

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK II-
GROSSHADERN DER LUDWIGS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. BURKHARD GÖKE

**Auswirkungen einer Überexpression von SOCS-1 oder SOCS-3 auf
die Expression der antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät an der
Ludwigs-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Astrid Severina Sörensen
aus
München

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. D. Engelhardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. U. H. Koszinowski Prof. Dr. med. J. Bogner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. C. Auernhammer Dr. med. J. Vlotides
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	06.03.2008

Diese Arbeit ist selbstständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der angegebenen Hilfsmittel entstanden. Alle der Literatur entnommenen Erkenntnisse sind als solche kenntlich gemacht und ihrer Herkunft entsprechend einzeln nachgewiesen.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Interferone	1
1.1.1. Typ I Interferone und ihre Signalwege	2
1.1.1.1. Jak-STAT-Signalweg	2
1.1.2. Wirkung von Interferonen im menschlichen Körper	5
1.1.3. Therapeutischer Einsatz der Interferone	6
1.2. Antivirale Interferon-induzierbare Proteine	7
1.2.1. Mx-Proteine	7
1.2.2. 2',5'-Oligoadenylatsynthase-Proteine	9
1.3. SOCS-Proteine	12
1.4. Hepatitis C	14
1.5. Fragestellung und Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	18
2.1.1. Zellkultur	18
2.1.2. Northern Blot	19
2.1.2.1 Puffer	20
2.1.3. Luciferaseassay und β -Galaktosidase-Assay	21
2.1.4. Western Blot	22
2.1.4.1. Puffer	23
2.1.5. RT-PCR und Geextraktion	24
2.1.6. Ligation und Transformation	25
2.1.7. RNA-Extraktion	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Zelllinie, Zellkultur und stabile Transfektion	26
2.2.2. Northern Blot	27

2.2.3. Luciferaseassay	28
2.2.4. β -Galaktosidase Assay	29
2.2.5. Proteinextraktion und Western Blot	29
2.2.6. RT-PCR und Sequenzierung	30
2.2.7. Ligation und Transformation zur Vektorvermehrung	31
2.2.8. Statistik	32
3. Ergebnisse	33
3.1. STAT-1 und STAT-3 Tyrosin-Phosphorylierung	33
3.2. Vorversuche zur Interferon-stimulierten Expression der antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS	36
3.2.1. Promotoraktivität	36
3.2.2. Genexpression	37
3.3. 2',5'-OAS Promotoraktivität und Genexpression	38
3.3.1. Promotoraktivität	38
3.3.2. Genexpression	38
3.4. MxA-Promotoraktivität und Genexpression	41
3.4.1. Promotoraktivität	41
3.4.2. Genexpression	41
3.5. Induktion der mSOCS-3 Promotoraktivität durch Interferon α , PMA und Bu ₂ cAMP	44
3.6. β -Galaktosidaseaktivität nach Transfektion	47
4. Diskussion	48
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	55
7. Publikationen	84
8. Lebenslauf	85
9. Danksagung	87

1. Einleitung

1.1. Interferone

Interferone bilden eine Gruppe von Zytokinen mit vielfältigen biologischen Funktionen. Derzeit sind sechs verschiedene Interferone bekannt, die sich in zwei Hauptklassen unterteilen lassen: Typ I Interferone (Interferon α , Interferon β , Interferon ω , Interferon κ und Limitin) und Typ II Interferone (Interferon γ).

Während sich die Sekretion von Typ II Interferonen hauptsächlich auf T-Lymphozyten und Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) beschränkt, werden Typ I Interferone in einer Vielzahl von Zellen als Antwort auf virale Infektionen, antigene Stimuli (33; 73; 82), aber auch bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren wie den platelet-derived growth factor (PDGF), Interleukin 1 (IL-1) und 2 (IL-2) und den Tumor Nekrose Faktor (TNF) gebildet (36; 118).

Interferone	Typ	lokalisiert auf Chr. Nr.	Anzahl der Gene	Bildung und Sekretion durch
Alpha	I	9	12	zahlreiche Zellarten
Beta	I	9	1	zahlreiche Zellarten
Omega	I	9	>6	zahlreiche Zellarten
Kappa	I	9	1	zahlreiche Zellarten
Gamma	II	12	1	v.a. T-Lymphozyten und NK-Zellen

Tabelle 1: Familie der humanen Interferone

1.1.1. Typ I Interferone und ihre Signalwege

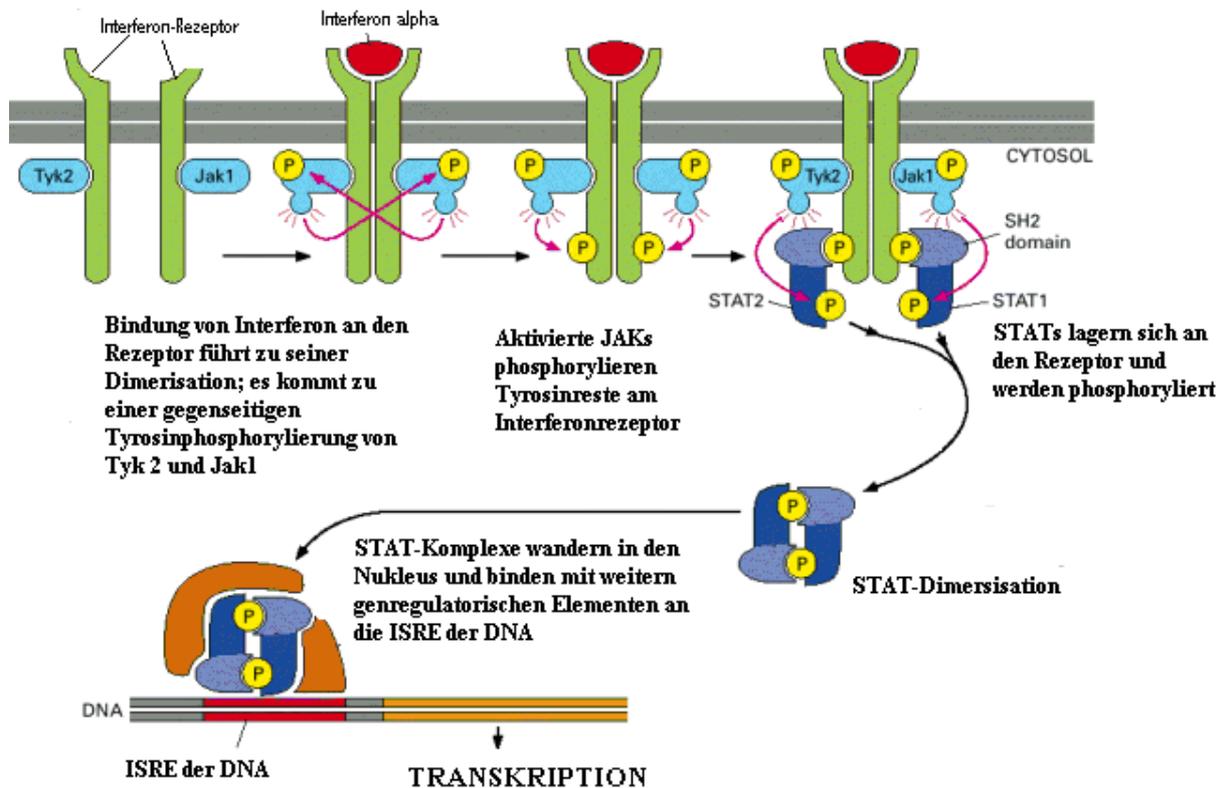
Nach ihrer Sekretion übermitteln die Typ I Interferone ihre zelluläre Reaktion über den heterodimeren Interferon-TypI-Rezeptor, der sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt: Interferon AR1 und Interferon AR2c (79; 94; 137). Neben diversen anderen Signalwegen kommt es hauptsächlich zu einer Aktivierung der Jak-STAT-Signalkaskade (24; 28; 74; 128). Dieser Signalweg wird auch in der Signalübertragung zahlreicher weiterer Zytokine beobachtet, wurde aber am Beispiel von Interferon aufgeklärt.

1.1.1.1. Jak-STAT-Signalweg

Die Aktivierung der Jak-STAT-Signalkaskade beinhaltet folgende Schritte (28; 45; 54; 62; 67; 99; 103; 123; 139; 146) (Abb. 1):

- (1) Interferon induziert die Heterodimerisation des Interferonrezeptors.
- (2) Aktivierung der Januskinasen (=Jak), rezeptorassoziierter Tyrosinkinase, durch Autophosphorylierung. Im Fall von Interferon Aktivierung von Jak1, Jak2, Tyk2
- (3) Aktivierung der STAT (=Signal Transducers and Activators of Transcription)-Proteine durch Phosphorylierung. Im Fall von Interferon hauptsächlich Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-2, sowie von STAT-3 und STAT-5
- (4) Dimerisation der phosphorylierten STAT- Proteine. Im Fall von Interferon hauptsächlich Bildung von STAT-1-Homodimeren und STAT-1/2 Heterodimeren
- (5) Nukleäre Translokation der STAT-Dimere

- (6) Komplexbildung der STAT-Dimere mit p48 (IRF-9) zu dem heterotrimeren sogenannten Interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3)
- (7) Bindung des ISGF3 in der Promotorregion von Zielgenen (sog. interferon-stimulated genes) an DNA-Sequenzen, die ISRE (=interferon-stimulated regulatory element) genannt werden
- (8) Transkription der Zielgene („interferon-stimulated genes“)



nach: Molecular Biology of the Cell,
Bruce Alberts et al.

Abbildung 1:

Darstellung der Jak-STAT-Signalkaskade am Beispiel von Interferon α

Nach Bindung von Interferon α an den Typ I-Interferon-Rezeptor kommt es zu einer Dimerisation des Rezeptors. Dies führt zu einer wechselseitigen Aktivierung von Tyk2 und Jak1. Diese phosphorylieren darauf Tyrosinreste am Interferonrezeptor. An die phosphorylierten Tyrosinreste lagern sich STAT-Proteine an und werden dadurch selbst phosphoryliert. Nach der Dimerisation der STAT-Proteine wandern die STAT-Komplexe in den Nukleus und bilden gemeinsam mit p48 den Transkriptionsfaktor Interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). ISGF3 bindet an die ISREs („interferon-stimulated regulatory elements“) in der Promoterregion verschiedener Zielgene („interferon stimulated genes“) und initiiert deren Transkription.

1.1.2. Wirkung von Interferonen im menschlichen Körper

Nach Ablauf der in 1.1.1.1. beschriebenen Signalkaskade kommt es im menschlichen Körper zu einer erhöhten Expression von etwa 300 Interferon-abhängigen Proteinen, die mit Hilfe von Oligonucleotide Microarray Studien identifiziert wurden (138). Diese Interferon-induzierbaren Proteine zeigen zahlreiche Wirkungen im menschlichen Körper, von besonderer Bedeutung sind antiproliferative, apoptotische und antivirale Wirkungen.

Die antiproliferative Wirkung ist bereits lange bekannt (66). Zahlreiche aus verschiedenen Geweben und Tumorentitäten abstammende Zelllinien reagieren auf Typ I Interferone mit einer Proliferationshemmung (17; 23; 84; 113; 116). So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Interferon α und Interferon β alle Phasen des Zellzykluses beeinflussen können (11; 24). Weiter bewirken Typ I Interferone in malignen Zellen den Eintritt in die Apoptose (135). Insgesamt sind bisher 19 ISGs mit proapoptotischer Wirkung bekannt (138).

Die antiviralen Effekte werden unter anderem durch die Proteine MxA (=Myxovirus resistance A) (22; 58; 87; 90; 104; 109), h2',5'-OAS (=humane 2',5'-Oligoadenylatsynthase) (12; 87; 93; 144) und hPKR (=humane Proteinkinase) (54; 87) vermittelt. Daneben gibt es eine Reihe weiterer Mediatoren der antiviralen zellulären Antwort, da auch dreifach defiziente MxA $-/-$, PKR $-/-$ und 2',5'-OAS $-/-$ Mäuse einen Teil der Interferon-vermittelten antiviralen Antwort zeigen (151).

1.1.3. Therapeutischer Einsatz der Interferone

Interferone waren die ersten Zytokine, die als klinische Therapeutika eingesetzt wurden. Sie finden heute unter anderem in der antiproliferativen Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML), des Kaposi Sarkoms, von Lymphomen, der Haarzelleukämie, des multiplen Myeloms, des Ovarialkarzinoms und neuroendokrinen Karzinomen des Gastro-Enteropankreatischen-Systems Verwendung. Ebenso sind sie bei der Behandlung mehrerer viraler Infektionen wie Hepatitis B und C und neurologischen Erkrankungen wie der multiplen Sklerose im Einsatz (18; 48; 49; 65; 67; 132; 152).

1.2. Antivirale Interferon-induzierbare Proteine

1.2.1. Mx-Proteine

Die Mx-Proteine zählen zu den Interferon-induzierbaren Proteinen. Sie wurden zuerst in Ratten als ein Genlocus, der die beiden verbundenen Gene Mx1 und Mx2 enthält, beschrieben (6; 75). Hiervon wird allerdings nur Mx1 synthetisiert. Die physiologische Wirkung besteht in einer Resistenz gegenüber Infektionen mit Influenzaviren (34; 126).

Im Menschen wurden analog dazu zwei Proteine gefunden, deren Gene auf dem Chromosom Nummer 21 lokalisiert sind. Diese beiden Proteine werden als MxA und MxB bezeichnet (3; 59; 60) und können im Zytoplasma zahlreicher menschlicher Zellen nachgewiesen werden. Allerdings zeigt nur MxA eine antivirale Aktivität (50). Die Funktion von MxB ist bisher ungeklärt (85). MxA zeigt ein breites Wirkungsspektrum unter anderem gegen Infektionen mit dem Masernvirus (116), Influenzavirus (96) sowie Hepatitis B (47) und Hepatitis C Viren (40). Eine Expression des MxA Proteins in transgenen Mäusen mit genetisch deletierter Typ I-Interferonrezeptoreinheit (MxA +/+, Interferon AR-/-) führt zu einer Resistenz gegenüber Thogoto, LaCrosse und Semliki Viren (52). Da eine Interferon-vermittelte Stimulation anderer antiviraler Proteine in diesem Modell durch die deletierte Typ I-Interferonrezeptoreinheit nicht vorhanden ist, scheint eine alleinige Anwesenheit von MxA auszureichen, um eine Zelle vor Viren zu schützen.

Die Induktion des menschlichen MxA-Proteins erfolgt fast nur durch Interferon α und Interferon β , also Typ I Interferone. Dies unterscheidet MxA von zahlreichen anderen Interferon-induzierbaren Proteinen (145).

Die Mx-Proteine gehören zur Dynaminfamilie der großen GTPasen mit einem Molekulargewicht von 70-80kDa (50; 128). Diese Proteinfamilie zeigt eine niedrige Affinität zu GTP, aber eine hohe intrinsische Aktivität bei der GTP-Hydrolyse (127). Alle Mx-Proteine besitzen am N-terminalen Ende die GTPase-Domäne und am C-terminalen Ende ihre Effektor-domäne. Eine besondere Eigenschaft der Mx-Proteine ist ihre Fähigkeit sich zu Oligomerenkomplexen zusammenzulagern, deren Funktion allerdings noch nicht vollständig geklärt ist (50). Weiterhin akkumuliert das menschliche MxA-Protein im Zytoplasma von Interferon-stimulierten Zellen und bindet sich zum Teil an das endoplasmatische Retikulum (1; 50) und an Actin und Tubulin (61). Eine eventuelle physiologische Funktion dieser Eigenschaften ist derzeit nicht bekannt. Die Wirkungsweise der Mx-Proteine ist noch relativ unverstanden. Bereits bekannt ist jedoch, dass MxA die Replikation einiger RNA-Viren inhibiert indem es sich an virale Ribonukleoproteinstrukturen bindet und die Transkription viraler RNA sowie die Translation viraler Subpartikel blockiert (71; 72). In Abwesenheit von viralen Zielstrukturen in der Zelle werden die Mx-Proteine sehr rasch abgebaut.

Nach einer Therapie mit Interferon α kommt es bei den meisten Patienten mit chronischer Hepatitis C zu einem signifikanten Anstieg der MxA Gen- und Proteinexpression (5). Ergebnisse mehrerer Studien zeigen zudem eine positive Korrelation von Anstieg der MxA-Expression und erfolgreicher Viruselimination unter Therapie mit Interferon α (5; 35).

1.2.2. 2',5'-Oligoadenylatsynthase-Proteine

2',5'-OAS-Proteine sind in zahlreichen Säugetierzellen zu finden, so auch beim Menschen (74; 117). Die Genexpression der 2',5'-OAS-Proteine wird ebenso wie die der Mx-Proteine stark durch Interferon α und Interferon β induziert (74; 144). Bisher wurden drei Größenklassen der 2',5'-OAS-Proteine identifiziert: OAS 1, 2 und 3 (25,107). Das kleinste Protein der 2',5'-OAS Proteinfamilie (OAS1) weist ein Molekulargewicht von 40 – 46 kDa auf. Die beiden größeren haben ein Gewicht von 69kDa (OAS2) bzw. 100kDa (OAS3) (116). Weiter ist ein OAS-like- (=OAS1-)-Protein bekannt (51; 106).

In Anwesenheit von dsRNA – beispielsweise bei einer viralen Infektion – polymerisiert die 2',5'-OAS ATP zu sogenannten 2'-5'-Oligoadenylaten. Dabei entstehen Adenylate mit der Formel $\text{pppA}(2'p5'A)_n$ mit $n \geq 1$. Hiervon aktivieren vor allem die tri- und tetrameren Adenylate die sogenannte RNase-L, eine latente Endoribonuclease. Diese wiederum bildet Dimere und spaltet virale Einzelstrang DNA sowie zelluläre mRNA, jedoch keine dsRNA (74).

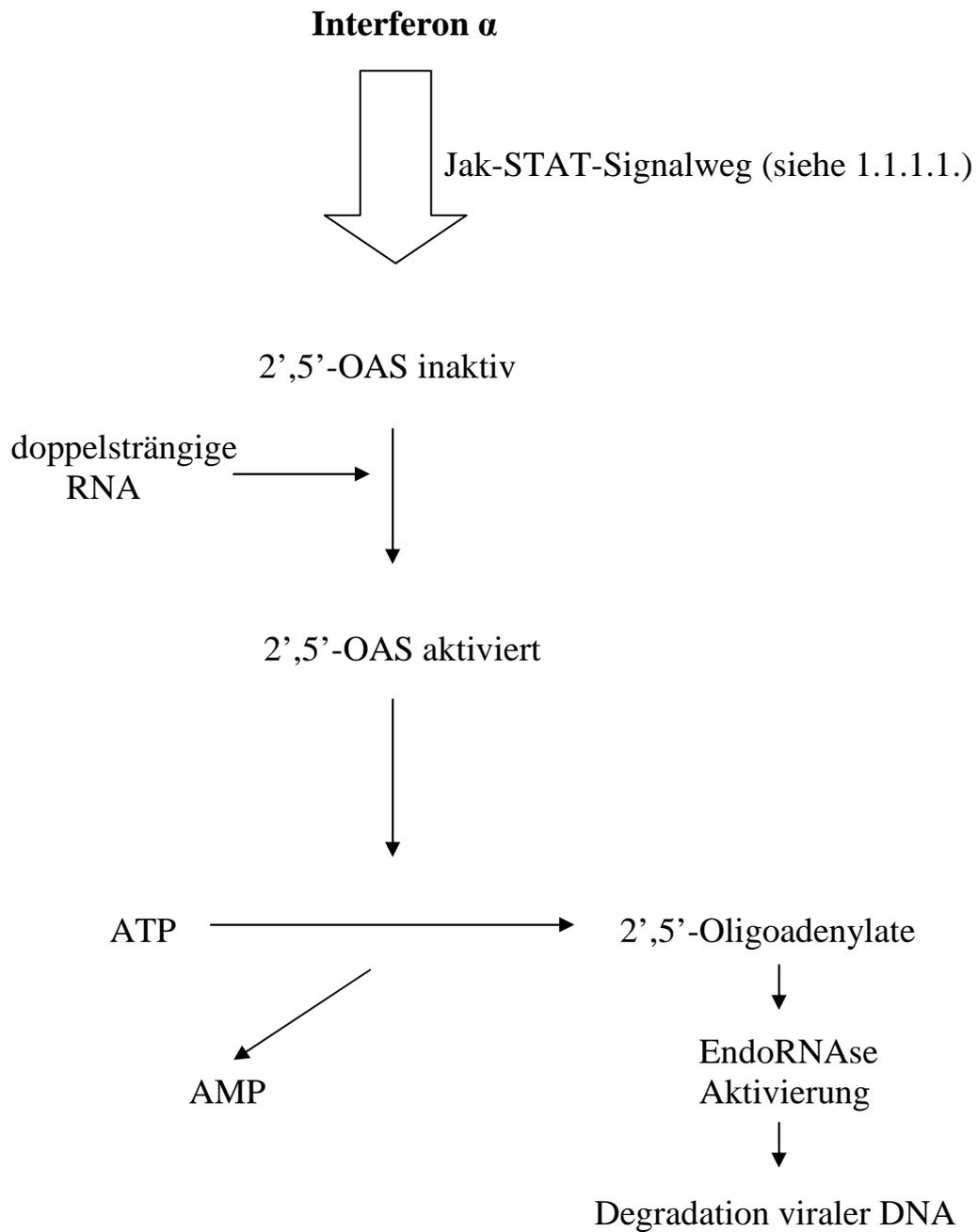


Abbildung 3:

Wirkungsweise der 2',5'-OAS-Proteine

Eine Aktivierung der 2',5'-OAS-Proteine erfolgt durch dsDNA. Daraufhin polymerisieren die 2',5'-OAS ATP zu Oligoadenylaten. Diese wiederum aktivieren eine EndoRNase, die virale DNA abbaut.

Die Wirkung der 2',5'-OAS wird durch eine Phosphodiesterase, die bevorzugt 2',5'-linked Oligonukleotide spaltet, beendet (37; 38; 63; 150). Die Aktivität der RNase-L wird durch einen spezifischen Inhibitor begrenzt (13; 76; 121; 122; 149).

Neben der Aktivierung der 2',5'-OAS durch dsDNA ist auch eine Aktivierung dieser Proteine durch das Hepatitis C Virus Core-Protein beschrieben (88).

Neben ihrer gut bekannten antiviralen Aktivität zeigen die 2',5'-OAS-Proteine auch pro-apoptotische Wirkungen, beispielsweise durch eine Aktivierung der RNase L (21; 29; 151).

1.3. SOCS-Proteine

Die Jak-STAT-Kaskade wird durch zahlreiche zelluläre Mechanismen in ihrer Aktivität begrenzt. Neben konstitutiven Inhibitoren wie Tyrosin-Phosphatasen und „protein inhibitors of activated STATs“ (PIA) gehören unter anderem die sogenannten SOCS (=suppressor of cytokine signaling)-Proteine zu dieser Gruppe.

Neben der Bezeichnung Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) wurden SOCS Proteine auch alternativ als Jak Binding Protein (JAB), STAT-inducible STAT Inhibitor (SSI) oder Cytokine-Inducible SH2 Containing Protein (CIS) bezeichnet und so mit unterschiedlicher Nomenklatur versehen. Die Familie der SOCS-Proteine besteht aus derzeit acht bekannten Proteinen: SOCS-1 / JAB1 / SSI-1 (31; 89; 129), SOCS-2 / CIS-2 / SSI-2 (81; 86; 129), SOCS-3 / CIS-3 / SSI-3 (81; 86; 129), SOCS-4 / CIS-7, SOCS-5 / CIS-6, SOCS-6 / CIS-4, SOCS-7 / CIS-5 und CIS / CIS-1 (41; 81; 148).

Die Expression der SOCS-Proteine wird durch zahlreiche Zytokine wie beispielsweise Interferon α , Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) aktiviert (2; 7; 8; 14; 31; 55; 89; 112; 129). Eine intrazelluläre Akkumulation der SOCS-Proteine wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus verhindert. So konnte gezeigt werden, dass SOCS-Proteine einen inhibitorischen Effekt auf ihre STAT-abhängige Expression haben, indem sie wie nachfolgend beschrieben die STAT-Aktivierung hemmen (8; 10; 41; 89).

Die Funktion und Wirkungsweise von SOCS-1 und SOCS-3 ist am besten untersucht. SOCS-1 und SOCS-3 sind effektive Inhibitoren der durch verschiedene Zytokine wie Typ I Interferone (Interferon α und Interferon β) oder IL-6 stimulierten Jak-STAT-Signalkaskade (9). Die gemeinsame Proteinstruktur aller SOCS-Proteine beinhaltet eine variable N-terminale Domäne, eine zentrale SH2-Domäne und eine C-terminale Domäne, die SOCS-

box motif genannt wird (10; 31; 57; 129). SOCS-Proteine können die Signalübertragung durch die Jak-STAT-Kaskade prinzipiell durch folgende drei Mechanismen inhibieren:

I) SOCS-1 und SOCS-3 können direkt an Jak2 binden. Die Bindung erfolgt über die SH2-Domäne der beiden Proteine an das phosphorylierte Tyr¹⁰⁰⁷ der Jak2 und führt dadurch zur Blockade der Kinaseaktivität (30; 81; 91; 94; 95; 114; 131; 147). Hierzu ist neben der SH2-Domäne auch eine Gruppe von etwa 30 Aminosäuren in der N-terminalen Domäne, die sogenannte KIR (=kinase inhibitory region), nötig (114; 115; 147).

II) SOCS-3 und CIS binden über ihre zentrale SH2-Domäne direkt an phosphorylierte Tyrosinreste der intrazellulären Domänen aktivierter Zytokinrezeptoren und verhindern dadurch die Anlagerung anderer Proteine wie beispielsweise der STATs. Dies führt zu einer Hemmung der Aktivierung dieser Proteine (91; 125).

III) SOCS-Proteine können durch Komplexbildung mit Elongin B und C im SOCS box motif ihre Zielobjekte zum Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Pathway markieren (68; 110; 119; 136; 140).

Eine Suppression der Interferon-Signalkaskade wurde bereits für SOCS-1 und SOCS-3 beschrieben (124). Weiterhin ist bekannt, dass eine Überexpression von SOCS-1 (124) oder von SOCS-3 in hämatopoetischen Tumorzellen die antiproliferative und antivirale Aktivität von Interferon α , Interferon β und Interferon γ hemmt (4; 124; 130).

1.4. Hepatitis C

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört zur Familie der Flaviviren. Derzeit sind sechs verschiedene Genotypen bekannt (108). Wie bei allen Flaviviren handelt es sich um ein umhülltes Virus mit einsträngiger RNA. Das Hepatitis C Virus ist weltweit verbreitet. Der Hauptübertragungsweg ist die Exposition mit kontaminiertem Blut. Die akute Infektion verläuft meist subklinisch mit unspezifischen Symptomen oder in einer milden Form. Allerdings wird eine HCV-Infektion in 60-80% der Fälle chronisch; von diesen Patienten entwickeln 5-20% nach zehn Jahren eine Leberzirrhose (27; 69) und 1-5% nach 20 Jahren ein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Bei Patienten mit chronischer Infektion und begleitender Leberzirrhose ist das Risiko an einem HCC zu erkranken nochmals deutlich erhöht (26; 56; 64; 133). Somit stellen Infektionen mit dem Hepatitis C Virus eine der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen dar. Weltweit sind mehr als 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert (27; 69; 105). Im deutschsprachigen Raum wird die Prävalenz nach Zahlen des Robert-Koch -Institutes mit 0,4% angegeben.

Derzeit besteht die Standardtherapie einer Hepatitis C aus der Kombination von pegyliertem Interferon α 2b (=ein Interferon α Molekül verbunden mit einem Polyethylen glycol-Molekül; daraus resultiert eine längere Wirksamkeit und eine nur einmal wöchentliche Injektion) plus Ribavirin (=ein synthetisches Guanosin-Analogon) über 24 oder 48 Wochen, jeweils abhängig vom Genotyp (77; 92). Bei den erfolgreich behandelten Patienten führt diese Kombinationstherapie zu einer „sustained virus response“ (SVR) im Sinne einer dauerhaften Viruselimination und nicht mehr nachweisbaren HCV-RNA-Serumspiegeln. Die Resultate dieser Kombinationstherapie sind allerdings relativ schlecht. So sprechen ungefähr 20% der Patienten, die mit dem Genotyp 2 oder 3 infiziert sind, und etwa 50% der Patienten, die mit dem Genotyp 1 infiziert sind, nicht

auf diese Therapie an (77; 92). Neben dem Genotyp des Hepatitis C Virus scheinen noch weitere Faktoren, die allerdings weitgehend unklar sind, eine Rolle im Nichtansprechen auf die Interferon-Ribavirin-Kombinationstherapie zu spielen (97; 98).

1.5. Fragestellung und Zielsetzung

Mehrere experimentelle Arbeiten deuten darauf hin, dass SOCS-Proteine eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Interferon-Resistenz spielen. So wurde in kutanen T-Zell-Lymphomen, in mehreren chronisch myeloischen Leukämie (CML) Zelllinien und in Blasten von CML-Patienten eine konstitutive SOCS-3 Expression nachgewiesen (20; 111). Diese scheint eine Rolle bei der Interferon-Resistenz dieser Zelllinien zu spielen. Weiterhin wurden in der Leber eine erhöhte SOCS-2- und SOCS-3-Proteinexpression als Mitverursacher bei der Interleukin (IL-)-10 induzierten Suppression der Interferon α vermittelten STAT-1 Aktivierung beschrieben (120). Des Weiteren konnte in Leberzellen gezeigt werden, dass es durch eine Überexpression des Hepatitis C Virus „core proteins“ zu einer Erhöhung der SOCS-3 mRNA Menge und einer Suppression der Interferon α induzierten STAT-1 Aktivierung kommt (16). Auch die antivirale Aktivität von Interferon α und Interferon β wird in Hela bzw. NIH-3T3 Zellen, die mit dem Vesicular Stomatitis Virus infiziert sind, durch eine Überexpression von SOCS-1 (112; 124) bzw. SOCS-3 (124) vollständig gehemmt.

Inzwischen liegen auch in vivo Daten vor, welche die in vitro Ergebnisse weiter bestätigen. So konnte in Leberbiopsaten von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion eine signifikant höhere SOCS-1 mRNA Expression im Vergleich zu nicht erkrankten Personen gezeigt werden (80). Darüber hinaus konnte kürzlich eine Korrelation zwischen einer Interferon-Resistenz und einer erhöhten SOCS-3 Proteinexpression in der Leber aufgezeigt werden (142).

Ziel dieser Arbeit ist es, am Modell der humanen Hepatomzelllinie Hep G2 eine mögliche Rolle der SOCS-Proteine in der Interferon α Resistenz bei der antiviralen Therapie der Hepatitis C zu untersuchen. Dabei soll die Expression

der beiden Interferon-induzierten antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS in einem Zellmodell mit SOCS-1 bzw. SOCS-3 Überexpression untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

Brutschrank CO₂-AutoZero, Heraeus Instruments (Osterode, Deutschland)

Sicherheitswerkbank LaminAir, Heraeus Instruments (Osterode, Deutschland)

Mikrozentrifuge MC 13, Millipore (Billerica, MA, USA)

Neubauer Zählkammer 0,100mm Tiefe

Präzisionspipetten, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Pasteurpipetten, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Glaspipetten, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Zellkulturflaschen und -platten, Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

Zellschaber, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen, Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

HepG2 Zellen, ATCC (Teddington, Middlesex, UK)

RPMI 1640, PAA Laboratories (Linz, Österreich)

Fetales Kälberserum , PAA Laboratories (Linz, Österreich)

Penicillin/Streptomycin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

Geneticin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

Amphotericin B, Biochrom (Berlin, Deutschland)

Trypsin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

PBS, Apotheke Klinikum Innenstadt (München, Deutschland)

Trypanblau, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

DMSO, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Interleukin 6, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Interferon α 2a , Essex-Pharma (München, Deutschland)
PMA, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Bu₂cAMP, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
BSA, Sigma (St. Louis, MO, USA)

2.1.2. Northern Blot

Ultraspec Plus 4045UV/Visible Spektrometer, LKB Biochrom (Cambridge, England)
Kammer DNA Sub Cell, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
DEPC (=Diethylpyrocarbonat), Apotheke Klinikum Innenstadt (München, Deutschland)
MOPS, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na-Acetat, Merck (Darmstadt, Deutschland)
EDTA (Titriplex III), Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaOH, Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaCl, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tri-Na-Citrat-Dihydrat, Merck (Darmstadt, Deutschland)
PeqGOLD Universal Agarose, peqLab (Erlangen, Deutschland)
Formaldehyd, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Formamide, Sigma (St. Louis, MO, USA)
Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Loading Dye Xylene Cyanole FF, Sigma (St. Louis, MO, USA)
Nucleasefreies Wasser, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
NaOH Pellets, Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trizma Base, Roth (Karlsruhe, Deutschland)

HCl (rauchend), Merck (Darmstadt, Deutschland)
Whatman-Filter-Papier, Biometra (Göttingen, Deutschland)
Hybond-N⁺-Membran, Amersham Biosciences UK Limited (Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, UK)
dCTP-alpha P³², Perkin Elmer Life Science (Zaventem, Belgien)
Labeling Kit DECA prime II DNA , Ambion (Austin, TX, USA)
Mouse β-actin DECAprobe Template, Ambion (Austin, TX, USA)
Quick Hyp Puffer, Stratagene (La Jolla , CA, USA)
QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)
Lachssperma, Stratagene (La Jolla , CA, USA)
Hybridisationsofen, Bachofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen, Deutschland)
UVStratalinker 1800, Stratagene (La Jolla , CA, USA)
SDS, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BioMax MS Film, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)
Filmkassette, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)

2.1.2.1. Puffer

10fach MOPS:

9,2% MOPS, 0,82% Na-Acetat, 0,37% EDTA, DEPC-Wasser

20fach SSC:

17,5% NaCl, 8,8% Tri-Na-Citrat-Dihydrat, DEPC-Wasser

2MTris pH 7,4:

24,2% Trizma Base, DEPC-Wasser

20%SDS:

20%SDS, DEPC-Wasser

Kammerpuffer:

10% 10fach MOPS, DEPC-Wasser

Probenpuffer:

58,8% Formamide, 29,4% Formaldehyd, 8,8% 10fach MOPS,
2,9% Ethidiumbromid

Hydrolysepuffer:

0,2% NaOH, 0,06% NaCl, DEPC-Wasser

Neutralisationspuffer:

90% 20fach SSC, 10% Tris pH 7,4

Waschlösung I:

10% 20fach SSC, 0,5% SDS(20%), DEPC-Wasser

Wasserlösung II:

0,5% 20fach SSC, 0,5% SDS(20%), DEPC-Wasser

2.1.3. Luciferase-Assay und β -Galaktosidase-Assay

Luminometer TD 20/20, Turner Designs (Sunnyvale, CA, USA)

Messröhrchen Disposable Cuvettes, Promega (Mannheim, Deutschland)

OPTIMEM 1, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

FuGENE 6, Roche (Mannheim, Deutschland)

Luciferase Assay System, Promega (Mannheim, Deutschland)

β -Galactosidase Enzym Assay, Promega (Mannheim, Deutschland)

2.1.4. Western Blot

Immobilon–PVDF-Folie, Millipore (Billerica, MA, USA)

Filterpapier (Whatman 3CHR und 1CHR), Biometra (Göttingen, Deutschland)

Autoradiographiefilm XOMAT–AR[®], Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)

Elektrophorese-Kammer ProteanIIxi, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

Semidry-Graphit–Elektroden (Laborwerkstätten Klinikum Großhadern, München, Deutschland)

Schüttler Rocker Platform, Bellco Glass, Inc. (Vineland, NJ, USA)

Hepes, Boehringer Mannheim Biochemicals (Mannheim, Deutschland)

Natriumchlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)

EDTA (Titriplex III), Merck (Darmstadt, Deutschland)

Natriumpyrophosphat , Sigma (St. Louis, MO, USA)

Natriumfluorid , Sigma (St. Louis, MO, USA)

Sodium Orhovanadate, Sigma (St. Louis, MO, USA)

DDT, Sigma (St. Louis, MO, USA)

SDS, Merck (Darmstadt, BRD)

Tween20, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Tris, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Methanol, Sigma (St. Louis, MO, USA)

6-Aminohexansäure, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Essigsäure, Merck (Darmstadt, BRD)

Urea, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Triton X100, Serva (Heidelberg, Deutschland)

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Sigma (St. Louis, MO, USA)

Aprotinin, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Leupeptin, Sigma (St. Louis, MO, USA)

Antikörper pSTAT-1, BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NY, USA)

Antikörper pSTAT-3, Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)

Antikörper STAT-1, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Antikörper STAT-3, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

2.1.4.1 Puffer

Lysispuffer:

50mM Hepes, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Na₄P₂O₇, 100mM NaF, 2 mM Sodium Othovanadat (pH 7,4), 1% Triton X100, 1mM PMSF, 20µM Leupeptin, 2µg/ml Aprotinin (2‰)

Probenpuffer:

0,1% DDT, 1% Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) in 0,1M Tris-HCl (pH 8,3)

Anode-I-Puffer:

0,3M Tris, 20% Methanol

Anode-II-Puffer:

0,025M Tris, 20% Methanol

Kathodenpuffer:

0,04M Aminohexansäure, 20% Methanol, 0,01% SDS

1,5% Tween20-PBS-Puffer:

0,1M Phosphat, 0,15M NaCl (pH 7,5), 1,5% Tween 20

Striplösung I:

2% SDS, 7M Urea, destilliertes Wasser

Striplösung II:

10% Essigsäure, destilliertes Wasser

2.1.5. RT-PCR und Gelextraktion

Random-Primer, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
DNTP 10mM, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
First-stranded Buffer, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
DTT 0,1M, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNase-Inhibitor, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Reverse Transkriptase = M-MLV, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PeqGOLD Universal Agarose, peqLab (Erlangen, Deutschland)
Trizma Base, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Borsäure, ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA)
EDTA (Titriplex III), Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Elektrophoresekammer Biometra Agargel Mini, Biometra (Göttingen, BRD)
100bp Marker, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Loading Dye Xylene Cyanole FF, Sigma (St. Louis, MO, USA)
Video Graphic Printer UP890CE, Intas (Göttingen, BRD)
MgSO₄, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
10xPuffer, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
DMSO, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DNTPs, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
TaqPolymerase, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Gelextraktionskit QIAquick, Qiagen (Hilden, Deutschland)
Primer (Sense, Antisense), Thermo Electron (Ulm, Deutschland)

2.1.6. Ligation und Transformation

TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

TOP 10 thermically competent E.coli, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

SOC-Medium, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Kanamycin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

Tryptone, Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)

Yeast Extract, Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland)

QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)

Nucleobond AX, Machery-Nagel (Easton, PA, USA)

2.1.7. RNA-Extraktion

Kühlzentrifuge EBA 12 R, Hettich-Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)

Trizol, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Chloroform, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Isopropylalkohol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

75% Ethanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.2. Methoden

2.2.1. Zelllinie, Zellkultur und stabile Transfektion

Die humane Hepatomzelllinie HepG2 wurde in RPMI 1640 Medium, welches mit 10% fetalem Kälberserum, 2mM Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin und 0,4% Amphotericin B versetzt wurde, in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Ein humaner SOCS-3 cDNA Klon, der die gesamte kodierende Sequenz enthielt (nt 104-808 Gen Bank Accesion No.AB004904), wurde in den TOPO TA Cloning Vektor kloniert und in den pCR3.1 Vektor subkloniert (7; 8). Ein humaner SOCS-1 cDNA Klon, der die gesamte kodierende Sequenz enthielt (Gen Bank Accesion No.U88326; freundliche Gabe von Dr.T.Wilson, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victoria, Australien), wurde in den pCR3.1 Vektor subkloniert. Alle Inserte wurden durch eine vollständige Sequenzierung verifiziert. Die stabile Transfektion der HepG2 Zellen wurde mit pCR3.1 alleine (pCR3.1/Kontrollvektor), pCR3.1/SOCS-1 oder pCR3.1/SOCS-3 mit Lipofectamin gemäß der Herstelleranleitung durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen in einem Selektionsmedium mit 1mg/ml Geneticin kultiviert. Nach vier Wochen wurden einzelne pCR3.1/Kontrollvektor, pCR3.1/SOCS-1 und pCR3.1/SOCS-3 transfizierte Zellen isoliert.

Alle Zellklone wurden weiterhin in Selektionsmedium mit 1mg/ml Geneticin in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Für die weiteren Versuche wurden jeweils drei Zellklone der Kontrollvektor-transfizierten, der SOCS-1-transfizierten und der SOCS-3-transfizierten Zellen

ausgewählt, die die stärkste Überexpression der Konstrukte im Northern Blot aufwiesen.

2.2.2. Northern Blot

Für die Northern Blots wurden etwa $1,8 \times 10^6$ HepG2 Zellen pro 100mmØ Zellkulturschale ausgesät und über 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden sie für weitere 24 Stunden in einem serumfreien RPMI 1640 Medium vorinkubiert. Darauf folgte nach Zugabe von frischem BSA-haltigem RPMI Medium die Stimulation mit 1000U/ml Interferon α über fünf Stunden. Nach Ablauf der Zeitspanne wurde die RNA mit TRIZOL extrahiert. Anschließend wurden jeweils 20 μ g der RNA in einem Formaldehydgel mit 1% Agarose aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zuletzt erfolgte das Crosslinking der RNA auf die Membran mit Hilfe von UV-Licht.

Die 2',5'-OAS-Probe (nt 470-894, GenBank Accession No.NM016817) und die MxA Probe (nt 391-1120, GenBank Accession No.NM002462) wurden mittels PCR generiert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt und die spezifischen Banden mit dem Gelextraktionskit QIAquick nach Herstelleranleitung extrahiert. Beide Fragmente wurden mittels Sequenzanalyse verifiziert. Für die β -Aktinprobe wurde β -actin DECAprobe, ein 1076kb langes Fragment des Mausgens, verwendet.

Die Vorhybridisierung der Membranen wurde mit Quick Hyb Solution über eine Stunde bei 68°C durchgeführt. Die Proben wurden unter Benutzung des DECAprimeII DNA labeling Kits mit [α -³²P]CTP markiert. Die auf diese Art radioaktiv markierten Proben wurden bei 95°C über zwei Minuten mit 100 μ l denaturierter Lachssperma DNA inkubiert und zu den vorhybridisierten Membranen hinzugefügt. Es folgte eine Hybridisierung über Nacht bei ebenfalls

68°C. Anschließend wurden die Membranen zweimal für 15 Minuten in 2xSSC-0,1%SDS bei Raumtemperatur und über 30 Minuten in 0,1xSSC-0,1%SDS bei 60°C gewaschen.

Mit diesen Membranen wurden Kodak Biomax MS Filme bei -70°C für ein bis vier Tage belichtet.

2.2.3. Luciferase-Assay

Für die Luciferase-Assays wurden etwa $0,30 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 6-Well Zellkulturschale ausgesät und über 24 Stunden kultiviert. Für die transiente Transfektion wurden ein -970nt h2',5'-OAS-Promotorluciferasekonstrukt im pGL2-BV Vektor (143) (freundliche Gabe von Dr. G. Floyd-Smith, Arizona-State University, Tempe, Arizona, USA) oder ein -553/+10 hMxA-Promotorluciferasekonstrukt im pGL2-BV Vektor (100) (freundliche Gabe von Dr. D. Kremsdorf, INSERM U.370, Paris, Frankreich) verwendet. Die transiente Transfektion wurde mittels FuGENE 6 und jeweils 2µg DNA nach Herstellerprotokoll in 100µl OPTIMEM pro Well über 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde das Transfektionsmedium durch BSA-haltiges RPMI 1640 Medium ersetzt, in dem die Zellen über 24 Stunden kultiviert wurden. Nach erneutem Mediumwechsel erfolgte die Zugabe von 1000U/ml Interferon α und eine Inkubation über sechs Stunden.

Die Aufbereitung der Zellen und die Messung der Luciferaseaktivitäten erfolgte mittels des Luciferase Assay Kits nach Protokoll des Herstellers.

Auch die Transfektion mit dem -2757/+929 mSOCS-3-Promotorkonstrukt im pGL3-BV Vektor (8) erfolgte mit der oben beschriebenen Methode.

2.2.4. β -Galaktosidase-Assay

Die transiente Transfektion der HepG2 Zellklone für den β -Galaktosidase-Assay erfolgte jeweils zeitgleich mit jeder wie oben beschriebenen Transfektion für den Luciferase-Assay.

Es wurden ebenfalls pro Well einer 6-Well Zellkulturschale 2 μ g DNA des pSV- β -Galactosidase Control Vectors verwendet.

Nach Aufbereitung der Zellen zum Luciferase-Assay erfolgte die Messung der β -Galaktosidase Aktivitäten mittels des β -Galactosidase Enzyme Assay System gemäß Herstelleranleitung.

2.2.5. Proteinextraktion und Western Blot Analyse

Für die Western Blots wurden etwa $1,8 \times 10^6$ HepG2 Zellen pro 100mm \emptyset Zellkulturschale ausgesät und über 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden sie für weitere 24 Stunden in einem serumfreien RPMI 1640 Medium vorinkubiert. Darauf folgte nach Zugabe von frischem BSA-haltigem Medium die Stimulation mit 1000U/ml Interferon α über 15 Minuten. Danach wurden die Zellen mit 500 μ l Lysispuffer (50mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM EDTA, 10mM Na₄P₂O₇, 100mM NaF und 2mM Natriumorthovanadate, pH 7,4) pro Zellkulturschale, dem 1% Triton X-100, 1mM Phenylmethylsulfonylfluoride, 2 μ g/ml Aprotinin, 20 μ M Leupeptin hinzugefügt wurde, lysiert. Die Lysate wurden bei 13000g über zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit SDS Sample Puffer (0,25M Tris HCl, 40% Glycerol, 2% Natriumdodezylsulfat (SDS), 1% Dithiothreitol, Bromphenolblau pH 8,8) 1:2 verdünnt. Die Proben wurden für fünf Minuten

gekocht und anschließend auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden innerhalb von 60 Minuten auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Die Membran wurde für 30 Minuten in TBS-T Puffer (0,02M Tris HCl, 0,15M NaCl, 2% Tween 20, 0,01% Natriumacid) geblockt. Die jeweilige geblockte Membran wurde über Nacht mit Antikörpern gegen pSTAT-1 (1:20000) und pSTAT-3 (1:20000) inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden die Membranen mit einem Peroxidase-konjugiertem Antikörper (1:25000) über zwei Stunden inkubiert.

Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen, über 30 Minuten in ein chemilumineszierendes Substrat getaucht und einem XOMAT-AR Film ausgesetzt. Nach einem Stripping der Membran erfolgte eine erneute Inkubation mit den Antikörpern gegen STAT-1 (1:20000) und STAT-3 (1:20000) wie oben beschrieben.

2.2.6. RT-PCR und Sequenzierung

Als Ausgangsprodukt für die RT-PCR wurde mRNA humaner HepG2 Zellen verwendet. Die reverse Transkription wurde mit der M-MLV Reverse Transcriptase gemäß Gebrauchsanweisung durchgeführt.

Die darauf folgende PCR wurde wie folgt durchgeführt: Nach einer initialen Denaturierung bei 94°C über drei Minuten folgten 40 Zyklen mit jeweils einer Minute Denaturierung bei 94°C, einer Minute Annealing bei entsprechender Temperatur und einer Minute Extension bei 72°C. Zum Abschluss erfolgte ein Elongationsschritt von sieben Minuten bei 72°C.

	GenBank Accesion Number	Sense Primer	Antisense Primer	Annealing- Temperatur
hMxA Nukleotide	NM 002462	5'-TCA CTG CAT TCT AGT TGT GG-3'	5'-ATA GAA TGG CGC CGG GCC TTT-3'	60°C
h2',5'-OAS Nukleotide	NM 016817	5'-CCA GCC CCT GGA TCT ATC GA-3'	5'-TGG CCT CGC TGA TTG GAC CT-3'	61,5°C

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primer

Nach der PCR erfolgte eine Identifikation der entsprechenden Banden nach Auftrennung durch Elektrophorese in einem 1%igem Agarosegel. Die spezifischen Banden wurden aus dem Gel mittels dem Gelextraktionskit QIAquick nach Herstelleranleitung extrahiert und anschließend im Institut für klinische Chemie im Klinikum Großhadern, München sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die Sequenzidentität.

2.2.7. Ligation und Transformation zur Vektorvermehrung

Die Vektorvermehrung der verwendeten Luciferasepromotorkonstrukte von MxA und 2',5'-OAS erfolgte in TOP 10 chemically competent E.coli mit Hilfe des TOPO TA cloning Kit (PCR 2.1) nach Gebrauchsanweisung. Die subklonierten Bakterienzellen wurden auf Platten mit LB-Medium und

Kanamycin ausgebracht und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Eine Transformationskontrolle erfolgte mittels X-Gal. Am nächsten Tag wurden einzelne positiv transformierte Zellklone ausgewählt und wiederum über Nacht in flüssigem LB-Medium plus 50µg/ml Kanamycin inkubiert. Es folgte eine Extraktion der Nukleinsäuren mit Hilfe des Maxiprepkits Nucleobond AX gemäß Gebrauchsanleitung.

2.2.8. Statistik

Für die Densitometrie der spezifischen Banden in den Northern und Western Blot Analysen wurde die National Institutes of Health Image 1,59 Software verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit der JMP 5.0.1 Software durchgeführt.

Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler der unabhängigen Experimente angegeben. Die statistischen Analysen des paarweisen Vergleichs zwischen dem Mittel einer Gruppe und dem Mittel der Kontrollgruppe wurden mit dem Student's t-test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ angesehen.

Bei allen Versuchen wurden jeweils drei verschiedene Klone pro Gruppe verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. STAT-1 und STAT-3 Tyrosin-Phosphorylierung

Zum Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-3 wurden HepG2-Zellklone mit 1000 U/ml Interferon α inkubiert. Nach einer Stimulationsdauer von 15 Minuten wurde nach Durchführung einer Proteinextraktion mit Hilfe der Western Blot Technik die Tyrosin-Phosphorylierung der STAT-Proteine verifiziert. Diese Versuchsanordnung wurde viermal durchgeführt.

Die durch densitometrische Messungen gewonnenen Messwerte der Tyrosinphosphorylierung des Kontrollklons pCR3.1/Kontrollvektor, Klon1 wurden als Referenzwert gleich eins gesetzt. Die Werte vor und nach der Interferon-Stimulation für die weiteren HepG2-Zellklone wurden als Vielfache dieses Referenzwertes berechnet.

Bei den drei Kontrollvektor-transfizierten Zellklonen zeigte sich nach Interferonstimulation ein 3- bis 6-facher Anstieg der STAT-1 Tyrosin-Phosphorylierung und ein 4- bis 5-facher Anstieg der STAT-3 Tyrosin-Phosphorylierung (Abb. 2 und Abb. 3).

Im Gegensatz dazu wiesen die SOCS-1- bzw. SOCS-3-überexprimierenden Zellklone nach Interferon-Stimulation nur einen 1- bis 2-fachen Anstieg bei der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT-1 auf (Abb. 2). Die STAT-3 Tyrosin-Phosphorylierung zeigte sich in den SOCS-1- bzw. SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen nahezu vollständig supprimiert (Abb. 3).

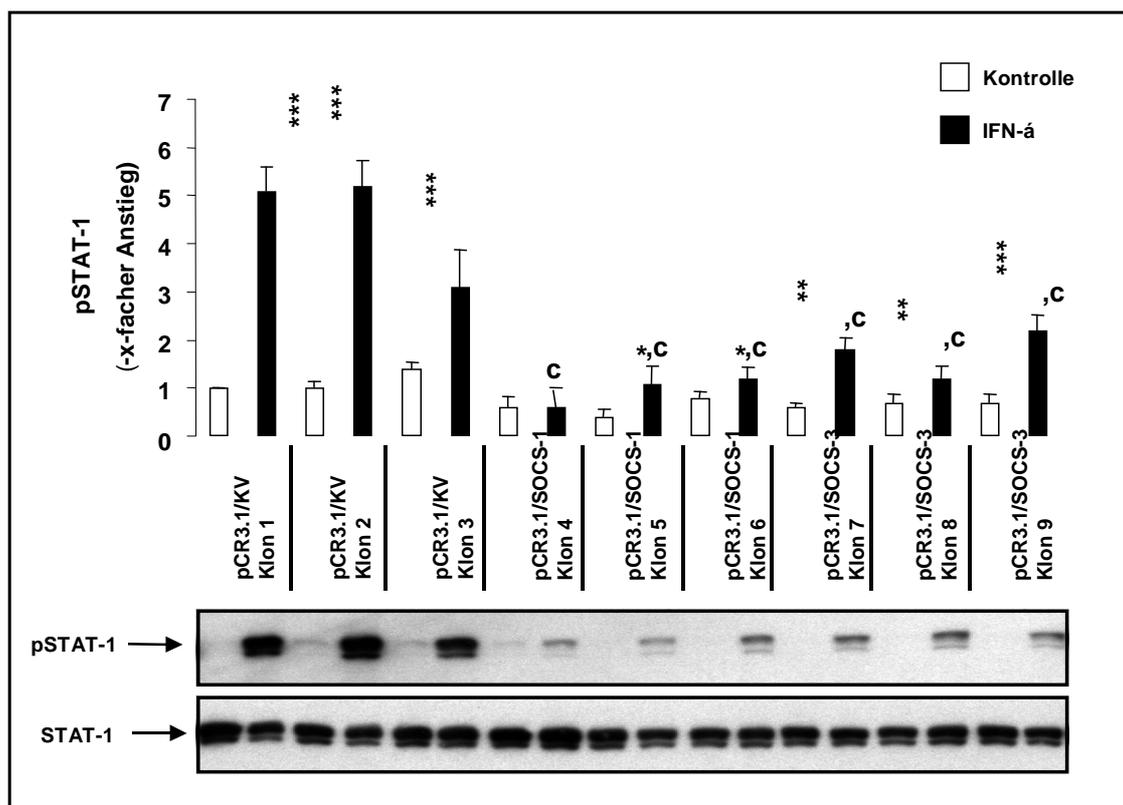


Abbildung 2:

Interferon α -induzierte STAT-1 Phosphorylierung in SOCS-1 und SOCS-3 überexprimierenden HepG2-Zellklonen

oben: Nach einer Inkubation der Zellen mit Interferon α über 15min zeigte sich in den Kontrollklonen pCR3.1/Kontrollvektor (KV), Klon 1-3 eine signifikante Zunahme der STAT-1 Phosphorylierung. In den SOCS-1 (pCR3.1/SOCS-1, Klon 4-6) und den SOCS-3 (pCR3.1/SOCS-3, Klon 7-9) überexprimierenden Zellklonen konnte kein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden.

* $p < 0,05$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

** $p < 0,01$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

*** $p < 0,001$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

^c $p < 0,001$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Interferon α

unten: Abbildung eines repräsentativen Western Blots der vier durchgeführten Experimente

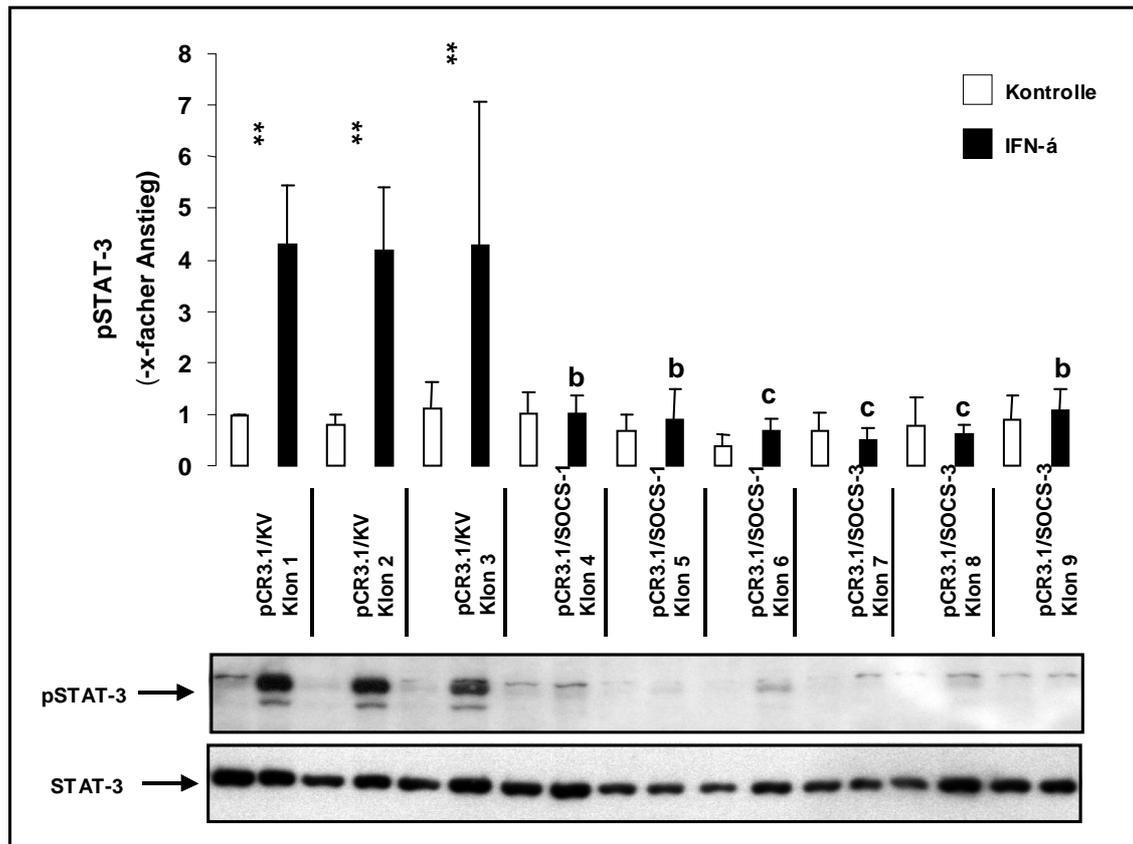


Abbildung 3:

Interferon α -induzierte STAT-3 Phosphorylierung in SOCS-1 und SOCS-3 überexprimierenden HepG2-Zellklonen

oben: Nach einer Inkubation der Zellen mit Interferon α über 15min zeigte sich in den Kontrollklonen pCR3.1/Kontrollvektor(KV), Klon 1-3 eine signifikante Zunahme der STAT-3 Phosphorylierung. In den SOCS-1 (pCR3.1/SOCS-1, Klon 4-6) und den SOCS-3 (pCR3.1/SOCS-3, Klon 7-9) überexprimierenden Zellklonen blieben die Basalwerte nahezu unverändert.

*** $p < 0.01$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle*

^b $p < 0,01$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Interferon α

^c $p < 0,001$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Interferon α

unten: Abbildung eines repräsentativen Western Blots der vier durchgeführten Experimente

3.2. Vorversuche zur Interferon-stimulierten Expression der antiviralen Proteine MxA und 2'5'-OAS

3.2.1. Promotoraktivität

Um die Zeitpunkte der maximalen Stimulation der Promotoraktivität von 2',5'-OAS und MxA durch Interferon α zu finden, wurde eine Inkubation mit 1000 U/ml bzw. 8000 U/ml Interferon α über 6, 8, 10 und 24 Stunden durchgeführt.

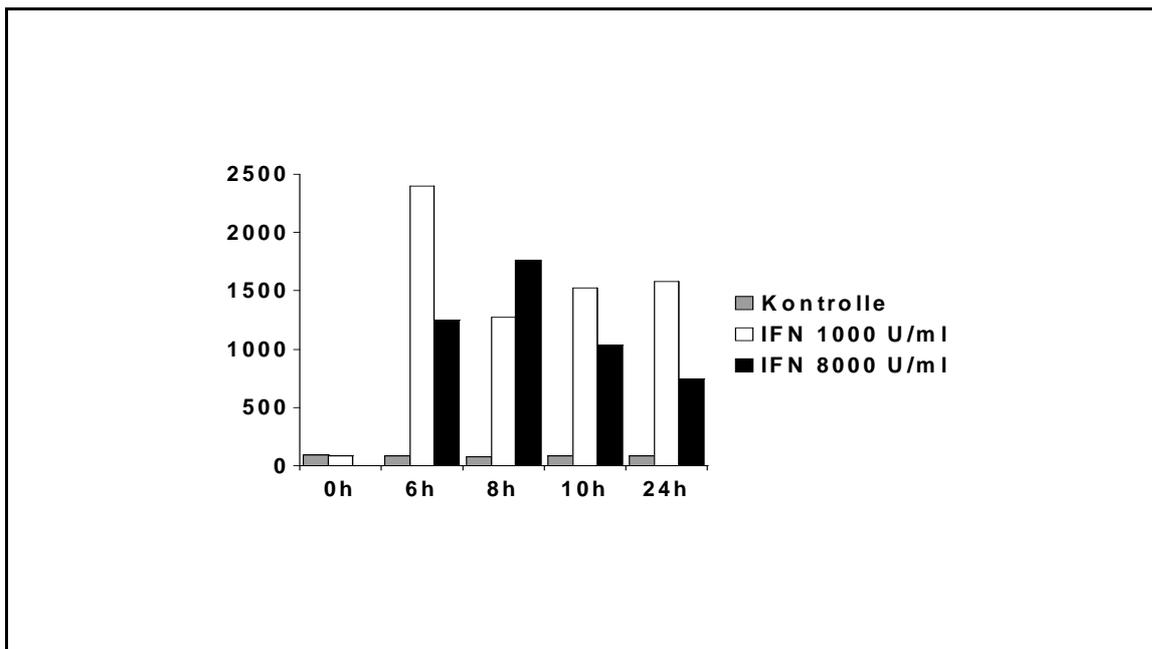


Abbildung 4:

Zeitverlauf der 2',5'-OAS-Promotoraktivität nach Interferon α Stimulation

Maximale Werte der Promotoraktivität konnten bei einer Interferonkonzentration von 1000 U/ml zum Zeitpunkt sechs Stunden nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich für die MxA Promotoraktivität (Daten nicht gezeigt).

Es zeigte sich nach Durchführung des Luciferase Assay Systems eine maximale Steigerung der Promotoraktivität nach sechs Stunden bei einer Interferonkonzentration von 1000 U/ml (Abb. 4).

Daher wurde dieser Zeitpunkt und eine Interferonkonzentration von 1000 U/ml für die nachfolgenden Experimente gewählt.

3.2.2. Genexpression

Um die Zeitpunkte der maximalen Stimulation der Genexpression von 2',5'-OAS und MxA durch Interferon α zu finden, wurde eine Inkubation mit 1000 U/ml Interferon α über 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden durchgeführt.

Es zeigte sich mit Hilfe der Northern Blot Technik in je vier Versuchen für 2',5'-OAS und MxA stets eine maximale Stimulation der Genexpression bei vier und sechs Stunden (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde als Stimulationsdauer für die nachfolgenden Experimente fünf Stunden gewählt.

3.3. 2',5'-OAS Promotoraktivität und Genexpression

3.3.1. Promotoraktivität

Zum Nachweis der 2',5'-OAS-Promotoraktivität wurden HepG2 Zellklone mit 1000 U/ml Interferon α inkubiert. Nach einem Zeitraum von sechs Stunden wurde mit Hilfe des Luciferase-Assays die Promotoraktivität untersucht. Es wurden vier unabhängige Versuche mit jeweils $n=3$ je Zellklon pro Versuch durchgeführt.

Der Kontrollwert des Klons pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1 wurde gleich eingesetzt und die gemessenen Werte der weiteren Zellklone wurden als ein Vielfaches dieses Referenzwertes berechnet.

Es zeigte sich in den Kontrollvektor-transfizierten Klonen ein 40- bis 80-facher Anstieg der Promotoraktivität unter Interferon α Stimulation. Im Gegensatz dazu gab es nahezu keinerlei Aktivitätserhöhung bei den SOCS-1- und SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen (Abb. 5).

3.3.2. Genexpression

Zum Nachweis der 2',5'-OAS-Genexpression wurden HepG2 Zellklone mit 1000 U/ml Interferon α inkubiert. Nach einem Zeitraum von fünf Stunden wurde mit Hilfe der Northern Blot-Technik die Genexpression verifiziert. Es wurden zwei Versuche durchgeführt.

Nach densitometrischer Auswertung wurde das Verhältnis des mRNA-Messwertes von 2',5'-OAS zu demjenigen von β -Aktin berechnet. Dieser

relative Messwert für die 2',5'-OAS-Genexpression des Klons pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1 diente als Referenzwert und wurde gleich eins gesetzt. Die weiteren gemessenen Werte werden als Vielfache dieses Referenzwertes angegeben.

Bei den Kontrollklonen zeigte sich ein 20-facher Anstieg der Genexpression nach der Interferonstimulation. In den SOCS-1-überexprimierenden Zellklonen war dieser Effekt vollständig aufgehoben. In den SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen zeigte sich nur ein schwacher Anstieg (Abb. 5).

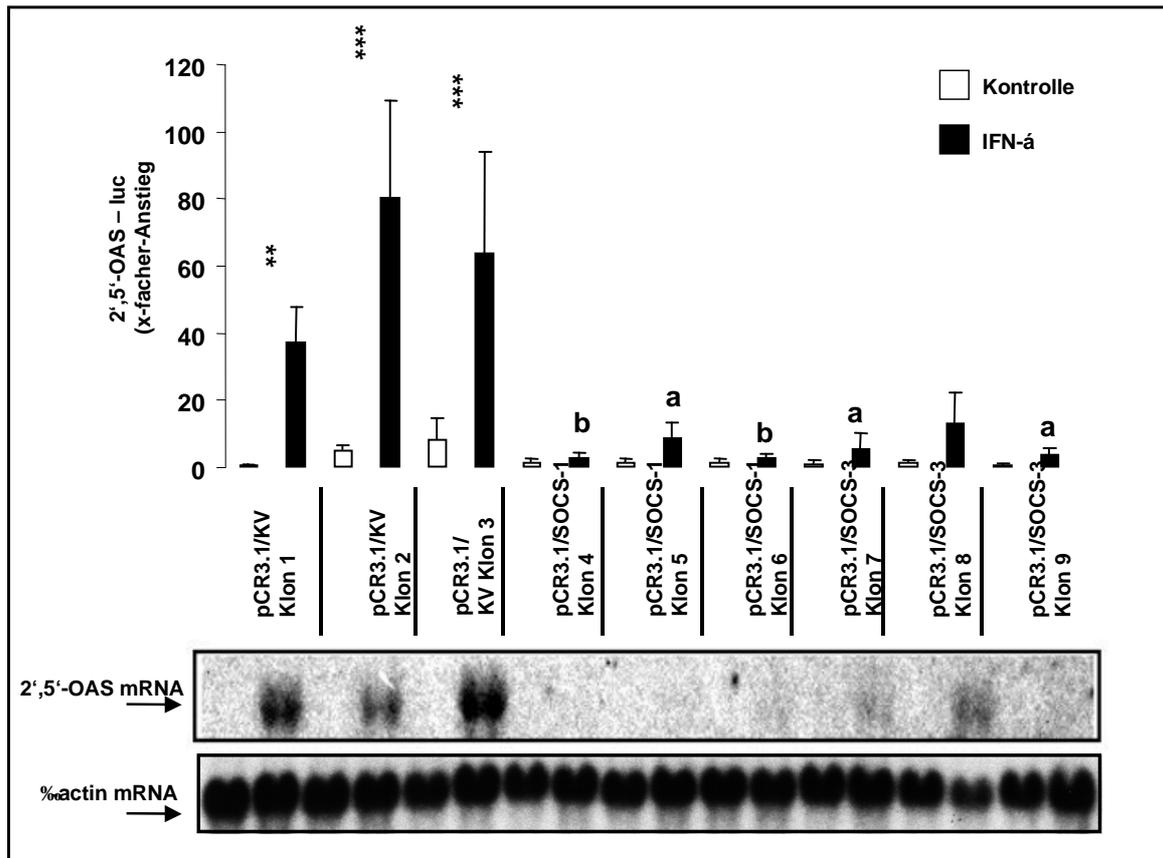


Abbildung 5:

Interferon α -induzierte 2',5'-OAS Promotoraktivität und Genexpression in SOCS-1 und SOCS-3 überexprimierenden HepG2 Zellklonen

oben: Im Luciferase-Assay zeigt sich in den Kontrollvektor(KV)-transfizierten Klonen pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1-3 ein signifikanter Anstieg der Promotoraktivität von 2',5'-OAS. In den SOCS-1 überexprimierenden Klonen (pCR3.1/SOCS-1, Klon 4-6) und den SOCS-3 überexprimierenden Klonen (pCR3.1/SOCS-3, Klon 7-9) ließ sich dagegen keine Stimulation der Promotoraktivität nachweisen.

** $p < 0,01$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

*** $p < 0,001$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon1, Kontrolle

^a $p < 0,05$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Interferon α

^b $p < 0,01$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Interferon α

unten : Ein repräsentativer Northern Blot der zwei durchgeführten Experimente

3.4. MxA-Promotoraktivität und Genexpression

3.4.1. Promotoraktivität

Zum Nachweis der MxA-Promotoraktivität wurden HepG2 Zellklone mit 1000 U/ml Interferon α inkubiert. Nach einem Zeitraum von sechs Stunden wurde mit Hilfe des Luciferase-Assays die Promotoraktivität untersucht. Es wurden vier unabhängige Versuche mit jeweils $n=3$ je Zellklon pro Versuch durchgeführt. Der Kontrollwert des Klons pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1 wurde gleich eingesetzt und die gemessenen Werte der weiteren Zellklone als ein Vielfaches dieses Referenzwertes berechnet.

Es zeigte sich in den Kontrollvektor-transfizierten Klonen eine 10- bis 35-fache Erhöhung der MxA-Promotoraktivität unter Interferon-Stimulation. In den SOCS-1- und SOCS-3-überexprimierenden Klonen ließ sich hingegen keine signifikante Stimulation nachweisen (Abb. 6).

3.4.2. Genexpression

Zum Nachweis der MxA-Genexpression wurden HepG2 Zellklone mit 1000 U/ml Interferon α inkubiert. Nach einem Zeitraum von fünf Stunden wurde mit Hilfe der Northern Blot-Technik die Genexpression verifiziert. Es wurden zwei Versuche durchgeführt.

Nach densitometrischer Auswertung wurde das Verhältnis des mRNA-Messwertes von MxA zu demjenigen von β -Aktin berechnet. Dieser relative Messwert für die MxA-Genexpression des Klons pCR3.1/Kontrollvektor, Klon1

diente als Referenzwert und wurde gleich eins gesetzt. Die weiteren gemessenen Werte werden als Vielfache dieses Referenzwertes angegeben

Die Kontrollvektor-transfizierten Zellklone wiesen nach der Interferonstimulation eine 7- bis 15-fache Steigerung der MxA mRNA-Menge auf. Die SOCS-1-überexprimierenden Zellklone dagegen zeigten nahezu keine Stimulation der Genexpression. In den SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen allerdings konnte eine etwa 10-fache Erhöhung der Genexpression nach der Interferonstimulation nachgewiesen werden (Abb. 6).

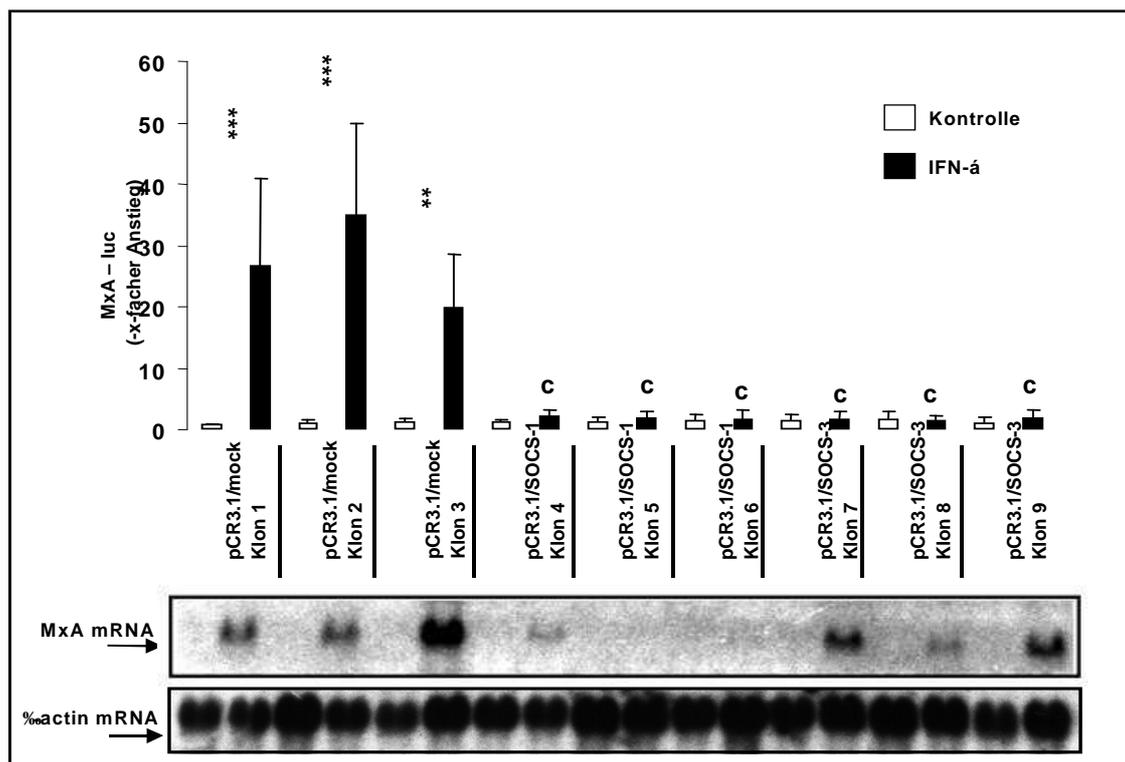


Abbildung 6:

Interferon α -induzierte MxA-Promotoraktivität und Genexpression in SOCS-1 und SOCS-3 überexprimierenden HepG2 Zellklonen

oben: Im Luciferase-Assay zeigte sich in den Kontrollvektor-transfizierten Klonen pCR3.1/Kontrollvektor (KV), Klon 1-3 ein signifikanter Anstieg der Promotoraktivität von MxA. In den SOCS-1 überexprimierenden Klonen pCR3.1/SOCS-1, Klon 4-6 und den SOCS-3 überexprimierenden Klonen pCR3.1/SOCS-3, Klon 7-9 lies sich dagegen keine signifikante Stimulation der Promotoraktivität nachweisen.

** $p < 0,01$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

*** $p < 0,001$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

^c $p < 0,001$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Interferon α

unten : Ein repräsentativer Northern Blot der zwei durchgeführten Experimente

3.5. Induktion der mSOCS-3 Promotoraktivität durch Interferon α , PMA und Bu₂cAMP

Die SOCS-3-Expression wird durch STAT-abhängige und STAT-unabhängige Mechanismen reguliert. Um eine allgemein verminderte Ansprechbarkeit der Zellklone auf Interferon aufgrund der Transfektion auszuschließen, wurden die verschiedenen Auswirkungen einer Stimulation dieser Zellen mit Interferon α , PMA und Bu₂cAMP auf ein SOCS-3-Promotor-Luciferasekonstrukt untersucht. Hiervon benutzt nur Interferon α die Jak-STAT-Signalkaskade für die zelluläre Signaltransduktion. Eine Stimulation mit PMA wird über den p38MAPK-Signalweg und eine Stimulation mit Bu₂cAMP über den cAMP-Signalweg vermittelt. In diese beiden Signalkaskaden greifen SOCS-1 und SOCS-3 nicht negativ regulierend ein. Der verwendete SOCS-3-Promotor enthält korrespondierende Elemente sowohl für einen STAT-vermittelten Signalweg als auch für einen p38MAPK (16) und cAMP (19) vermittelten Signalweg. Für den Versuch wurden Interferon α in einer Konzentration von 1000U/ml, PMA in einer Konzentration von 100nM und Bu₂cAMP in einer Konzentration von 5mM verwendet und die Effekte dieser Substanzen auf die Aktivität des -2757/+929 nt umspannenden SOCS-3-Promotorkonstruktes untersucht. Alle Versuche wurden dreimal unabhängig mit jeweils n=3 je Zellklon durchgeführt. Der Basalwert des Klons pCR3.1/Kontrollvektor, Klon1 wurde gleich eingesetzt und diente als Referenzwert zur Berechnung der restlichen Werte.

Es zeigte sich in den drei Kontrollvektor-transfizierten Zellklonen eine 10- bis 25-fache Stimulation durch Interferon α , eine 5- bis 20-fache Stimulation durch PMA und eine 8- bis 17-fache Stimulation durch Bu₂cAMP.

In den SOCS-1- bzw. SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen dagegen zeigte sich keinerlei Aktivitätssteigerung durch Interferon α ; allerdings konnte eine deutliche Aktivitätssteigerung durch PMA hervorgerufen werden. Diese betrug

das 7- bis 14-fache bei in den SOCS-1-transfizierten Zellklonen und das 12- bis 17-fache in den SOCS-3-transfizierten Zellklonen. Ähnlich zeigten sich die Ergebnisse der Experimente mit Bu₂cAMP; es konnte ein 8- bis 14-facher Aktivitätsanstieg in den SOCS-1-transfizierten Zellklonen und ein 8- bis 22-facher Aktivitätsanstieg in den SOCS-3-transfizierten Zellklonen nachgewiesen werden (Abb. 7). Somit zeigt sich ein spezifischer inhibitorischer Effekt der SOCS-Expression auf die STAT-abhängigen Signalkaskade von Interferon α , jedoch nicht auf die STAT-unabhängigen Signalkaskaden von PMA bzw. Bu₂cAMP. Ein unspezifischer generell inhibitorischer Effekt der SOCS-Überexpression in den transfizierten Zellen konnte damit ausgeschlossen werden.

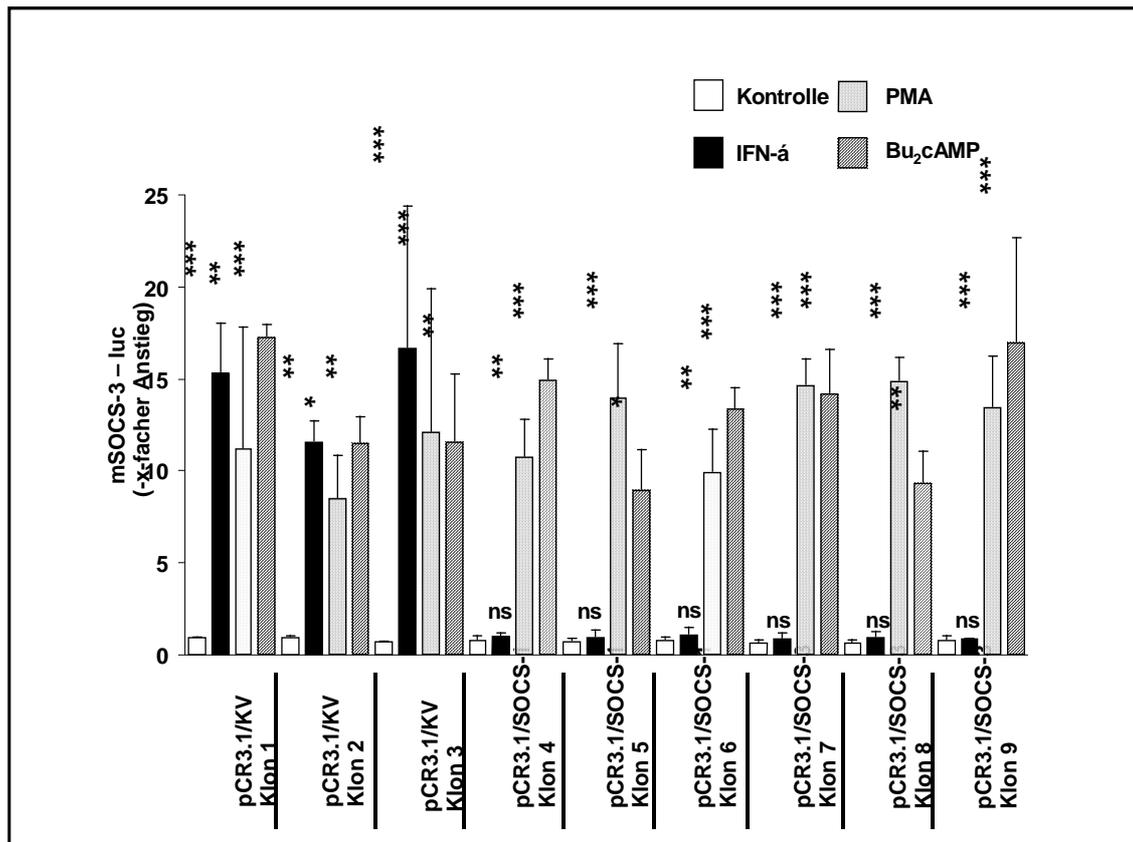


Abbildung 7:

Interferon α , PMA und Bu₂cAMP induzierte Aktivität des mSOCS-3 Promotors in SOCS-1 und SOCS-3 überexprimierenden HepG2 Klonen

In den Kontrollvektor-transfizierten Zellklonen pCR3.1/Kontrollvektor (KV), Klon 1-3 kommt es bei allen drei Substanzen zu einer signifikanten Steigerung der mSOCS-3 Promotoraktivität. In den SOCS-1 (pCR3.1/SOCS-1, Klon 4-6) und den SOCS-3 (pCR3.1/SOCS-3, Klon 7-9) überexprimierenden Klonen kommt es nur nach Stimulation mit PMA und Bu₂cAMP zu einer signifikanten Zunahme der Promotoraktivität; die STAT-abhängige Interferon-Signalkaskade wird dagegen vollständig inhibiert.

* $p < 0,05$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

** $p < 0,01$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

*** $p < 0,001$ vs. pCR3.1/Kontrollvektor, Klon 1, Kontrolle

3.6. β -Galaktosidaseaktivität nach Transfektion

Auch nach der transienten Transfektion der Zellen über sechs Stunden mit dem psV- β -Galactosidase Control Vektor wurde der Wert des Zellklons pCR3.1/Kontrollvektor Klon 1 gleich eins gesetzt und diente so als Referenzwert. Die übrigen Messwerte wurden als Vielfaches dieses Referenzwertes berechnet.

Es zeigte sich in allen transfizierten Zellen eine gleichmäßige Transfektionsrate (Daten nicht gezeigt). Deshalb ist davon auszugehen, dass die oben dargestellten Unterschiede in den einzelnen Gruppen nicht durch eine unregelmäßige Transfektion hervorgerufen werden.

4. Diskussion

In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zelluläre Überexpression von SOCS-1 und SOCS-3 zur Suppression der Interferon-induzierten STAT-Phosphorylierung und zur Suppression der STAT-abhängigen und Interferon-induzierten Genexpression der antiviralen humanen Proteine 2',5'-OAS und MxA führt.

Seit seiner Entdeckung im Jahre 1989 hat sich das Hepatitis C-Virus als Hauptursache für viele Fälle der transfusions-assoziierten Hepatitis und der sporadischen nonA-nonB-Hepatitis herauskristallisiert (53; 64; 100; 105). Hepatitis ist heute weltweit eine der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen, Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (92; 105). Derzeit ist Interferon α eines der wichtigsten Therapeutika in der Therapie der chronischen Hepatitis C. Zwar konnten in den letzten Jahren steigende Erfolgsraten durch den Einsatz von pegyliertem Interferon (ein Interferon α Molekül verbunden mit einem Polyethylen glycol-Molekül-daraus resultiert eine längere Wirksamkeit und eine nur einmal wöchentliche Injektion) in Kombination mit Ribavirin (ein synthetisches Guanodin-Analogon) erreicht werden, dennoch sprechen weiterhin etwa 20-50% der Patienten nicht auf diese Kombinationstherapie an (92). Die Ursachen des Therapieversagens scheinen multifaktoriell bedingt zu sein. Es wird über mögliche virale Faktoren, aber auch über Patientenfaktoren berichtet. So zeigen die Genotypen 2 und 3 des Hepatitis C Virus eine deutlich höhere Ansprechrate auf die Kombinationstherapie als die Genotypen 1 und 4 (32; 80). Weiter sind virale Proteine beschrieben, die einen inhibitorischen Effekt auf das Interferonsystem zeigen (15; 39; 43; 44; 46; 53; 78; 101; 102; 134; 141). Ein Einfluß dieser viralen Proteine ist zum einen auf der Ebene der Jak-STAT-Signalkaskade

beschrieben. So konnte eine Hemmung des Interferon-Signalweges unterhalb der STAT-Phosphorylierung gezeigt werden (53). Dies wird durch Verhinderung der Bindung des STAT-Transskriptionsfaktor-Komplexes IGSF3 an die Promotoren der Interferon-abhängigen Gene vermittelt (15). Zum anderen interferieren beispielsweise das virale Protein NS5A oder ein kurzes Stück des E2-Hüllenglykoprotein des Virus mit dem Interferon-induzierbarem antiviralem Effektorprotein PKR (42; 43; 101; 134). Weiter wurde eine Induktion der IL-8-Expression und eine darauffolgende Suppression der 2',5'-OAS-Aktivität trotz Interferon α Präsenz nachgewiesen (46; 101). Auch Patientenfaktoren wie männliches Geschlecht, hohes Alter und Zugehörigkeit zu bestimmten ethnischen Gruppen, wie beispielsweise zur Population der Afroamerikaner, oder ein erhöhter TNF α Spiegel im Blut beeinflussen ebenfalls eine erfolgreiche Interferon-Ribavirin-Therapie (70; 80; 83; 97). Die zugrundeliegenden molekularen Zusammenhänge bei Therapieversagen oder schlechtem Ansprechen sind allerdings kaum verstanden.

Die antivirale Wirkung von Interferon wird vor allem über die Jak-STAT-Signalkaskade vermittelt. Dadurch erscheint eine Blockade der Jak-STAT-Signalkaskade ein durchaus effektiver Weg für das Hepatitis C Virus zur Abwehr der antiviralen Interferon-induzierten Effekte zu sein. Interferenzen des Hepatitis C Virus mit dieser Signalkaskade konnten kürzlich gezeigt werden. Dabei kommt es zur oben beschriebenen Blockade der IGSF3 Bindung an die dazugehörigen Promotoren und der Aktivierung von STAT-1/STAT-3-Dimeren (15; 30). In einer weiteren Studie wurde eine Induktion der SOCS-3 mRNA-Expression und eine erhöhte Transkriptionsaktivität des SOCS-3 Promotor/Luciferase Reporter Gens durch Hüllproteine des Hepatitis C Virus beschrieben (16). Auf Grund dieser Mechanismen ergibt sich die Annahme, dass eine erhöhte zelluläre SOCS-Expression einer der möglichen molekularen Mechanismen sein könnte, die eine Interferonresistenz unter Therapie bedingen.

SOCS-Proteine konnten bereits in anderen Modellen als Ursache für eine Interferonresistenz beschrieben werden (16; 20; 120).

Um diese Hypothese zu testen und den Einfluß von SOCS-1 und SOCS-3 auf die antiviralen Proteine 2',5'-OAS und MxA zu zeigen, wurden durch stabile Transfektion humane HepG2 Zellen, die entweder SOCS-1 oder SOCS-3 überexprimieren, erzeugt. SOCS-1 und SOCS-3 wurden aus der Familie der SOCS-Proteine ausgewählt, da beide zum einen als die potentesten und zum anderen als die am besten untersuchten Inhibitoren der Jak-STAT-Signalkaskade gelten (124).

Wie bereits in zahlreichen Studien beschrieben, geht die Blockierung des Jak-STAT-Signalweges durch die SOCS-Proteine mit einer Suppression der Tyrosin-Phosphorylierung der STAT-Proteine einher (31; 81; 91; 94; 114; 131; 147). Dies konnte auch in obigen Versuchen nachgewiesen werden. So zeigt sich in den SOCS-1- und den SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen im Gegensatz zu den Kontrollvektor-transfizierten Zellen eine deutliche Hemmung der STAT-1-Phosphorylierung (Abb. 2). Bei der STAT-3-Phosphorylierung konnte sogar eine nahezu komplett aufgehobene Phosphorylierung in den SOCS-1 und den SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen nachgewiesen werden (Abb. 3). Dieses Ergebnis beweist auch eine erfolgreiche Transfektion der Zellen mit dem PCR3.1/SOCS-1- bzw. dem PCR3.1/SOCS-3-Vektor-konstrukt.

Zum Nachweis der mRNA-Expression des antiviralen Proteins 2',5'-OAS wurden die HepG2 Zellklone mit Interferon α über fünf Stunden inkubiert. Nach Durchführung der Northern Blot Analyse zeigte sich in den Kontrollvektor-transfizierten Zellen ein deutlicher Anstieg der Genexpression der 2',5'-OAS. In den SOCS-1-überexprimierenden Zellklonen war die Interferon α -induzierte Genexpression von 2',5'-OAS komplett aufgehoben (Abb. 5). In den SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen zeigte sich im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor-transfizierten Zellklonen eine signifikante Reduktion der

mRNA-Expression des antiviralen Proteins 2',5'-OAS. Für den Nachweis der Promotoraktivität der 2',5'-OAS erfolgte eine sechsstündige Inkubation der Zellklone mit Interferon α . Hier konnte nach Durchführung des Luciferase-Assays in den Kontrollvektor-transfizierten Zellklonen ein deutlicher Anstieg der Promotoraktivität unter Interferon α Stimulation für das Protein 2',5'-OAS nachgewiesen werden. In den SOCS-1 und SOCS 3 überexprimierenden Zellklonen dagegen kam es zu nahezu keinerlei Aktivitätserhöhung der Promotoraktivität des 2',5'-OAS Gens (Abb. 5). Es ist hervorzuheben, dass sowohl in den SOCS-1- als auch in den SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen eine fast vollständige Suppression der 2',5'-OAS-Promotoraktivität vorliegt.

Auch zum Nachweis der mRNA-Expression des antiviralen Proteins MxA wurde ebenso wie für das Protein 2',5'-OAS eine fünfstündige Inkubation der Zellklone mit Interferon α und eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich in den Kontrollvektor-transfizierten Zellklonen ähnlich wie oben für 2',5'-OAS beschrieben ein deutlicher Anstieg der m-RNA-Expression von MxA. In den SOCS-1-überexprimierenden Zellklonen zeigt die Interferon α induzierte Genexpression von MxA kaum eine Änderung gegenüber dem Basalwert (Abb. 6). In den SOCS-3 überexprimierenden Zellklonen dagegen konnte zwar eine Suppression der Interferon α induzierten Genexpression von MxA nachgewiesen werden, die allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen der 2',5'-OAS Analysen nicht signifikant ist. Ebenso wie beim Nachweis der Promotoraktivität der 2',5'-OAS wurde eine sechsstündige Inkubation mit Interferon α und anschließend ein Luciferase-Assay durchgeführt. Es zeigte sich nach Durchführung des Luciferase Assays in den Kontrollvektor-transfizierten Zellen ein deutlicher Anstieg der Promotoraktivität unter Interferon α Stimulation für MxA. Im Gegensatz dazu kam es sowohl in den SOCS-1- als auch den SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen zu nahezu keinerlei Aktivitätserhöhung der Promotoraktivität (Abb. 6). Dabei ist hervorzuheben, dass sowohl in den SOCS-1- als auch den SOCS-3-überexprimierenden

Zellklonen eine nahezu komplette Suppression der Promotoraktivitäten nachzuweisen ist.

Bei der Suppression der Interferon-induzierten Genexpression zeigt sich allerdings ein Unterschied zwischen den SOCS-1 und SOCS-3 überexprimierenden Zellklonen in den Untersuchungen zu den beiden antiviralen Proteinen. Möglicherweise werden diese Beobachtungen durch weitere regulatorische Elemente, die nicht innerhalb der Promotorsequenz des für diese Studie verwendeten MxA-Promotors liegen, verursacht. Andererseits könnte SOCS-1 auch eine potentere inhibitorische Wirkung auf die Interferon-induzierte 2',5'-OAS- und MxA-Expression haben. Ähnliche Ergebnisse hierzu wurden in den Zelllinien HeLa und MCF beobachtet. Dort erwies sich SOCS-1 als der wesentlich potentere Inhibitor von STAT-1 und somit der Unterbrechung der durch Interferon induzierten zellulären Signalkaskade (124). Die sowohl bei der Promotoraktivierung als auch bei der Genexpression von 2',5'-OAS und MxA geringe bestehende Stimulation in den SOCS-1- und SOCS-3-überexprimierenden Zellklonen könnte durch mögliche alternative Interferon-Signalwege erklärt werden. Diese laufen nicht über die Jak-STAT-Signalkaskade ab und entziehen sich somit der negativen STAT-Regulation durch die SOCS-Proteine. Daher kann es trotz SOCS-1- bzw. SOCS-3-Überexpression zur Expression Interferon-abhängiger Proteine kommen (67).

Um eine unspezifisch verminderte Stimulierbarkeit der Zellklone auf Interferon auf Grund der Transfektion auszuschließen, wurden die verschiedenen Auswirkungen einer Stimulation dieser Zellen mit Interferon α , PMA und Bu₂cAMP auf ein SOCS-3-Promotor-Luciferasekonstrukt untersucht (Abb. 7). Hiervon benutzt nur Interferon α die Jak-STAT-Signalkaskade für die zelluläre Signaltransduktion. Eine Stimulation mit PMA wird dagegen über den p38MAPK-Signalweg und eine Stimulation mit Bu₂cAMP über den cAMP-Signalweg vermittelt. In diese beiden Signalkaskaden greifen SOCS-1 und SOCS-3 nicht negativ regulierend ein. Der verwendete SOCS-3-Promotor

enthält korrespondierende Elemente sowohl für einen STAT-vermittelten Signalweg als auch für einen p38MAPK (16) und cAMP (19) vermittelten Signalweg. In den Kontrollvektor-transfizierten Zellen kam es nach Zugabe aller drei Substanzen zu einer deutlich erhöhten Promotoraktivität des mSOCS-3-Promotors im Luciferase-Assay. Dagegen zeigte sich eine deutliche Suppression des durch Interferon-induzierten STAT-Signalweges durch die Überexpression von SOCS-1 und SOCS-3 in den Zellen. Die durch PMA und Bu₂cAMP hervorgerufene SOCS-3 Promotoraktivität wurde in den SOCS-1 bzw. SOCS-3 überexprimierenden Zellklonen dagegen nicht signifikant unterdrückt (Abb. 7). Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die Transfektion nicht zu einer allgemein verminderten Ansprechbarkeit der transfizierten Zellen kommt, sondern spezifisch die Jak-STAT-Signalkaskade durch eine SOCS-Überexpression gehemmt wird.

Während andere Arbeitsgruppen eine erhöhte Expression der SOCS-1- bzw. SOCS-3-Proteine in Leberzellen durch eine chronischen Hepatitis C Virus-Infektion zeigen konnten (80; 142), demonstriert die hier vorgelegte Arbeit, dass eine erhöhte Expression von SOCS-1 bzw. SOCS-3 in humanen Hepatomzellen durch Suppression der Interferon-induzierten Jak-STAT Signalkaskade nachfolgend zur Suppression der Expression der antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS führt. Über diesen Mechanismus kann die Überexpression von SOCS-1 und SOCS-3 so zur Interferonresistenz bei viralen Infekten wie der chronischen Hepatitis C beitragen.

5. Zusammenfassung

In den vorgestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass SOCS-1 und SOCS-3 die Genexpression und die Promotoraktivität der beiden Interferon-induzierten antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS hemmen.

In den Kontrollvektor-transfizierten Zellklonen konnte sowohl in den Luciferase-Assays als auch in den Northern Blot Analysen ein signifikanter Anstieg der Promotoraktivität bzw. der Genexpression der beiden antiviralen Proteine nachgewiesen werden. In den SOCS-1 und SOCS-3 überexprimierenden Zellklonen dagegen zeigte sich eine deutliche Suppression der Promotoraktivität und der Genexpression.

Die hier vorgestellten Daten demonstrieren eine Rolle der SOCS-Proteine in der Interferonresistenz durch Hemmung der Jak-STAT abhängigen Expression von antiviralen Proteinen. Dieser Mechanismus stellt eine mögliche Erklärung für die Entstehung einer Interferonresistenz bei der chronischen Hepatitis C Infektion dar. Auf Grund der gezeigten Rolle von SOCS-Proteinen in der Pathophysiologie der Interferon-Resistenz sollten zukünftige Therapieoptionen mit dem Ziel des SOCS-Silencing zur Verbesserung der Interferontherapie evaluiert werden.

6. Literaturverzeichnis

(1)

Accola M.A., Huang B., AlMasri A., McNiven M.A., 2002. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmatic reticulum. *J Biol Chem*, 277 (24): 21829-35

(2)

Adams T.E., Hansen J.A., Starr R., Nicola N.A., Hilton D.J., Billestrup N., 1998. Growth Hormone preferentially induces the rapid transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signalling. *J Biol Chem*, 273 (3): 1285-7

(3)

Aebi M., Föh J., Hurt N., Samuel C.E., Thomis D., Bazzigher L., Pavlovic J., Haller O., Staehli P., 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol*, 9 (11): 5062-72

(4)

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

(5)

Antonelli G., Simeoni E., Turriziani O., Tesoro R., Redaelli A., Roffi L., Antonelli L., Pistello M., Dianzani F., 1999. Correlation of interferon-induced expression of MxA mRNA in peripheral blood mononuclear cells with the response of patients with chronic active hepatitis C to IFN-alpha therapy. *J Interferon Cytokine Res*, 19 (3): 243-51

(6)

Arnheiter H., Frese M., Kambadur R., Meier E., Haller O., 1996. Mx transgenic mice-animal models of health. *Curr Top Microbiol Immunol*, 206: 119-47

(7)

Auernhamer C.J., Chesnokova V., Bousquet C., Melmed S., 1998. Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukaemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion. *Mol Endocrinol*, 12 (7): 954-961

(8)

Auernhammer C.J., Bousquet C., Melmed S., 1999. Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (12): 6964-69

(9)

Auernhammer C.J., Bousquet C., Chesnokova V., Melmed S., 2000. SOCS proteins: modulators of neuroimmunoendocrine functions. Impact on corticotroph LIF signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 917: 658-64

(10)

Auernhammer C.J., Melmed S., 2001. The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest*, 108 (12): 1735-40

(11)

Balkwill F., Taylor-Papadimitriou J., 1978. Interferon affects both G1 and S+G2 in cells stimulated from quiescence to growth. *Nature*, 274 (5673): 798-800

(12)

Benech P., Vigneron M., Peretz D., Revel M., Chebath J., 1987. Interferon-responsive regulatory elements in the promotor of the human 2'5'-oligo(A) synthase gene. *Mol Cell Biol*, 7 (12): 4498-504

(13)

Bisbal C., Martinand C., Silhol M., Lebleu B., Salehzada T., 1995. Cloning and characterization of a Rnase L inhibitor. *J Biol Chem*, 270 (22): 13308-17

(14)

Bjorbaek C., Elmquist J.K., Frantz J.D., Shoelsen S.E., Flier J.S., 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*, 1 (4): 619-25

(15)

Blindenbacher A., Duong F.H., Hunziker L., Stutvoet S.T., Wang X., Terracciano L., Moradpour D., Blum H.E., Alonzi T., Tripodi M., LaMonica N., Heim M.H., 2003. Expression of hepatitis C virus inhibits interferon signaling through upregulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology*, 124 (5): 1465-75

(16)

Bode J.G., Ludwig S., Ehrhardt C., Albrecht U., Erhardt A., Schaper F., Heinrich P.C., Haussinger D., 2003. Interferon-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J*, 17 (3): 488-90

(17)

Borden E.C., Hogan T.F., Voelkel J.G., 1982. Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons alpha and beta for diploid and transformed human cells. *Cancer Res*, 42 (12): 4948-53

(18)

Borden E.C., Williams B.R., 2000. Interferons. In Bast R.C.Jr., J.F.Holland, Ganster T.S.. Eds. *Cancer Medicine*, 5th edition, Toronto, B.C.Decjer Inc., 815-24

(19)

Bousquet C., Chesnokova V., Kariagina A., Ferrand A., Melmed S., 2001. cAMP neuropeptide agonists induce pituitary suppressor of cytokine signaling-3 : Novel negative feedback mechanism for corticotroph cytokine action. *Mol Endocrinology*, 15 (11): 1880-90

(20)

Brender C., Nielsen M., Kaltoft K., Mikkelsen G., Zhang Q., Wasik M., Billestrup N., Ødum N., 2001. STAT-3-mediated consecutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 97 (4): 1056-62

(21)

Castelli J.C., Hassel B.A., Maran A., Paranjape J., Hewitt J.A., Li X.L., Hsu Y.T., Silverman R.H., Youle R.J., 1998. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ*, 5 (4): 313-20

(22)

Chang K.C., Hansen E., Foroni L., Lida J., Goldspink G., 1991. Molecular and functional analysis of the virus- and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch Virol*, 117 (1-2): 1-15

(23)

Chawla-Sarkar M., Leaman D.W., Borden E.C., 2001. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res*, 7 (6): 1821-31

(24)

Chawla-Sarkar M., Lindner D.J., Liu Y.-F., Williams B.R., Sen G.C., Silverman R.H., Borden E.C., 2003. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8 (3): 237-49

(25)

Chebath J., Benech P., Hovanessian A., Galabrun J., Revel M., 1987. Four different forms of interferon-induced 2'-5'-oligo(A) synthase identified by immunoblotting in human cells. *J Biol Chem*, 262 (8): 3852-57

(26)

Chiaramonte M., Stroffolini T., Vian A., Stazi M.A., Floreali A., Lorenzoni U., Lobello S., Farinati F., Naccarato R., 1999. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer*, 85 (10): 2132-37

(27)

Cohen J., 1999. The scientific challenge of hepatitis C. *Science*, 285 (5424): 26-30

(28)

Darnell J.E., Kerr I.M., Stark G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to Interferons and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264 (5164): 1415-21

(29)

Diaz-Guerra M., Rivas C., Esteban M., 1997. Activation of the Interferon-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology*, 236 (2): 354-63

(30)

Duong F.H., Filipowicz M., Tripodi M., La Monica N., Heim M.H., 2004. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology*, 126 (1): 263-77

(31)

Endo T.A., Masuhara M., Yokouchi M., Suzuki R., Sakamoto H., Mitsui K., Matsumoto A., Tanimura S., Ohtsubo M., Misawa H., Miyazaki T., Leonor N., Taniguchi T., Fujita T., Kanakura Y., Komiya S., Yoshimura A., 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits Jak kinases. *Nature*, 387 (6636): 921-24

(32)

Falck-Ytter Y., Kale H., Mullen K.D., Sarbah S.A., Sorescu L., McCullough A.J., 2002. Surprisingly small effect of antiviral treatment in patients with hepatitis C. *Ann Intern Med*, 136 (4): 288-92

(33)

Fenner J.E., Starr R., Cornish A.L., Zhang J.G., Metcalf D., Schreiber R.D., Sheehan K., Hilton D.J., Alexander W.S., Hertzog P.J., 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. *Nat Immunol*, 7 (1): 33-9

(34)

Fernandez M., Quiroga J.A., Martin J., Cotonat T., Pardo M., Horisberger M.A., Carreno V., 1997. Impaired interferon induction of human MxA protein in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol*, 51 (4): 332-37

(35)

Fernandez M., Quiroga J.A., Martin J., Herrero M., Pardo M., Horisberger M.A., Carreno V., 1999. In vivo and in vitro induction of MxA protein in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus. *J Infect Dis*, 180 (2): 262-7

(36)

Field A.K., Tytell A.A., Lampson G.P., Hillemann M.R., 1967. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. Proc Natl Acad Sci USA, 1967 58 (3):1004-10

(37)

Floyd-Smith G., Slattery E., Lengyel P., 1981. Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5') oligoadenylate-dependent endonuclease. Science, 212 (4498): 1030-32

(38)

Floyd-Smith G., Yoshie O., Lengyel P., 1982. Covalent linkage of (2'-5')pppApApA(³²P)pCp to (2'-5')(A)_n-dependent ribonucleases in cell extracts by ultraviolet irradiation. J Biol Chem, 257 (15): 8584-87

(39)

Foy E., Li K., Wang C., Sumpler R.Jr., Ikeda M., Lemon S.M., Gale M.Jr., 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. Science, 300 (5622): 1145-48

(40)

Frese M., Pietschmann T., Moradpour D., Haller O., Bartenschlager R., 2001. Interferon- α inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. J Gen Virology, 82 (Pt 4): 723-33

(41)

Fujimoto M., Naka T., 2003. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. Trends Immunol, 24 (12): 659-66

(42)

Gale M.Jr., Korth M.J., Tang N.M., Tan S.-L., Hopkins D.A., Dever T.E., Polyak S.J., Gretch D.R., Katze M.G., 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the non-structural 5A protein. *Virology*, 230 (2): 217-227

(43)

Gale M.Jr., Blakeley C.M., Kwieciszewski B., Tan S.L., Dossett M., Tong N.M., Korth M.J., Polyak S.J., Gretch D.R., Katze M.G., 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol*, 18 (9): 5208-18

(44)

Gale M.Jr., Kwieciszewski B., Dossett M., Nakao H., Katze M.G., 1999. Antiapoptotic and oncogenic potential of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol*, 73 (8) : 6506-16

(45)

Gauzzi M.C., Velazquez L., McKendry R., Mogensen K.E., Fellous M., Pellegrini S., 1996. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem*, 271 (34): 20494-500

(46)

Girard S., Shalhoub P., Lescure P., Sabile A., Misek D.E., Hanash S., Brechot C., Beretta L., 2002. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin 8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology*, 295 (2): 1262-71

(47)

Gordien E., Rosmorduc O., Peltekian C., Garreau F., Brechot C., Kremsdorf D., 2001. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol*, 75 (6): 2684-91

(48)

Gutterman J.U., 1994. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (4): 1198-205

(49)

Hagenbeek A., Carde P., Meerwaldt J.H., Somers R., Thomas J., De Bock R., Raemaekers J.M., van Hoof A., De Wolf-Peeters C., van Glabbeke M., 1998. Maintenance of remission with human recombinant interferon alfa-2a in patients with stages III and IV low-grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 16 (1): 41-7.

(50)

Haller O., Kochs G., 2002. Interferon induced Mx proteins: Dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 3 (10): 710-17

(51)

Hartmann R., Olsen H.S., Widder S., Jørgensen R., Justesen J., 1998. p59OASL, a 2',5' oligoadenylate synthase like protein: a novel human gene related to the 2',5' oligoadenylate synthase family. *Nucleic Acids Res*, 26 (18): 4121-28

(52)

Hefti H.P., Frese M., Landis H., Di Paolo C., Aguzzi A., Haller O., Pavlovic J., 1999. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. *J Virol*, 73 (8): 6984-91

(53)

Heim M.H., Moradpour D., Blum H.E., 1999. Expression of hepatitis C virus proteins inhibit signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol*, 73 (10): 8469-475

(54)

Heim M.H., 2000. Intracellular signaling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis*, 32 (3): 257-263

(55)

Helman D., Sandowski Y., Cohen Y., Matsumoto A., Yoshimura A., Merchav S., Gertler A., 1998. Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and Jak2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT-5 signaling. *FEBS Lett*, 441 (2): 287-291

(56)

Hepatocellular Carcinoma Study Group, 1998. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *Lancet*, 351 (9115): 1535-9. Erratum in *Lancet*, 352 (9135): 1230

(57)

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

(58)

Horisberger M.A., Staehli P., Haller O., 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 (7): 1910-1914

(59)

Horisberger M.A., Hochkeppel H.K., 1987. Interferon-alpha induced human 78 kD protein: purification and homologies with the mouse Mx protein, production of monoclonal antibodies, and potentiation effect of Interferon-gamma. *J Interferon Res*, 7 (4): 331-43

(60)

Horisberger M.A., McMaster G.K., Zeller H., Wathelet M.G., Dellis J., Content J., 1990. Cloning and sequence analyses of cDNAs for interferon- and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: Functional study of the corresponding gene promoter. *J Virol*, 64 (3): 1171-81

(61)

Horisberger M.A., 1992. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol*, 66 (8): 4705-09

(62)

Horvath C.M., Darnell J.E.Jr., 1996. The antiviral state induced by alpha interferon requires transcriptionally active STAT-1 protein. *J Virol*, 70 (1): 647-50

(63)

Hovanessian A.G., Wood J., Meurs E., Montagnier L., 1979. Increased nuclease activity in cells treated with pppA2'p5'A2'p5'A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 (6): 3261-65

(64)

International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma Study Group. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *Lancet*, 351 (9115): 1535-9. Erratum in: *Lancet*, 352 (9135):1230

(65)

Jonasch E., Kumar U.N., Linette G.P., Hodi F.S., Soiffer R.J., Ryan B.F., Sober A.J., Mihm M.C., Tsao H., Langley R.G., Cosimi B.A., Gadd M.A., Tanabe K.K., Souba W., Haynes H.A., Barnhill R., Osteen R., Haluska F.G., 2000. Adjuvant high-dose interferon alfa-2b in patients with high-risk melanoma. *Cancer J*, 6 (3): 139-45

(66)

Kalvakolanu D.V., 2000. Interferons and cell growth control. *Histol Histopathol*, 15 (2): 523-37

(67)

Kalvakolanu D.V., 2003. Alternate interferon signaling pathways. *Pharmacol Ther*, 100 (1): 1-29

(68)

Kamura T., Sato S., Haque D., Liu L., Kaelin W.G.Jr., Conaway R.C., Conaway J.W., 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

(69)

Kenny-Walsh E., 1999. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med*, 340 (16): 1228-33

(70)

Kimball P., Elswick R.K., Shiffman M., 2001. Ethnicity and cytokine production gauge response of patients with hepatitis C to interferon-alpha therapy. *J Med Virol*, 65 (3): 510-16

(71)

Kochs G., Haller O., 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (5): 2082-6

(72)

Kochs G., Haller O., 1999. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*, 274 (7): 4370-6

(73)

Kotenko S.V., Gallagher G., Baurin V.V., Lewis-Antes A., Shen M., Shah N.K., Langer J.A., Sheikh F., Dickensheets H., Donnelly R.P., 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 4 (1): 69-77.

(74)

Lengyel P., 1982. Biochemistry of interferons and their action. *Ann Rev Biochem*, 51: 251-282

(75)

Leong J.C., Trobridge G.D., Kim C.H., Johnson M., Simon B., 1998. Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunol Rev*, 166: 349-63

(76)

Li X.L., Boyanapalli M., Weihua X., Kalvakolanu D.V., Hassel B.A., 1998. Induction of interferon synthesis and activation of interferon-stimulated genes by liposomal transfection reagents. *J Interferon Cytokine Res*, 18 (11): 947-52

(77)

Lin O.S., Keeffe E.B., 2001. Current treatment strategies for chronic hepatitis B and C. *Annu Rev Med* 52: 29-49

(78)

de Lucas S., Bartolomé J., Carreno V., 2005. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis*, 191 (1):93-9

(79)

Lutfalla G., Holland S.J., Cinato E., Monneron D., Reboul J., Rogers N.C., Smith J.M., Stark G.R., Gardiner K., Mogensen K.E., et al., 1995. Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *EMBO J*, 14 (20): 5100-8

(80)

Manns M.P., McHutchinson J.G., Gordon S.C., Rustgi V.K., Shiffman M., Reindollar R., Goodman Z.D., Koury K., Ling M., Albrecht J.K., 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 358 (9286): 958-65

(81)

Mashuara M., Sakamoto H., Matsumoto A., Suzuki R., Yasukawa H., Mitsui K., Wakioka T., Tanimura S., Sasaki A., Misawa H., Yokouchi M., Ohtsubo M., Yoshimura A., 1997. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 239 (2): 439-46

(82)

Mbow M.L., Sarisky R.T., 2004. What is disrupting IFN-alpha's antiviral activity? *Trends Biotechnol*, 22 (8): 395-9

(83)

McHutchinson J.G., Gordon S.C., Schiff E.R., Shiffman M.L., Lee W.M., Rustgi V.K., Goodman Z.D., Ling M.H., Cort S., Albrecht J.K., 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*, 339 (21): 1485-92

(84)

Meager A., 2002. Biological assays for interferons. *J Immunol Methods*, 261 (1-2): 21-36

(85)

Melen K., Keskinen P., Ronni T., Sareneva T., Lounatmaa K., Julkunen I., 1996. Human MxB protein, an interferon-alpha-inducible GTPase, contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin region beneath the nuclear envelope. *J Biol Chem*, 271 (38): 23478-86

(86)

Minamoto S., Ikegame K., Ueno K., Narazaki M., Naka T., Yamamoto H., Matsumoto T., Saito H., Hosoe S., Kishimoto T., 1997. Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 237 (1): 79-83

(87)

Müller U., Steinhoff U., Reis L.F.L., Hemmi S., Pavlovic J., Zinkernagel R.M., Aguet M., 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264 (5167): 1918-21

(88)

Naganuma A., Nozaki A., Tanaka T., Sugiyama K., Takagi H., Mori M., Shimotohno K., Kato N., 2000. Activation of the interferon-inducible 2'-5'-oligoadenylate synthase gene by hepatitis C virus core protein. *J Virol*, 74 (18): 8744-50

(89)

Naka T., Narazaki M., Hirata M., Matsumoto T., Minamoto S., Aono A., Nishimoto N., Kajita T., Taga T., Yoshizaki K., Akira S., Kishimoto T., 1997. Structure of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387 (6636): 924-29

(90)

Nakade K., Handa H., Nagata K., 1997. Promoter structure of the MxA gene that confers resistance to influenza virus. *FEBS Lett*, 418 (3): 315-18

(91)

Nicholsen S.E., Willson T.A., Farley A., Starr R., Zhang J.G., Baca M., Alexander W.S., Metcalf D., Hilton D.J., Nicola N.A., 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

(92)

NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C, 2002. *NIH Consensus State Sci Statements*, 19: 1-46

(93)

Nishiguchi S., Kuroki T., Otani S., Takeda T., Hirota S., Shimizu Y., Nakajima S., Saito S., Shiomi S., Kobayashi K., 1989. Relationship of the effects of interferon on chronic hepatitis B and the induction of 2',5'-oligoadenylate synthase. *Hepatology*, 10 (1): 29-33

(94)

Novick D., Cohen B., Rubinstein M., 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell*, 77 (3): 391-400

(95)

Ohya K., Kajigaya S., Yamashita Y., Miyazato A., Hatake K., Miura Y., Ikeda U., Shimada K., Ozawa K., Mano H., 1997. SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 272 (43): 27178-82

(96)

Pavlovic J., Haller O., Staeheli P., 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol*, 66 (4): 2564-9

(97)

Pawlotsky J.-M., 2003. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral Res*, 59 (1): 1-11

(98)

Pawlotsky J.-M., 2003. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis*, 16 (6): 587-92

(99)

Platanias L.C., Fish E.N., 1999. Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol*, 27 (11):1583-92

(100)

Podevin P., Rosmorduc O., Conti F., Calmus Y., Meier P.J., Poupon R., 1999. Bile acid modulate the interferon signalling pathway. *Hepatology*, 29 (6): 1840-47

(101)

Polyak S.J., Paschal D.M., McArdle S., Gale M.J., Moradpour D., Gretch D.R., 1999. Characterization of the effects of hepatitis C virus non-structural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology*, 29 (4): 1262-71

(102)

Polyak S.J., Khabar K.S., Paschal D.M., Ezelle H.J., Duverlie G., Barber G.N., Lavy D.E., Mukaida N., Gretch D.R., 2001. Hepatitis C virus non-structural 5A protein induces interleukin 8, leading to partial inhibition of the interferon induced antiviral response. *J Virol*, 75 (13): 6095-106

(103)

Qureshi S.A., Salditt-Georgieff M., Darnell J.E.Jr., 1995. Tyrosine-phosphorylated STAT-1 and STAT-2 plus a 48kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (9): 3829-33

(104)

Rang A., Bruns M., Heise T., Will H., 2002. Antiviral activity of interferon- α against hepatitis B virus can be studied in non-hepatic cells and is independent of MxA. *J Biol Chem*, 277 (10): 7645-7

(105)

Ray Kim W., 2002. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes and Infection*, 4 (12) :1219-25

(106)

Rebouillat D., Marie I., Hovanessian A.G., 1998. Molecular cloning and characterization of two related and interferon-induced 56-kDa and 30-kDa proteins highly similar to 2'-5' oligoadenylate synthetase. *Eur J Biochem*, 257 (2): 319-30

(107)

Rebouillat D., Hovanessian A.G., 1999. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res*, 19 (4): 295-308

(108)

Robertson B., Myers G., Howard C., Brettin T., Bukh J., Gaschen B., Gojobori T., Maertens G., Mizokami M., Nainan O., Netesov S., Nishioka K., Shin-i T., Simmonds P., Smith D., Stuyver L., Weiner A., 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol*, 143 (12): 2493-503

(109)

Ronni T., Matikainen S., Lehtonen A., Palvimo J., Dellis J., Van Eylen F., Goetschy J.F., Horisberger M., Content J., Julkunen I., 1998. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res*, 18 (9): 773-81.

(110)

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

(111)

Sakai I., Takeuchi K., Yamauchi H., Narumi H., Fujita S., 2002. Constitutive expression of SOCS-3 confers resistance to Interferon α in chronic myelogenous leukaemia cells. *Blood*, 100 (8): 2926- 31

(112)

Sakamoto H., Yasukawa H., Masuhara M., Tanimura S., Sasaki A., Yuge K., Ohtsubo M., Ohtsuka A., Fujita T., Ohta T., Furukawa Y., Iwase S., Yamada H., Yoshimura A., 1998. A janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon- γ -inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood*, 92 (5): 1668-76

(113)

Sangfelt O., Erickson S., Castro J., Heiden T., Einhorn S., Grander D., 1997. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth are independent responses to interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Cell Growth Differ*, 8 (3): 343-52

(114)

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

(115)

Sasaki A., Yasukawa H., Shouda T., Kitamura T., Dikic I., Yoshimura A., 2000. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and Jak2. *J Biol Chem* 275 (38): 29338-47

(116)

Schnorr J.-J., Schneider-Schaulies S., Simon-Jodicke A., Pavlovic J., Horisberger M.A., ter Meulen V., 1993. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol*, 67 (8): 4760-8

(117)

Sen G., Lengyel P., 1992. The interferon system. *J Biol Chem*, 267 (8): 5017-20

(118)

Sen G.C., Ransohoff R.M., 1993. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res*, 42: 57-102

(119)

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

(120)

Shen X., Hong F., Nguyen V.-A., Gao B., 2000. Il-10 attenuates IFN- α -activated STAT-1 in the liver: Involvement of SOCS-2 and SOCS-3. *FEBS Lett*, 480 (2-3): 132-6

(121)

Silverman R.H., Cirino N.M., 1997. in mRNA Metabolism and post-Transcription Gene Regulation. ed. Morris D.R., Harford J.B.. New York Wiley & Sons, 295-309

(122)

Silverman R.H., 1997. Ribonucleases: Structure and Function. Academic Press Inc., NY, 515-51

(123)

Soh J., Donnelly R.J., Kotenko S., Mariano T.M., Cook J.R., Wang N., Emanuel S., Schwartz B., Miki T., Pestka S., 1994. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell*, 76 (5): 793-802

(124)

Song M.M., Shuai K., 1998. The suppressor of cytokine signalling (SOCS) 1 and SOCS-3 but not SOCS-2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem*, 273 (52): 35056-35062

(125)

de Souza D., Fabri L.J., Nash A., Hilton D.J., Nicola N.A., Baca M., 2002. SH2 domains from suppressor of cytokine signalling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities. *Biochem*, 41 (29): 9229-36

(126)

Staeheli P., 1990. Interferon-induced proteins and their antiviral state. *Adv Virus Res* 38: 147-200

(127)

Staehele P., Pitossi F., Pavlovic J., 1993. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends in Cell Biol*, 3 (8): 268-72.

(128)

Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R.G., Silverman R.H., Schreiber R.D., 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67: 227-64

(129)

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

(130)

Stoiber D., Kovarik P., Cohn S., Johnston J.A., Steinlein P., Decker T., 1999. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signalling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor Interferon- γ . *J Immunol*, 163 (5): 2640-47

(131)

Suzuki R., Sakamoto H., Yasukawa H., Masuhara M., Wakioka T., Sasaki A., Yuge K., Komiya S., Inoue A., Yoshimura A., 1998. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT-3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene*, 17 (17): 2271-78

(132)

Tamm I., Grimme H., Bergen E., Simon J.C., Schopf E., Mertelsmann R., Lindemann A., Brennscheidt U., 1997. Dacarbazine and interferon alpha for stage IV malignant melanoma. *Oncology*, 54 (4): 270-4

(133)

Tarao K., Rino Y., Ohkawa S., Shimizu A., Tamai S., Miyakawa K., Aoki H., Imada T., Shindo K., Okamoto N., Totsuka S., 1999. Association between high serum alanine aminotransferase levels and more rapid development and higher rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis. *Cancer*, 86 (4): 589-95

(134)

Taylor D.R., Shi S.T., Romano P.R., Barber G.N., Lai M.M., 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, 285 (5424): 107-10

(135)

Thyrell L., Erickson S., Zhivotovsky B., Pokrovskaja K., Sangfelt O., Castro J., Einhorn S., Grander D., 2002. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene*, 21 (8): 1251-62

(136)

Ungureanu D., Saharinen P., Junttila I., Hilton D.J., Silvennoinen O., 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

(137)

Uze G., Lutfalla G., Gresser I., 1990. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell*, 60 (2): 225-34

(138)

de Veer M.J., Holko M., Frevel M., Walker E., Der S., Paranjape J.M., Silverman R.H., Williams B.R., 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*, 69 (6): 912-20

(139)

Velazquez L., Fellous M., Stark G.R., Pellegrini S., 1992. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell*, 70 (2): 313-22

(140)

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

(141)

Vyas J., Elia A., Clemens M.J., 2003. Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *RNA*, 9 (7): 858-70

(142)

Walsh M.J., Jonsson J.R., Richardson M.M., Lipka G., Purdie D., Clouston A., Powell E.E., 2005. Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of SOCS-3 in patients with chronic hepatitis C, viral genotyp 1. *Gut*, 55 (4): 529-35

(143)

Wang Q, Floyd-Smith G., 1997. The p69/71 (2',5')-oligoadenylate synthase promoter contains multiple regulatory elements required for interferon-alpha-induced expression. *DNA Cell Biol*, 16 (12): 1385-94

(144)

Wang Q., Floyd-Smith G., 1998. Maximal induction of p69 2',5'-oligoadenylate synthase in daudi cells requires cooperation between an ISRE and two IRF-1-like elements. *Gene*, 222 (1): 83-90

(145)

v.Wussow P., Jakschies D., Hochkeppel H.-K., Fibich C., Penner L., Deicher H., 1990. The human intracellular Mx-homologous protein is specifically induced by type I interferons. *Eur J Immunol*, 20 (9): 2015-19

(146)

Yan H., Krishnan K., Greenlund A.C., Gupta S., Lim J.T., Schreiber R.D., Schindler C.W., Krolewski J.J., 1996. Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (Interferon AR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT-2 protein. *EMBO J* , 15 (5): 1064-74.

(147)

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

(148)

Yoshimura A., Ohkubo T., Kiguchi T., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Hara T., Miyajima A., 1995. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH 2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J*, 14 (12): 2816-26

(149)

Zhou A., Hassel B.A., Silverman R.H., 1993. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell*, 72 (5): 753-65

(150)

Zhou A., Paranjape J., Brown T.L., Nie H., Naik S., Dong B., Chang A., Trapp B., Fairchild R., Colmenares C., Silverman R.H., 1997. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J*, 16 (21): 6355-63

(151)

Zhou A., Paranjape J.M., Der S.D., Williams B.R., Silverman R.H., 1999. Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology*, 258 (2): 435-40

(152)

Zinzani P.L., Bendandi M., Magagnoli M., Rondelli D., de Vivo A., Benni M., Zamagni E., Cavo M., Tura S., 1997. Results of a fludarabine induction and alpha-interferon maintenance protocol in pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*, 59 (2): 82-8

7. Publikationen

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit wurden – mit Genehmigung des Dekanats - vorab wie folgt publiziert:

Vlotides G., **Sörensen A.S.**, Kopp F., Zitzmann K., Cengic N., Brand S., Zachoval R., Auernhammer C.J., 2004. SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN- α -induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun* 320 (3): 1007-14 (*Journal Impact Factor* 2,8)

8. Lebenslauf

Astrid Severina Sörensen

geboren am 20.09.1980 in München

ledig

Schulbildung

Juli 1999

Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

November 1999 – August 2001

Humanmedizin, LMU München,
vorklinischer Studienabschnitt

August 2001

Physikum

September 2001 – August 2002

1. Klinischer Studienabschnitt,
LMU München

August 2002

1. Staatsexamen

September 2002 – August 2004

2. Klinischer Studienabschnitt,
LMU München

September 2004

2. Staatsexamen

Oktober 2004 – Februar 2005

Städt. Krankenhaus

München-Neuperlach, PJ

Gynäkologie und Geburtshilfe

Februar 2005 – März 2005

Klinikum Großhadern, München

Medizinische Klinik II, PJ

Innere Medizin, Gastroenterologie

April 2005 – Mai 2005

Klinikum Großhadern, München

Medizinische Klinik III, PJ

Innere Medizin, Onkologie

Mai 2005 – September 2005

Städt. Krankenhaus
München-Neuperlach, PJ
Chirurgie

November 2005

3.Staatsexamen und
Approbation

Facharztweiterbildung

seit Juli 2006

Assistenzärztin in der Med. Klinik I
Chefarzt: Prof. Dr. med. Karel Caca
Klinikum Ludwigsburg

9. Danksagung

Mein Dank gilt:

PD Dr. med. Christoph Auernhammer, Endokrinologische Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik II im Klinikum Grosshadern, München für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Dr. med. George Vlotides für die hilfreiche Einarbeitung und dauerhafte engagierte Unterstützung meiner experimentellen Arbeiten.

Gerald Spöttel und Jennifer Meinecke für ihre stete Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung.

Dr. rer. nat. Kathrin Zitzmann für die kollegiale Zusammenarbeit und die zahlreichen Hilfestellungen.