildung 3-8).

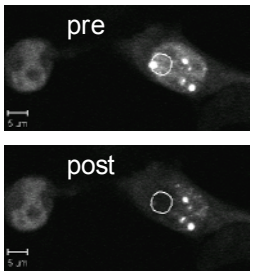

Abbildung 3-8: Schneller Austausch des humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Fusionsproteins im Nukleus
HEK 293 Zellen wurden mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Konstrukt mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. Die lebenden Zellen wurden in einer beheiz-baren Kammer bei 37°C mit einem konfokalen Laserscan-mikroskops visualisiert. Bilder wurden unmittelbar vor und nach dem Bleichen der markierten Region (Kreis, ROIs) mit dem Laser aufgenommen. Maßstab = 5µm.

Es zeigte sich, dass nach dem Bleichen einer definierten Region im Zellkern, die homogene Fluoreszenz im gesamten Zellkern schnell verloren ging. Im Gegensatz dazu waren die gesprenkelten nukleären Strukturen außerhalb der Bleichregion in ihrer Fluoreszenz stabil. Dies

deutet darauf hin, dass ein schneller Austausch des humanen GFP-SOCS1-Proteins im Nukleus erfolgte. Die gesprenkelten nukleären Strukturen nahmen daran allerdings nicht teil.

Im Folgenden sollte die Lokalisation des humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Fusionsproteins in lebenden HEK 293 Zellen nach Stimulation mit humanem IFN-α untersucht werden. Hierzu wurden die auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäten HEK 293 Zellen 18-24 h nach der transienten Transfektion mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Konstrukt in einer beheizbaren Kammer kultiviert. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml humanem IFN-α stimuliert und bei 37°C über einen definierten Zeitraum mit dem konfokalen Laserscanmikroskop beobachtet. Es wurden in regelmäßigen Abständen Bilder aufgenommen (Abbildung 3-9).

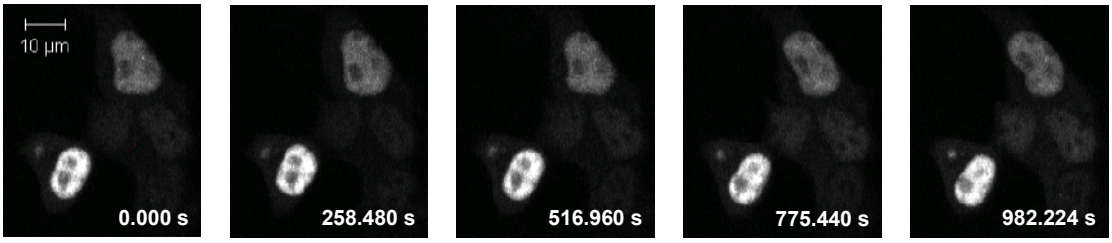

Abbildung 3-9: Lokalisation des humanen N-terminl GFP-markierten SOCS1-Fusionsproteins in HEK 293 Zellen nach Stimulation mit humanem IFN-α
HEK 293 Zellen wurden mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. Die lebenden Zellen wurden in einer beheizbaren Kammer bei 37°C nach Stimulation mit 100 ng/ml humanem IFN-α mit einem konfokalen Laserscanmikroskop beobachtet. Zu den angegebenen Zeiten wurden Bilder aufgenommen. Maßstab = 10µm.

Aus Abbildung 3-9 ist erkennbar, dass sich die Lokalisation des humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Proteins nach Stimulation mit humanem IFN-α über einen Zeitraum von etwa 16 min nicht änderte. In diesem Zeitraum sind Signalprozesse durch IFN-α (z.B. STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung) jedoch bereits voll aktiv.

Aufgrund der Tatsache, dass die murinen und humanen C- und N-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukte die gleiche Lokalisation für die einzelnen SOCS-Proteine ergaben, wurden die weiteren Untersuchungen, wenn nicht anders angegeben, nur noch mit den humanen N-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten durchgeführt.
Um die Ergebnisse der Lokalisationsstudie für das CIS-, SOCS3- aber vor allem für das SOCS1-Protein, zu bestätigen, wurden im Folgenden eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt.

3.4.3 Expressionsnachweis verschiedener humaner N- und C-terminal GFP-markierter SOCS-Proteine in HEK 293 Zellen

Als erstes wurde untersucht, ob in den transient transfizierten GFP-SOCS-exprimierenden Zellen das jeweilige Fusionsprotein in der entsprechenden Größe exprimiert wird und ob möglicherweise eine Degradation des GFP-markierten SOCS-Fusionsproteins beobachtbar wäre. Letzteres würde die fluoreszenzmikroskopische Detektion der Fusionsproteine beeinträchtigen.

Dazu wurden Gesamtzellextrakte von HEK 293 Zellen gewonnen, die zum einen die humanen N-terminal und zum anderen die humanen C-terminal GFP-markierten SOCS1-, SOCS3- oder CIS-Proteine transient exprimierten. Auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Fusionsproteine wurden mit einem direkt HRP-markierten polyklonalen Antikörper gegen das GFP-Protein untersucht (Abbildung 3-10).

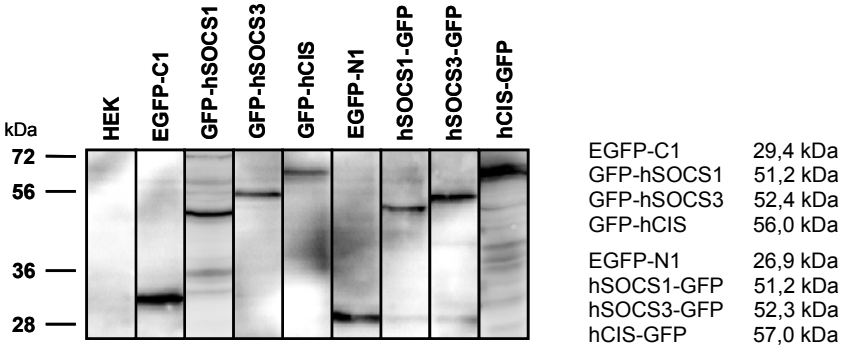

Abbildung 3-10: Expressionsnachweis von verschiedenen humanen N- und C-terminal GFP-markierten SOCS-Fusionsproteinen in HEK 293 Zellen
Gesamtzellextrakte von HEK 293 Zellen, die nicht-transfiziert, mit den angegebenen humanen N- oder C-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten oder Leervektoren mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert waren, wurden im Western Blot untersucht. Die Fusionsproteine wurden mit einem direkt HRP-markierten Antikörper gegen das GFP-Protein (1:500) nachgewiesen. Die Größe der Proteine wurde mit dem auf der linken Seite dargestellten Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus ermittelt.

In Abbildung 3-10 werden Western Blots aus zwei unabhängigen Versuchen gezeigt. Es konnte in allen Zelllysaten eine deutliche Bande des jeweiligen GFP-SOCS-Fusionsproteins in der angegebenen Größe detektiert werden. In den Kontrollansätzen, bei denen die HEK 293 Zellen nur mit den Leervektoren transfiziert wurden, konnte auch nur das freie GFP-Protein mit einer Größe von 29,4 kDa nach Transfektion mit pEGFP-C1 bzw. 26,9 kDa nach Transfektion mit pEGFP-N1 nachgewiesen werden. Der Größenunterschied zwischen den beiden GFP-Proteinen kommt zustande, da die integrierten Aminosäuren innerhalb der multiplen Klonierungsstelle im pEGFP-C1 Vektor noch mit abgelesen werden. Demgegenüber wurde in Zellen, die mit den GFP-markierten SOCS-Konstrukten transient transfiziert wurden, auch nur die jeweiligen Fusionsproteine detektiert, aber kein freies GFP-Protein. In nicht-transfizierten HEK 293 Zellen konnte mit dem

GFP-Antikörper keine spezifische Bande nachgewiesen werden. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass zum einen kein freies GFP-Protein in den Zellen, die mit den N- oder C-terminal GFP-markierten SOCS-Plasmiden transient transfiziert wurden, vorlag. Damit ergaben sich auch keine Hinweise, dass die GFP-SOCS-Fusionsproteine gespalten oder degradiert wurden, was in beiden Fällen die fluoreszenzmikroskopischen Daten verfälschen könnte.

3.4.4 Lokalisationsnachweis von N-terminal GFP-markierten SOCS-Fusionsproteinen in weiteren Zelllinien

Als nächstes sollte ausgeschlossen werden, dass die Lokalisation der verschiedenen GFP-markierten SOCS-Fusionsproteine in HEK 293 Zellen zelltypspezifisch ist. Deshalb wurden auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern RAW 264.7, NIH/3T3 und HeLa Zellen mit den N-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten transient transfiziert, die Nuklei mittels DAPI-Lösung angefärbt, die Zellen dabei gleichzeitig mit Ethanol fixiert und im Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich des Expressionsmusters beurteilt (Abbildung 3-11). Bei RAW 264.7 und NIH/3T3 Zellen handelt es sich um murine Zelllinien, demzufolge wurden diese Zellen mit den murinen N-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten transient transfiziert. Die humanen HeLa-Zellen wurden dagegen mit den humanen SOCS-Konstrukten transient transfiziert, die ebenfalls am N-Terminus mit dem GFP-Protein markiert waren.

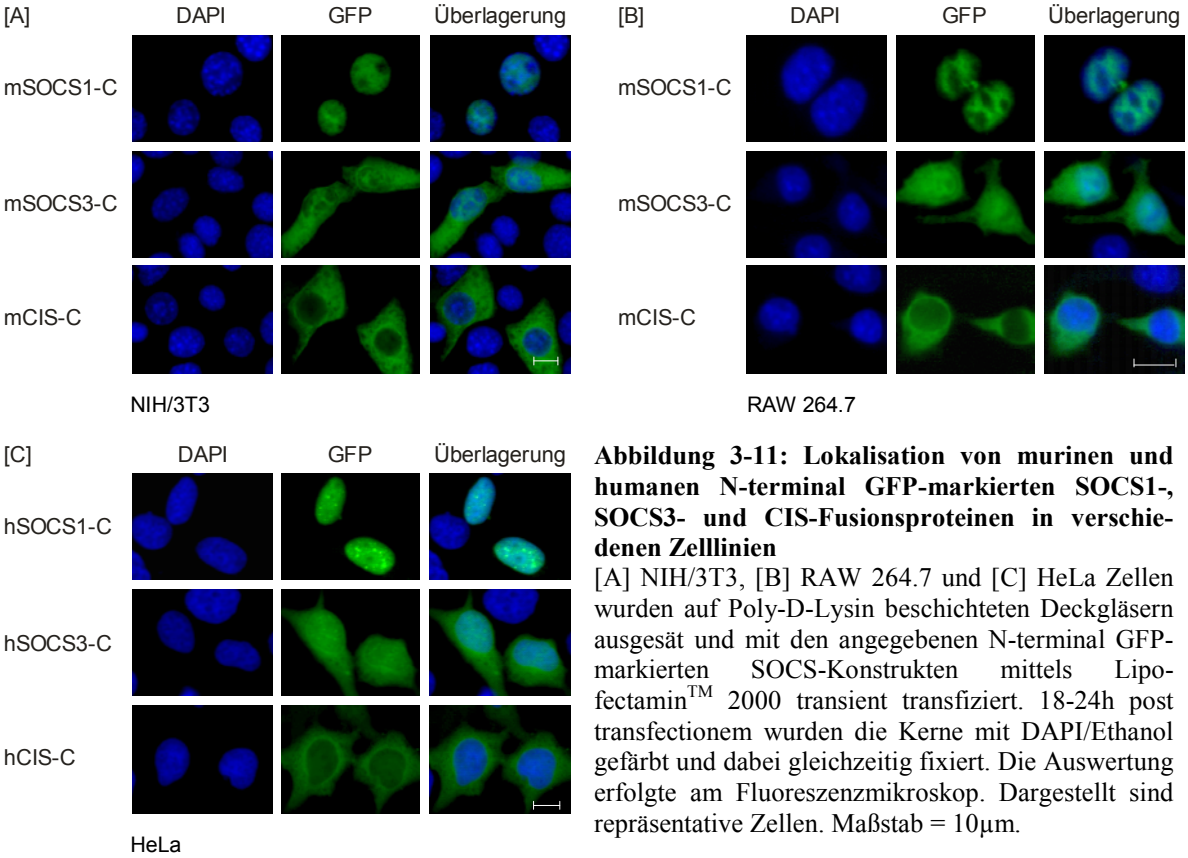

Abbildung 3-11: Lokalisation von murinen und humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-, SOCS3- und CIS-Fusionsproteinen in verschiedenen Zelllinien
[A] NIH/3T3, [B] RAW 264.7 und [C] HeLa Zellen wurden auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesät und mit den angegebenen N-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. 18-24h post transfectionem wurden die Kerne mit DAPI/Ethanol gefärbt und dabei gleichzeitig fixiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Dargestellt sind repräsentative Zellen. Maßstab = 10µm.

Wie in Abbildung 3-11 ersichtlich, konnte für die murinen und humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-, SOCS3- und CIS-Proteine in NIH/3T3, RAW 264.7 und HeLa Zellen die gleiche Lokalisation wie in HEK 293 Zellen (Abbildung 3-5) nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich keine Differenz hinsichtlich der Lokalisation in murinen (RAW 264.7, NIH/3T3) versus humanen Zellen (HEK 293, HeLa). Das GFP-CIS-Fusionsprotein zeigte eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation in allen drei Zelllinien, das GFP-SOCS3-Protein war gleichmäßig im Kern und Zytoplasma der verschiedenen Zellen verteilt und für das GFP-markierte SOCS1-Protein konnte wieder eine deutliche Kernlokalisation zum Teil mit Nukleoli-ähnlichen Aussparungen in den verschiedenen Zelllinien detektiert werden. Somit konnte eine zelltypspezifische Lokalisation der GFP-SOCS Fusionsproteine ausgeschlossen werden, da es sich bei RAW 264.7 Zellen um Makrophagen handelt, HeLa Zellen eine epithelähnliche Zelllinie darstellt und NIH/3T3 Zellen zwar auch wie HEK 293 Zellen Fibroblasten sind, allerdings handelt es sich hierbei um murine Zellen. Es bleibt allerdings festzustellen, dass die in einigen HEK 293 Zellen vorhandene gesprenkelte nukleäre GFP-Fluoreszenz in NIH/3T3 und RAW 264.7 Zellen nicht detektiert werden konnte. In HeLa-Zellen war dieses Expressionsmuster zum Teil vorhanden, allerdings nicht in dem Umfang wie in HEK 293 Zellen.

3.4.5 Detektion der Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS über weitere Nachweisepitope

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die murinen und humanen N- und C-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukte das gleiche Expressionsmuster zeigten (Abbildung 3-5), auch nach Transfektion von verschiedenen Zelllinien (Abbildung 3-11). Außerdem war kein freies GFP-Protein in den mit den GFP-SOCS-Konstrukten transient transfizierten HEK 293 Zellen vorhanden. Schließlich hatte die Position des GFP-Proteins (N- oder C-terminal) innerhalb der Fusionsproteine keinen Einfluss auf die Lokalisation der GFP-SOCS-Fusionsproteine.

In weiteren Experimenten sollte nun untersucht werden, ob die vorliegenden Lokalisationen für das SOCS1-, SOCS3- und CIS-Protein auch mit anderen Nachweisepitopen beobachtet werden konnte. Dieser Versuchsansatz erfolgte unter Verwendung von SOCS-Plasmiden, die mit anderen Epitopen, über die der Nachweis erfolgte, markiert waren.

Dazu wurden auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäte HEK 293 Zellen mit einem flag-markierten murinen SOCS1- bzw. SOCS3-Plasmid und einem myc-markierten CIS-Plasmid transient transfiziert. Der Nachweis der SOCS-Proteine erfolgte mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung mit einem FITC-markierten flag- bzw. myc-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit dem DAPI-Farbstoff angefärbt. Die Lokalisation wurde anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. In Abbildung 3-12 sind repräsentative Zellen dargestellt.

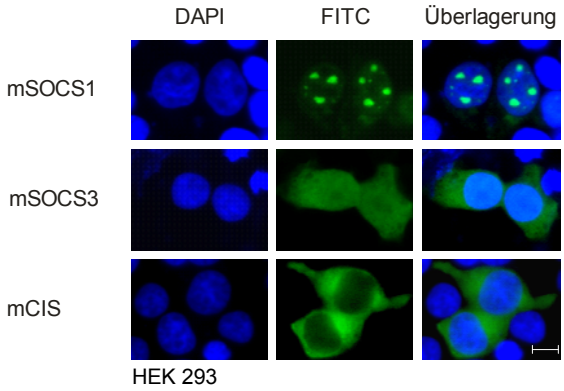

Abbildung 3-12: Lokalisationsnachweis der verschiedenen SOCS-Proteine über weitere Nachweisepitope
HEK 293 Zellen wurden mit einem flag-markiertem SOCS1- und SOCS3-Konstrukt sowie einem myc-markierten CIS-Plasmid mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. 18-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und mit 90%-igem Methanol permeabilisiert. Anschließend wurden die SOCS-Proteine in der direkten Immunfluoreszenzfärbung mit einem FITC-markierten Antikörper gegen das flag- bzw. myc-Epitop dargestellt. Kerne wurden mit dem DAPI-Farbstoff angefärbt. Maßstab = 10 µm.

Aus Abbildung 3-12 geht hervor, dass auch mit den myc- bzw. flag-markierten SOCS-Konstrukten das bereits beschriebene Expressionsmuster bestätigt werden konnte. Allerdings war die Fluoreszenzintensität schwächer ausgeprägt. Das myc-markierte murine CIS-Protein konnte vorwiegend im Zytoplasma nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war das flag-markierte murine SOCS3-Protein homogen in der Zelle verteilt und das flag-markierte murine SOCS1-Protein zeigte eine deutliche Lokalisation im Nukleus. In einigen mit dem flag-markierten murinen SOCS1-Konstrukt transient transfizierten Zellen konnte auch wieder eine gesprenkelte GFP-Fluoreszenz, wie in Abbildung 3-12 erkennbar ist, detektiert werden. Diese war von der Struktur und der Anzahl der Zellen, die diese gesprenkelte GFP-Fluoreszenz trugen, vergleichbar mit den GFP-SOCS1-Fusionsproteinen.

3.4.6 Zellfraktionierung transient transfizierter HEK 293 Zellen

Im nächsten Schritt sollten die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen mittels biochemischer Zellfraktionierung untermauert werden. Dazu wurden HEK 293 Zellen mit den humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-, SOCS3- und CIS-Konstrukten transient transfiziert. Anschließend wurden aus den Zellen zytosolische und nukleäre Extrakte präpariert. Die GFP-SOCS-Fusionsproteine wurden im Western Blot mit einem direkt HRP-markierten Antikörper gegen das GFP-Protein nachgewiesen (Abbildung 3-13). Die Reinheit der Fraktionen wurde durch jeweils einen speziellen zytosolischen (GAPDH) und nukleären (Lamin A/C) Marker überprüft.

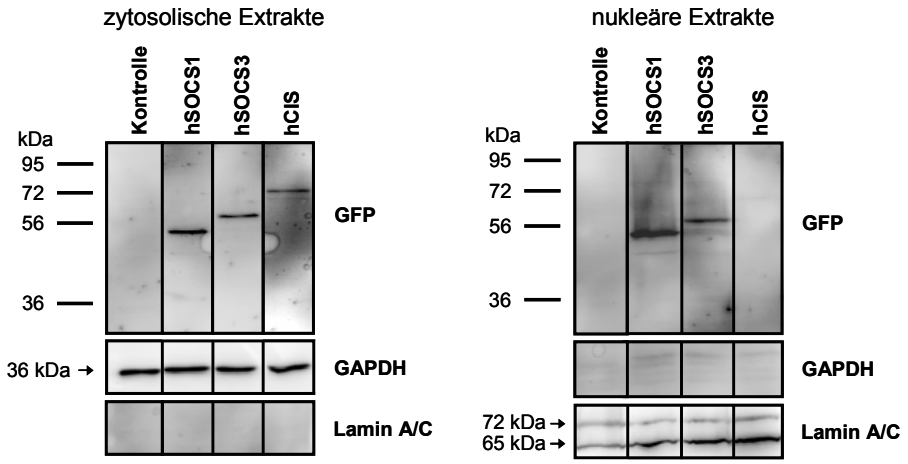

Abbildung 3-13: Zellfraktionierung von transient mit N-terminal GFP-markiertem SOCS1-, SOCS3- und CIS-Plasmiden transfizierten HEK 293 Zellen
Aus HEK 293 Zellen, die mit dem humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-, SOCS3- und CIS-Plasmid mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert wurden, erfolgte die Aufreinigung von zytosolischen und nukleären Extrakten. Im Western Blot wurden die Fusionsproteine mit einem direkt HRP-markierten anti-GFP Antikörper (1:500) detektiert. Nach Entfernung der gebundenen Antikörper-Komplexe wurde der zytosolische Marker GAPDH (1:250) und der nukleäre Marker Lamin A/C (1:1000) mittels Antikörper nachgewiesen. Die Größe der Proteine wurde mit dem auf der linken Seite dargestellten Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus ermittelt.

Die Daten der Zellfraktionierung zeigten einen Expressionsnachweis des humanen GFP-SOCS1-Proteins sowohl in der zytosolischen als auch in der nukleären Fraktion. Allerdings war der Nachweis dieses Fusionsproteins im Zytoplasma schwächer ausgeprägt. Das humane GFP-SOCS3-Fusionsprotein wurde in beiden Zellfraktionen gleichmäßig exprimiert. Die Expression des humanen GFP-markierten CIS-Proteins konnte nur in den zytosolischen Extrakten nachgewiesen werden. Nach Entfernung der gebundenen GFP-Antikörper-Komplexe von den Blot-Membranen erfolgte der Nachweis von spezifischen zytosolischen bzw. nukleären Proteinen in beiden Fraktionen. Dazu wurden beide Blot-Membranen zum einen mit einem Antikörper gegen den zytosolischen Marker GAPDH und zum anderen mit dem Lamin A/C-Antikörper als nukleären Marker reinkubiert. Bei GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) handelt es sich um ein sogenanntes *housekeeping*-Gen, das konstitutiv exprimiert und somit nicht reguliert wird. Es wird ubiquitär in fast allen Zellen auf hohem Niveau gebildet und ist an der Glykolyse beteiligt. Die Proteine Lamin A und Lamin C sind Bestandteile der Kernmembran. Es konnte ein deutlicher Nachweis des GAPDH-Proteins bei 36 kDa in den zytosolischen Extrakten und von den beiden Proteinen Lamin A/C bei 65 kDa und 74 kDa in den nukleären Extrakten detektiert werden. Zur Reinheitskontrolle der Zellextrakte wurden die vorliegenden Antikörper-Komplexe erneut von den Blot-Membranen entfernt und mit dem gegensätzlichen Antikörper reinkubiert, das bedeutet der zytosolische Blot mit dem Lamin A/C-Antikörper und der nukleäre Blot mit dem Antikörper gegen

das GAPDH-Protein. Hierbei wurde in den nukleären Extrakten keine GAPDH-Bande bei 36 kDa nachgewiesen. Ebenso konnte in den zytosolischen Extrakten kein Nachweis von Lamin A/C erbracht werden. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die präparierten Zellfraktionen sehr rein waren. In der Zusammenschau konnten die Daten der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen somit mittels biochemischen Methoden bestätigt werden.

3.4.7 Endogener SOCS-Nachweis aus RAW 264.7 Zellen

Als nächstes sollte der Nachweis der endogenen Proteine SOCS1 und SOCS3 erfolgen, obwohl bekannt ist, dass z.B. das SOCS1-Protein nach Stimulation auf einem geringen Niveau exprimiert wird und zugleich nur eine kurze Halbwertszeit besitzt.

In einem Vorversuch wurde analysiert, ob die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 in der Lage ist, die Transkription der SOCS-Gene nach Stimulation zu induzieren. Dazu wurden die Makrophagen für zwei, vier und acht Stunden mit murinem IFN-γ zur Induktion der Transkription des SOCS1-Gen bzw. mit LPS zur Induktion der Genexpression von SOCS3 stimuliert. Mittels quantitativer RT-PCR wurden die Zellen auf Transkription der Gene SOCS1 und SOCS3 sowie TNF-α relativ zur endogenen Kontrolle β-Aktin untersucht. Die Messung der TNF-α-Expression diente als Positiv-Kontrolle für eine erfolgte Stimulation der Zellen, da das proinflammatorische Zytokin TNF-α als Zielgen des TLR4-Liganden LPS über den MyD88-abhängigen Signalweg induziert werden kann (Abbildung 3-14).

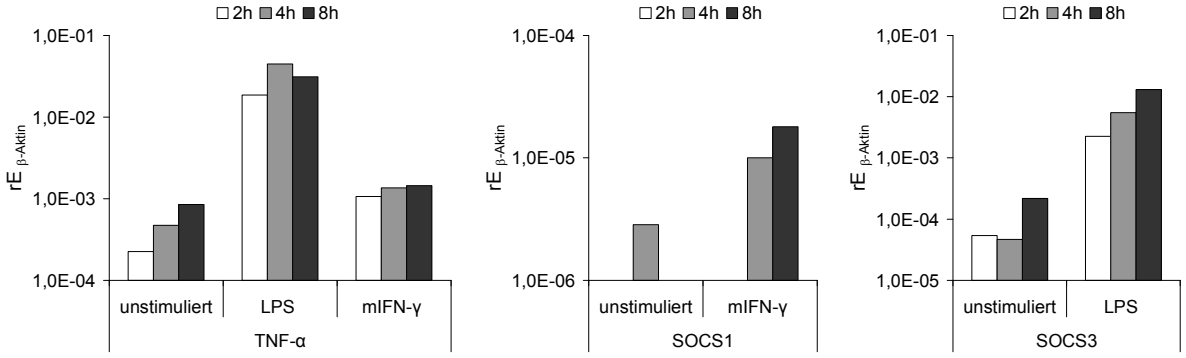

Abbildung 3-14: Induktion der SOCS1- und SOCS3-mRNA in stimulierten RAW 264.7 Zellen
1 x 10^6 RAW 264.7 Zellen wurden mit murinem IFN-γ (5U/ml) oder mit LPS (1 µg/ml) stimuliert. Die mRNA-Expression von TNF-α, SOCS1 und SOCS3 wurde mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen. Bestimmt wurde die relative Expression (rE) in Relation zur Expression von β-Aktin.

TNF-α als Positiv-Kontrolle zeigte bereits nach zweistündiger Stimulation mit LPS eine deutliche Induktion. Diese konnte nach 4 h noch geringfügig erhöht werden und war nach 8 h wieder rückläufig. Dagegen hatte die Stimulation mit murinem IFN-γ kaum Einfluss auf die TNF-α-

Induktion. Dies ist darauf zurückzuführen, dass IFN-γ ein Ligand des JAK/STAT-Signalwegs ist und somit keinen direkten Einfluss auf die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen ausübt. Aus Abbildung 3-14 ist außerdem erkennbar, dass SOCS1-mRNA in unstimulierten Zellen nicht oder nur geringfügig nachweisbar war. Nach Stimulation mit murinem IFN-γ konnte in dem untersuchten Zeitraum die stärkste Induktion der Expression des SOCS1-Gens nach 8 h erreicht werden. Allerdings lag das Transkriptionsniveau deutlich unter dem des SOCS3-Gens, welches bereits in unstimulierten Zellen auf einem deutlich höheren Niveau transkribiert wurde. Nach Stimulation zeigte sich über die angegebene Zeit ein stetiger Anstieg des Transkriptionsniveaus des SOCS3-Gens.

Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass die stärkste Induktion der SOCS1-mRNA nach 8 h IFN-γ-Stimulation und für die SOCS3-mRNA nach 4-8 h-iger Stimulation mit LPS vorlag. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die anschließenden Zellfraktionierungen in RAW 264.7 Zellen nach einer 4-6 stündigen Stimulation mit IFN-γ bzw. LPS durchgeführt.

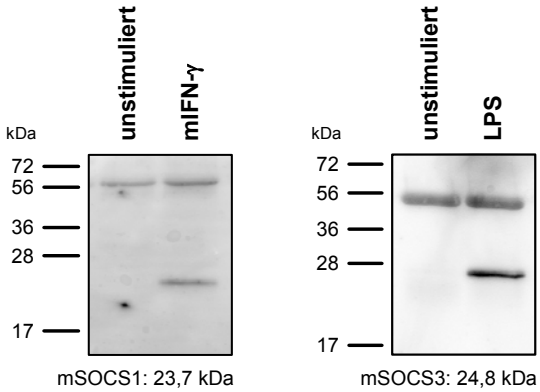

Abbildung 3-15: Endogener Nachweis der murinen SOCS1- und SOCS3-Proteine aus Gesamtzellextrakten nach Stimulation von RAW 264.7 Zellen
RAW 264.7 Zellen wurden für 4 h mit murinem IFN-γ (50 ng/ml) zur Induktion des murinen SOCS1-Proteins bzw. mit LPS (100 ng/ml) zur Induktion des murinen SOCS3-Proteins stimuliert. Aus den gewonnenen Gesamtzellextrakten wurde anschließend mittels Immunpräzipitation murines SOCS1- bzw. murines SOCS3-Protein angereichert und im Western Blot mit dem anti-JAB/SOCS-1 (J192; 1:100) bzw. mit dem SOCS-3 Antikörper (1B2; 1 µg/ml) nachgewiesen. Die Größe der Proteine wurde mit dem auf der linken Seite dargestellten Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus ermittelt.

Als erstes wurden für den endogenen SOCS-Nachweis murine RAW 264.7 Makrophagen für 4 h mit murinem IFN-γ zur Induktion des SOCS1-Proteins bzw. mit LPS zur Induktion des SOCS3-Proteins stimuliert. Aus den gewonnenen Gesamtzellextrakten wurde eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen murinen monoklonalen Antikörper gegen das SOCS1-Protein bzw. einem murinen polyklonalen Serum gegen das SOCS3-Protein zur Anreicherung der jeweiligen SOCS-Proteine durchgeführt. Der Nachweis von SOCS1- und SOCS3-Proteinen erfolgte im Western Blot.

Es wurden spezifische Antikörper gegen das SOCS1- bzw. SOCS3-Protein verwendet, die jeweils N-terminale Bereiche des murinen SOCS1- oder SOCS3-Proteins erkennen (Abbildung 3-15).

Wie aus Abbildung 3-15 ersichtlich ist, konnte nach Stimulation mit murinem IFN-γ oder LPS endogenes SOCS1- bzw. SOCS3-Protein in RAW 264.7 Zellen induziert und somit in Gesamtzell-extrakten nachgewiesen werden. Es ist eine deutliche spezifische Bande in der stimulierten Probe für das murine SOCS1-Protein bei 23,7 kDa und für das murine SOCS3-Protein bei etwa 24,8 kDa ersichtlich.

Zur genaueren Bestimmung der Verteilung des endogenen SOCS1-Proteins sollte anschließend eine Auftrennung der zytosolischen und nukleären Kompartimente erfolgen. Dazu wurden aus RAW 264.7 Zellen, die 6 h mit murinem IFN-γ zur Induktion des SOCS1-Proteins stimuliert wurden, zytosolische und nukleäre Extrakte hergestellt. Anschließend erfolgte aus den gewonnenen Proben eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen das SOCS1-Protein. Die beiden Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot charakterisiert. Zur Detektion wurden hierfür spezifische Antikörper gegen das SOCS1-Protein eingesetzt (Abbildung 3-16).

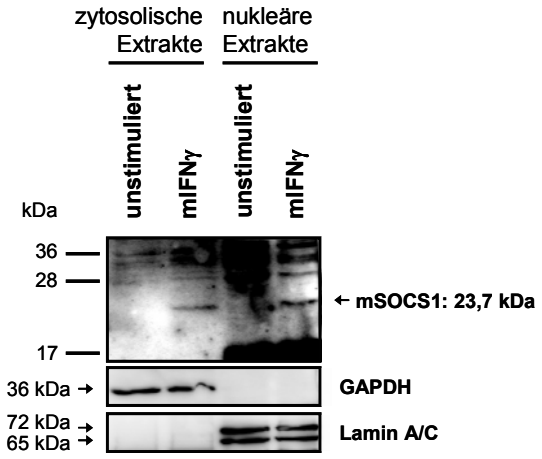

Abbildung 3-16: Nachweis des murinen SOCS1-Proteins aus immun-präzipitierten nukleären und zytosolischen Extrakten nach Stimulation von RAW 264.7 Zellen
RAW 264.7 Zellen wurden für 6 h mit murinem IFN-γ (50 ng/ml) zur Induktion des murinen SOCS1-Proteins stimuliert. Aus den gewonnenen nukleären und zytosolischen Extrakten wurde anschließend mittels Immunpräzipitation das murine SOCS1-Protein angereichert und im Western Blot mit dem anti-JAB/SOCS1 Antikörper (1:50) nachgewiesen. Nach Entfernung der gebundenen Antikörper-Komplexe wurde der zytosolische Marker GAPDH (1:250) und der nukleäre Marker Lamin A/C (1:1000) mittels Antikörper nachgewiesen. Die Größe der Proteine wurde mit dem auf der linken Seite dargestellten Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus ermittelt.

Der Nachweis von endogenem SOCS1-Protein war schwierig. Dies beruht auf der Tatsache, dass zum einen die SOCS-Proteine nach Stimulation nur schwach exprimiert werden und zum anderen die Halbwertszeit dieser Proteine nur sehr kurz ist (Larsen and Ropke 2002).
Für das endogene SOCS1-Protein konnte nach Protokolloptimierung ein schwacher Nachweis erzielt werden. Dies war sowohl in den nukleären als auch in den zytosolischen Extrakten möglich. Anschließend wurden, zur Bestimmung der Reinheit der Zellextrakte, die vorliegenden Antikörperkomplexe von der Blot-Membran entfernt und nacheinander mit dem spezifischen zytosolischen Marker GAPDH bzw. den spezifischen nukleären Markern Lamin A und C reinkubiert. Hierbei konnte ein deutlicher Nachweis des GAPDH-Proteins bei 36 kDa in den zytosolischen Extrakten und von den beiden Proteinen Lamin A/C bei 65 kDa und 74 kDa in den nukleären Extrakten detektiert werden. Dagegen konnte weder GAPDH in den nukleären Extrakten noch eine Lamin A/C Doppelbande in den zytosolischen Extrakten nachgewiesen werden. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die präparierten Zellfraktionen sehr rein waren. Somit konnte gezeigt werden, dass das endogene SOCS1-Protein sowohl in den nukleären als auch in den zytosolischen Extrakten vorliegt. Dies wiederum bestätigt die Daten der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen, dass das SOCS1-Protein im Nukleus exprimiert wurde.

3.5 Identifizierung eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) im SOCS1-Protein

Aufgrund der Tatsache, dass das SOCS1-Protein in den untersuchten Zellen eine deutliche Lokalisation im Zellkern aufwies, nachgewiesen sowohl durch fluoreszenztechnische Beobachtungen als auch durch biochemische Methoden mittels Zellfraktionierung, wurde nach einem eventuell vorhandenen nukleären Lokalisationssignal (NLS) gesucht, welches die Translokation des Proteins aus dem Zytoplasma in den Nukleus bedingt. Dazu wurde sowohl die humane als auch die murine SOCS1-Proteinsequenz mit dem Programm predictNLS (http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/) analysiert und mit experimentell verifizierten oder mit durch *in silico* Mutagenese erhaltenen potenziellen nukleären Lokalisationssignalen abgeglichen. Es wurde eine putative NLS-Sequenz innerhalb des murinen und humanen SOCS1-Proteins identifiziert. In Abbildung 3-17 ist die humane SOCS1-Sequenz mit der putativen NLS-Sequenz (rot) dargestellt. Diese putative NLS-Sequenz RMLGAPLRQRR, bestehend aus 11 Aminosäuren, war zwischen der SH2-Domäne und der SOCS-Box des SOCS1-Proteins lokalisiert und umfasste die Aminosäuren 160 bis 170 innerhalb des humanen SOCS1-Proteins bzw. die Aminosäuren 161 bis 171 innerhalb des murinen SOCS1-Proteins. Hierbei handelte es sich um das NLS-Motiv: R[MNQ]x{4,8}[MNQ]RR. Dieses konnte auch in 26 weiteren Proteinen, bei denen es sich ausschließlich um nukleäre Proteine handelte, als Kernlokalisationssignal vorhergesagt werden. Außerdem wurde diese Sequenz nicht in bekannten zytosolischen Proteinen gefunden.

Dieses nukleäre Lokalisationssignal ähnelt einem zweigeteilten NLS-Motiv bestehend aus zwei basischen Regionen, die durch Arginin-Reste am N- und C-Terminus der NLS bestimmt werden. Den basischen Aminosäuren innerhalb der NLS wird eine Rolle für die Bindung des Proteins an Importin α, einem Adaptermolekül, welches am klassischen Importin α/β-abhängigen Importweg für NLS-tragende Proteine aus dem Zytoplasma in den Zellkern beteiligt ist, zugeschrieben. Da sich unmittelbar vor und nach der vorhergesagten NLS-Sequenz noch jeweils ein Arginin-Rest befand und aufgrund der nachfolgend beschriebenen Experimente wurde die vorhergesagte NLS auf folgende Sequenz, bestehend aus 14 Aminosäuren, erweitert: RRMLGAPLRQRRVR. In Abbildung 3-17A wurden die zwei basischen Regionen der putativen NLS durch Boxen hervorgehoben. Im Gegensatz zum SOCS1-Protein konnte ein solches nukleäres Lokalisationssignal weder im SOCS3- noch im CIS-Protein identifiziert werden. In Abbildung 3-17A wurde der zur NLS-Sequenz korrespondierende Bereich in der humanen Sequenz dieser beiden SOCS-Proteine dargestellt.

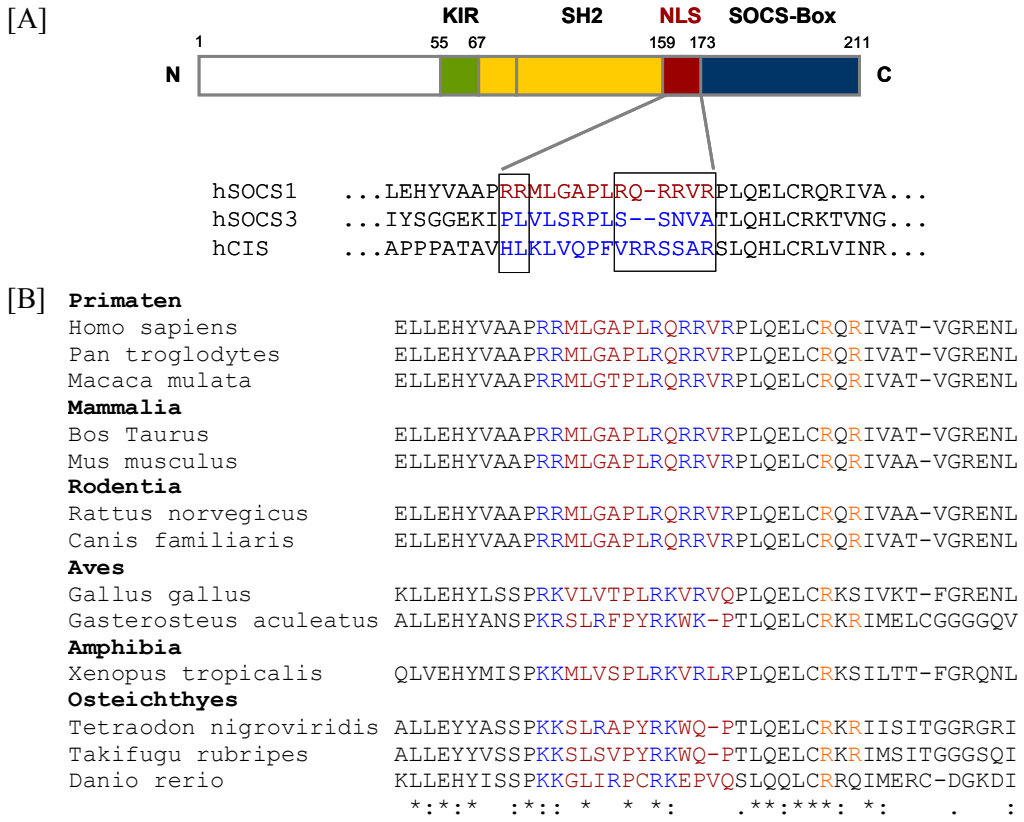

Abbildung 3-17: Identifizierung eines putativen nukleären Lokalisationssignals (NLS) im SOCS1-Protein
[A] Oben: Die schematische Darstellung des SOCS1-Proteins zeigt neben den bekannten Domänen KIR, SH2 und SOCS-Box auch die putative NLS. Unten: Sequenzvergleich des humanen SOCS1-, SOCS3- und CIS-Proteins mit der identifizierten NLS in rot. Die zwei Bereiche mit basischen Aminosäuren sind durch Boxen hervorgehoben. [B] Sequenzvergleich des SOCS1-Proteins aus verschiedenen Spezies. Die putative NLS ist in rot dargestellt, basische Aminosäuren innerhalb der NLS sind blau markiert und in orange sind Arginin-Reste innerhalb einer dritten basischen Region hervorgehoben.

Des Weiteren wurde ein Sequenzvergleich von veröffentlichten Proteindaten für das SOCS1-Protein aus verschiedenen Spezies durchgeführt. Es zeigte sich, dass das oben beschriebene zweigeteilte nukleäre Lokalisationssignal evolutionär konserviert ist (Abbildung 3-17B). Bei den Knochenfischen zeigte sich allerdings ein etwas abgewandeltes NLS-Sequenzmotiv, wobei die erste Region aus basischen Aminosäuren (N-Terminus der NLS) auch bei den Knochenfischen noch besonders hoch konserviert war. Hier kam es lediglich zu einem Wechsel der basischen Aminosäuren von Arginin (R) nach Lysin (K). Bei näheren Untersuchungen konnte außerdem eine dritte basische Region, mehr C-terminal von der NLS gelegen, identifiziert werden (Abbildung 3-17B orange unterlegt).

3.6 Mutation der putativen NLS minimiert die Kernexpression des SOCS1-Proteins

3.6.1 Lokalisation verschiedener SOCS1-Mutanten in HEK 293 Zellen

Als nächstes wurde eine umfangreiche Mutationsanalyse bezüglich der funktionellen Bedeutung der identifizierten putativen NLS im SOCS1-Protein durchgeführt. Alle folgenden Mutationen wurden in das pEGFP-C1-hSOCS1-Konstrukt mit Hilfe des QuikChange® XL Site-directed Mutagenesis Kits eingeführt (vgl. Kap. 2.2.2.2), mittels Sequenzierung verifiziert und hinsichtlich des Expressionsmusters in HEK 293 Zellen untersucht.

Als erstes wurden zwei bekannte Mutationen in das humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Fusionsprotein eingeführt. Es wurde Phenylalanin an Position 58 zu Alanin (F58A) mutiert. Hierbei handelte es sich um eine Mutation in der KIR-Region, die dazu führen sollte, dass das humane SOCS1-Protein nicht mehr mit der katalytischen Furche JH1 in der Kinase-Domäne der Janus-Kinase JAK2 interagieren kann. Zum anderen wurde in der SH2-Domäne des humanen SOCS1-Proteins Arginin an Position 104 zu Lysin (R104K) mutiert. Diese Mutante sollte nicht mehr in der Lage sein, mit der SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosin-Reste im JAK2-Protein zu binden. Beide Mutanten können somit nicht mehr den JAK/STAT Signalweg inhibieren[16]. Nach Transfektion der F58A- und R104K-Mutante in HEK 293 Zellen war kein Unterschied hinsichtlich der Lokalisation in der Zelle im Vergleich zum Wildtyp SOCS1-Protein erkennbar (Abbildung 3-18). Beide Mutanten wurden im Zellkern exprimiert. In einigen Zellen konnte die gesprenkelte nukleäre GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Als nächstes sollte die Rolle der putativen NLS-Sequenz untersucht werden. Dazu wurde als erstes eine Serie von C-terminalen Deletionsmutanten durch Einfügen von Stop-Codons generiert, die das putative nukleäre Lokalisationssignal in unterschiedlichem Ausmaß verkürzten. Als erstes wurde Arginin an Position

[16] Die Funktion dieser und aller weiterer Mutanten wurde später unter 3.8 analysiert.

172 zu einem Stop-Codon (R172X) mutiert. Dadurch entstand ein GFP-SOCS1-Fusionsprotein, das keine SOCS-Box aber noch die vollständige NLS exprimierte. Diese Deletion der kompletten SOCS-Box resultierte in einer überwiegend nukleären Lokalisation der R172X-Mutante nach Transfektion in HEK 293 Zellen. Allerdings war auch eine schwache GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma erkennbar (Abbildung 3-18). Als nächstes wurden die SOCS-Box und zusätzlich noch ein Teil der putativen NLS deletiert. Dazu wurde Prolin an Position 165 zu einem Stop-Codon verändert (P165X). Diese Mutante führte zu einer nahezu homogenen Verteilung des SOCS1-Proteins in HEK 293 Zellen (Abbildung 3-18). Außerdem wurde noch die komplette NLS-Sequenz zusammen mit der SOCS-Box durch Mutation von Tyrosin an Position 154 zu einem Stop-Codon deletiert (Y154X). Diese Mutante zeigte einen kompletten Verlust der nukleären Expression. Allerdings zeigte diese Y154X-Mutante eine untypische zytoplasmatische Expression in Form eines stark fluoreszierenden Punktes im Zytoplasma der Zelle. Es war nicht auszuschließen, dass dieses Expressionsmuster aufgrund eines nicht korrekt gefalteten Proteins hervorgerufen wurde.

In einer zweiten Versuchsserie wurden Punktmutationen innerhalb der putativen nukleären Lokalisationssequenz des humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Proteins vorgenommen. Dazu wurde eine steigende Anzahl an Arginin-Resten durch Alanin-Reste ersetzt (R/A), so dass es zu einer Akkumulation von Alanin-Resten innerhalb der NLS kam. Es wurden die Mutanten 1R/A bis 6R/A generiert (vgl. Kap. 2.1.7). In Abbildung 3-18 wurde die Lokalisation der 1R/A-, 3R/A- und 6R/A-Mutante nach Transfektion in HEK 293 Zellen dokumentiert. Es ist erkennbar, dass sich das nukleo-zytoplasmatische Expressionsmuster dieser humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten mit steigender Anzahl an R/A-Mutationen invertierte. Die 1R/A-Mutante zeigte noch eine komplette nukleäre Expression, die mit der Lokalisation des Wildtyp SOCS1-Proteins vergleichbar war. Bei der 3R/A-Mutante fanden sich zum einen Zellen, bei denen das Protein homogen in der Zelle verteilt war, zum anderen waren auch Zellen vorhanden, bei denen die GFP-Fluoreszenz vorwiegend im Zytoplasma zu beobachten war. Die 6R/A-Mutante ließ schließlich eine deutliche Verschiebung im Expressionsmuster des Proteins erkennen. Dieses Konstrukt zeigte eine überwiegend, wenn nicht sogar ausschließliche, zytoplasmatische Lokalisation. Die Expression des Proteins war im Zytoplasma gleichmäßig verteilt. In einigen Zellen wurde auch die Akkumulation eines perinukleären Punktes beobachtet (Pfeilspitze in Abbildung 3-18).

In einem dritten Ansatz wurde die komplette putative NLS-Sequenz im humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Protein bestehend aus 14 Aminosäuren deletiert (hS1/Del). Weiterhin wurden in diese Deletionsmutante die Aminosäuren PLVLSRPLSSNVAT aus dem humanen SOCS3-Protein inseriert (hS1/Del+hS3). Beide humanen GFP-SOCS1-Mutanten wurden anschließend in HEK 293 Zellen transient transfiziert und hinsichtlich ihrer Lokalisation nach Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI-Lösung mikroskopisch beurteilt. Wie aus Abbildung 3-18 erkennbar ist, gab es keinen Unterschied zwischen der hS1/Del- und hS1/Del+hS3-Mutante hinsichtlich ihrer

Lokalisation. In beiden Fällen war eine deutliche zytoplasmatische Expression erkennbar. Bei der hS1/Del+hS3-Mutante war in manchmal Zellen auch ein perinukleärer Punkt (Pfeilspitze in Abbildung 3-18) erkennbar. Das Expressionsmuster dieser Mutanten ähnelte dem der 6R/A-Mutante.

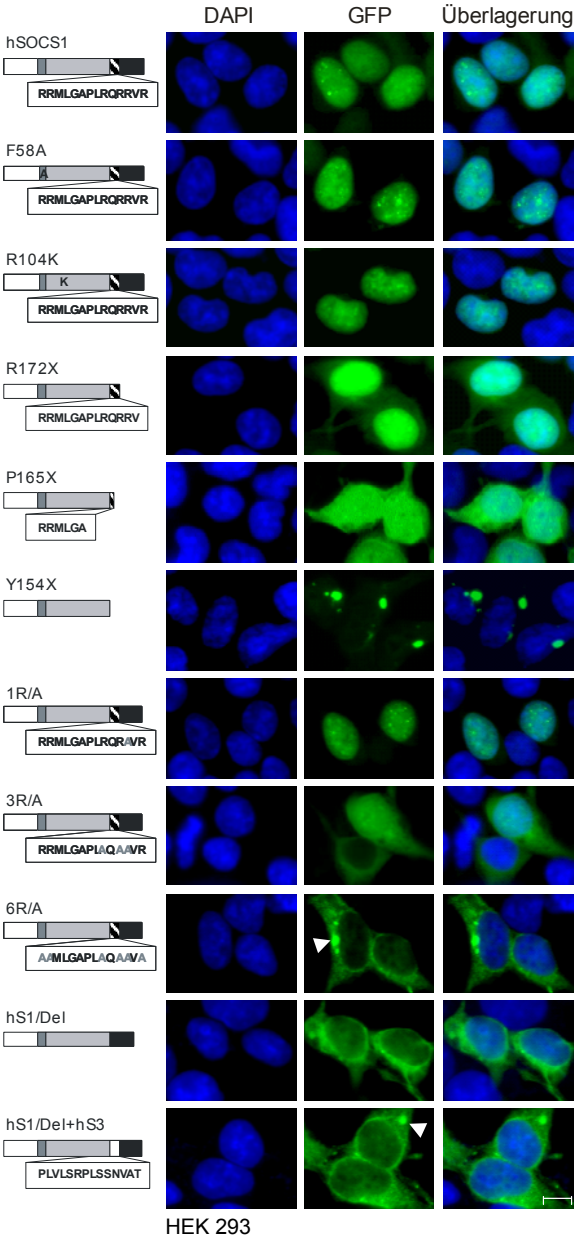

Abbildung 3-18: Mutationen im Bereich der putativen NLS des humanen SOCS1-Proteins führen zur Veränderung des Expressionsmusters
pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid und die angegebenen humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten wurden in HEK 293 Zellen mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. Nach Färbung der Kerne mit dem DNA-Farbstoff DAPI und gleichzeitiger Fixierung der Zellen mit Ethanol wurde das Expressionsmuster der verschiedenen Proteine im Fluoreszenzmikroskop beurteilt und anhand von repräsentativen Zellen dokumentiert. Links neben den mikroskopischen Bildern ist eine schematische Skizze von jeder Mutante dargestellt (weiß: variabler N-terminaler Bereich, dunkelgrau: KIR-Region, hellgrau: ESS- und SH2-Domäne, gestreift: putative NLS, schwarz: SOCS-Box; Pfeilspitze: perinukleärer Punkt). Maßstab = 10 µm.

3.6.2 Quantitative Lokalisationsanalyse der verschiedenen humanen SOCS1-Mutanten in HEK 293 Zellen

Anschließend wurde eine quantitative Analyse des humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Proteins und der verschiedenen humanen GFP-SOCS1-Mutanten hinsichtlich ihrer Lokalisation vorgenommen. Dazu wurden die verschiedenen Konstrukte in HEK 293 Zellen transient transfiziert. Die Zellkerne wurden mit DAPI/Ethanol-Lösung angefärbt und die Zellen dabei gleichzeitig fixiert. Im Anschluss wurden von zwei Personen von jeder Mutante mindestens 100 transfizierte Zellen gezählt und in ihrem Expressionsmuster hinsichtlich nukleärer und zytoplasmatischer Lokalisation beurteilt. Dabei wurde bewertet, ob sich die GFP-Fluoreszenz deutlich im Zytoplasma oder im Nukleus zeigt oder in der gesamten Zelle verteilt war. Wenn die Fluoreszenz in der gesamten Zelle lokalisiert war, wurde noch einmal unterschieden, ob dabei das Zytoplasma (Zytoplasma > Nukleus) oder der Kern (Nukleus > Zytoplasma) mehr betont war. Unter „undefiniert“ wurden Erscheinungsformen in Zellen zusammengefasst, die nicht regelmäßig auftraten, wie z.B. ein prominenter Punkt oder eine Anhäufung von mehreren kleinen Punkten im Zytoplasma.

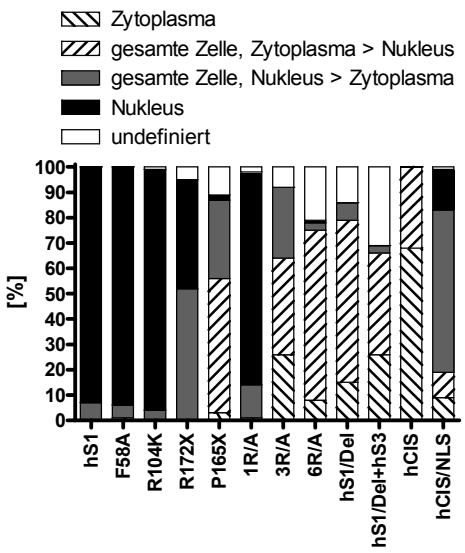

Abbildung 3-19: Quantifizierung der verschiedenen humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten hinsichtlich der Lokalisation in HEK 293 Zellen
Auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäte HEK 293 Zellen wurden mit pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid und den angegebenen humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. 18-24 h nach der Transfektion wurden die Kerne mit DAPI/Ethanol-Lösung angefärbt und die Zellen dabei gleichzeitig fixiert. Mindestens 100 Zellen wurden hinsichtlich des Expressionsmusters mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops beurteilt. Angegeben ist die Verteilung der Expressionsmuster in %.

Aus Abbildung 3-19 ist erkennbar, dass das humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Protein sowie die beiden bekannten Mutanten F58A (Mutation in KIR-Region) und R104K (Mutation in SH2-Domäne) sich in ihrem Expressionsmuster nicht unterschieden. Alle drei Konstrukte zeigten eine deutliche Kernlokalisation. Es konnte nur eine marginale Fluoreszenz dieser Proteine im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Deletion der kompletten SOCS-Box (R172X) bewirkte eine geringe Verschiebung des Expressionsmusters. Die R172X-Mutante war zwar noch deutlich im Nukleus lokalisiert, allerdings konnte auch eine stärkere Fluoreszenz im Zytoplasma im Vergleich zum N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Protein nachgewiesen werden. Dieses

verschobene Expressionsmuster wurde deutlicher, wenn zur Deletion der SOCS-Box zusätzlich noch ein Teil der putativen NLS entfernt wurde (P165X). Diese Mutante zeigte eine annähernd homogene Verteilung des GFP-SOCS1-Fusionsproteins in der Zelle, wobei bei circa 50% der Zellen die Fluoreszenz stark im Zytoplasma war. Dagegen war bei etwa 40% der Zellen das Protein zwar auch in der gesamten Zelle verteilt, zeigte aber eine etwas stärkere Fluoreszenz im Nukleus.

Bei den drei verschiedenen R/A-Mutanten konnte eine deutliche Verschiebung im Expressionsmuster beobachtet werden. Wenn nur ein Arginin-Rest in der putativen NLS nach Alanin mutiert wurde (1R/A), konnte kein Unterschied in der Lokalisation im Vergleich zum N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Protein beobachtet werden. Diese Mutante wurde überwiegend im Nukleus exprimiert und zeigte nur eine marginale Expression im Zytoplasma. Bei der 3R/A-Mutante zeigten die Zellen ein differentes Expressionsmuster. Größtenteils war das mutierte N-terminal GFP-markierte SOCS1-Protein in der gesamten Zelle verteilt und zeigte entweder eine deutlichere Fluoreszenz im Zytoplasma oder auch im Nukleus. Bei einem geringen Teil der Zellen war die Fluoreszenz prädominant im Nukleus zu beobachten. Wenn allerdings alle sechs Arginin-Reste nach Alanin mutiert wurden (6R/A), kam es zu einer klaren Verschiebung des Expressionsmusters. Bei circa 60% der Zellen war die Fluoreszenz in der gesamten Zelle verteilt, wobei das Zytoplasma deutlicher hervorgehoben war. 10% der Zellen zeigten eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung. Dagegen konnte nur bei 5% der Zellen eine überwiegend nukleäre Expression des mutierten N-terminal GFP-markierten SOCS1-Proteins nachgewiesen werden. Bei den beiden Deletionsmutanten, in denen die putative NLS-Sequenz des humanen GFP-SOCS1-Proteins entfernt wurde (hS1/Del) bzw. durch die entsprechenden Aminosäuren aus dem humanen SOCS3-Protein ersetzt wurde (hS1/Del+hS3), zeigte sich auch eine deutliche Verschiebung im Expressionsmuster. Die Lokalisation dieser beiden mutierten GFP-SOCS1-Proteine war vergleichbar mit der 6R/A-Mutante. Auch hier konnte eine Verteilung beider Proteine in der gesamten Zelle beobachtet werden, wobei die Expression der Fusionsproteine im Zytoplasma stärker war. Zwischen 15 und 30% der Zellen zeigte eine auffallend zytoplasmatische Lokalisation.

Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass eine Veränderung des putativen nukleären Lokalisationssignals eine Veränderung der Lokalisation des humanen GFP-SOCS1-Fusionsproteins zur Folge hat. So bewirkte die Zerstörung der basischen Aminosäuren in der putativen NLS oder die komplette Deletion dieser Region eine verstärkte Expression dieser mutierten humanen GFP-SOCS1-Proteine im Zytoplasma. Dies deutete darauf hin, dass diese Region Merkmale eines funktionalen nukleären Lokalisationssignals aufweist.

3.6.3 Expressionsnachweis der humanen SOCS1-Mutanten in HEK 293 Zellen

Nach Klonierung wurde jedes mutierte humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Plasmid mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Wildtyp SOCS1-Sequenz (NCBI: gi 2245383) über das Programm ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) abgeglichen. Es wurden für jede SOCS1-Mutante Klone präpariert, welche nur die eingefügten, zielgerichteten Mutationen enthielten und ansonsten vollständig mit der humanen Wildtyp SOCS1-Sequenz übereinstimmten.

Zusätzlich erfolgte der Expressionsnachweis der verschiedenen mutierten humanen GFP-SOCS1-Fusionsproteine aus Gesamtzellextrakten von transfizierten HEK 293 Zellen im Western Blot (Abbildung 3-20). Dazu wurde die Proteinkonzentration in den verschiedenen Lysaten mittels BCA-Assay bestimmt. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Proteine wurden mit einem direkt HRP-markierten Antikörper gegen das GFP-Protein nachgewiesen.

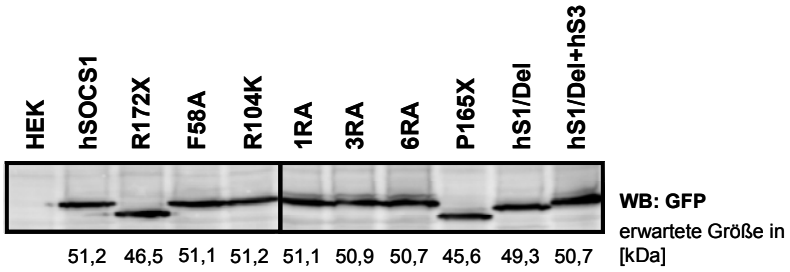

Abbildung 3-20: Expressionsnachweis der verschiedenen humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten in HEK 293 Zellen
Aus Gesamtzellextrakten von HEK 293 Zellen, die mit dem humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Plasmid und den angegebenen Mutanten mittels Lipofectamin™ transient transfiziert worden waren, erfolgte der Expressionsnachweis im Western Blot mit einem direkt HRP-gekoppelten Antikörper (1:500) gegen das GFP-Protein. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte HEK 293 Zellen. Unter der Abbildung ist die zu erwartende Größe des jeweiligen Proteins in kDa notiert. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.

Aus Abbildung 3-20 ist ersichtlich, das in den transient transfizierten HEK 293 Zellen eine deutliche Expression des humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Fusionsproteins und der verschiedenen Mutanten in der zu erwartenden Größe mit dem verwendeten direkt HRP-gebundenen Antikörper gegen das GFP-Protein nachgewiesen werden konnte.

3.7 Transfer der NLS-Sequenz des humanen SOCS1-Proteins in das humane CIS-Protein

Zur weiteren Überprüfung, ob es sich bei der putativen NLS auch um ein funktionales nukleäres Lokalisationssignal handelt, wurde die NLS-Sequenz des humanen SOCS1-Proteins zwischen

SH2-Domäne und SOCS-Box des ansonsten zytoplasmatischen humanen N-terminal GFP-markierten CIS-Proteins (hCIS/NLS) inseriert. Dazu wurde als erstes eine SpeI-Restriktionsenzymschnittstelle im pEGFP-C1-hCIS-Konstrukt zwischen die SH2-Domäne und die SOCS-Box mittels Quik Change XL Kit generiert, über die anschließend die NLS-Sequenz in Form eines Oligonukleotids eingefügt wurde.

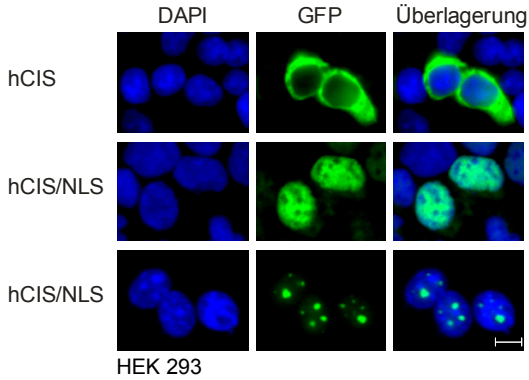

Abbildung 3-21: Lokalisation der humanen GFP-markierten CIS/NLS-Mutante in HEK 293 Zellen
HEK 293 Zellen wurden mit pEGFP-C1-hCIS-Konstrukt bzw. dem GFP-hCIS/NLS-Plasmid mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. Die Lokalisation in den zuvor fixierten Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI markiert. Maßstab = 10 µm.

Humanes N-terminal GFP-markiertes Wildtyp CIS-Protein wurde, wie bereits schon erwähnt, überwiegend im Zytoplasma exprimiert (Abbildung 3-5, Abbildung 3-21). Nach Insertion des nukleären Lokalisationssignals aus dem humanen SOCS1-Protein zwischen SH2-Domäne und SOCS-Box des humanen CIS-Proteins konnte allerdings eine deutliche Lokalisationsänderung beobachtet werden. Das humane GFP-CIS/NLS-Fusionsprotein zeigte nun eine klare Expression im Nukleus zum Teil mit Nukleoli-ähnlichen Aussparungen (Abbildung 3-21, hCIS/NLS: obere Reihe). In einigen Zellen konnte auch ein gesprenkeltes Expressionsmuster beobachtet werden, allerdings nicht in dem Umfang wie beim humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Fusionsprotein (Abbildung 3-21, hCIS/NLS: untere Reihe). Ansonsten war das Expressionsmuster ähnlich zum humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Protein.

Sowohl das humane N-terminal GFP-markierte CIS-Protein als auch das humane N-terminal GFP-markierte CIS/NLS-Fusionsprotein wurden anschließend hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle quantifiziert. Dazu wurden mindestens 100 Zellen von den in Abbildung 3-21 transient transfizierten HEK 293 Zellen hinsichtlich zytoplasmatischer und nukleärer Verteilung in der Zelle beurteilt (Abbildung 3-22). Das Bewertungsschema wurde bereits unter 3.6.2 näher erläutert.

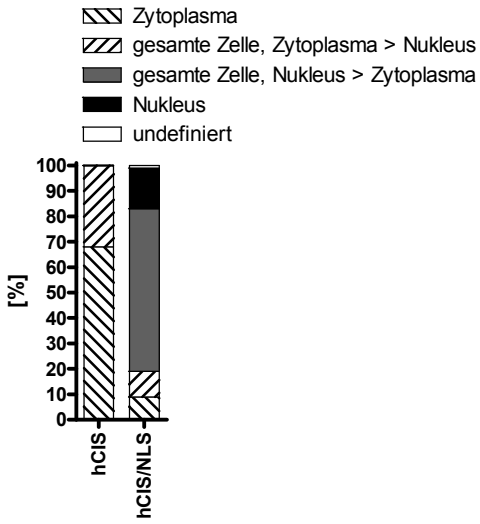

Abbildung 3-22: Quantifizierung des humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp CIS-Proteins und des humanen N-terminal GFP-markierten CIS/NLS-Fusionsproteins in HEK 293 Zellen
Auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäte HEK 293 Zellen wurden mit pEGFP-C1-hCIS-Plasmid bzw. dem humanen N-terminal GFP-markierten CIS/NLS-Konstrukt mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert, fixiert und der Kern mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt. Mindestens 100 transfizierte Zellen wurden hinsichtlich des Expressionsmusters am Fluoreszenzmikroskops beurteilt.

Aus Abbildung 3-22 ist deutlich erkennbar, dass nach Insertion des nukleären Lokalisationssignals aus dem humanen SOCS1-Protein in das humane CIS-Protein eine Verschiebung des Expressionsmusters in der Zelle beobachtbar ist. Während das humane N-terminal GFP-markierte CIS-Protein vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert war, zeigte die humane N-terminal GFP-markierte CIS/NLS-Mutante eine deutliche Expression im Nukleus. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der putativen NLS auch um eine funktionale NLS handelt, welche transferierbar nukleäre Lokalisation vermittelt.

3.8 Funktionelle Analyse der humanen SOCS1-Mutanten bezüglich der Inhibition im JAK/STAT Signalweg

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Veränderungen im Expressionsmuster bei den verschiedenen humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten die bekannte Funktion des Wildtyp SOCS1-Proteins, Inhibition im JAK/STAT Signalweg, beeinflussen. Dies wurde anhand der Stimulation von HEK 293 Zellen mit humanem IFN-α gemessen. Es erfolgte eine Überprüfung mittels verschiedener Versuchsansätze. Dazu wurden HEK 293 Zellen mit dem humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Protein und den verschiedenen mutierten pEGFP-C1-hSOCS1-Konstrukten transient transfiziert und mit humanem IFN-α stimuliert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Tyrosin-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 analysiert. Außerdem wurde die Aktivität eines STAT1/2-abhängigen Luciferase-Reporterplasmids im Luminometer bestimmt.

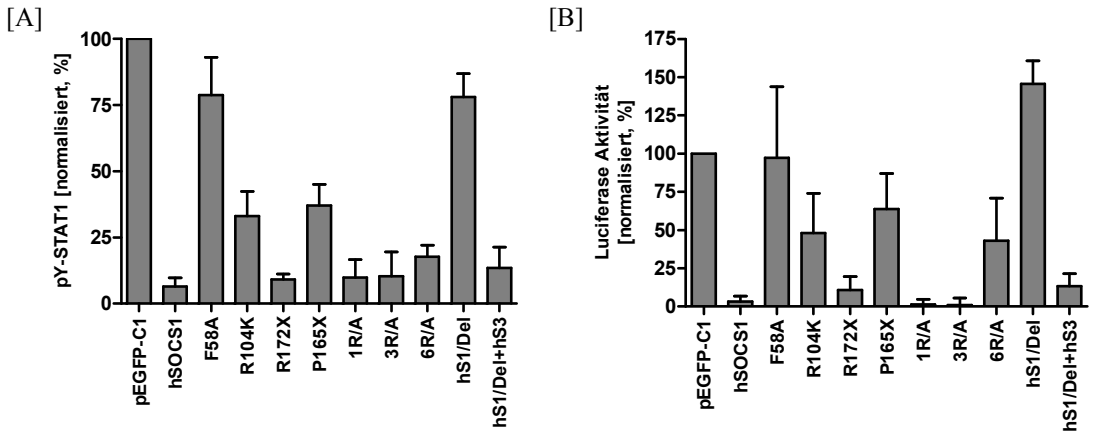

Abbildung 3-23: NLS-Mutanten zeigen keinen wesentlichen Funktionsverlust hinsichtlich der Inhibition im JAK/STAT-Signalweg
[A] HEK 293 Zellen wurden mit pEGFP-C1 (Leervektor), pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid und den angegebenen humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. Nach 18-24 h wurden die Zellen mit humanem IFN-α für 45 min stimuliert, gegen phosphoryliertes Tyrosin 701 (pY701) im STAT1-Protein gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von pY-STAT1-Alexa 647 innerhalb der GFP-positiven Zellen wurde bestimmt. Es wurde die Differenz aus stimulierten und unstimulierten GFP-positiven Zellen berechnet und der Leervektor auf 100% gesetzt (mindestens drei unabhängige Experimente, Mittelwert + Standardabweichung). [B] HEK 293 Zellen wurden wie in [A] zusammen mit einem ISRE-Luciferase Reporterplasmid transient transfiziert. 18-24 h nach Transfektion wurden die Zellen 6 h mit humanem IFN-α stimuliert und anschließend die Luciferase-Aktivität im Luminometer gemessen. Es wurde der Quotient aus stimulierten und unstimulierten Zellen berechnet und der Leervektor auf 100% gesetzt (mindestens vier unabhängige Experimente; Mittelwert + Standard-abweichung).

Aus Abbildung 3-23 ist erkennbar, dass beide Versuchsansätze ein gleichartiges Ergebnis ergaben. Als Negativkontrolle wurde in beiden Testsystemen der Leervektor pEGFP-C1 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Plasmid, das nur das GFP-Protein exprimiert, welches in Folge dessen keinen Einfluss auf den JAK/STAT-Signalweg ausüben und somit keine Inhibition vermitteln sollte. Der Leervektor pEGFP-C1 wurde deshalb zur Normalisierung eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit von verschiedenen Versuchsansätzen zu ermöglichen. N-terminal GFP-markiertes Wildtyp SOCS1-Protein (Positivkontrolle) führte zu einer kompletten Inhibition der Tyrosin-Phosphorylierung und der Reportergen-Induktion. Die KIR-Mutante F58A zeigte einen kompletten Verlust der inhibitorischen Aktivität in beiden Versuchsansätzen, dagegen war die SH2-Mutante R104K partiell noch funktional. Alle Mutanten mit einem deutlich veränderten nukleären versus zytoplasmatischen Expressionsmuster (6R/A, hS1/Del+hS3) waren überraschenderweise noch in der Lage, STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung zu inhibieren. Allerdings war der inhibitorische Effekt teilweise leicht abgeschwächt. In beiden Testsystemen spielte die SOCS-Box keine Rolle, da die R172X-Mutante noch inhibitorische Wirkung zeigte und diese mit dem Wildtyp SOCS1-Protein vergleichbar war. Interessanterweise zeigte die humane N-terminal GFP-markierte SOCS1-Mutante, in der die komplette NLS-Sequenz deletiert und nicht durch die homologe humane

SOCS3-Region ersetzt wurde (hS1/Del), einen kompletten Verlust der inhibitorischen Aktivität. Dagegen zeigte die P165X-Mutante, in der die NLS zum Teil deletiert wurde, noch eine partielle Inhibition in beiden Testsystemen. Bei der 1R/A- und der 3R/A-Mutante, die überwiegend im Nukleus lokalisiert waren, konnte noch eine komplette Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs sowohl auf der Ebene der STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung als auch bei der Messung der Reportergen-Aktivität unter Verwendung eines ISRE- (*interferon stimulated response element*) Promotors nachgewiesen werden. Die 6R/A-Mutante, die eine deutliche Verschiebung im Expressionsmuster gegenüber dem humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Protein und somit eine äußerst prominente zytoplasmatische Expression zeigte, war noch in der Lage, den IFN-Signalweg zu inhibieren, allerdings war dieser inhibitorische Effekt bei der Messung der STAT1 Tyrosin-Phosphorylierung deutlicher ausgeprägt als bei der Verwendung eines Luciferase-Reportergen-Systems unter der Kontrolle eines ISRE-Promotors. Auch die hS1/Del+hS3-Mutante, die das gleiche Expressionsmuster wie die 6R/A-Mutante aufweist, zeigte nur eine geringfügige Einschränkung in der Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs im Vergleich zum humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Protein.

Im nächsten Schritt wurden unterschiedliche Mengen des humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Proteins, von der 6R/A- und von der hS1/Del+hS3-Mutante in HEK 293 Zellen transfiziert, mit humanem IFN-α für 6 h stimuliert und anschließend die Luciferase-Reportergen-Aktivität im Luminometer bestimmt (Abbildung 3-24). Hiermit sollte bestimmt werden, ob die transfizierte Plasmidmenge zu einer Verschiebung der inhibitorischen Potenz für die angegebenen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten führt.

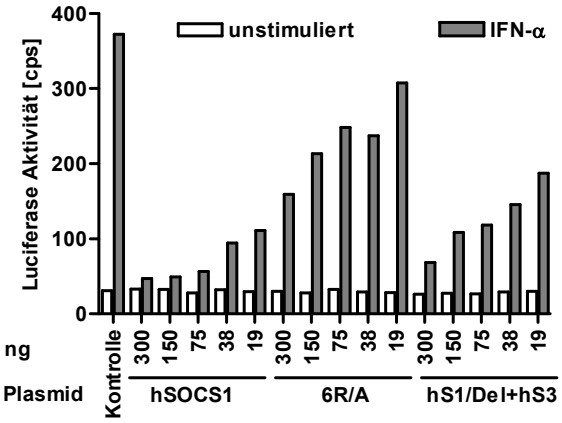

Abbildung 3-24: Abhängigkeit der transfizierten Plasmidmenge auf den inhibitorischen Effekt im JAK/STAT-Signalweg
HEK 293 Zellen wurden mit dem pEGFP-C1-hSOCS1-Plasmid, der 6R/A- und hS1/Del+hS3-Mutante zusammen mit einem ISRE-Luciferase Reporter-plasmid mittels Lipofectamin™ 2000 transient transfiziert. 18-24 h nach Transfektion wurden die Zellen 6 h mit humanem IFN-α stimuliert und anschließend die Luciferase-Aktivität im Luminometer gemessen (Mittelwert aus Doppelbestimmung und eines von drei Experimenten ist dargestellt).

Aus Abbildung 3-24 ist ersichtlich, dass ein geringer Unterschied zwischen dem humanen N-terminal GFP-markierten Wildtyp SOCS1-Protein und der hS1/Del+hS3-Mutante hinsichtlich der Potenz zur Inhibition der IFN-α-Reportergen-Aktivität vorliegt. Dagegen zeigte die 6R/A-

Mutante einen partiellen Verlust in der Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs auf Reportergen-Ebene. Außerdem ist erkennbar, dass in diesem Ansatz der inhibitorische Effekt des JAK/STAT-Signalwegs auf Reportergen-Ebene von der transfizierten Plasmidmenge abhängig ist. Wobei humanes N-terminal GFP-markiertes Wildtyp SOCS1-Protein auch noch bei einer niedrig transfizierten Plasmidmenge eine hohe Potenz zur Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs aufweist.

4 Diskussion

4.1 Abwehr von Mikroorganismen durch das angeborene und das adaptive Immunsystem

Im Laufe der Evolution haben höhere Organismen einen komplexen Abwehrapparat in Form des Immunsystems entwickelt, um eingedrungene Mikroorganismen zu erkennen und zu eliminieren. Hierbei lässt sich funktionell das unspezifisch wirkende und entwicklungsgeschichtlich ältere angeborene Immunsystem vom adaptiven Immunsystem unterscheiden. Letzteres zeichnet sich durch hochspezifische Rezeptoren aus, die auf der Oberfläche von T- und B-Zellen exprimiert werden. T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich, interagieren mit antigenpräsentierenden Zellen und B-Zellen und nehmen regulatorische Aufgaben wahr. B-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort durch Produktion von Antikörpern, die sezerniert werden und durch die Pathogene spezifisch erkannt werden. Das große Repertoire unterschiedlicher Rezeptoren entsteht durch somatische Rekombination der Immunglobulingene und der Gene des T-Zell-Rezeptors während der Entwicklung der unreifen Lymphozyten (Janeway et al. 2005). Durch die Antigenspezifität und die klonale Expansion antigenspezifischer Zellen ermöglicht das adaptive Immunsystem eine sehr effektive Immunantwort, deren Aufbau mehrere Tage in Anspruch nimmt. Ein Charakteristikum der erworbenen Immunität ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Erreger eine stärkere und effektivere Immunantwort ermöglicht (Janeway et al. 2005). Das erworbene Immunsystem arbeitet jedoch nicht unabhängig vom angeborenen Immunsystem. Für fast jeden Schritt einer effizienten adaptiven Immunantwort werden vom angeborenen Immunsystem Signale benötigt. Das angeborene Immunsystem ist in allen vielzelligen Organismen vorhanden. Es erkennt eingedrungene Erreger, stellt eine erste Abwehrfront dar und kontrolliert die Initiation und Art der adaptiven Immunantwort. Dabei werden vom angeborenen Immunsystem über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkannt, die für das Überleben und die Pathogenität der Mikroben essentiell sind (Medzhitov and Janeway 1997). In diesem Zusammenhang spielt die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Takeda et al. 2003), die vor allem auf Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert werden, bei der Erkennung von PAMPs eine entscheidende Rolle.

Die Erkennung von PAMPs über Toll-like Rezeptoren bewirkt in Zellen des angeborenen Immunsystems die Aktivierung eines komplexen Signalwegs, der die Induktion von Effektorfunktionen zur Folge hat (Kopp and Medzhitov 1999). Im Rahmen der Abwehr kann aber auch aufgrund fehlender Spezifität körpereigenes Gewebe geschädigt werden. Ausdruck von direkten, antimikrobiellen Abwehrprozessen sind die Produktion von Sauerstoff- und Stickstoffoxid-Radikalen und die Sekretion antimikrobieller Peptide (Medzhitov 2001). Außerdem verbessern

Toll-like Rezeptoren die proinflammatorische Phagozytose und die intrazelluläre Abtötung von Mikroben (Blander and Medzhitov 2004). Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie z.B. IL-1, -6, -8, -12 und TNF-α spielen in dieser frühen Phase der angeborenen Immunantwort eine entscheidende Rolle. Sie signalisieren und verteilen im Wirtsorganismus Informationen über eine erfolgte Infektion, sind für die Rekrutierung von Effektorzellen zuständig und verstärken die Expression antigenpräsentierender [MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse II] und kostimulierender Moleküle (B7.1, B7.2), was für die Initiierung einer geeigneten adaptiven Immunantwort unerlässlich ist. Hierbei wird diskutiert, dass letzteres indirekt über eine auto-/parakrine IFN-β-Schleife funktioniert (Hoebe et al. 2003b). Schließlich sind Zellen des angeborenen Immunsystems aber auch Effektorzellen des erworbenen Immunsystems. So spielt z.B. die Aktivierung von Makrophagen durch T-Lymphozyten-generiertes IFN-γ eine entscheidende Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Mikroorganismen.
Da beide Systeme von verschiedenen Zellen abhängig sind und nicht ausschließlich in bestimmten Organen lokalisiert sind, ist eine interzelluläre Kommunikation über Zellkontakte und besonders über lösliche Faktoren von größter Wichtigkeit. In diesem Zusammenhang spielen Zytokine und ihre Rezeptoren eine entscheidende Rolle, die eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellen (Dalpke and Heeg 2003).

4.2 Zytokinregulation durch SOCS-Proteine

Zytokine, die an Typ I Rezeptoren binden, spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von verschiedenen Immunzellen. Zusammen mit Interferonen, die mit Typ II Zytokin-Rezeptoren interagieren, haben diese Zytokine eine essentielle Funktion bei der Abwehr von Mikroorganismen. Nach Bindung der Zytokine an den entsprechenden Rezeptor kommt es zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs. Dabei werden Rezeptor-ständige Janus-Kinasen durch Transphosphorylierung aktiviert. Gleichzeitig werden durch die JAK-Proteine Tyrosin-Reste in den Rezeptorketten phosphoryliert. Daran binden präformierte STAT-Dimere aus dem Zytoplasma, die anschließend ebenfalls an Tyrosin-Resten phosphoryliert werden. Diese als Homo- bzw. Heterodimere aktivierten STAT-Moleküle translozieren in den Nukleus, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken. Um eine überschießende Reaktion zu verhindern, muss der JAK/STAT-Signalweg genau reguliert werden. In diesem Zusammenhang wurde mit der Familie der SOCS-Proteine eine Gruppe von induzierbaren, negativ regulatorisch wirkenden Proteinen beschrieben (Starr et al. 1997; Endo et al. 1997; Naka et al. 1997; Yoshimura et al. 1995).

4.2.1 Induktion von SOCS-Proteinen: klassischer Weg

SOCS-Proteine stellen echte intrazelluläre *Feedback*-Inhibitoren dar, da sie erst durch das aktivierende Signal induziert werden. Die Aktivierung erfolgt hierbei über STAT-Faktoren, die an entsprechende Promotor-Elemente in STAT-induzierenden Genen binden. Tatsächlich wurden in den Promotor-Regionen der SOCS-Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS STAT-bindende Elemente gefunden (Endo et al. 1997; Naka et al. 1997). Die Proteine üben dann ihre Funktion am aktivierten Rezeptor aus, indem sie diesen inhibieren und somit eine weitere Signaltransduktion unterbinden. Hierbei interagieren die SOCS-Proteine entweder direkt mit den Janus-Kinasen (SOCS1-, SOCS3-Protein) oder kompetieren mit STAT-Molekülen um die Bindungsstellen am phosphorylierten Rezeptor (SOCS3-, CIS-Protein) (Nicholson et al. 1999; Nicholson et al. 2000; Yasukawa et al. 1999; Sasaki et al. 2000; Bjorbak et al. 2000; Matsumoto et al. 1999).
Die Induzierbarkeit von SOCS-Proteinen durch zahlreiche JAK/STAT-abhängige Zytokine in verschiedenen Zellen und Geweben und ihre Funktion als negativ wirkende Regulatoren von Zytokin-vermittelten Antworten wird in der Literatur ausführlich beschrieben (Abbildung 1-1). Initial wurde angenommen, dass die Induktion und Wirkung der SOCS-Proteine auf den JAK/STAT-Signalweg beschränkt sei.

4.2.2 Induktion von SOCS-Proteinen: alternativer Weg

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS auch durch prototypische TLR-Liganden induziert werden können (Stoiber et al. 1999; Dalpke et al. 2001; Dalpke et al. 2003). Aufgrund der widersprüchlichen Befunde hinsichtlich der Signalwege, die zur Induktion der verschiedenen SOCS-Proteine beitragen, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit Versuche in MyD88-defizienten Mäusen durchgeführt, um einer Beantwortung dieser Problematik näher zu kommen.
Es ist bekannt, dass eine Defizienz des zentralen Adaptermoleküls MyD88 mit fehlender (TLR2, TLR9) oder verminderter (TLR3, TLR4) Induktion von direkten Zielgenen, wie z.B. TNF-α, einhergeht (Kawai et al. 1999; Kaisho et al. 2001). Die vorgelegten Daten zeigen, dass eine LPS- oder Poly(I:C)-Stimulation von peritonealen Makrophagen aus MyD88$^{-/-}$ Mäusen zu keiner Induktion des SOCS3- und CIS-Gens mehr führte, die SOCS1-Induktion dagegen nicht beeinflusste. Nach Stimulation mit CpG-DNA und LTA war diese jedoch komplett inhibiert. Diese Daten lassen sich damit erklären, dass TLR2- und TLR9-Signale komplett von MyD88 abhängig sind (Toshchakov et al. 2002). Dagegen spielen im TLR3- und TLR4-Signalweg noch weitere Adaptermoleküle eine Rolle. In diesem Zusammenhang wäre TRIF/TICAM-1 zu nennen, das sowohl im TLR4- als auch im TLR3-Signalweg als Adaptermolekül wirken kann. Dabei wird allerdings ein anderer Signalweg aktiviert, bei dem Typ-I-Interferone (IFN-β) nach Sekretion über den JAK/STAT-Signalweg STAT1/2-abhängige Gene aktivieren können. Die Induktion des

SOCS1-Gens erfolgt abhängig vom TRIF-Signalweg, da in MyD88$^{-/-}$ Mäusen nach TLR3- und TLR4-Stimulation noch eine deutliche (vergleichbar mit der Induktion in Wildtyp-Mäusen) bzw. eine leicht abgeschwächte SOCS1-Induktion vorhanden war.

Interessanterweise konnte hier in Peritonealmakrophagen gezeigt werden, dass, neben Aktivierung des TLR4- und TLR3-Signalwegs, die Stimulation von TLR2 und TLR9 mit LTA und Pam_3CSK_4 bzw. CpG-ODN auch zur Induktion von IFN-β und dem IFN-β-abhängigen Gen IP-10 führte, obwohl diese beiden Signalwege ausschließlich von MyD88 abhängig sind. Auch die Gruppe um Akira konnte beobachten, dass, ähnlich wie nach LPS-Stimulation, auch die Aktivierung des TLR9-Signalwegs zur Expression von IFN-β, IFN-β-abhängigen Genen sowie zur Hochregulation von CD40 führte (Hoshino et al. 2002). Die Daten zur TLR2-vermittelten Induktion von IFN-β stehen allerdings im Kontrast zu früheren Ergebnissen. Toshchakov et al. zeigten ebenfalls in Peritonealmakrophagen, dass nur TLR4 aber nicht TLR2 in der Lage war, IFN-β-vermittelte STAT1-Aktivierung zu induzieren (Toshchakov et al. 2002). Allerdings konnte hier deutlich gezeigt werden, dass TLR2-Aktivierung zur Induktion von IFN-β führte. Die verwendete Liptoteichonsäure war hoch aufgereinigt und als strikt TLR2-abhängig charakterisiert worden (Lehner et al. 2001).

Es blieb die Frage zu klären, ob die Induktion des SOCS1-Gens direkt erfolgt oder über einen IFN-β-abhängigen, auto-/parakrinen Signalweg. Letzteres würde mit den Ergebnissen von Crespo et al. übereinstimmen (Crespo et al. 2000). Die Gruppe schlug vor, dass LPS indirekt über die Induktion eines auto-/parakrin wirkenden Faktors, z.B. IFN-α/β, zur Expression des SOCS1-Proteins fähig ist. Diese Aussage wurde getroffen aufgrund von Neutralisationsexperimenten, in denen LPS-induzierte IFN-α/β-Produktion durch entsprechende Antikörper zu einer partiellen Inhibition der SOCS1-Induktion führte (Crespo et al. 2000). Hier konnte mit Hilfe von generierten Makrophagen aus LPS-responsiven C3H/HeN-Mäusen und LPS-nicht-responsiven C3H/HeJ-Mäusen in einem *transwell*-System gezeigt werden, dass nach LPS-Stimulation die Induktion des SOCS1-Gens direkt erfolgt. In diesem Versuchsansatz konnte keine Induktion des SOCS1-Gens in den aus LPS-nicht-responsiven C3H/HeJ-Mäusen generierten Makrophagen nachgewiesen werden. Somit konnte der Einfluss eines auto-/parakrin wirkenden Faktors, wie z.B. IFN-β, ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis konnte mit aus Typ I Interferon-Rezeptor-defizienten Mäusen (IFNAR-I$^{-/-}$) generierten Makrophagen bestätigt werden. In diesen Zellen konnte nach LPS-, LTA- und CpG-Stimulation das SOCS1-Gen noch induziert werden. Im Vergleich zu den Wildtyp-Makrophagen war zwar die Induktion marginal reduziert, aber im Vergleich zu den unstimulierten Zellen deutlich nachweisbar (Baetz et al. 2004).

SOCS3-mRNA konnte nach Stimulation mit allen genannten TLR-Liganden in MyD88-defizienten Zellen nicht mehr induziert werden. Dies würde für eine MyD88-abhängige Induktion des SOCS3-Gens sprechen. Nach TLR3-Stimulation (ausschließlich TRIF-abhängig) über Poly(I:C) konnte

SOCS3-mRNA nachgewiesen werden. Zwei weiteren Arbeitsgruppen war es auch möglich, eine direkte Induktion des SOCS1-Gens nach Stimulation mit LPS zu zeigen (Nakagawa et al. 2002; Kinjyo et al. 2002). Dazu stimulierten Nakagawa et al. RAW264.7-Makrophagen mit LPS für verschiedene Zeiten und unter Zugabe von Cycloheximid (Translationshemmer). Anschließend konnte mittels quantitativer RT-PCR eine Induktion der SOCS1-mRNA bereits nach einer Stunde bestimmt werden. Auch CpG-DNA via Stimulation von TLR9 war in der Lage, die Gene SOCS1 und SOCS3 auf direktem Weg zu induzieren (Dalpke et al. 2001). Diese Beobachtungen stimmten mit den Daten von Bode et al. überein. Die Gruppe konnte zeigen, dass LPS und TNF-α die Expression von SOCS3-mRNA direkt induzieren können. Hierbei scheint die MAP-Kinase p38 in die Induktion des SOCS3-Gens, vor allem nach TNF-α-Stimulation, mit involviert zu sein. Das SOCS3-Protein inhibierte nach TNF-α-Stimulation die IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung in Makrophagen (Bode et al. 1999). Die Arbeitsgruppen von Stoiber und Dalpke konnten diese Daten bestätigen. Sie zeigten, dass nach LPS-Stimulation eine Cycloheximid-Behandlung die SOCS3-Induktion nicht beeinflusste (Stoiber et al. 1999; Dalpke et al. 2003). Neben TNF-α konnte auch IL-1β das SOCS3-Protein in Leberzellen induzieren und dadurch Wachstumssignale während einer Entzündung, Sepsis oder Infektion in der Leber inhibieren (Boisclair et al. 2000). Auch eine direkte Induktion des MAPK-Signalwegs über PMA (*phorbol myristate acetate*) konnte eine Expression des SOCS3-Proteins vermitteln (Bode et al. 2001). Weiterhin konnten Stoiber et al. berichten, dass es nach LPS-Stimulation in Bac1.2F5-Makrophagen zu einer Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs durch reduzierte STAT1-Aktivierung kommt. Auch hier konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen SOCS3-Induktion und Inhibition des IFN-γ-Signalwegs beobachtet werden. Die Induktion des SOCS3-Proteins war direkt und unabhängig von einer intermediären Proteinsynthese. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Befunden konnte eine Induktion des SOCS1- und CIS-Gens in den von Stoiber untersuchten Zellen nicht beobachtet werden (Stoiber et al. 1999). Hierbei könnten zellspezifische Unterschiede eine Rolle spielen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Stimulation mit dem grampositiven Bakterium *Listeria monocytogenes*. Während eine kurze Behandlung mit *L. monocytogenes* die STAT1-Aktivität über p38-abhängige S727-Phosphorylierung erhöhte, bewirkte eine verlängerte Inkubation mit dem Keim eine SOCS3-vermittelte Inhibition der STAT1 Y701-Phosphorylierung. Im Gegensatz zur Stimulation mit LPS war die SOCS3-Synthese nach Stimulation mit *L. monocytogenes* jedoch auch von einer intermediären Proteinsynthese eines noch unbekannten sezernierten Zytokins abhängig. Dabei konnte eine Rolle von IL-10, das auch das SOCS3-Protein induzieren kann, und von Typ I und Typ II Interferonen ausgeschlossen werden (Stoiber et al. 2001). Anscheinend spielen bei der Stimulation mit ganzen Keimen noch sekundäre Signalwege eine Rolle.

4.2.3 Wirkung der TLR-induzierten SOCS-Proteine

Die inhibitorische Wirkung der SOCS-Proteine im JAK/STAT-Signalweg kommt zustande durch Inhibition der Janus-Kinasen-Aktivität oder durch Inhibition der Bindung von STAT-Molekülen an die zytoplasmatische Domäne des phosphorylierten Rezeptors. Da der JAK/STAT-Signalweg von verschiedenen Zytokinen genutzt wird, beschränkt sich die Wirkung der SOCS-Proteine nicht nur auf den induzierenden Signalweg, sondern inhibiert auch andere JAK/STAT-abhängige Zytokin-Signalwege (Dalpke and Heeg 2002).

Neuere Befunde weisen jedoch daraufhin, dass SOCS-Proteine auch JAK/STAT-unabhängige Signalwege beeinflussen können. Es konnte von zwei Gruppen gezeigt werden, dass das SOCS1-Protein eine Rolle für die LPS-Sensitivität *in vivo* spielt und an der sogenannten LPS-Toleranz beteiligt ist (Kinjyo et al. 2002; Nakagawa et al. 2002). Allerdings konnten nur Nakagawa et al. eine schwache Interaktion des SOCS1-Proteins mit IRAK1 nachweisen.

Um allgemein den Einfluss von SOCS-Proteinen auf den TLR- sowie auf den JAK/STAT-Signalweg zu untersuchen, wurden stabile SOCS-überexprimierende RAW264.7-Makrophagen (SOCS1, SOCS2, SOCS3, CIS) mit LPS bzw. CpG-DNA stimuliert. Anschließend wurde die Induktion der TNF-α- und IP-10-mRNA sowie im Überstand die Sekretion beider Proteine bestimmt (Baetz et al. 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene nach LPS- oder CpG-ODN-Stimulation die Induktion des direkten TLR-abhängigen Gens TNF-α durch die verschiedenen SOCS-Proteine beeinflusst wurde. Allerdings war die Induktion des IFN-β-abhängigen Gens IP-10 auf mRNA- und Protein-Ebene nach LPS- und CpG-Stimulation in den SOCS1-überexprimierenden Makrophagen signifikant erniedrigt. Die Wirkung der Proteine SOCS3 und CIS war nach LPS- und CpG-Stimulation weniger effektiv, aber dennoch vorhanden. Außerdem konnte mittels Western Blot Analyse gezeigt werden, dass weitere TLR-abhängige Signalmoleküle wie die MAP-Kinasen und NFκB in diesen SOCS-überexprimierenden Zellen nach TLR-Stimulation ebenfalls nicht beeinflusst waren. Dagegen war die STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung als Ausdruck von IFN-β-Wirkung durch einzelne SOCS-Proteine inhibiert. Dabei führte eine SOCS1-, SOCS3- und CIS-Überexpression zu einer reduzierten TLR-vermittelten STAT1-Phosphorylierung, wobei jedoch die STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung nach LPS-Stimulation in den SOCS3-transfizierten Zellen nur inkomplett inhibiert wurde (Baetz et al. 2004).

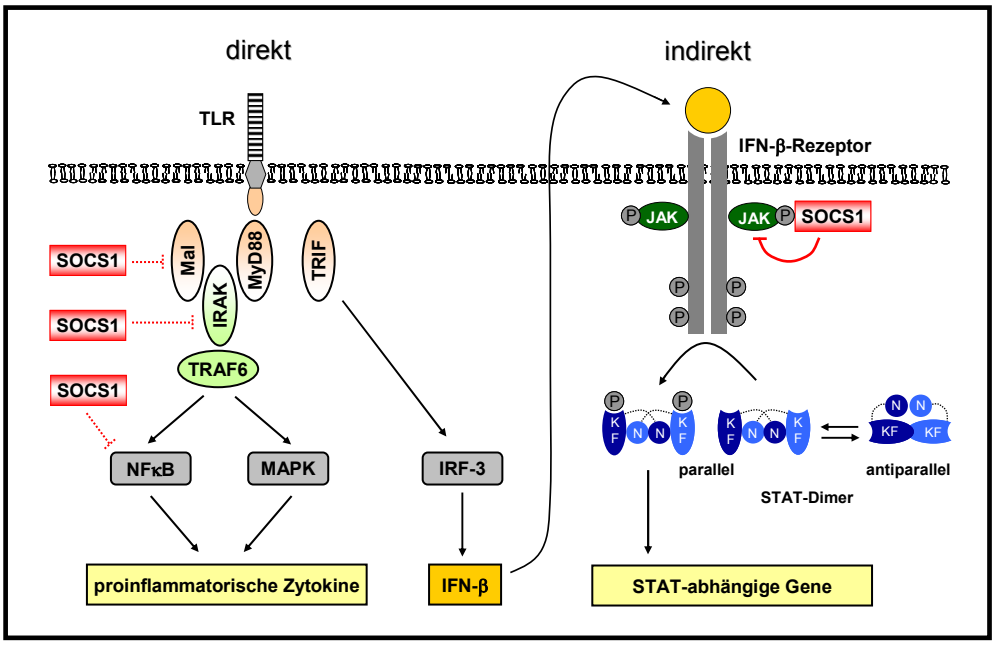

Abbildung 4-1: Rolle des SOCS1-Proteins im TLR-Signalweg
Das nach TLR-Stimulation direkt induzierte SOCS1-Protein übt seine inhibitorische Wirkung im Wesentlichen auf den indirekten, IFN-β-abhängigen Signalweg durch Inhibition der Janus-Kinase aus. Experimentelle Daten deuten jetzt darauf hin, dass das SOCS1-Protein an der Regulation von Mal, IRAK und NFκB beteiligt sein könnte.

Anhand dieser Daten lässt sich ein Konzept entwickeln, das die differente Wirkung vor allem des SOCS1-Proteins auf direkte versus indirekte (IFN-β-abhängige) Zielgene des TLR-Signalwegs betrachtet (Abbildung 4-1). Während der direkte TLR-abhängige Signalweg durch das SOCS1-Protein im Wesentlichen unbeeinflusst bleibt, wird der durch TLR-Liganden ausgelöste, indirekte IFN-β-abhängige Signalweg durch das SOCS1-Protein inhibiert. Dieses Konzept konnte durch die Arbeit von Peter Murray bekräftigt werden (Gingras et al. 2004). SOCS1$^{-/-}$ Mäuse reagieren hyperresponsiv auf LPS. Die Gruppe zeigte, dass nach Kreuzung dieser Mäuse mit Tyk2-defizienten Mäusen (IFN-β-abhängige Janus-Kinase) die Hyperresponsivität nicht mehr vorhanden war und konnte somit auch einen Einfluss der IFN-β-Wirkung auf den LPS-Signalweg nachweisen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass der Tyk2-abhängige IFN-β-Signalweg eine Amplifikation des TLR-Signalwegs vermitteln konnte und Tyk2-defiziente Mäuse eine verringerte Sensitivität gegenüber LPS aufwiesen (Thomas et al. 2006; Karaghiosoff et al. 2003). Aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang außerdem gezeigt werden, dass einige direkte TLR-abhängige Gene sensitiv auf IFN-β reagieren (Schroder K et al. 2007). Dies könnte ein Anhaltspunkt für die gegensätzlichen Befunde sein.

Wie bereits erwähnt, berichteten Nakagawa et al. von einer erhöhten LPS-Sensitivität in SOCS1$^{-/-}$ Mäusen (Nakagawa et al. 2002). Dies führten sie auf die fehlende inhibitorische Wirkung des SOCS1-Proteins zurück. Nach Kotransfektion von IRAK1- und SOCS1-Expressionsplasmiden konnte eine schwache Interaktion zwischen den beiden Proteinen mittels Immunpräzipitation

nachgewiesen werden. Zwischenzeitlich gab es weitere Hinweise für eine direkte Wirkung des SOCS1-Proteins im TLR-Signalweg. Dabei spielt das SOCS1-Protein als E3-Ubiquitin-Ligase eine zentrale Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass das SOCS1-Protein zum einen mit dem Adapterprotein Mal und zum anderen mit p65 (Untereinheit von NFκB) interagiert (Mansell et al. 2006; Ryo et al. 2003). Über diese Assoziation wurde das an das SOCS1-Protein gebundene Substrat polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbauweg zugeführt. Dadurch kommt es zu einer Inhibition im TLR-Signalweg. Diese Wirkung des SOCS1-Proteins als E3-Ubiquitin-Ligase wird später noch ausführlicher diskutiert.

Zusammenfassung

Mit den bisherigen Daten konnte gezeigt werden, dass die Induktion der SOCS-Proteine, im Gegensatz zur Wirkung, nicht auf den JAK/STAT-Signalweg beschränkt ist. In diesem Zusammenhang spielt der TLR-Signalweg eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass auch prototypische TLR-Liganden [LTA, LPS, CpG-DNA, Poly(I:C)] zur Induktion von SOCS-Proteinen fähig sind, wobei SOCS3 und CIS direkte, von intermediärer Proteinsynthese unabhängige Zielgene darstellen. Die Induktion ist von MyD88 abhängig. Für die SOCS1-Induktion gibt es in der Literatur noch widersprüchliche Befunde. Hier konnte gezeigt werden, dass neben dem MyD88-abhängigen auch der MyD88-unabhängige, TRIF-abhängige Signalweg eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass in Peritonealmakrophagen nach Stimulation von TLR2, TLR4 und TLR9 die Expression von IFN-β induziert wird. Dieses wird von der Zelle sezerniert und bindet in einem auto-/parakrinen Mechanismus an seinen entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche und aktiviert dadurch den JAK/STAT-Signalweg. Dieser, durch TLR-Liganden induzierte, indirekte Signalweg kann durch das SOCS1-Protein und in geringem Umfang auch von den Proteinen SOCS3 und CIS inhibiert werden. Dies konnte anhand einer reduzierten STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung und IP-10-Induktion in SOCS-überexprimierenden Makrophagen bestimmt werden. Dagegen wurden in diesen Zellen die hier untersuchten direkten TLR-abhängigen Signalmoleküle (MAPK, NFκB) und Zielgene (TNF-α) nicht beeinflusst.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte im Folgenden die räumliche Verteilung der SOCS-Proteine innerhalb der Zelle genauer untersucht werden, um einen näheren Einblick in die Wirkungsweise dieser Proteine zu erhalten.

4.3 Subzelluläre Lokalisation von SOCS-Proteinen

Aufgrund der beschriebenen Funktion der SOCS-Proteine als negative *Feedback*-Inhibitoren im JAK/STAT-Signalweg und aufgrund der eigenen Befunde zur Rolle im TLR-Signalweg sollte weiterhin die physiologische Lokalisation der Proteine SOCS1, SOCS3 und CIS in Zellen untersucht werden. Dazu wurden Fusionsproteine aus dem jeweiligen SOCS-Protein und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) generiert. Nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte in HEK 293 Zellen konnte für die verschiedenen SOCS-Fusionsproteine eine differente Verteilung in der Zelle beobachtet werden.

Die Beurteilung der Lokalisation erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie durch die grüne Autofluoreszenz des GFP-Proteins. Dabei zeigte das GFP-markierte CIS-Protein eine zytoplasmatische Lokalisation, das GFP-SOCS3-Protein war ubiquitär in der Zelle verteilt und für das SOCS1-Fusionsprotein konnte eine nukleäre Lokalisation in der Zelle beobachtet werden. Alle drei SOCS-Proteine waren annähernd gleich groß und die Proteine SOCS1 und SOCS3 wiesen große Homologien zueinander auf (Yasukawa et al. 2000; Alexander 2002). Die prominente Lokalisation für das SOCS1-Protein im Nukleus war überraschend, da davon ausgegangen wird, dass SOCS-Proteine ihre inhibitorische Funktion an Typ I und Typ II Zytokin-Rezeptoren ausüben und dafür im Zytoplasma lokalisiert sein sollen, um nach Expression anschließend an den Rezeptor rekrutiert werden zu können. Die beobachtete Lokalisation für die drei SOCS-Proteine konnte sowohl mit den N- als auch mit den C-terminal GFP-markierten SOCS-Konstrukten nachgewiesen werden. Somit konnte die Position des GFP-Proteins innerhalb der SOCS-Fusionsproteine als möglicher Grund für die unterschiedliche Lokalisation ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte die nukleo-zytoplasmatische Verteilung der einzelnen SOCS-Proteine durch Expression der entsprechenden humanen und murinen SOCS-Plasmide in unterschiedlichen humanen (HEK 293, HeLa) und murinen (NIH/3T3, RAW 264.7) Zelllinien bestätigt werden. Damit konnte auch ein zellspezifischer Effekt sowie die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung in einzelnen Bereichen der humanen und murinen Sequenzen für die differente Expression der SOCS-Fusionsproteine ausgeschlossen werden. Gleichzeitig deuten diese Befunde darauf hin, dass die nukleäre Lokalisation ein allgemeiner Mechanismus ist, der in vielen Zelltypen stattfindet und vielleicht von konservierten Bereichen im SOCS1-Protein abhängig ist. Freies GFP-Protein ist aufgrund seiner Größe von ca. 28 kDa ubiquitär in der Zelle verteilt (Ketteler et al. 2003; Spangenburg 2005). Es kann den Kernporenkomplex, der sich in der Kernmembran befindet, durch Diffusion ungehindert passieren. Die Grenze für den bidirektionalen Austausch von Makromolekülen zwischen Nukleus und Zytoplasma liegt bei etwa 40 kDa bzw. einem Durchmesser von ca. 9 nm (Paine et al. 1975; Keminer and Peters 1999). Humanes GFP-markiertes SOCS1- (51,2 kDa), SOCS3- (52,4 kDa) und CIS-Protein (56 kDa) können aufgrund ihrer Größe

nicht durch freie Diffusion in den Nukleus gelangen. Somit muss ein aktiver Transportprozess für die Translokalisation des SOCS1-Proteins in den Zellkern existieren.
Im Western Blot konnte mittels eines Antikörpers, der gegen das GFP-Protein gerichtet war, gezeigt werden, dass die SOCS-Fusionsproteine nach Transfektion der jeweiligen Plasmide in HEK 293 Zellen nicht gespalten oder degradiert werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass freies GFP-Protein die Lokalisation der einzelnen SOCS-Fusionsproteine verfälschen könnte. Des Weiteren wurde die Lokalisation der SOCS-Proteine auch noch über andere Nachweisepitope detektiert. Dazu wurde ein flag-markiertes SOCS1- und SOCS3-Expressionsplasmid sowie ein myc-markiertes CIS-Plasmid transient in HEK 293 Zellen transfiziert und mittels direkter Immunfluoreszenz über einen FITC-markierten flag- bzw. myc-Antikörper nachgewiesen. Auch hierbei konnte das CIS-Protein im Zytoplasma detektiert werden, das SOCS3-Protein war homogen in der Zelle verteilt und das SOCS1-Protein zeigte wieder eine prominente nukleäre Lokalisation.

In der Literatur wurde auch von anderen Arbeitsgruppen zum Teil die gleiche Lokalisation für die einzelnen SOCS-Proteine als Zufallsbefunde gezeigt. Es wurde zum Beispiel von Vuong et al. eine Kolokalisation des SOCS1-Proteins mit dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*micrcotubule-organizing center*, MTOC) und dem assoziierten 20S-Proteasom in Form eines perinukleären Punktes im Zytoplasma beschrieben. Beim MTOC, auch als Zentrosom bezeichnet, handelt es sich um eine Struktur, die im Zytoplasma lokalisiert ist und eine wichtige Rolle bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts spielt. Ein genauerer Blick in die veröffentlichten Daten zeigte allerdings auch eine prominente SOCS1-Expression im Nukleus. Allerdings wurde auf diese nukleäre Lokalisation nicht weiter eingegangen (Vuong et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte zum Teil auch in einigen Zellen eine ähnliche SOCS1-Expression im Zytoplasma in Form eines stark leuchtenden Punktes nachgewiesen werden. Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte allerdings keine Kolokalisation von in HEK 293 Zellen transient transfizierten GFP-markierten SOCS1-Protein und der α-Untereinheit des endogenen 20S-Proteasoms nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die prominente Expression beschränkte sich deutlich auf den Zellkern. Des Weiteren konnten Ketteler et al. zeigen, dass nach Transfektion von einem GFP-markierten CIS- bzw. SOCS3-Plasmid in die retrovirale Verpackungszelllinie Phoenix-eco das CIS-Protein im Zytoplasma und das SOCS3-Protein homogen in der ganzen Zelle verteilt exprimiert werden (Ketteler et al. 2003). Die gleiche Beobachtung für ein GFP- bzw. flag-markiertes SOCS3-Expressionsplasmid konnte auch nach transienter Transfektion einer differenzierten Myoblasten-Zelllinie, einer humanen Neuroblastom-Zelllinie bzw. von COS-Zellen, sowie nach Transduktion des entsprechenden Plasmid-tragenden Viruses in primäre sensorische Neurone aus dem Hinterwurzelganglion nachgewiesen werden (Spangenburg 2005; Yadav et al. 2005; Emanuelli et al. 2000; Miao et al. 2006). Auch für GFP-markiertes CIS-Protein konnte die zytoplasmatische Lokalisation in TIDA- (tuberoinfundibular dopaminergen) Neuronen bzw. in einer Leberzelllinie von weiteren

Arbeitsgruppen gezeigt werden (Anderson et al. 2006; Ram and Waxman 2000). Außerdem konnten Ben-Yair et al. auch eine nukleäre Lokalisation von YFP- bzw. CFP-markiertem SOCS1-Protein in transfizierten HEK 293 Zellen beobachten. Dagegen zeigte entsprechend markiertes SOCS2-, SOCS3- oder SOCS6-Protein eine gleichmäßige Verteilung in der Zelle, wobei beim SOCS3- und SOCS6-Protein die Fluoreszenz sich mehr im Zellkern konzentrierte und beim SOCS2-Protein mehr im Zytoplasma angereichert war. Allerdings konnte für die nukleäre Lokalisation vom SOCS1-Protein keine physiologische Rolle identifiziert werden (Ben-Yair et al. 2002). Auch die Gruppe von Yoshimura konnte eine nukleäre Lokalisation des SOCS1-Proteins nach transienter Transfektion eines myc-markierten SOCS1-Plasmids in HeLa-Zellen detektieren (Kamio et al. 2004). Anhand dieser Daten ist ersichtlich, dass die Lokalisation der nachgewiesenen SOCS-Proteine weder von der Zelllinie abhängig ist, in dem die Proteine exprimiert werden, noch vom Nachweisepitop.
Zusammenfassend kann hierfür gesagt werden, dass Hinweise aus der Literatur die vorliegenden fluoreszenztechnischen Daten bestätigen, dass das CIS-Protein im Zytoplasma vorliegt, das SOCS3-Protein ubiquitär in der Zelle verteilt ist und das SOCS1-Protein prominent im Zellkern exprimiert wird.

Diese fluoreszenzmikroskopischen Daten konnten zum anderen mittels Zellfraktionierung bestätigt werden. Dazu wurden zum einen HEK 293 Zellen mit dem humanen GFP-markierten SOCS1-, SOCS3- und CIS-Plasmid transient transfiziert bzw. RAW 264.7 Makrophagen mit IFN-γ zur Induktion des endogenen SOCS1-Proteins stimuliert. Anschließend wurde aus den Zellen sowohl die zytoplasmatische als auch die nukleäre Fraktion aufgereinigt. In den transfizierten HEK 293 Zellen konnte mittels eines Antikörpers, der gegen das GFP-Protein gerichtet war, das CIS-Protein nur in den zytoplasmatischen Extrakten und das SOCS3-Protein in beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Das SOCS1-Protein wurde zwar auch in beiden Fraktionen detektiert, allerdings war der Expressionsnachweis in der nukleären Fraktion stärker vorhanden. Nach Induktion der endogenen SOCS1-Expression durch IFN-γ-Stimulation von RAW 264.7 Zellen konnte das SOCS1-Protein ebenfalls in beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Über den Nachweis eines spezifischen zellulären (GAPDH) und nukleären (Lamin A/C) Markers, jeweils in beiden Fraktionen, wurde die Reinheit der Extrakte bestimmt. Auf den ersten Blick würden die Ergebnisse für das SOCS1-Protein nicht mit den fluoreszenztechnischen Daten korrelieren, da sich hier die Expression des GFP-markierten SOCS1-Proteins deutlich auf den Zellkern beschränkte. Nach Überbelichtung konnte allerdings gezeigt werden, dass auch eine schwache GFP-Fluoreszenz des humanen SOCS1-Fusionsproteins im Zytoplasma vorhanden war, allerdings die prominente Expression sich ausschließlich auf den Zellkern beschränkte. Der Nachweis des endogenen SOCS1-Proteins mittels Zellfraktionierung war sehr schwach vorhanden, was darauf zurückzuführen ist, dass das SOCS1-Protein zum einen nach Stimulation nur schwach exprimiert wird

und zum anderen nur eine kurze Halbwertszeit aufweist (Starr et al. 1997; Dalpke et al. 2003; Larsen and Ropke 2002). Dennoch konnte auch hier gezeigt werden, dass das SOCS1-Protein auch im Nukleus exprimiert wurde. Dieses Ergebnis konnte von Maine et al. bestätigt werden. Die Gruppe konnte sowohl in den zytoplasmatischen als auch in den nukleären Extrakten das SOCS1-Protein mittels Western Blot Analyse detektieren (Maine et al. 2007). Die Zellfraktionierungsdaten für das SOCS3- und CIS-Protein stimmten mit den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen überein.

4.4 Identifizierung eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) im SOCS1-Protein

Die Kompartimentierung der Zelle in Membran-umhüllte Organellen führt zum Entstehen von Reaktionsräumen, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Zusammensetzung und ihrer zellbiologischen Funktionen unterscheiden. Topogene Sequenzen in karyophilen Proteinen gewährleisten deren kontrollierten, aktiven Import (*nuclear localization signal*, NLS) bzw. Export (*nuclear export signal*, NES) durch die Kernporenkomplexe der Kernmembran. Kernlokalisations-signale enthalten ein oder mehrere Cluster von basischen Aminosäuren (Dingwall and Laskey 1991). Letztere sind durch eine *Spacer*-Region variabler Länge und Aminosäurezusammensetzung voneinander getrennt. Die klassische NLS in Form eines einzelnen Clusters wurde als erstes beim großen T-Antigen des Simian Virus (SV40 T-Antigen; PKKKRKV) bzw. als zweigeteiltes NLS-Motiv im Kernprotein Nukleoplasmin, welches in Oozyten und Embryos von *Xenopus* vorkommt (KRPAAIKKAGQAKKKK), identifiziert (Dingwall and Laskey 1991). Diese basischen NLS-Motive interagieren mit dem zytosolischen Rezeptor Importin, einem Heterodimer aus einer α- und einer β-Untereinheit (Gorlich and Mattaj 1996). Importin-α enthält eine NLS-Bindestelle und Importin-β ist verantwortlich für die Bindung des Importin-Substrat-Komplexes an die zyto-plasmatische Seite des Kernporenkomplexes und die nachfolgende Translokation des Komplexes durch den Kernporenkomplex. Bisherige Studien weisen darauf hin, dass einige Importsubstrate bevorzugt an bestimmte Importin-α-Isoformen binden (Kohler et al. 1999). So interagieren zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 als Homo- bzw. Heterodimere bevorzugt mit Importin-α5 (Fagerlund et al. 2002), während NFκB präferenziell an das Importin-α3 und Importin-α4 bindet (Fagerlund et al. 2005).

Aufgrund der vorliegenden Daten, dass das SOCS1-Protein im Nukleus lokalisiert ist, nachge-wiesen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Zellfraktionierung, wurde nach einem eventuell vorhandenen nukleären Lokalisationssignal (NLS) gesucht, welches die Translokation des SOCS1-Proteins aus dem Zytoplasma in den Nukleus bedingt. Dazu wurde sowohl die humane als auch die murine SOCS1-Proteinsequenz mit dem Programm predictNLS analysiert (Cokol et al. 2000). Das Programm gleicht die entsprechende Sequenz mit experimentell verifizierten oder mit durch

in silico Mutagenese erhaltenen potenziellen nukleären Lokalisationssignalen ab. In Folge dessen konnte dieses Programm eine putative NLS-Sequenz zwischen der SH2-Domäne und der SOCS-Box des murinen und humanen SOCS1-Proteins identifizieren (RMLGAPLRQRR). Hierbei handelte es sich um das NLS-Motiv: R[MNQ]x{4,8}[MNQ]RR. Dieses wurde auch in 26 weiteren Proteinen, bei denen es sich ausschließlich um nukleäre Proteine handelte, als Kernlokalisations-signal vorhergesagt. Außerdem wurde diese Sequenz nicht in bekannten zytosolischen Proteinen gefunden. Da sich unmittelbar vor und nach der vorhergesagten NLS-Sequenz noch jeweils ein Arginin-Rest befand und es bekannt ist, dass basische Aminosäuren für die Bindung an Importin eine wichtige Rolle spielen (Conti et al. 1998), wurde die vorhergesagte NLS auf folgende Sequenz erweitert: RRMLGAPLRQRRVR. Es ähnelt einem zweigeteilten NLS-Motiv (Boulikas 1993) bestehend aus zwei basischen Regionen, die durch Arginin-Reste am N- und C-Terminus der NLS bestimmt werden (RR und RQRRVR) und einer *Spacer*-Region aus sechs Aminosäuren. Ein Sequenzvergleich mit veröffentlichten Proteindaten für das SOCS1-Protein aus verschiedenen Spezies zeigte, dass dieses nukleäre Lokalisationssignal evolutionär konserviert war, allerdings nicht im SOCS3- oder im CIS-Protein identifiziert werden konnte.

4.5 Mutationsanalyse der putativen NLS im SOCS1-Protein

Zur genaueren Charakterisierung der funktionellen Bedeutung des putativen nukleären Lokalisationssignals im SOCS1-Protein wurde eine umfangreiche Mutationsanalyse durchgeführt (Abbildung 4-2). Es ist bekannt, dass basische Aminosäuren innerhalb einer NLS für die Bindung an Importin eine wichtige Rolle spielen (Conti et al. 1998). Deshalb war es von Interesse, die putative NLS-Sequenz im Bereich der Arginin-Reste (R) zu mutieren. Dazu wurde als erstes im humanen GFP-markierten SOCS1-Plasmid eine steigende Anzahl an Arginin-Resten durch Alanin-Reste ersetzt (R/A), so dass es zu einer Akkumulation von Alanin-Resten innerhalb der NLS kam. Es wurden die Mutanten 1R/A bis 6R/A generiert und nach transienter Transfektion in HEK 293 Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Es war erkennbar, dass sich das nukleo-zytoplasmatische Expressionsmuster dieser humanen N-terminal GFP-markierten SOCS1-Mutanten mit steigender Anzahl an R/A-Mutationen invertierte. Während die 1 R/A-Mutante (einzelne Mutation in der zweiten Region der putativen NLS: RQRRVR) noch eine komplette nukleäre Expression zeigte, es bei der 3 R/A-Mutante (drei R/A-Mutationen in der zweiten Region: RQRRVR) Zellen gab, bei denen die GFP-Fluoreszenz sowohl homogen in der Zelle als auch vorwiegend im Zytoplasma auftrat, war dagegen die 6 R/A-Mutante (Mutation der beiden basischen Regionen: RR und RQRRVR) überwiegend, wenn nicht sogar ausschließlich, im Zytoplasma lokalisiert.

Taniguchi et al. konnten in der Polo-like Kinase 1 (Plk1), eine Serin-Threonin-Kinase, die für die Regulation von verschiedenen Aspekten bei der Mitose zuständig ist, eine zweigeteilte NLS-

Sequenz (RRRSLLELHKRRK) über ähnliche Mutationsanalysen identifizieren (Taniguchi et al. 2002). Die Gruppe konnte zeigen, dass die Mutationen der einzelnen Regionen (RRR oder KRRK), durch Mutation der basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) nach Alanin (A), nur zu einer geringen Veränderung in der subzellulären Verteilung des Proteins führte. Dagegen bewirkte die gleichzeitige Mutation der beiden basischen Regionen eine zytoplasmatische Lokalisation des Proteins. Auch im Matrix-Protein (M-Protein) des *Newcastle Disease* Virus wurde eine putative NLS identifiziert (KKGKKVTFDKLERKIRR) (Coleman and Peeples 1993). Hierbei handelte es sich ebenfalls um ein zweigeteiltes NLS-Motiv. Anhand von verschiedenen Deletions- und Substitutionsmutanten konnte eine interne Abhängigkeit zwischen den getrennten basischen Regionen der NLS nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde die Rolle der putativen zweigeteilten NLS-Sequenz anhand von trunkierten SOCS1-Mutanten untersucht. Durch Einfügen von Stop-Codons wurde zum einen das putative nukleäre Lokalisationssignal in unterschiedlichem Ausmaß verkürzt und zum anderen ging die Expression der SOCS-Box in diesen Mutanten komplett verloren. Es konnte gezeigt werden, dass die R172X-Mutante, in der das letzte Arginin in der zweiten basischen Region (RQRRVR) der putativen NLS zu einem Stop-Codon mutiert wurde, noch überwiegend im Zellkern lokalisiert war, allerdings auch eine schwache Fluoreszenz im Zytoplasma zeigte. Anschließend wurde Prolin an Position 165, eine Aminosäure in der *Spacer*-Region, durch ein Stop-Codon ersetzt (P165X). Diese Mutante, die nur noch die erste basische Region der putativen NLS-Sequenz enthielt, war ubiquitär in der Zelle verteilt. Außerdem wurde die komplette NLS durch Einfügen eines Stop-Codons an Position 154 deletiert (Y154X). Diese Mutante zeigte einen kompletten Verlust der nukleären Expression. Allerdings zeigte diese Y154X-Mutante eine untypische zytoplasmatische Expression in Form eines stark fluoreszierenden Punktes im Zytoplasma der Zelle. In dieser Mutante wurde ein Tyrosin an Position 154 zu einem Stop-Codon mutiert. Tyrosine stellen oft Phosphorylierungsstellen in Proteinen dar. Im SOCS3-Protein konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von zwei Tyrosin-Resten zur Instabilität des Proteins führt und somit die Halbwertszeit verkürzt (Haan et al. 2003). Deswegen kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Expressionsmuster aufgrund eines nicht korrekt gefalteten Proteins hervorgerufen wurde.

Mit diesen beiden Ansätzen zur genaueren Charakterisierung der putativen NLS im SOCS1-Protein konnte verdeutlicht werden, dass beide basischen Regionen des zweigeteilten NLS-Motivs für den Transport des Proteins aus dem Zytoplasma in den Zellkern erforderlich sind. Die Daten zeigen, dass bei Mutation oder Deletion einer basischen Region bereits ein Effekt in Bezug auf die Lokalisationsänderung des entsprechenden Proteins ersichtlich ist. Diese konnte aber durch eine zusätzliche Mutation in der anderen basischen Region amplifiziert werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Mutationen im Bereich der putativen NLS-Sequenz des bereits oben erwähnten M-Proteins des *Newcastle Disease* Virus oder im Nucleoplasmin von *Xenopus*

getroffen werden (Coleman and Peeples 1993; Robbins et al. 1991). Daraus ist ersichtlich, dass zweigeteilte NLS-Motive nur im Ganzen ihre Funktion komplett entfalten können und für den Transport des jeweiligen Proteins aus dem Zytoplasma in den Zellkern erforderlich sind (Dingwall and Laskey 1991). Zweigeteilte NLS-Motive stellen somit die stärksten Vermittler für die nukleäre Translokation dar (Makkerh et al. 1996).

Als nächstes wurde das putative nukleäre Lokalisationssignal im SOCS1-Fusionsprotein deletiert (hS1/Del). Anhand des dreidimensionalen Modells des SOCS1-Proteins von Giordanetto et al. ist ersichtlich, dass es sich bei diesem Bereich um eine unstrukturierte Region handelt (Giordanetto and Kroemer 2003). Des Weiteren wurde eine Mutante generiert, in der die NLS durch die entsprechenden Aminosäuren aus dem SOCS3-Protein substituiert wurden (hS1/Del+hS3). Nach Transfektion dieser beiden Mutanten in HEK 293 Zellen konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie in beiden Fällen eine deutliche zytoplasmatische Expression detektiert werden. Dieses zytoplasmatische Expressionsmuster zeigte Ähnlichkeiten zur 6R/A-Mutante, in der alle basischen Aminosäuren der zweigeteilten NLS-Sequenz durch Alanin substituiert wurden.

Eine funktionelle NLS wird unter anderem auch über ihre Fähigkeit charakterisiert, dass sie ein normalerweise zytoplasmatisches Protein nach Fusion in den Nukleus transferieren kann (Roberts et al. 1987). Allerdings konnten Roberts et al. zeigen, dass bei diesem Versuchsansatz die Funktionalität der putativen NLS von der Position, in der die NLS ins zytoplasmatische Protein inseriert wird, abhängig ist. Bei manchen generierten Fusionsproteinen scheint die NLS aufgrund der vorliegenden Tertiärstruktur des neu generierten Proteins maskiert und somit für die Erkennung als solche über Importin nicht mehr zugänglich zu sein. Außerdem spielt auch die Wahl des Reporterproteins eine wichtige Rolle. So bewirkte z.B. das nukleäre Lokalisationssignal von GAL4, einem DNA-Bindeprotein von *Saccharomyces cerevisiae*, den Transport der ansonsten im Zytoplasma vorkommenden Invertase in den Nukleus. Allerdings war die NLS nach Fusion an die β-Galactosidase aus *Escherichia coli* nicht in der Lage, das Protein in den Kern zu transferieren (Nelson and Silver 1989).

Es lag auf der Hand, für diesen Versuchsansatz die putative NLS aus dem humanen SOCS1-Protein in das humane CIS-Protein zu inserieren, da aus den bisherigen fluoreszenzmikroskopischen und biochemischen Daten offensichtlich ist, dass dieses Protein im Zytoplasma lokalisiert ist. Da die SOCS-Proteine untereinander große Homologien zueinander aufweisen, wurde zum annähernden Erhalt der Tertiärstruktur die putative NLS des SOCS1-Proteins an die gleiche Position im CIS-Protein und zwar zwischen die SH2-Domäne und die SOCS-Box inseriert (hCIS/NLS). Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung dieser Mutante in HEK 293 Zellen zeigte eine deutliche Lokalisationsänderung. Während humanes Wildtyp GFP-markiertes CIS-Protein im Zytoplasma lokalisiert war, zeigte das humane GFP-CIS/NLS-Fusionsprotein eine klare Expression im Nukleus. Das Expressionsmuster ähnelte dem humanen GFP-markierten SOCS1-Protein.

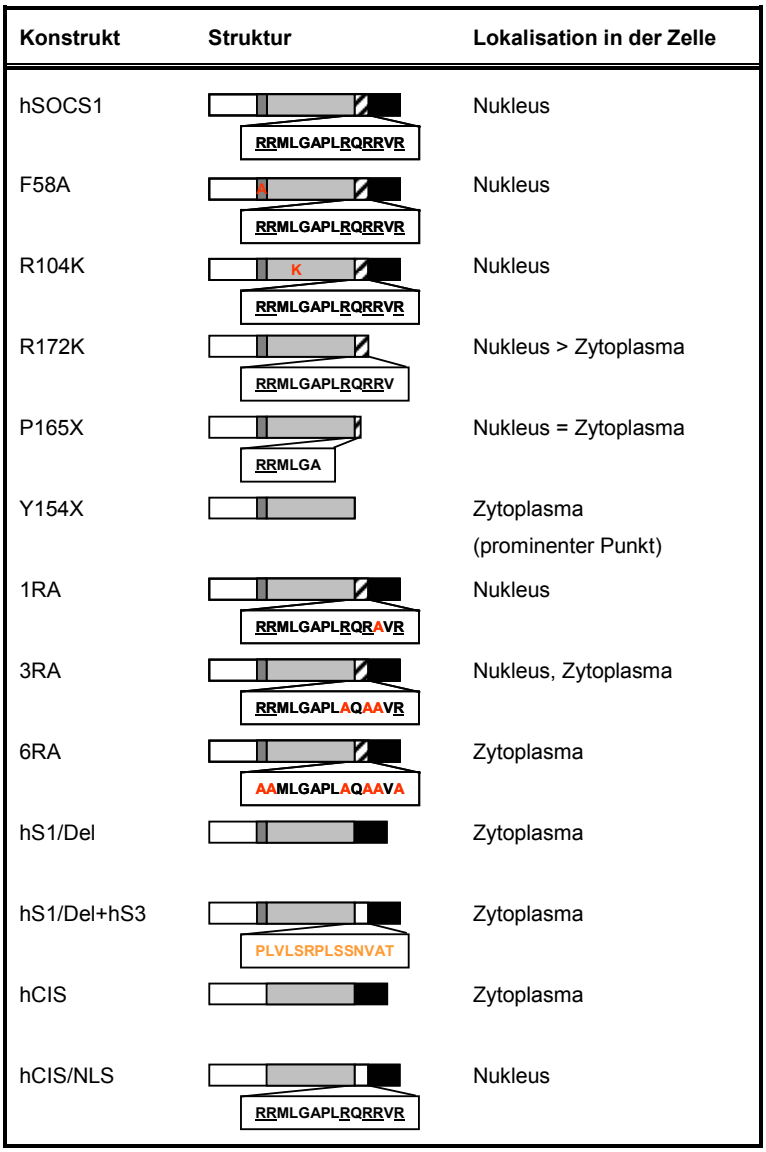

Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der generierten Konstrukte mit der dominanten Lokalisation in der Zelle
Namentliche Auflistung, schematische Darstellung sowie dominante Lokalisation von Wildtyp SOCS1 und CIS sowie den generierten Mutanten (Nomenklatur: vgl. 2.1.7; 3.6.1). Vergrößert dargestellt ist die Aminosäuresequenz des nukleären Lokalisationssignals (NLS) mit den basischen Aminosäuren (unterstrichen) bzw. den eingefügten Mutationen (farbig hervorgehoben). weiß: variabler N-terminaler Bereich, dunkelgrau: KIR-Region, hellgrau: ESS- und SH2-Domäne, gestreift: putative NLS, schwarz: SOCS-Box

4.6 Funktionelle Analyse der humanen SOCS1-Mutanten bezüglich der bekannten Inhibition im JAK/STAT Signalweg

Es stellt sich nun die Frage, wie die nukleäre Lokalisation des SOCS1-Proteins mit der gut beschriebenen inhibitorischen Funktion im JAK/STAT-Signalweg im Zusammenhang steht. Dabei soll das SOCS1-Protein über die SH2-Domäne zusammen mit der *extended* SH2-Subdomäne an phosphorylierte JAK1-Moleküle binden und über die KIR-Domäne, die als Pseudosubstrat fungiert,

deren Kinase-Aktivität inhibieren (Yasukawa et al. 1999). Es wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze durchgeführt. Zum einen wurde der proximale Bereich des JAK/STAT-Signalwegs durch Messung der Tyrosin-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zum anderen wurde im Zellkern auf Transkriptionsebene mit Hilfe eines STAT1/2-abhängigen Luciferase-Reportergens der distale Bereich gemessen.

Beide Versuchsansätze ergaben ein gleichartiges Ergebnis. N-terminal GFP-markiertes Wildtyp SOCS1-Protein (Positivkontrolle) führte zu einer kompletten Inhibition der Tyrosin-Phosphorylierung und der Reportergen-Induktion. Alle Mutanten mit einem deutlich veränderten nukleären versus zytoplasmatischen Expressionsmuster (6R/A, hS1/Del+hS3) waren noch in der Lage, die STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung zu inhibieren. Eine Ausnahme bildete dabei die hS1/Del-Mutante, in der die putative NLS mit ihren 14 Aminosäuren deletiert wurde. Gleichzeitig wurden die entsprechenden Aminosäuren aus dem humanen SOCS3-Protein an diese Stelle inseriert. Diese hS1/Del-Mutante zeigte zwar auch eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation, allerdings war die Mutante nicht in der Lage, weder die STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung noch die Reportergen-Induktion zu inhibieren. Dies würde sich damit erklären lassen, dass durch die 14 Aminosäuren-umfassende Deletion die Tertiärstruktur des Proteins so verändert wird, dass die SH2-Domäne einschließlich der *extended* SH2-Subdomäne und die KIR-Region, die sich unmittelbar vor dem deletierten Bereich befinden und für eine komplette Inhibition erforderlich sind, nicht mehr frei zugänglich sind und somit die Bindung an phosphorylierte JAK1-Moleküle nicht mehr möglich ist. Die Vermutung wird durch die F58A-Mutante, die eine Mutation innerhalb der Bindestelle der KIR-Region aufweist und somit nicht mehr aktiv ist, bekräftigt. Allerdings war die R104K-Mutante, die eine Mutation in der SH2-Domäne trägt, teilweise noch aktiv. In beiden Testsystemen spielte die SOCS-Box keine Rolle, da die R172X-Mutante noch inhibitorische Wirkung zeigte und diese mit dem Wildtyp SOCS1-Protein vergleichbar war. Bei der P165X-Mutante, in der neben der SOCS-Box zusätzlich noch die zweite basische Region der putativen NLS fehlt, war der inhibitorische Effekt leicht abgeschwächt. Bei der 1R/A- und der 3R/A-Mutante, die überwiegend im Nukleus lokalisiert waren, konnte noch eine komplette Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs sowohl auf der Ebene der STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung als auch bei der Messung der Reportergen-Aktivität nachgewiesen werden. Die 6R/A-Mutante, die eine deutliche Verschiebung im Expressionsmuster gegenüber dem Wildtyp SOCS1-Protein und somit eine äußerst prominente zytoplasmatische Expression zeigte, war noch in der Lage, den IFN-Signalweg zu inhibieren, allerdings war der inhibitorische Effekt bei der Messung der STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung deutlicher ausgeprägt als im Luciferase-Reportergen-System.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in einem LIF-, EPO- und IRF-1-induzierten Luciferase-Reporter-System nach transienter Transfektion des Wildtyp SOCS1-Proteins und verschiedenen generierten Mutanten beobachtet werden (Nicholson et al. 1999; Yasukawa et al. 1999; Narazaki et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die SH2-Domäne essentiell ist für die Bindung an die

Kinase-Domäne des JAK2-Proteins (Yasukawa et al. 1999). Eine Mutation der Aminosäure Arginin an Position 105 innerhalb der SH2-Domäne des murinen SOCS1-Proteins nach Lysin (K) (Yasukawa et al. 1999), Glutaminsäure (E) (Yasukawa et al. 1999) oder Glutamat (Q) (Narazaki et al. 1998) führte zu einem inhibitorischen Effekt, allerdings war dieser zum Teil etwas abgeschwächt. Dies lässt sich allgemein damit erklären, dass mehrere Aminosäuren der SH2-Domäne mit Aminosäuren von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen interagieren (Marengere and Pawson 1992; Waksman et al. 1993) und somit eine einzelne Mutation in diesem Bereich nicht zu einem kompletten Funktionsverlust führte. Dies stimmt mit den hier erhobenen Befunden für die R104K-Mutante des humanen SOCS1-Proteins überein. Bindungsstudien identifizierten Tyrosin an Position 1007 (Y1007) in der Aktivierungsdomäne des JAK2-Proteins als spezifisches Pendant für die SOCS1-Interaktion (Yasukawa et al. 1999; Ungureanu et al. 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die 24 Aminosäuren unmittelbar vor der SH2-Domäne wichtig waren für die Bindung als auch für die biologische Funktion des SOCS1-Proteins. Dieser Bereich umfasste die *extended* SH2-Domäne (ESS: I68-G79 im murinen SOCS1-Protein) und die Kinase-inhibitorische Region (KIR: F56-R67 im murinen SOCS1-Protein). Mutanten des SOCS1-Proteins, die die komplette N-terminale Region (Aminosäure 3-75) oder nur den unmittelbaren Bereich vor der SH2-Domäne umfassten (Aminosäure 47-75), waren nicht mehr in der Lage, den LIF- oder IL-6-induzierten Signalweg zu inhibieren (Narazaki et al. 1998; Nicholson et al. 1999).

Genauere Mutationsanalysen des Segmentes F56-G79 im murinen SOCS1-Protein identifizierten spezifische Aminosäuren, die wichtig sind für die JAK2-SOCS1-Assoziation. Der Bereich I68-G79 war für die Bindung an unterschiedliche Peptide, die pY1007 enthielten, erforderlich. Mutationen der Aminosäuren I68 und L75 (ESS) führten zu einer beträchtlichen Reduktion bei der Interaktion des murinen SOCS1-Proteins mit der Kinase-Domäne des JAK2-Proteins und mit pY1007. Dagegen führten Mutationen von F56 und F59 im murinen SOCS1-Protein zur Hemmung der inhibitorischen Wirkung des SOCS1-Proteins im EPO/STAT5-Signalweg (Yasukawa et al. 1999). Dieses Ergebnis konnte auch in dem hier angewandten Testsystem mit der F58A-Mutante des humanen SOCS1-Proteins erzielt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass generierte Mutanten des SOCS1-Proteins, denen die SOCS-Box fehlt, die STAT5-vermittelte Aktivierung der Transkription (Yasukawa et al. 1999), den LIF-vermittelten (Nicholson et al. 1999) sowie den IL-6-vermittelten Signalweg (Narazaki et al. 1998) noch inhibieren können. Diese Beobachtung konnte auch mit der hier generierten R172X-Mutante des humanen SOCS1-Proteins gezeigt werden.

Verallgemeinernd konnte in diesen drei Arbeiten gezeigt werden, dass die SOCS-Box des SOCS1-Proteins für die Inhibition des Zytokin-induzierten Signalwegs im Luciferase-Reporter-System nicht erforderlich war. Die *extended* SH2-Domäne sowie die SH2-Region spielten eine wichtige Rolle für die Bindung an phosphorylierte Janus-Kinasen. Die KIR-Domäne war essentiell für die inhibitorische Wirkung des SOCS1-Proteins.

Allerdings konnten Zhang et al. zeigen, dass *in vivo* die SOCS-Box des SOCS1-Proteins für die Inhibition des IFN-γ-Signalwegs eine partielle Rolle spielt (Zhang et al. 2001). Sie konstruierten Mäuse, in denen sie die SOCS-Box des SOCS1-Gens deletierten. Die Deletion zeigte einen milderen, aber prinzipell ähnlichen Phänotyp wie in SOCS1$^{-/-}$ Mäusen, was auf eine signifikante Rolle der SOCS-Box hinweist. Diese diskrepanten Ergebnisse *in vivo* und *in vitro* ließen sich wie folgt erklären. In einem Überexpressionssystem, wie auch in dieser Arbeit angewandt, ist die direkte Hemmung des JAK/STAT-Signalwegs über die SH2-, *extended* SH2- und KIR-Domäne für eine komplette Inhibition des Signalwegs suffizient, so dass kein weiterer Effekt der SOCS-Box offensichtlich wird. Bei einem physiologischen SOCS1-Expressionsniveau jedoch könnte dieser Mechanismus nur zu einer partiellen Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs führen. Weitere Hemmmechanismen wären deshalb erforderlich. In diesem Zusammenhang könnte die über die SOCS-Box-vermittelte proteasomale Degradierung gebundener Substrate eine wichtige Rolle spielen.

Die eigenen Daten zeigen außerdem, dass eine Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs unabhängig von der Lokalisation der SOCS1-Mutante erfolgte. So war z.B. die hS1/Del+hS3-Mutante, in der die putative NLS durch den entsprechenden Bereich aus dem humanen SOCS3-Protein substituiert wurde, im Zytoplasma lokalisiert, konnte aber, ebenso wie das Wildtyp SOCS1-Protein, den JAK/STAT-Signalweg inhibieren. Es muss noch erwähnt werden, dass mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Überbelichtungsexperimenten eine schwache Fluoreszenz des SOCS1-Proteins auch im Zytoplasma detektiert werden konnte. Das zeigt, dass anscheinend bereits kleine Proteinmengen ausreichend sind, den Zytokin-Signalweg zu inhibieren. Diese Vermutung lässt sich durch die Beobachtungen weiterer Autoren bekräftigen. Es konnte gezeigt werden, dass eine komplette Inhibition von Zytokin-induzierter Gentranskription oder morphologische Veränderungen schon bei einem niedrigen Expressionsniveau, vergleichbar der endogenen SOCS1- und SOCS3-Expression, erfolgt (Favre et al. 1999; Song and Shuai 1998; Suzuki et al. 1998). Interessanterweise war in *Tet on*-induzierbaren HeLa-SOCS1-Zellen die STAT1-Tyrosin-Phosphorylierung nach Stimulation mit Interferon (α oder γ) schon allein in der Abwesenheit von Doxycyclin inhibiert. Unter diesen Bedingungen wird das SOCS1-Protein auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert. Die Induktion der SOCS-Expression durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Doxycyclin veränderte nicht den inhibitorischen Effekt des SOCS1-Proteins auf die Aktivierung von STAT1. Diese Daten deuten darauf hin, dass für den maximalen inhibitorischen Effekt eines SOCS-Proteins schon sehr geringe Proteinmengen *in vivo* ausreichend sind und korrelieren mit den eigenen fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen und erhobenen Daten der Funktionsanalyse im JAK/STAT-Signalweg. Die prominente Expression des Wildtyp SOCS1-Proteins war allerdings im Nukleus lokalisiert und es scheint, dass diese prominente Kernlokalisation und die damit verbundene Funktion unabhängig von der bisher bekannten SOCS1-Funktion im JAK/STAT-Signalweg ist.

Zusammenfassung

Nach Herstellung von GFP-markierten SOCS-Konstrukten und Transfektion in HEK 293 Zellen konnte eine unterschiedliche nukleo-zytoplasmatische Verteilung dieser Proteine in der Zelle beobachtet werden. Dabei zeigte das CIS-Protein eine zytoplasmatische Lokalisation, das SOCS3-Protein war ubiquitär in der Zelle verteilt und für das SOCS1-Protein konnte eine nukleäre Lokalisation beobachtet werden. Diese Lokalisation für das SOCS1-Protein war überraschend, da aufgrund des bisherigen Kenntnisstands davon ausgegangen wurde, dass das SOCS1-Protein den JAK/STAT-Signalweg an den JAK-Proteinen, die sich am Rezeptor befinden, inhibieren sollte. Die gleiche Lokalisation der verschiedenen humanen und murinen GFP-SOCS-Fusionsproteine konnte auch nach Expression in weiteren Zelllinien und über weitere Nachweisepitope beobachtet werden. Ebenso konnte mittels Zellfraktionierung ein Nachweis des endogenen SOCS1-Proteins im Kern erbracht werden. Mit Hilfe einer Sequenzanalyse konnte ein putatives zweigeteiltes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) zwischen der SH2-Domäne und der SOCS-Box des SOCS1-Proteins, allerdings nicht im SOCS3- oder CIS-Protein, identifiziert werden. Anschließend wurde die NLS durch Mutationsanalysen weiter charakterisiert. Die Deletion der NLS, eine Serie von R/A-Punktmutationen sowie die Substitution dieser Region mit der entsprechenden Sequenz aus dem SOCS3-Protein führten zu einem verstärkten zytoplasmatischen Expressionsmuster. Des Weiteren bewirkte der Transfer der NLS aus dem SOCS1-Protein in das normalerweise im Zytoplasma lokalisierte CIS-Protein eine nukleäre Lokalisation. Anschließend wurden die generierten SOCS1-Mutanten hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung im JAK/STAT-Signalweg untersucht. Trotz Unterschieden in der Lokalisation waren diese Mutanten noch in der Lage, wenn zum Teil auch etwas abgeschwächt, die IFN-α-vermittelte STAT1-Aktivierung zu inhibieren. Aufgrund der Ergebnisse scheint es sich um eine neuartige Funktion des SOCS1-Proteins zu handeln, die unabhängig von dem bekannten Effekt der SOCS-Proteine im JAK/STAT-Signalweg erfolgt, im Nukleus stattfindet und von der SOCS-Box abhängig ist.

4.7 Mögliche Funktionen des SOCS1-Proteins im Nukleus

Das SOCS1-Protein wird in unstimulierten Zellen nicht oder nur geringfügig exprimiert. Nach Zytokin-Stimulation wird das Gen schnell induziert und das SOCS1-Expressionsniveau wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Anschließend wird das Protein wieder herunterreguliert. Dabei wird der SOCS-Box eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Der N-terminale Bereich der SOCS-Box ist unter den einzelnen Mitgliedern der SOCS-Familie hoch konserviert. Dies deutet auf eine ähnliche Funktion in jedem Protein hin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die SOCS-Box des SOCS1-Proteins in Überexpressions-systemen für die Inhibition von JAK/STAT-abhängigen Signalwegen nicht erforderlich ist (Zhang et al. 2001; Narazaki et al. 1998; Nicholson et al. 1999; eigene Daten der Mutationsanalyse).

Hierbei scheint die Wirkung der SH2-, *extended* SH2- und KIR-Domäne für eine komplette Inhibition des Signalwegs ausreichend zu sein. Allerdings sieht die Situation *in vivo* anders aus, da Mäuse mit einer Deletion der SOCS-Box im SOCS1-Gen und SOCS1-defiziente Mäuse einen ähnlichen Phänotyp aufweisen (Zhang et al. 2001). Für eine komplette Inhibition spielen, neben dem bereits erwähnten Mechanismus, noch weitere Hemmeffekte eine Rolle, die anscheinend über die SOCS-Box vermittelt werden. Es wurde eine Funktion der SOCS-Box für die inhibitorische Wirkung der SOCS-Proteine vorgeschlagen. SOCS-Proteine interagieren dabei über ihre SOCS-Box mit Elongin C, dass zur Ausbildung eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (ECS: Elongin B/C-Cul-2/Cul-5-SOCS-Box-Protein) führt, an dem die Proteine Elongin B und C, Cullin-2 oder Cullin-5 und das RING-Finger Protein Rbx1 oder Rbx2 beteiligt sind (Kile et al. 2002; Kamura et al. 2004). Letzteres stabilisiert die Interaktion von Cullin mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) (Kamura et al. 1998). Elongin B/C fungiert in diesem Komplex als Adapter, der die SOCS-Proteine über ihre SOCS-Box mit dem Cullin-Rbx-Modul verbindet. Der E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex transferiert in der Anwesenheit des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) und eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) Polyubiquitin-Ketten auf das am SOCS-Protein gebundene Substrat, das letztendlich zu dessen proteasomaler Degradierung führt.
Allerdings ist die genaue Funktion der SOCS-Box noch umstritten und wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird beschrieben, dass die Interaktion mit Elongin C zur Stabilisierung des SOCS1-Proteins führte (Narazaki et al. 1998; Kamura et al. 1998; Hanada et al. 2001), da eine Deletion der SOCS-Box im SOCS1-Protein das Expressionsniveau des SOCS1-Proteins deutlich reduzierte. Dies konnte aber durch Zugabe eines Proteasomen-Inhibitors wieder aufgehoben werden.
Andere Autoren berichten jedoch über eine durch diese Interaktion hervorgerufene Destabilisierung von SOCS-Proteinen (Kamizono et al. 2001; Zhang et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das SOCS3-Protein über die SOCS-Box mit Elongin B und C interagierte und darüber dem proteasomalen Abbauweg zugeführt wurde (Zhang et al. 1999).

In der Literatur konnten weitere Hinweise gefunden werden, dass das SOCS1-Protein im Komplex mit Elongin B/C, Cullin-2 sowie Rbx1 als E3-Ubiquitin-Ligase (ECS^{SOCS1}) (Kamura et al. 2004) wirkt. Es konnte gezeigt werden, dass die an das SOCS1-Protein gebundenen Substrate, wie z.B. JAK2, TEL-JAK2, Vav, IRS-1, IRS-2 und Mal, nach Interaktion des SOCS1-Proteins mit Elongin C an den gebildeten ECS^{SOCS1}-Komplex rekrutiert, ubiquitiniert und letztendlich im Proteasom abgebaut werden (Ungureanu et al. 2002; Kamizono et al. 2001; Frantsve et al. 2001; De Sepulveda et al. 2000; Rui et al. 2002; Mansell et al. 2006).

Des Weiteren wurde eine Rolle des SOCS1-Proteins auch als E3-Ubiquitin-Ligase im NFκB-Signalweg nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die Stabilität von NFκB durch proteasomale Degradierung reguliert wurde. In diesem Zusammenhang wurde mittels Immunpräzipitation eine

Interaktion des SOCS1-Proteins mit der p65-Untereinheit von NFκB nachgewiesen (Ryo et al. 2003). Ähnliches wurde auch von Saccani et al. berichtet (Saccani et al. 2004). Sie konnten zeigen, dass nach Stimulation die Beendigung des NFκB-Signalwegs nicht nur von der Induktion von IκBα, welches NFκB wieder aus dem Kern exportiert, sondern auch durch proteasomale Degradierung bedingt wurde. In diesem Zusammenhang wurde das SOCS1-Protein als mögliche E3-Ubiquitin-Ligase für die NFκB-Regulation vorgeschlagen. Es wurde aber angemerkt, dass die angenommene SOCS1-Expression im Zytoplasma diese Hypothese nicht unterstützen würde (Saccani et al. 2004). Mit den hier erhobenen Daten konnte aber eine nukleäre Expression des SOCS1-Proteins nachgewiesen werden. Dies würde die Hypothese von Saccani et al., dass das SOCS1-Protein als E3-Ubiquitin-Ligase im NFκB-Signalweg wirkt, bekräftigen. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Maine et al. verstärkte diese Arbeitshypothese (Maine et al. 2007). COMMD1 (*copper metabolism gene MURR1 domain-containing protein 1*), ein ubiquitär exprimierter Inhibitor von NFκB, beschleunigte die Ubiquitinierung und Degradierung von NFκB-Untereinheiten durch die Interaktion mit ECS^{SOCS1}. Es konnte gezeigt werden, dass COMMD1 die Interaktion zwischen dem SOCS1-Protein und der NFκB-Untereinheit p65/RelA stabilisierte, dadurch die Ubiquitinierung von p65/RelA förderte und somit die NFκB-vermittelte Transkription im Nukleus inhibierte. Diese Gruppe konnte außerdem mittels Zellfraktionierung und anschließender Western Blot Analyse das SOCS1-Protein sowohl in den zytoplasmatischen als auch in den nukleären Extrakten detektieren. Damit wurden die hier erhobenen biochemischen Daten bestätigt.

Die bereits im ersten Teil dieser Arbeit diskutierte Rolle des SOCS1-Proteins im TLR-vermittelten Signalweg konnte, zusammen mit den Daten von Gingras et al., eine inhibierende Wirkung des SOCS1-Proteins auf direkte TLR-Zielgene (TNF-α-Messung) ausschließen (Baetz et al. 2004; Gingras et al. 2004). Dagegen wurde der nach TLR-Stimulation induzierte indirekte, IFN-β-abhängige Signalweg durch das SOCS1-Protein inhibiert (IP-10-Messung). Allerdings wurde von zwei weiteren Gruppen eine inhibierende Wirkung des SOCS1-Proteins im TLR-vermittelten NFκB-Signalweg beschrieben (Kinjyo et al. 2002; Nakagawa et al. 2002). Sie konnten zeigen, dass das SOCS1-Protein eine Rolle für die LPS-Sensitivität *in vivo* spielt und an der sogenannten LPS-Toleranz beteiligt ist. Es stellt sich nun die Frage, wie diese diskrepanten Ergebnisse zusammenpassen. Ein Grund dafür könnte sein, dass der SOCS1-sensitive, auto-/parakrine IFN-β-abhängige Signalweg einen verstärkenden Effekt auf den TLR-Signalweg ausübt. Dies konnte bereits für die Sekretion von IL-12p70 gezeigt werden (Gautier et al. 2005). Dabei hatte das nach TLR-Stimulation induzierte IFN-β zusammen mit dem NFκB-Signalweg einen synergistischen Effekt und war für eine optimale IL-12p70-Sekretion entscheidend. Des Weiteren könnte die Tatsache, dass einige NFκB-abhängige Gene für eine optimale Induktion nur eine kurze NFκB-

Wirkung benötigen, während für andere Gene eine verlängerte NFκB-Aktivität erforderlich ist (Kuwata et al. 2006; Natoli et al. 2005; Hoffmann and Baltimore 2006), darauf hindeuten, dass die Wirkung des SOCS1-Proteins vielleicht nur eine spezielle Subgruppe von TLR-induzierten, NFκB-abhängigen Genen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion des NFκB-abhängigen Gens TNF-α durch einen Proteasomen-Inhibitor nicht beeinflusst wurde. In diesem Versuchsansatz konnte jedoch eine gesteigerte KC- und IL-6-Induktion nachgewiesen werden (Saccani et al. 2004). In diesem Zusammenhang könnte das SOCS1-Protein als E3-Ubiquitin-Ligase die Stabilität von NFκB regulieren und somit auf Gene, die eine verlängerte NFκB-Aktivität benötigen (KC, IL-6), Einfluss nehmen. Dagegen würden Gene (TNF-α), die nur eine kurze NFκB-Aktivität erfordern, durch das SOCS1-Protein nicht beeinflusst werden. Dies könnte erklären, dass mit den hier erhobenen Daten im ersten Teil der Arbeit kein Einfluss des SOCS1-Proteins auf den direkten TLR-Signalweg nachgewiesen werden konnte, da es sich hier vermutlich um ein TLR-induziertes Zielgen handelt, das zur Aktivierung nur eine kurze NFκB-Wirkung benötigt. Die Bestimmung von TLR-abhängigen Genen, die eine verlängerte NFκB-Aktivierung benötigen, wie z.B. IL-6 oder KC, würden aber vielleicht durch das SOCS1-Protein beeinflusst werden.

Eine weitere mögliche Funktion des SOCS1-Proteins im Nukleus wurde von Kamio et al. beschrieben (Kamio et al. 2004). Die Gruppe zeigte, dass das E7-Protein des humanen Papilloma Virus (HPV) in der Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie HeLa nach IFN-γ-Stimulation degradiert wurde und dadurch die Zellen nicht mehr proliferierten. Sie machten dafür das SOCS1-Protein verantwortlich, das nach IFN-γ-Stimulation induziert wurde und im Nukleus über die SH2-Domäne Phosphotyrosin-unabhängig mit dem E7-Protein interagierte. Auch hier wirkte das SOCS1-Protein als E3-Ubiquitin-Ligase und induzierte SOCS-Box-abhängig die Ubiquitinierung und anschließende Degradierung des E7-Proteins. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass nach Überexpression des SOCS1-Proteins in HeLa-Zellen die E7-vermittelte Proliferation durch Hoch-regulation des Rb- (Retinoblastom-) Expressionsniveau (Tumorsuppressor) unterdrückt wurde. Damit wurde eine Rolle des SOCS1-Proteins als Anti-Onkogen beschrieben.

Anhand der eigenen Daten und den Hinweisen aus der Literatur lässt sich ein Modell entwickeln, das zeigt, dass das SOCS1-Protein neben seiner bisher bekannten Funktion im JAK/STAT-Signalweg noch eine wichtige Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase ausübt. Dieser über die SOCS-Box vermittelte Hemmeffekt findet höchstwahrscheinlich im Kern statt (Abbildung 4-3).
Nach Stimulation der Toll-like Rezeptoren kommt es zur Induktion von direkten und indirekten, IFN-β-abhängigen Zielgenen. Im Rahmen dieser Induktion wird das SOCS1-Gen auf direktem Weg, das heißt ohne den Einfluss von sezernierten Typ I Interferonen, induziert. Das exprimierte SOCS1-Protein bindet über die SH2-Region und die *extended* SH2-Subdomäne an phosphorylierte

Janus-Kinasen und vermittelt über die KIR-Domäne die inhibitorische Wirkung. Somit hemmt das SOCS1-Protein den indirekten IFN-β-vermittelten TLR-Signalweg.

Des Weiteren kommt es über den direkten MyD88-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von NFκB im Zytoplasma. Dieses transloziert in den Nukleus und führt zur Induktion von direkten TLR-abhängigen Zielgenen. Dabei können zwei Klassen von induzierten Genen unterschieden werden. Eine Gruppe von NFκB-abhängigen Genen benötigt für eine optimale Induktion nur eine kurze NFκB-Wirkung (Gene vom transienten NFκB-Typ, z.B. TNF-α), während für andere Gene eine verlängerte NFκB-Aktivität (Gene vom protrahierten NFκB-Typ, z.B. IL-6, KC) erforderlich ist. Es ist wahrscheinlich, dass das SOCS1-Protein als E3-Ubiquitin-Ligase eine inhibitorische Wirkung auf die zuletzt genannte Gruppe von NFκB-abhängigen Genen Einfluss nimmt. Dabei interagiert das SOCS1-Protein mit der NFκB-Untereinheit p65 und rekrutiert über die SOCS-Box Elongin B/C, Cullin-2 und Rbx1. Dieser E3-Ligase-Komplex bewirkt anschließend die Ubiquitinierung des gebundenen p65-Proteins und führt dieses dem proteasomalen Abbauweg zu. Über diesen SOCS-Box-vermittelten Signalweg übt das SOCS1-Protein seine inhibitorische Wirkung auf direkte TLR-Zielgene aus, die eine verlängerte NFκB-Wirkung benötigen.

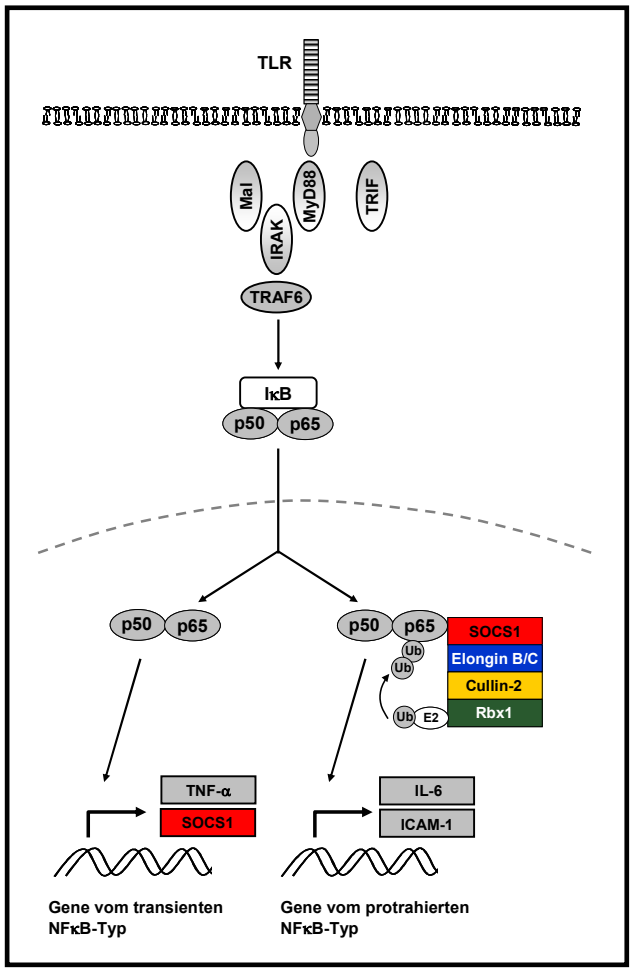

Abbildung 4-3: Funktion des SOCS1-Proteins als E3-Ubiquitin-Ligase
Nach Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLR) kommt es zur Induktion einer Signalkaskade, in deren Verlauf es zur Aktivierung von NFκB im Zytoplasma kommt. Dieses transloziert in den Kern und führt zur Aktivierung von NFκB-abhängigen Genen. Dabei werden zwei Gruppen von induzierten Genen unterschieden. Gene vom transienten NFκB-Typ benötigen zur Induktion nur eine kurze NFκB-Wirkung. Zur optimalen Induktion von Genen vom protrahierten NFκB-Typ ist dagegen eine verlängerte NFκB-Aktivität erforderlich. Im Verlauf dieser Signalkaskade wird das SOCS1-Protein auf direktem Weg induziert. Dieses übt anschließend seine inhibitorische Wirkung auf Gene vom protrahierten NFκB-Typ aus. Dabei bindet es an die p65-Untereinheit im NFκB und rekrutiert über die SOCS-Box Elongin B/C, Cullin-2 sowie Rbx1. Dieser E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex transferiert anschließend in der Anwesenheit des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) und eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) Polyubiquitin-Ketten auf p65, das letztendlich zu dessen proteasomaler Degradierung führt.

4.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Sequenz- und Mutationsanalyse ein zweigeteiltes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) im SOCS1-Protein identifiziert und ausführlich charakterisiert werden. Diese NLS ist für die prominente Kernlokalisation des SOCS1-Proteins verantwortlich. Diese nukleäre Lokalisation scheint ein Hinweis auf eine neuartige Funktion des SOCS1-Proteins zu sein, da die generierten Mutanten trotz unterschiedlicher Lokalisation noch in der Lage waren, die IFN-α-vermittelte STAT1-Aktivierung zu inhibieren.

Es zeichnet sich in der Literatur ab, dass das SOCS1-Protein über die SOCS-Box als E3-Ubiquitin-Ligase wirken kann. Es wurde beschrieben, dass das SOCS1-Protein mit der NFκB-Untereinheit p65 interagieren kann und darüber die proteasomale Degradierung des Proteins vermittelt. Dadurch scheint das SOCS1-Protein einen inhibitorischen Effekt auf TLR-induzierte, NFκB-abhängige Zielgene zu nehmen, die eine verlängerte NFκB-Aktivität benötigen.

Es sollte nun weiter getestet werden, inwieweit diese Hypothese zutrifft und ob diese Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase einen Hinweis für die gesuchte Funktion des SOCS1-Proteins im Nukleus darstellt. Dazu könnte als erstes in den bereits vorliegenden stabilen SOCS-überexprimierenden (SOCS1, SOCS3, CIS) RAW 264.7 Zellen nach Stimulation die Bindungsaktivität des aktivierten Transkriptionsfaktors NFκB mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) bestimmt werden, um nachzuweisen, ob in den stabil transfizierten Zellen ein Unterschied zwischen den verschiedenen SOCS-Proteinen besteht.

Für die folgenden Versuche sollte nukleär exprimiertes Wildtyp SOCS1-Protein im Vergleich zur 6R/A- und hS1/Del+hS3-Mutante (beide im Zytoplasma lokalisiert) verwendet werden, um den Einfluss des jeweiligen SOCS1-Proteins in Bezug auf die Lokalisation zu testen. Nach Transfektion von HEK 293 Zellen mit den verschiedenen SOCS-Konstrukten und Stimulation mit IL-1β könnte mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation von endogenem NFκB im Rahmen einer Kinetik und der Einfluss von den verschiedenen SOCS-Mutanten nachgewiesen werden. Des Weiteren könnte aus SOCS-transfizierten HEK 293 Zellen nach Stimulation und Immunpräzipitation von RelA mit Hilfe eines Ubiquitin-Antikörpers dessen Ubiquitinierung und auch hier der Einfluss der verschiedenen SOCS-Mutanten untersucht werden.

Anschließend sollte noch einmal der Einfluss des SOCS1-Proteins auf den direkten TLR-Signalweg untersucht werden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass das SOCS1-Protein NFκB-abhängige Gene, die eine verlängerte NFκB-Wirkung benötigen, beeinflusst. Dafür sollten in den SOCS-überexprimierenden Zellen weitere Gene untersucht werden, die in diese Gruppe fallen, wie z.B. IL-6, KC, ICAM-1.

Des Weiteren befinden sich C-terminal von der identifizierten NLS zwei weitere Arginin-Reste. Anhand von weiteren Mutationsanalysen soll der Einfluss dieser Aminosäuren in Bezug auf die bisher identifizierte NLS untersucht werden.

5 Literaturverzeichnis

Abbas, A. K. and A. H. Lichtmann (2004). "Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System."

Abbas, A. K., A. H. Lichtmann and J. S. Pober (2000). Cellular and Molecular Immunology.

Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas and H. Wagner (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-68.

Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Alexander, W. S. (2002). "Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(6): 410-6.

Alexander, W. S., R. Starr, J. E. Fenner, C. L. Scott, E. Handman, N. S. Sprigg, J. E. Corbin, A. L. Cornish, R. Darwiche, C. M. Owczarek, T. W. Kay, N. A. Nicola, P. J. Hertzog, D. Metcalf and D. J. Hilton (1999). "SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine." Cell **98**(5): 597-608.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.

Anderson, S. T., J. L. Barclay, K. J. Fanning, D. H. Kusters, M. J. Waters and J. D. Curlewis (2006). "Mechanisms underlying the diminished sensitivity to prolactin negative feedback during lactation: reduced STAT5 signaling and up-regulation of cytokine-inducible SH2 domain-containing protein (CIS) expression in tuberoinfundibular dopaminergic neurons." Endocrinology **147**(3): 1195-202.

Auernhammer, C. J., C. Bousquet and S. Melmed (1999). "Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6964-9.

Azam, M., C. Lee, I. Strehlow and C. Schindler (1997). "Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing." Immunity **6**(6): 691-701.

Baetz, A. (2003). Beeinflussung von Toll-like Rezeptor- (TLR-) Aktivierung durch Suppressor of Cytokine Signaling- (SOCS-) Proteine. Diplomarbeit.

Baetz, A., M. Frey, K. Heeg and A. H. Dalpke (2004). "Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells." J Biol Chem **279**(52): 54708-15.

Ben-Yair, L., R. Slaaby, A. Herman, Y. Cohen, E. Biener, N. Moran, A. Yoshimura, J. Whittaker, P. De Meyts, B. Herman and A. Gertler (2002). "Preparation and expression of biologically active prolactin and growth hormone receptors and suppressor of cytokine signaling proteins 1, 2, 3, and 6 tagged with cyan and yellow fluorescent proteins." Protein Expr Purif **25**(3): 456-64.

Berlato, C., M. A. Cassatella, I. Kinjyo, L. Gatto, A. Yoshimura and F. Bazzoni (2002). "Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation." J Immunol **168**(12): 6404-11.

Bjorbak, C., H. J. Lavery, S. H. Bates, R. K. Olson, S. M. Davis, J. S. Flier and M. G. Myers, Jr. (2000). "SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985." J Biol Chem **275**(51): 40649-57.

Blander, J. M. and R. Medzhitov (2004). "Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors." Science **304**(5673): 1014-8.

Bode, J. G., S. Ludwig, C. A. Freitas, F. Schaper, M. Ruhl, S. Melmed, P. C. Heinrich and D. Haussinger (2001). "The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription." Biol Chem **382**(10): 1447-53.

Bode, J. G., A. Nimmesgern, J. Schmitz, F. Schaper, M. Schmitt, W. Frisch, D. Haussinger, P. C. Heinrich and L. Graeve (1999). "LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages." FEBS Lett **463**(3): 365-70.

Boisclair, Y. R., J. Wang, J. Shi, K. R. Hurst and G. T. Ooi (2000). "Role of the suppressor of cytokine signaling-3 in mediating the inhibitory effects of interleukin-1beta on the growth hormone-dependent transcription of the acid-labile subunit gene in liver cells." J Biol Chem **275**(6): 3841-7.

Boulikas, T. (1993). "Nuclear localization signals (NLS)." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **3**(3): 193-227.

Breeuwer, M. and D. S. Goldfarb (1990). "Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins." Cell **60**(6): 999-1008.

Brender, C., R. Columbus, D. Metcalf, E. Handman, R. Starr, N. Huntington, D. Tarlinton, N. Odum, S. E. Nicholson, N. A. Nicola, D. J. Hilton and W. S. Alexander (2004). "SOCS5 is expressed in primary B and T lymphoid cells but is dispensable for lymphocyte production and function." Mol Cell Biol **24**(13): 6094-103.

Cao, Z., J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama and D. V. Goeddel (1996). "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." Nature **383**(6599): 443-6.

Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh and A. G. Bowie (2006). "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." Nat Immunol **7**(10): 1074-81.

Chen, X. P., J. A. Losman, S. Cowan, E. Donahue, S. Fay, B. Q. Vuong, M. C. Nawijn, D. Capece, V. L. Cohan and P. Rothman (2002). "Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2175-80.

Clemens, M. J. and A. Elia (1997). "The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function." J Interferon Cytokine Res **17**(9): 503-24.

Cohney, S. J., D. Sanden, N. A. Cacalano, A. Yoshimura, A. Mui, T. S. Migone and J. A. Johnston (1999). "SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation." Mol Cell Biol **19**(7): 4980-8.

Cokol, M., R. Nair and B. Rost (2000). "Finding nuclear localization signals." EMBO Rep **1**(5): 411-5.

Coleman, N. A. and M. E. Peeples (1993). "The matrix protein of Newcastle disease virus localizes to the nucleus via a bipartite nuclear localization signal." Virology **195**(2): 596-607.

Conti, E., M. Uy, L. Leighton, G. Blobel and J. Kuriyan (1998). "Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha." Cell **94**(2): 193-204.

Crespo, A., M. B. Filla, S. W. Russell and W. J. Murphy (2000). "Indirect induction of suppressor of cytokine signalling-1 in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide: partial role of autocrine/paracrine interferon-alpha/beta." Biochem J **349**(Pt 1): 99-104.

Croker, B. A., D. L. Krebs, J. G. Zhang, S. Wormald, T. A. Willson, E. G. Stanley, L. Robb, C. J. Greenhalgh, I. Forster, B. E. Clausen, N. A. Nicola, D. Metcalf, D. J. Hilton, A. W. Roberts and W. S. Alexander (2003). "SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo." Nat Immunol **4**(6): 540-5.

Dalpke, A. and K. Heeg (2002). "Signal integration following Toll-like receptor triggering." Crit Rev Immunol **22**(3): 217-50.

Dalpke, A. and K. Heeg (2003). "Suppressors of cytokine signaling proteins in innate and adaptive immune responses." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **51**(2): 91-103.

Dalpke, A. H., S. Eckerle, M. Frey and K. Heeg (2003). "Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling." Eur J Immunol **33**(7): 1776-87.

Dalpke, A. H., S. Opper, S. Zimmermann and K. Heeg (2001). "Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs." J Immunol **166**(12): 7082-9.

De Sepulveda, P., S. Ilangumaran and R. Rottapel (2000). "Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation." J Biol Chem **275**(19): 14005-8.

Decker, T. and P. Kovarik (2000). "Serine phosphorylation of STATs." Oncogene **19**(21): 2628-37.

Dingwall, C. and R. A. Laskey (1991). "Nuclear targeting sequences--a consensus?" Trends Biochem Sci **16**(12): 478-81.

Dogusan, Z., E. L. Hooghe-Peters, D. Berus, B. Velkeniers and R. Hooghe (2000). "Expression of SOCS genes in normal and leukemic human leukocytes stimulated by prolactin, growth hormone and cytokines." J Neuroimmunol **109**(1): 34-9.

Dundr, M. and T. Misteli (2001). "Functional architecture in the cell nucleus." Biochem J **356**(Pt 2): 297-310.

Egwuagu, C. E., C. R. Yu, M. Zhang, R. M. Mahdi, S. J. Kim and I. Gery (2002). "Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance." J Immunol **168**(7): 3181-7.

Emanuelli, B., P. Peraldi, C. Filloux, D. Sawka-Verhelle, D. Hilton and E. Van Obberghen (2000). "SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling." J Biol Chem **275**(21): 15985-91.

Endo, T. A., M. Masuhara, M. Yokouchi, R. Suzuki, H. Sakamoto, K. Mitsui, A. Matsumoto, S. Tanimura, M. Ohtsubo, H. Misawa, T. Miyazaki, N. Leonor, T. Taniguchi, T. Fujita, Y. Kanakura, S. Komiya and A. Yoshimura (1997). "A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases." Nature **387**(6636): 921-4.

Fagerlund, R., L. Kinnunen, M. Kohler, I. Julkunen and K. Melen (2005). "NF-{kappa}B is transported into the nucleus by importin {alpha}3 and importin {alpha}4." J Biol Chem **280**(16): 15942-51.

Fagerlund, R., K. Melen, L. Kinnunen and I. Julkunen (2002). "Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5." J Biol Chem **277**(33): 30072-8.

Favre, H., A. Benhamou, J. Finidori, P. A. Kelly and M. Edery (1999). "Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction." FEBS Lett **453**(1-2): 63-6.

Federici, M., M. L. Giustizieri, C. Scarponi, G. Girolomoni and C. Albanesi (2002). "Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1." J Immunol **169**(1): 434-42.

Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird and L. A. O'Neill (2001). "Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction." Nature **413**(6851): 78-83.

Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha and D. T. Golenbock (2003). "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." J Exp Med **198**(7): 1043-55.

Frantsve, J., J. Schwaller, D. W. Sternberg, J. Kutok and D. G. Gilliland (2001). "Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation." Mol Cell Biol **21**(10): 3547-57.

Fujimoto, M., T. Naka, R. Nakagawa, Y. Kawazoe, Y. Morita, A. Tateishi, K. Okumura, M. Narazaki and T. Kishimoto (2000). "Defective thymocyte development and perturbed homeostasis of T cells in STAT-induced STAT inhibitor-1/suppressors of cytokine signaling-1 transgenic mice." J Immunol **165**(4): 1799-806.

Fujimoto, M., H. Tsutsui, S. Yumikura-Futatsugi, H. Ueda, O. Xingshou, T. Abe, I. Kawase, K. Nakanishi, T. Kishimoto and T. Naka (2002). "A regulatory role for suppressor of cytokine signaling-1 in T(h) polarization in vivo." Int Immunol **14**(11): 1343-50.

Gautier, G., M. Humbert, F. Deauvieau, M. Scuiller, J. Hiscott, E. E. Bates, G. Trinchieri, C. Caux and P. Garrone (2005). "A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells." J Exp Med **201**(9): 1435-46.

Gil, M. P., E. Bohn, A. K. O'Guin, C. V. Ramana, B. Levine, G. R. Stark, H. W. Virgin and R. D. Schreiber (2001). "Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6680-5.

Gingras, S., E. Parganas, A. de Pauw, J. N. Ihle and P. J. Murray (2004). "Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling." J Biol Chem **279**(52): 54702-7.

Giordanetto, F. and R. T. Kroemer (2003). "A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1)." Protein Eng **16**(2): 115-24.

Gorlich, D. and I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-8.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

Greenhalgh, C. J., D. Metcalf, A. L. Thaus, J. E. Corbin, R. Uren, P. O. Morgan, L. J. Fabri, J. G. Zhang, H. M. Martin, T. A. Willson, N. Billestrup, N. A. Nicola, M. Baca, W. S. Alexander and D. J. Hilton (2002). "Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling." J Biol Chem **277**(43): 40181-4.

Gregorieff, A., S. Pyronnet, N. Sonenberg and A. Veillette (2000). "Regulation of SOCS-1 expression by translational repression." J Biol Chem **275**(28): 21596-604.

Haan, S., P. Ferguson, U. Sommer, M. Hiremath, D. W. McVicar, P. C. Heinrich, J. A. Johnston and N. A. Cacalano (2003). "Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation." J Biol Chem **278**(34): 31972-9.

Hacker, H., R. M. Vabulas, O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira and H. Wagner (2000). "Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6." J Exp Med **192**(4): 595-600.

Hanada, T., T. Yoshida, I. Kinjyo, S. Minoguchi, H. Yasukawa, S. Kato, H. Mimata, Y. Nomura, Y. Seki, M. Kubo and A. Yoshimura (2001). "A mutant form of JAB/SOCS1 augments the cytokine-induced JAK/STAT pathway by accelerating degradation of wild-type JAB/CIS family proteins through the SOCS-box." J Biol Chem **276**(44): 40746-54.

Harada, M., K. Nakashima, T. Hirota, M. Shimizu, S. Doi, K. Fujita, T. Shirakawa, T. Enomoto, M. Yoshikawa, H. Moriyama, K. Matsumoto, H. Saito, Y. Suzuki, Y. Nakamura and M. Tamari (2007). "Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **36**(4): 491-6.

Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-79.

Hay, R. J., M. L. Macy and T. R. Chen (1989). "Mycoplasma infection of cultured cells." Nature **339**(6224): 487-8.

He, Y., W. Zhang, R. Zhang, H. Zhang and W. Min (2006). "SOCS1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation." J Biol Chem **281**(9): 5559-66.

Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner and S. Bauer (2003). "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." Eur J Immunol **33**(11): 2987-97.

Heim, M. H. (1999). "The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus." J Recept Signal Transduct Res **19**(1-4): 75-120.

Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

Hilton, D. J., R. T. Richardson, W. S. Alexander, E. M. Viney, T. A. Willson, N. S. Sprigg, R. Starr, S. E. Nicholson, D. Metcalf and N. A. Nicola (1998). "Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 114-9.

Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han and B. Beutler (2003a). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." Nature **424**(6950): 743-8.

Hoebe, K., E. M. Janssen, S. O. Kim, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, J. Han and B. Beutler (2003b). "Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways." Nat Immunol **4**(12): 1223-9.

Hoffmann, A. and D. Baltimore (2006). "Circuitry of nuclear factor kappaB signaling." Immunol Rev **210**: 171-86.

Hoffmann, J. A. (2003). "The immune response of Drosophila." Nature **426**(6962): 33-8.

Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell and R. Medzhitov (2002). "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." Nature **420**(6913): 329-33.

Hoshino, K., T. Kaisho, T. Iwabe, O. Takeuchi and S. Akira (2002). "Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation." Int Immunol **14**(10): 1225-31.

Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda and S. Akira (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J Immunol **162**(7): 3749-52.

Huang, Y., J. J. Feld, R. K. Sapp, S. Nanda, J. H. Lin, L. M. Blatt, M. W. Fried, K. Murthy and T. J. Liang (2007). "Defective hepatic response to interferon and activation of suppressor of cytokine signaling 3 in chronic hepatitis C." Gastroenterology **132**(2): 733-44.

Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto, W. E. Thierfelder, B. Kreider and O. Silvennoinen (1994). "Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs." Trends Biochem Sci **19**(5): 222-7.

Irie-Sasaki, J., T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C. D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D. M. Rothstein and J. M. Penninger (2001). "CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling." Nature **409**(6818): 349-54.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

Janeway, C. A., Jr., P. Travers, M. Walport and M. J. Shlomchik (2005). Immunobiology; the immune system in health and disease.

Kaisho, T. and S. Akira (2006). "Toll-like receptor function and signaling." J Allergy Clin Immunol **117**(5): 979-87; quiz 988.

Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino and S. Akira (2001). "Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells." J Immunol **166**(9): 5688-94.

Kamio, M., T. Yoshida, H. Ogata, T. Douchi, Y. Nagata, M. Inoue, M. Hasegawa, Y. Yonemitsu and A. Yoshimura (2004). "SOCS1 [corrected] inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein." Oncogene **23**(17): 3107-15.

Kamizono, S., T. Hanada, H. Yasukawa, S. Minoguchi, R. Kato, M. Minoguchi, K. Hattori, S. Hatakeyama, M. Yada, S. Morita, T. Kitamura, H. Kato, K. Nakayama and A. Yoshimura (2001). "The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2." J Biol Chem **276**(16): 12530-8.

Kamura, T., K. Maenaka, S. Kotoshiba, M. Matsumoto, D. Kohda, R. C. Conaway, J. W. Conaway and K. I. Nakayama (2004). "VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases." Genes Dev **18**(24): 3055-65.

Kamura, T., S. Sato, D. Haque, L. Liu, W. G. Kaelin, Jr., R. C. Conaway and J. W. Conaway (1998). "The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families." Genes Dev **12**(24): 3872-81.

Karaghiosoff, M., R. Steinborn, P. Kovarik, G. Kriegshauser, M. Baccarini, B. Donabauer, U. Reichart, T. Kolbe, C. Bogdan, T. Leanderson, D. Levy, T. Decker and M. Muller (2003). "Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock." Nat Immunol **4**(5): 471-7.

Kario, E., M. D. Marmor, K. Adamsky, A. Citri, I. Amit, N. Amariglio, G. Rechavi and Y. Yarden (2005). "Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling." J Biol Chem **280**(8): 7038-48.

Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.

Keminer, O. and R. Peters (1999). "Permeability of single nuclear pores." Biophys J **77**(1): 217-28.

Ketteler, R., C. S. Moghraby, J. G. Hsiao, O. Sandra, H. F. Lodish and U. Klingmuller (2003). "The cytokine-inducible Scr homology domain-containing protein negatively regulates signaling by promoting apoptosis in erythroid progenitor cells." J Biol Chem **278**(4): 2654-60.

Kile, B. T., B. A. Schulman, W. S. Alexander, N. A. Nicola, H. M. Martin and D. J. Hilton (2002). "The SOCS box: a tale of destruction and degradation." Trends Biochem Sci **27**(5): 235-41.

Kinjyo, I., T. Hanada, K. Inagaki-Ohara, H. Mori, D. Aki, M. Ohishi, H. Yoshida, M. Kubo and A. Yoshimura (2002). "SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation." Immunity **17**(5): 583-91.

Kohler, M., C. Speck, M. Christiansen, F. R. Bischoff, S. Prehn, H. Haller, D. Gorlich and E. Hartmann (1999). "Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import." Mol Cell Biol **19**(11): 7782-91.

Kopp, E. B. and R. Medzhitov (1999). "The Toll-receptor family and control of innate immunity." Curr Opin Immunol **11**(1): 13-8.

Kovarik, P., M. Mangold, K. Ramsauer, H. Heidari, R. Steinborn, A. Zotter, D. E. Levy, M. Muller and T. Decker (2001). "Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression." Embo J **20**(1-2): 91-100.

Krebs, D. L. and D. J. Hilton (2000). "SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling." J Cell Sci **113 (Pt 16)**: 2813-9.

Krebs, D. L. and D. J. Hilton (2001). "SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling." Stem Cells **19**(5): 378-87.

Krebs, D. L., D. Metcalf, T. D. Merson, A. K. Voss, T. Thomas, J. G. Zhang, S. Rakar, K. O'Bryan M, T. A. Willson, E. M. Viney, L. A. Mielke, N. A. Nicola, D. J. Hilton and W. S. Alexander (2004). "Development of hydrocephalus in mice lacking SOCS7." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15446-51.

Krebs, D. L., R. T. Uren, D. Metcalf, S. Rakar, J. G. Zhang, R. Starr, D. P. De Souza, K. Hanzinikolas, J. Eyles, L. M. Connolly, R. J. Simpson, N. A. Nicola, S. E. Nicholson, M. Baca, D. J. Hilton and W. S. Alexander (2002). "SOCS-6 binds to insulin receptor substrate 4, and mice lacking the SOCS-6 gene exhibit mild growth retardation." Mol Cell Biol **22**(13): 4567-78.

Krieg, A. M., S. Matson and E. Fisher (1996). "Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **6**(2): 133-9.

Kuwata, H., M. Matsumoto, K. Atarashi, H. Morishita, T. Hirotani, R. Koga and K. Takeda (2006). "IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation." Immunity **24**(1): 41-51.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

Lang, R., A. L. Pauleau, E. Parganas, Y. Takahashi, J. Mages, J. N. Ihle, R. Rutschman and P. J. Murray (2003). "SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling." Nat Immunol **4**(6): 546-50.

Larsen, L. and C. Ropke (2002). "Suppressors of cytokine signalling: SOCS." Apmis **110**(12): 833-44.

Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik and D. T. Golenbock (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." Nat Immunol **5**(2): 190-8.

Latz, E., A. Verma, A. Visintin, M. Gong, C. M. Sirois, D. C. Klein, B. G. Monks, C. J. McKnight, M. S. Lamphier, W. P. Duprex, T. Espevik and D. T. Golenbock (2007). "Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9." Nat Immunol **8**(7): 772-9.

Lehner, M. D., S. Morath, K. S. Michelsen, R. R. Schumann and T. Hartung (2001). "Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators." J Immunol **166**(8): 5161-7.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." Cell **86**(6): 973-83.

Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." Annu Rev Immunol **16**: 293-322.

Li, S., S. Chen, X. Xu, A. Sundstedt, K. M. Paulsson, P. Anderson, S. Karlsson, H. O. Sjogren and P. Wang (2000). "Cytokine-induced Src homology 2 protein (CIS) promotes T cell receptor-mediated proliferation and prolongs survival of activated T cells." J Exp Med **191**(6): 985-94.

Li, X., G. Zhang, N. Ngo, X. Zhao, S. R. Kain and C. C. Huang (1997). "Deletions of the Aequorea victoria green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence." J Biol Chem **272**(45): 28545-9.

Liang, H., C. F. Reich, D. S. Pisetsky and P. E. Lipsky (2000). "The role of cell surface receptors in the activation of human B cells by phosphorothioate oligonucleotides." J Immunol **165**(3): 1438-45.

Lim, C. P. and X. Cao (2006). "Structure, function, and regulation of STAT proteins." Mol Biosyst **2**(11): 536-50.

Maine, G. N., X. Mao, C. M. Komarck and E. Burstein (2007). "COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase." Embo J **26**(2): 436-47.

Makkerh, J. P., C. Dingwall and R. A. Laskey (1996). "Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids." Curr Biol **6**(8): 1025-7.

Mansell, A., R. Smith, S. L. Doyle, P. Gray, J. E. Fenner, P. J. Crack, S. E. Nicholson, D. J. Hilton, L. A. O'Neill and P. J. Hertzog (2006). "Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation." Nat Immunol **7**(2): 148-55.

Mao, X., Z. Ren, G. N. Parker, H. Sondermann, M. A. Pastorello, W. Wang, J. S. McMurray, B. Demeler, J. E. Darnell, Jr. and X. Chen (2005). "Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding." Mol Cell **17**(6): 761-71.

Marengere, L. E. and T. Pawson (1992). "Identification of residues in GTPase-activating protein Src homology 2 domains that control binding to tyrosine phosphorylated growth factor receptors and p62." J Biol Chem **267**(32): 22779-86.

Marine, J. C., C. McKay, D. Wang, D. J. Topham, E. Parganas, H. Nakajima, H. Pendeville, H. Yasukawa, A. Sasaki, A. Yoshimura and J. N. Ihle (1999a). "SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis." Cell **98**(5): 617-27.

Marine, J. C., D. J. Topham, C. McKay, D. Wang, E. Parganas, D. Stravopodis, A. Yoshimura and J. N. Ihle (1999b). "SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality." Cell **98**(5): 609-16.

Martens, N., G. Uzan, M. Wery, R. Hooghe, E. L. Hooghe-Peters and A. Gertler (2005). "Suppressor of cytokine signaling 7 inhibits prolactin, growth hormone, and leptin signaling by interacting with STAT5 or STAT3 and attenuating their nuclear translocation." J Biol Chem **280**(14): 13817-23.

Matsuda, T., T. Yamamoto, H. Kishi, A. Yoshimura and A. Muraguchi (2000). "SOCS-1 can suppress CD3zeta- and Syk-mediated NF-AT activation in a non-lymphoid cell line." FEBS Lett **472**(2-3): 235-40.

Matsumoto, A., M. Masuhara, K. Mitsui, M. Yokouchi, M. Ohtsubo, H. Misawa, A. Miyajima and A. Yoshimura (1997). "CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation." Blood **89**(9): 3148-54.

Matsumoto, A., Y. Seki, M. Kubo, S. Ohtsuka, A. Suzuki, I. Hayashi, K. Tsuji, T. Nakahata, M. Okabe, S. Yamada and A. Yoshimura (1999). "Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice." Mol Cell Biol **19**(9): 6396-407.

Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto and T. Seya (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." J Immunol **171**(6): 3154-62.

Matuoka, K., H. Miki, K. Takahashi and T. Takenawa (1997). "A novel ligand for an SH3 domain of the adaptor protein Nck bears an SH2 domain and nuclear signaling motifs." Biochem Biophys Res Commun **239**(2): 488-92.

Mayer, A. K., M. Muehmer, J. Mages, K. Gueinzius, C. Hess, K. Heeg, R. Bals, R. Lang and A. H. Dalpke (2007). "Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells." J Immunol **178**(5): 3134-42.

McGarrity, G. J., V. Vanaman and J. Sarama (1984). "Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review." In Vitro **20**(1): 1-18.

Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "The Toll receptor family and microbial recognition." Trends Microbiol **8**(10): 452-6.

Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." Cell **91**(3): 295-8.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.

Metcalf, D., C. J. Greenhalgh, E. Viney, T. A. Willson, R. Starr, N. A. Nicola, D. J. Hilton and W. S. Alexander (2000). "Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2." Nature **405**(6790): 1069-73.

Metcalf, D., S. Mifsud, L. Di Rago, N. A. Nicola, D. J. Hilton and W. S. Alexander (2002). "Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 943-8.

Meyer, T., A. Begitt, I. Lodige, M. van Rossum and U. Vinkemeier (2002). "Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways." Embo J **21**(3): 344-54.

Meylan, E., J. Tschopp and M. Karin (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." Nature **442**(7098): 39-44.

Miao, T., D. Wu, Y. Zhang, X. Bo, M. C. Subang, P. Wang and P. M. Richardson (2006). "Suppressor of cytokine signaling-3 suppresses the ability of activated signal transducer and activator of transcription-3 to stimulate neurite growth in rat primary sensory neurons." J Neurosci **26**(37): 9512-9.

Mizushima, S. and S. Nagata (1990). "pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector." Nucleic Acids Res **18**(17): 5322.

Mooney, R. A., J. Senn, S. Cameron, N. Inamdar, L. M. Boivin, Y. Shang and R. W. Furlanetto (2001). "Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance." J Biol Chem **276**(28): 25889-93.

Morath, S., A. Geyer and T. Hartung (2001). "Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus." J Exp Med **193**(3): 393-7.

Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena and A. Mantovani (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." J Immunol **164**(11): 5998-6004.

Myers, M. P., J. N. Andersen, A. Cheng, M. L. Tremblay, C. M. Horvath, J. P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford and N. K. Tonks (2001). "TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B." J Biol Chem **276**(51): 47771-4.

Naka, T., T. Matsumoto, M. Narazaki, M. Fujimoto, Y. Morita, Y. Ohsawa, H. Saito, T. Nagasawa, Y. Uchiyama and T. Kishimoto (1998). "Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15577-82.

Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira and T. Kishimoto (1997). "Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor." Nature **387**(6636): 924-9.

Naka, T., H. Tsutsui, M. Fujimoto, Y. Kawazoe, H. Kohzaki, Y. Morita, R. Nakagawa, M. Narazaki, K. Adachi, T. Yoshimoto, K. Nakanishi and T. Kishimoto (2001). "SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo." Immunity **14**(5): 535-45.

Nakagawa, R., T. Naka, H. Tsutsui, M. Fujimoto, A. Kimura, T. Abe, E. Seki, S. Sato, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, K. Yamanishi, I. Kawase, K. Nakanishi and T. Kishimoto (2002). "SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses." Immunity **17**(5): 677-87.

Narazaki, M., M. Fujimoto, T. Matsumoto, Y. Morita, H. Saito, T. Kajita, K. Yoshizaki, T. Naka and T. Kishimoto (1998). "Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13130-4.

Natoli, G., S. Saccani, D. Bosisio and I. Marazzi (2005). "Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time." Nat Immunol **6**(5): 439-45.

Nelson, M. and P. Silver (1989). "Context affects nuclear protein localization in Saccharomyces cerevisiae." Mol Cell Biol **9**(2): 384-9.

Nicholson, S. E., D. De Souza, L. J. Fabri, J. Corbin, T. A. Willson, J. G. Zhang, A. Silva, M. Asimakis, A. Farley, A. D. Nash, D. Metcalf, D. J. Hilton, N. A. Nicola and M. Baca (2000). "Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6493-8.

Nicholson, S. E., T. A. Willson, A. Farley, R. Starr, J. G. Zhang, M. Baca, W. S. Alexander, D. Metcalf, D. J. Hilton and N. A. Nicola (1999). "Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction." Embo J **18**(2): 375-85.

Nicola, N. A., S. E. Nicholson, D. Metcalf, J. G. Zhang, M. Baca, A. Farley, T. A. Willson, R. Starr, W. Alexander and D. J. Hilton (1999). "Negative regulation of cytokine signaling by the SOCS proteins." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **64**: 397-404.

Niemand, C., A. Nimmesgern, S. Haan, P. Fischer, F. Schaper, R. Rossaint, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (2003). "Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3." J Immunol **170**(6): 3263-72.

O'Keefe, R. T., A. Mayeda, C. L. Sadowski, A. R. Krainer and D. L. Spector (1994). "Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors." J Cell Biol **124**(3): 249-60.

O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.

O'Shea, J. J., M. Gadina and R. D. Schreiber (2002). "Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway." Cell **109 Suppl**: S121-31.

Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington (1996). "Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein." Science **273**(5280): 1392-5.

Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa and T. Seya (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.

Paine, P. L., L. C. Moore and S. B. Horowitz (1975). "Nuclear envelope permeability." Nature **254**(5496): 109-14.

Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.

Pranada, A. L., S. Metz, A. Herrmann, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (2004). "Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling." J Biol Chem **279**(15): 15114-23.

Rakesh, K. and D. K. Agrawal (2005). "Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors." Biochem Pharmacol **70**(5): 649-57.

Ram, P. A. and D. J. Waxman (2000). "Role of the cytokine-inducible SH2 protein CIS in desensitization of STAT5b signaling by continuous growth hormone." J Biol Chem **275**(50): 39487-96.

Ramana, C. V., M. P. Gil, Y. Han, R. M. Ransohoff, R. D. Schreiber and G. R. Stark (2001). "Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6674-9.

Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey and C. Dingwall (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." Cell **64**(3): 615-23.

Roberts, B. L., W. D. Richardson and A. E. Smith (1987). "The effect of protein context on nuclear location signal function." Cell **50**(3): 465-75.

Rui, L., M. Yuan, D. Frantz, S. Shoelson and M. F. White (2002). "SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2." J Biol Chem **277**(44): 42394-8.

Ryo, A., F. Suizu, Y. Yoshida, K. Perrem, Y. C. Liou, G. Wulf, R. Rottapel, S. Yamaoka and K. P. Lu (2003). "Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA." Mol Cell **12**(6): 1413-26.

Saccani, S., I. Marazzi, A. A. Beg and G. Natoli (2004). "Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response." J Exp Med **200**(1): 107-13.

Saito, H., Y. Morita, M. Fujimoto, M. Narazaki, T. Naka and T. Kishimoto (2000). "IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma." J Immunol **164**(11): 5833-43.

Sakai, I., K. Takeuchi, H. Yamauchi, H. Narumi and S. Fujita (2002). "Constitutive expression of SOCS3 confers resistance to IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells." Blood **100**(8): 2926-31.

Sasaki, A., H. Yasukawa, T. Shouda, T. Kitamura, I. Dikic and A. Yoshimura (2000). "CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2." J Biol Chem **275**(38): 29338-47.

Sasaki, A., H. Yasukawa, A. Suzuki, S. Kamizono, T. Syoda, I. Kinjyo, M. Sasaki, J. A. Johnston and A. Yoshimura (1999). "Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain." Genes Cells **4**(6): 339-51.

Schluter, G., D. Boinska and S. C. Nieman-Seyde (2000). "Evidence for translational repression of the SOCS-1 major open reading frame by an upstream open reading frame." Biochem Biophys Res Commun **268**(2): 255-61.

Schmitz, J., M. Weissenbach, S. Haan, P. C. Heinrich and F. Schaper (2000). "SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130." J Biol Chem **275**(17): 12848-56.

Schnare, M., A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov (2000). "Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88." Curr Biol **10**(18): 1139-42.

Schroder K, Spille M, Pilz A, Lattin J, Bode K, Irvine KM, Burrows AD, Ravasi T, Weighardt H, Stacey KJ, Decker T, Hume DA, D. AH and S. MJ (2007). "Differential effects of CpG DNA on IFNb induction and STAT1 activation in murine macrophages versus dendritic cells: identification of a novel function for STAT1 in toll-like receptor signalling." J Immunol. **in press**.

Seki, Y., K. Hayashi, A. Matsumoto, N. Seki, J. Tsukada, J. Ransom, T. Naka, T. Kishimoto, A. Yoshimura and M. Kubo (2002). "Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13003-8.

Seki, Y., H. Inoue, N. Nagata, K. Hayashi, S. Fukuyama, K. Matsumoto, O. Komine, S. Hamano, K. Himeno, K. Inagaki-Ohara, N. Cacalano, A. O'Garra, T. Oshida, H. Saito, J. A. Johnston, A. Yoshimura and M. Kubo (2003). "SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses." Nat Med **9**(8): 1047-54.

Shouda, T., T. Yoshida, T. Hanada, T. Wakioka, M. Oishi, K. Miyoshi, S. Komiya, K. Kosai, Y. Hanakawa, K. Hashimoto, K. Nagata and A. Yoshimura (2001). "Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis." J Clin Invest **108**(12): 1781-8.

Shuai, K. (2000). "Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins." Oncogene **19**(21): 2638-44.

Simoncic, P. D., A. Lee-Loy, D. L. Barber, M. L. Tremblay and C. J. McGlade (2002). "The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3." Curr Biol **12**(6): 446-53.

Song, M. M. and K. Shuai (1998). "The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities." J Biol Chem **273**(52): 35056-62.

Spangenburg, E. E. (2005). "Suppressor of cytokine signaling-3 induces myoblast differentiation." J Biol Chem.

Spector, D. L., X. D. Fu and T. Maniatis (1991). "Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus." Embo J **10**(11): 3467-81.

Starr, R., D. Metcalf, A. G. Elefanty, M. Brysha, T. A. Willson, N. A. Nicola, D. J. Hilton and W. S. Alexander (1998). "Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14395-9.

Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola and D. J. Hilton (1997). "A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling." Nature **387**(6636): 917-21.

Stoiber, D., P. Kovarik, S. Cohney, J. A. Johnston, P. Steinlein and T. Decker (1999). "Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma." J Immunol **163**(5): 2640-7.

Stoiber, D., S. Stockinger, P. Steinlein, J. Kovarik and T. Decker (2001). "Listeria monocytogenes modulates macrophage cytokine responses through STAT serine phosphorylation and the induction of suppressor of cytokine signaling 3." J Immunol **166**(1): 466-72.

Suzuki, A., T. Hanada, K. Mitsuyama, T. Yoshida, S. Kamizono, T. Hoshino, M. Kubo, A. Yamashita, M. Okabe, K. Takeda, S. Akira, S. Matsumoto, A. Toyonaga, M. Sata and A. Yoshimura (2001). "CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation." J Exp Med **193**(4): 471-81.

Suzuki, R., H. Sakamoto, H. Yasukawa, M. Masuhara, T. Wakioka, A. Sasaki, K. Yuge, S. Komiya, A. Inoue and A. Yoshimura (1998). "CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells." Oncogene **17**(17): 2271-8.

Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

Taniguchi, E., F. Toyoshima-Morimoto and E. Nishida (2002). "Nuclear translocation of plk1 mediated by its bipartite nuclear localization signal." J Biol Chem **277**(50): 48884-8.

Thomas, K. E., C. L. Galligan, R. D. Newman, E. N. Fish and S. N. Vogel (2006). "Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide." J Biol Chem **281**(41): 31119-30.

Toshchakov, V., B. W. Jones, P. Y. Perera, K. Thomas, M. J. Cody, S. Zhang, B. R. Williams, J. Major, T. A. Hamilton, M. J. Fenton and S. N. Vogel (2002). "TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages." Nat Immunol **3**(4): 392-8.

Triantafilou, M., F. G. Gamper, R. M. Haston, M. A. Mouratis, S. Morath, T. Hartung and K. Triantafilou (2006). "Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting." J Biol Chem **281**(41): 31002-11.

Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annu Rev Biochem **67**: 509-44.

Uematsu, S. and S. Akira (2006). "Toll-like receptors and innate immunity." J Mol Med **84**(9): 712-25.

Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith and A. Aderem (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14459-63.

Ungureanu, D., P. Saharinen, I. Junttila, D. J. Hilton and O. Silvennoinen (2002). "Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1." Mol Cell Biol **22**(10): 3316-26.

Verdier, F., S. Chretien, O. Muller, P. Varlet, A. Yoshimura, S. Gisselbrecht, C. Lacombe and P. Mayeux (1998). "Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein." J Biol Chem **273**(43): 28185-90.

Vuong, B. Q., T. L. Arenzana, B. M. Showalter, J. Losman, X. P. Chen, J. Mostecki, A. S. Banks, A. Limnander, N. Fernandez and P. B. Rothman (2004). "SOCS-1 Localizes to the Microtubule Organizing Complex-Associated 20S Proteasome." Mol Cell Biol **24**(20): 9092-101.

Waksman, G., S. E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn and J. Kuriyan (1993). "Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms." Cell **72**(5): 779-90.

Wang, D., D. Stravopodis, S. Teglund, J. Kitazawa and J. N. Ihle (1996). "Naturally occurring dominant negative variants of Stat5." Mol Cell Biol **16**(11): 6141-8.

Yadav, A., A. Kalita, S. Dhillon and K. Banerjee (2005). "JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3." J Biol Chem **280**(36): 31830-40.

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." Nat Immunol **4**(11): 1144-50.

Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J. N. Ihle and A. Yoshimura (1999). "The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop." Embo J **18**(5): 1309-20.

Yasukawa, H., M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, M. Hoshijima, T. Hirano, K. R. Chien and A. Yoshimura (2003). "IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages." Nat Immunol **4**(6): 551-6.

Yasukawa, H., A. Sasaki and A. Yoshimura (2000). "Negative regulation of cytokine signaling pathways." Annu Rev Immunol **18**: 143-64.

Yoshikawa, H., K. Matsubara, G. S. Qian, P. Jackson, J. D. Groopman, J. E. Manning, C. C. Harris and J. G. Herman (2001). "SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity." Nat Genet **28**(1): 29-35.

Yoshimura, A. (2006). "Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development." Cancer Sci **97**(6): 439-47.

Yoshimura, A., T. Ohkubo, T. Kiguchi, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, T. Hara and A. Miyajima (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**(12): 2816-26.

Zasloff, M. (1983). "tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: carrier-mediated translocation process." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(21): 6436-40.

Zhang, J. G., A. Farley, S. E. Nicholson, T. A. Willson, L. M. Zugaro, R. J. Simpson, R. L. Moritz, D. Cary, R. Richardson, G. Hausmann, B. J. Kile, S. B. Kent, W. S. Alexander, D. Metcalf, D. J. Hilton, N. A. Nicola and M. Baca (1999). "The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2071-6.

Zhang, J. G., D. Metcalf, S. Rakar, M. Asimakis, C. J. Greenhalgh, T. A. Willson, R. Starr, S. E. Nicholson, W. Carter, W. S. Alexander, D. J. Hilton and N. A. Nicola (2001). "The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13261-5.

Zhong, M., M. A. Henriksen, K. Takeuchi, O. Schaefer, B. Liu, J. ten Hoeve, Z. Ren, X. Mao, X. Chen, K. Shuai and J. E. Darnell, Jr. (2005). "Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 3966-71.

6 Veröffentlichungen und Präsentationen

6.1 Veröffentlichungen

Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH
Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells
J Biol Chem. 2004 Dec 24; 279(52):54708-15. Epub 2004 Oct 18

Bartz H, Avalos NM, **Baetz A**, Heeg K, Dalpke AH
Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation
Blood. 2006 Dec 15; 108(13):4102-8. Epub 2006 Aug 8

Baetz A, Zimmermann S and Dalpke AH
Microbial immune evasion employing suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins
Inflammation & Allergy – Drug Targets, 2007, in press

zur Publikation eingereicht:

Baetz A, Heeg K, Dalpke AH
Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)
2007, submitted

Dalpke AH, Heeg K, Bartz H and **Baetz A**
Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins – Shuttling off innate immunity
2007, submitted

6.2 Präsentationen

Vortrag im Rahmen des Symposiums "Infektion und Immunabwehr"; März 2004, Rothenfels, Deutschland
Andrea Bätz, Klaus Heeg und Alexander Dalpke: Hemmung von Toll-like Rezeptoren durch SOCS- (suppressor of cytokine signaling) Proteine

Posterpräsentation auf dem "12th International Congress of Immunology"; Juli 2004, Montreal, Kanada
Andrea Baetz, Markus Frey, Klaus Heeg and Alexander H. Dalpke: Mechanisms of inhibition of Toll-like receptors by Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)

Posterpräsentation auf dem "Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology"; September 2005, Kiel, Deutschland
Andrea Baetz, Klaus Heeg and Alexander Dalpke: About an unexpected localization of SOCS1

Vortrag im Rahmen des "1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology"; September 2006, Paris, Frankreich
Andrea Baetz, Klaus Heeg and Alexander Dalpke: Tracking cellular distribution of Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) proteins

Vortrag im Rahmen des "First Congress of the Society of Innate Immunity"; Mai 2007, Ankara, Türkei
Andrea Baetz, Klaus Heeg and Alexander Dalpke: Identification of a Nuclear Localization Signal (NLS) in SOCS1

7 Danksagung

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung seit Beginn meiner Diplomarbeit in Marburg bis zum Ende meiner Promotion in Heidelberg und die Bereitstellung des interessanten Themas bedanke ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Alexander Dalpke, der mir durch wertvolle Anregungen, Diskussionen, Ratschläge und Geduld immer zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Klaus Heeg danke ich dafür, dass ich meine Arbeit am Hygiene-Institut in seiner Abteilung unter besonders guten Arbeitsbedingungen durchführen konnte sowie für die Möglichkeit, an zahlreichen Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Ralf Bartenschlager danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat, als Erstgutachter meiner Arbeit und als Mitglied in meinem PhD-Komitee zu fungieren.

Für die hilfreiche Unterstützung und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei den Mitarbeitern Dr. Holger Bartz, Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding, Rebecca Benz, Dr. Konrad Bode, Adelina Dillmann, Anne Doster, Florian Eberle, Fabian Fey, Markus Frey, Aline Gierschke, Mehtap Gündogdu, Christian Kölsche, Dr. Katharina Kubatzky, Dr. Anja Mayer, Mario Mühmer, Marijo Parcina, Stefanie Penati, Mirjam Peter, Uwe Scheuermann, Mehtap Serin, Martina Spille und Julia Strebovsky sowie allen Mitarbeitern aus Marburg bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön geht dabei an Dr. Anja Mayer, Mirjam Peter, Martina Spille und Julia Strebovsky für die extrem lustigen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors sowie für jegliche Hilfe und Unterstützung besonders in der Endphase.

Martina Spille und Markus Krieg danke ich vielmals für die hilfreiche Durchsicht und Korrekturen des Manuskripts.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Hans und Erika Bätz, die mich in all den Jahren in jeder möglichen Form unterstützt haben und immer vollstes Vertrauen hatten.