

VÍA JAK-STAT: UNA VISIÓN GENERAL

Arturo Valle Mendiola
Isabel Soto Cruz

RESUMEN

La vía de transducción de señales a través de las Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción (Jak-STAT) es esencial para la señalización de muchas citocinas. Esta vía transmite información que se recibe de señales polipeptídicas extracelulares, a través de receptores transmembranales, directamente a promotores blanco en el núcleo, generando en consecuencia un mecanismo para regular la transcripción sin necesidad de segundos mensajeros. Una alteración en la regulación de la vía de señalización Jak-STAT está asociada con varias enfermedades humanas. Estudios recientes han ayudado a entender los mecanismos reguladores que modifican la cantidad y calidad de la respuesta a esta vía de señales. En esta revisión se da una visión general de esta vía, de la estructura de las JAKs y STATs, así como de algunos fármacos inhibidores de la vía.

Palabras Claves: JAK, STAT, cinasas, factores de transcripción, dominio de pseudocinasa, dominio SH2, inhibidor, AG-490, piceatanol.

The JAK-STAT pathway: a general view

ABSTRACT

The Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (Jak-STAT) pathway is essential for the signal transduction of many cytokines. This pathway transmits information received from extracellular polypeptide signals, through transmembrane receptors, directly to target gene promoters in the nucleus, providing a mechanism for transcriptional regulation without second messengers. Dysregulation of Jak-STAT signaling is associated with various human diseases. Recent studies have helped to shed some light on regulatory mechanisms that modify quantity and quality of the signaling response. Here, we summarize our current knowledge on Jak-STAT signaling and some of the known inhibitors of the pathway.

Key Words: JAK, STAT, kinase, transcription factor, pseudokinase domain, SH2 domain, inhibitor, AG-490, piceatanol.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 20 DE SEPTIEMBRE DEL 2005 Y ACEPTADO EL 08 DE NOVIEMBRE DEL 2005.

INTRODUCCIÓN

La vía JAK STAT fue originalmente descubierta a través del estudio de la transducción de señales intracelulares inducidas por interferón. Entretanto, se han encontrado un gran número de citocinas, hormonas y factores de crecimiento que activan a las JAKs y STATs. Las proteínas JAK (Janus cinasas) son la única clase de proteínas con actividad de tirosina cinasa que se asocian con receptores de citocinas. En la unión del ligando, ellas activan a los miembros de la familia de Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STAT).¹

Las citocinas que se unen a los receptores de clase I o II emplean la vía de señalización de JAK-STAT para manifestar

la mayoría de sus efectos sobre las células.^{2,3,4}

Los receptores de citocinas son clasificados dentro de varios grupos con base a sus similitudes estructurales. Los receptores de citocinas clase I, incluyen los receptores para la mayoría de las interleucinas, por ejemplo, la familia que utiliza la subunidad gp130 o de la IL-6 (IL-6, IL-11, OSM, LIF, CT-1, G-CSF, IL-12, IL-23, leptina, CNTF, NNT-1/BSF3), la familia del receptor de IL-2 o que utiliza a la subunidad γ C (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21⁵) y los receptores de cadena sencilla (EPO, GH, PRL, Tpo).⁶ Estos receptores no poseen actividad enzimática intrínseca, como actividad de cinasa o fosfatasa; tienen una estructura en el dominio extracelular, consistente de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos, que forman 14 hojas β plegadas antiparalelas. Las siete hojas β del amino y las siete del carboxilo terminal forman una estructura similar a un barril, que es semejante

Laboratorio de Oncología, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES Zaragoza, UNAM. Email: arturovalle@correo.unam.mx

al dominio tipo III de la fibronectina. Estos receptores tienen un patrón conservado de residuos de cisteínas en el dominio amino terminal, y una secuencia de TrpSerXTrpSer (donde X es cualquier aminoácido) en el dominio carboxi terminal. En contraste, no tienen una homología significativa en los dominios intracelulares, pero sí una pequeña similitud en la región proximal a la membrana.^{7,8}

Los receptores de la familia del interferón (IFN- α/β , IFN- γ , las interleucinas (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22) son clasificados dentro de la clase II de receptores para citocinas; estos poseen un motivo análogo conservado en el dominio extracelular⁷. Este dominio contiene otro patrón de residuos conservados de cisteínas, pero carece del motivo TrpSerXTrpSer.

Las STATs pueden ser activadas por receptores con actividad intrínseca de cinasa, como el EGF-R, CSF-1R y el PDGF-R. Algunos miembros de los receptores acoplados a proteína G han mostrado que pueden señalizar a través de las STATs, por ejemplo la angiotensina (AT1)^{9,6}.

Hasta la fecha, se han identificado en los mamíferos cuatro miembros de la familia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2, todas ellas poseen más de 1000 aminoácidos y se encuentran en un rango de peso molecular que va desde 120 a 130 kDa) y siete factores STAT (STAT1-STAT6), con dos isoformas de STAT5, llamadas STAT5a y STAT5b, que existen como dos genes estrechamente relacionados.^{4,10} Cada receptor de citocina aparentemente se acopla a una serie específica de JAKs y STATs, aunque existe un traslapamiento sustancial entre los diferentes receptores en diversos contextos biológicos.¹¹ Estas se muestran en la tabla 1.

Descubrimiento de la vía JAK/STAT

Las investigaciones realizadas sobre la transcripción inducida por IFN llevaron al descubrimiento de la familia de las STATs. El elemento de respuesta genética estimulado por IFN- α (ISRE; secuencia de nucleótidos AGTTT₃TTTCC) fue utilizado para purificar por afinidad a un complejo de cuatro proteínas, el ISGF3 (factor genético estimulado por IFN- α) de células HeLa. Las dos primeras proteínas descubiertas en este complejo son conocidas ahora como STAT1 α y STAT1 β (son iguales excepto por 38 aminoácidos del carboxilo terminal de STAT1 α , los cuales no se encuentran en STAT1 β , como resultado de un empalme alternativo de un solo ARNm). El siguiente miembro del complejo es STAT2, que comparte más del 44% de la secuencia de aminoácidos idénticos y 62% de similitud con STAT1, y por último p48, la cual no es una proteína STAT, pero representa otra familia de reguladores de la transcripción llamada Factores reguladores de IFN (IRFs).^{12,13} Dos STATs fueron identificadas por búsqueda de homología en bibliotecas de ADNc, estas fueron nombradas STAT3 y STAT4, se descubrió inmediatamente que STAT3 es activada por el factor de crecimiento epidermal (EGF) y la IL-6. Algunos factores de crecimiento y las citocinas que comparten a la subunidad gp130 y sus homólogos activan a STAT3. Solo la IL-12 es capaz de

estimular a STAT4. STAT5a fue purificada como el factor de la glándula mamaria de oveja (MGF), este factor activa la transcripción de los genes que codifican para las proteínas de la leche en respuesta a la prolactina. Una segunda proteína muy relacionada, STAT5b, se descubrió que es codificada por otro gen. STAT6 fue purificado de timocitos humanos como el factor de respuesta a IL-4.¹⁴

STAT1 es activada por el IFN- γ y forma un homodímero que se une a los elementos de la secuencia activada por IFN- γ (GAS) en los promotores de los genes activados por IFN- γ . En respuesta al IFN- α , STAT1 forma principalmente el factor de transcripción ISGF3, el cual se une a los elementos de respuesta estimulados por interferón. La situación se vuelve más compleja en el caso de IFN- γ , ya que puede inducir la formación de ISGF3 en ciertas células. El homodímero de STAT1 y el heterodímero STAT1-STAT2 también se pueden formar en respuesta al IFN- α ; también en ciertas células el IFN- α puede inducir la formación del heterodímero STAT1-STAT3, aunque estos heterodímeros se forman normalmente en respuesta a la IL-6 y a citocinas relacionadas, las cuales comparten el receptor gp130. Los homodímeros de STAT1 y STAT3 pueden formarse en esas mismas condiciones.¹⁵

Una contribución importante que resultó de los experimentos genéticos en células somáticas^{14,2} fue la identificación de las proteínas requeridas para la respuesta inducida por interferón, la cual fue determinada en la línea celular U1, que es deficiente para el IFN- α/β , ya que ha perdido la tirosina cinasa Tyk2, un miembro de la familia JAK. Estas células no responden al tratamiento con IFN- α/β .^{14,2} Otras líneas celulares, que responden a IFN- α/β o IFN- γ , mostraron ser deficientes en JAK1 o JAK2.¹⁴ Aunque es claro que las JAKs fosforilan a las STATs, existen receptores que pueden fosforilar directamente a las STATs sin necesidad aparente de las JAKs.¹⁴

Función de JAK/STAT en células normales

Se ha reconocido que el primer paso en el proceso de señalización a través de citocinas es la inducción por ligando de la homo- o la heterodimerización de los componentes de los receptores, cuyas regiones citoplasmáticas están acopladas con moléculas de señalización.¹⁶ El siguiente paso, de gran importancia, es la transfosforilación y activación de las JAKs asociadas al receptor, una vez activadas son capaces de fosforilar en residuos de tirosina a las cadenas del receptor, creando sitios de unión para los dominios homólogos a Src2 (SH2) de los Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STATs), así como para otras moléculas, tales como la proteína adaptadora Shc.^{17,18} Las STATs son reclutadas por el receptor fosforilado, para que a su vez sean fosforiladas por las JAKs. Las proteínas STATs después de ser fosforiladas, se dimerizan, se translocan al núcleo, y estimulan la expresión de los genes inducibles por citocinas.^{17,19} Al parecer, las STATs se encuentran como monómeros libres en el citoplasma, sin embargo, datos recientes apoyan la teoría de que estas moléculas también se encuentran formando parte de complejos oligoméricos de alto peso molecular

llamados STATosomas²⁰ (Valle Mendiola, datos no publicados). Se han descrito 2 STATosomas: el STATosoma I (200-400kDa)²⁰ (Valle Mendiola, datos no publicados) y el STATosoma II (1-2MDa)²⁰ se encuentran en el citoplasma. Se ha demostrado que estos complejos pueden ser formados por STAT1, STAT3 o STAT5²⁰, de estos dos STATosomas, solo en el STATosoma I se han encontrado STATs fosforiladas, tanto en el citoplasma como en el núcleo²⁰ (Valle Mendiola, datos no publicados).

Las proteínas JAK/STAT también participan en sistemas de receptores que no son de citocina, por ejemplo, las vías que se activan por receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa tales, como el PGDF y el EGF, así como de los receptores con siete dominios transmembranales como el receptor de angiotensina. Además, las STAT parecen tener un papel en la señalización del receptor de TNF. Las STATs también interactúan en el núcleo con el receptor de glucocorticoides y CBP/P300 y en ese contexto pueden funcionar como proteínas que unen al ADN específicamente (a través del dominio de unión al DNA) en vez de hacerlo como activadores transcripcionales clásicos. Por ejemplo, STAT3 funciona como molécula adaptadora relacionada con fosfatidilinositol 3-cinasa en la vía del receptor de interferón tipo I. Nuevas evidencias indican que las STATs pueden unirse directamente a las JAK y no al receptor fosforilado en tirosina.¹¹

JAK1, JAK2 y Tyk2 son expresadas de manera ubicua mientras que JAK3 esta restringida a células de líneas mieloides y linfoides⁹, aunque también existen reportes sobre la presencia de una variante de empalme de JAK3 en células transformadas de seno²¹ y en células de cáncer cervical, donde se encontró a JAK3 activada constitutivamente.²²

Las STATs han sido identificadas en *Drosophila*, *Dictyostelium*, *Caenorhabditis elegans*, *Anopheles*, *Danio* y *Xiphophorus*, pero están ausentes en las levaduras¹⁵. La más estudiada es el homólogo de JAK llamado hop, en *Drosophila*.

JAKs

La primera proteína tirosina cinasa Janus (JAK) fue clonada en 1990. Debido a que no tenía una función aparente, una broma circulante en esa época fue que JAK significaba “solo una cinasa más” (Just Another Kinase). Esta percepción peyorativa se desvaneció con el descubrimiento de que Tyk2 (un miembro de la familia JAK) es esencial para la señalización del receptor de IFN.

En contraste, desde que las STATs (transductores y activadores de la señales de transcripción) fueron aisladas como proteínas de unión al DNA de los genes inducibles por interferón, su importancia fue reconocida inmediatamente²³.

Las proteínas JAKs son un componente central en la regulación de la señalización de las citocinas. Debido al papel crítico de las citocinas en la mediación de la inflamación y la inmunidad, podría proponerse que la activación constitutiva de las JAKs

puede contribuir a los desórdenes hematopoyéticos y a las enfermedades inflamatorias y de autoinmunidad²⁴.

Varios eventos pueden observarse después de la activación de las JAK, incluyendo: el reclutamiento y activación de la vía Shc-Grb2-Sos-Ras-Raf1-MAPK, llevando a la transcripción de los genes tempranos (c-fos, c-jun); segundo, el reclutamiento y activación de las STATs; tercero, la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRSs), seguido por el reclutamiento y activación de la PI-3K²⁵

Existen otras cinasas que pueden ser activadas por las JAK, entre ellas se encuentra Pyk2 (AK β /RAFTK), la cual es un miembro de la familia de cinasas de adhesión focal (FAK). Pyk2 es activada después de la estimulación con IL-2 de una manera dependiente de JAK; hay una asociación física y fosforilación de Pyk2 por parte de JAK3, sugiriendo que Pyk2 es un componente de la vía de señalización de la IL-2 aunque de forma independiente de la activación de las STATs.²⁶

La sobreexpresión de una JAK3 mutante (que carece del dominio C-terminal, el cual posee la actividad de cinasa, pero conserva la capacidad de unión con el IL-2R γ) en la línea F7, resulta en la inhibición selectiva de la activación de JAK1/JAK3 y de la proliferación celular inducida por la IL-2. Dos genes inducibles por la IL-2, c-fos y c-myc fueron dañados, pero bcl-2, no, lo cual sugiere un papel crítico de JAK3 en la señalización por IL-2 pero además de la existencia de una vía independiente de JAK para el gen bcl-2.²⁷

Se ha propuesto que la AKT (PKB), una proteína con actividad de cinasa de serina/treonina puede participar. La activación de Akt por la IL-2 vía PI3-K y el rescate de las señales antiapoptóticas y proliferativas de la IL-2 mediadas por PI3-K mediado por una Akt activa constitutivamente indica que estas señales son transducidas por Akt²⁸.

Otra vía que induce la activación de las JAKs involucra a la ceramida. Se ha demostrado una intercomunicación entre la vía JAK/STAT y la vía de la esfingomielinasa (Smasa). La ceramida puede activar a JAK2, y por consiguiente a STAT1 y 3. Además la ceramida exógena natural puede promover la unión al DNA de STAT1/3, lo cual indica que, probablemente, la CER endógena es un segundo mensajero importante en los efectos de la Smasa.²⁹

Diversos resultados han mostrado que JAK1 juega un papel en la mediación de las respuestas biológicas inducidas por las tres subfamilias de citocinas: Los receptores de citocina de clase II (receptores para IFN α/β , IFN γ e IL-10), los receptores que utilizan a la subunidad γ_c (subfamilia de receptores de IL-2) y los receptores que utilizan a la subunidad gp130 (subfamilia de receptores de IL-6)³ (Tabla 1).

Los resultados de los análisis de células y tejidos derivados de ratones JAK1^{-/-} demostraron que hay un requerimiento absoluto

Proteína	Familia de receptores	Fenotipo por delección genética
Tyk2	IFN- α/β , IL-10, IL-6, IL-12	No reportado
JAK1	IFN- α/β , IFN- γ , IL-6, IL-11, OSM, LIF, CNTF, G-CSF, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, EGF, PDGF, CSF-1	Muerte perinatal
JAK2	IFN- γ , IL-6, OSM, LIF, CNTF, leptina, IL-12, IL-13, IL-5, GM-CSF, EPO, GH, PRL, G-CSF, EGF, PDGF, CSF-1, AT1	Muerte embrionaria
JAK3	IL-2, IL-4, IL-7, IL-19, IL-15	SCID autosómica, análoga a la deficiencia de γ_c ligada a X
STAT1	IFN- α/β , IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-11, OSM, LIF, CNTF, G-CSF, IL-2, IL-7, GH, PRL, PDGF, EGF, CSF-1, AT1	Defectos en las defensas antimicrobianas principalmente debido a la falta de respuesta a IFN
STAT2	IFN- γ , AT1	No reportado
STAT3	IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-11, OSM, CNTF, leptina, IL-12, IL-15, IL-2, IL-7, IL-9, GH, G-CSF, EGF, PDGF	Muerte embrionaria
STAT4	IL-12	Pérdida de la respuesta a IL-12 como la diferenciación de células Th1
STAT5a/b	IFN- γ , IL-10, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, EPO, GH, PRL, G-CSF, leptina	STAT5a: Pérdida del desarrollo de la glándula mamaria y de la lactogénesis STAT5b: Pérdida de la función de GH, incluyendo ausencia de dimorfismo sexual en la tasa de crecimiento, expresión de genes en el hígado y reducción de la fertilidad STAT5a/b: Pérdida de la proliferación de células T periféricas en respuesta a IL-2
STAT6	IL-4, IL-13, leptina	Pérdida de la respuesta a IL-4 como la diferenciación de células Th2

CNTF, factor ciliar neurotrófico; CSF-1, factor estimulante de colonias 1; EGF, factor de crecimiento epidermal; EPO, eritropoyetina; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; GH, hormona de crecimiento; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos; LIF, factor inhibidor de leucemia; OSM, oncostatina M; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PRL, prolactina; SCID, síndrome de inmunodeficiencia severa combinada.

Tabla 1. Unión de las proteínas JAK/STAT con receptores de citocina.

de JAK1 en la mediación de la respuesta biológica a IFN α e IFN γ .³⁰⁻³² Estos resultados establecen que JAK1 es un componente común de la vía JAK/STAT, el cual es compartido por todos los miembros de la familia de receptores de clase II, es decir, a los receptores de citocinas; además, JAK1 en la hematopoyesis, solo se asocia a receptores de citocina que selectivamente inducen el desarrollo de poblaciones de células linfoides.³

Otros resultados revelan que la respuesta mediada por el receptor de IL-7 requiere a JAK1 así como a JAK3. Se demostró que JAK1 es el socio obligado de JAK3 para la inducción de la señal de supervivencia.³

Los timocitos provenientes de ratones nulos para JAK1, no responden a otras citocinas linfopoyéticas como la IL-2 y la IL-4, ambos incorporan a γ_c como parte del complejo de receptor

activado.³³ Estos resultados demuestran que la asociación de JAK1 y JAK3 es necesaria para inducir las respuestas biológicas por los receptores que utilizan a la subunidad γ_c . JAK1 no es requerido por otros receptores hematopoyéticos, como aquellos que unen a GM-CSF o G-CSF, los cuales se había reportado que activaban a JAK1 y JAK2 *in vitro*.^{3,34} Las células T periféricas de ratones Knockout (KO) para JAK3 presentan características inusuales; exhiben en la superficie el fenotipo de células T activadas o de memoria, pero no responden y son altamente susceptibles a la apoptosis. Además, una gran parte de las células KO con JAK3 proliferan *in vivo*.³⁵

Las células T deficientes en JAK3 así como las deficientes en γ_c se parecen a las células T activadas o de memoria ya que expresan altos niveles de CD44 y CD69, y bajos niveles de CD62L. Esta activación de células T periféricas parece ser dependiente de la estimulación antigénica, por lo que, es

probable que las interacciones entre sí mismas o con los antígenos ambientales provoquen la activación policlonal de las células T deficientes en JAK3 y γ_c .^{35,36}

En ensayos *in vitro*, se ha observado que las células deficientes en JAK3 son incapaces de secretar IL-2 o de proliferar, aún en presencia de IL-2 exógena.³⁵ Estos defectos proliferativos indican que JAK3 es esencial para la señalización del receptor de IL-2.

Datos recientes muestran que las células T provenientes de ratones deficientes en JAK3 o γ_c son más propensas a la muerte celular; se ha descubierto que las células T deficientes en la subunidad γ_c expresan bajos niveles de bcl-2. Consistente con estas observaciones, la IL-2 y las señales de JAK3- γ_c previenen la apoptosis por un mecanismo que involucra la sobreexpresión de los genes anti-apoptóticos bcl-2 y bcl-xL.³⁵

El análisis de ratones KO deficientes de JAK3 y de humanos deficientes en JAK3 ha demostrado claramente el papel esencial y no redundante de JAK3 en algunas vías de señalización inducidas por citocinas. Por ejemplo, la señalización del receptor para IL-2, al cual se une JAK1 por medio de la cadena β y a JAK3 por la cadena γ ; si esta señalización es inhibida se produce el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID). En una línea de células B provenientes de un paciente con SCID, (esta enfermedad tiene como característica que las células del sistema inmune presentan una JAK3 mutada, la cual no es catalíticamente activa, por lo que las células son JAK3⁻), por lo que la IL-2 no induce fosforilación de JAK1, IL-2R β o de STAT5.^{36,34}

JAK3 ha sido recientemente implicada en el funcionamiento de otros inmunoreceptores. Se ha demostrado una asociación constitutiva entre la proteína de superficie celular CD40 y JAK3 en varias líneas de células B humanas, en donde JAK3 se activa y fosforila a CD40. Esta asociación ha sido encontrada en la región rica en prolina, en una secuencia de ocho aminoácidos en la cola citoplásmica de CD40 que se parece al motivo Box1 de los miembros de la familia de receptores de citocinas. La delección de esta secuencia resulta en la pérdida de la expresión de genes. Además, se ha descrito una asociación entre JAK3 y Sam68, un intermediario asociado con el receptor de antígeno de células T (TCR)¹¹. Interesantemente, timocitos procedentes de ratones que han perdido a JAK3 tienen respuestas disminuidas a la coestimulación con anti-CD3 y anti-CD28 cuando son comparadas con ratones que han perdido γ_c , sugiriendo que JAK3 puede tener un papel en la señal mitogénica al estimular al receptor de antígeno de los timocitos.¹¹

Se ha demostrado que la IL-2 estimula principalmente a JAK3 en comparación a JAK1 en linfocitos T humanos y en la línea celular YT.³⁸ También se ha demostrado que la activación de JAK1 no se requiere para la activación de JAK3 y STAT5 en las células MOLT4³⁹; la sobreexpresión de JAK3 resulta en su activación⁴⁰ y la activación de JAK3 precede a la activación de JAK1⁴¹; además JAK3 puede autofosforilarse.⁴²

Se ha demostrado recientemente la existencia de una activación jerárquica de las tirosina cinasas en la señalización mediada por la IL-2, esto es, Lck puede funcionar en forma paralela a JAK3, mientras que Syk funciona como un elemento río abajo de las JAKs en la señalización por IL-2. JAK3 puede regular la actividad catalítica de Syk vía JAK1 (ya que JAK3 fosforila a JAK1, pero no a la inversa). La activación de la vía JAK3/STAT no depende de Lck o Syk.⁴³

A pesar de la importancia de las JAKs, la regulación de su actividad enzimática aún no es bien comprendida. En general, la mayoría de las PTKs son sustratos para la fosforilación en Tyr, y este es un importante aspecto de su regulación. Evidencia experimental ha revelado que la autofosforilación de residuos críticos de Tyr en el dominio de cinasa de las PTKs es requerido para la completa actividad de la cinasa.⁴² Por ejemplo, se han identificado los residuos Y416 de c-Src y Y1162 del receptor de insulina (IRK)^{44,45} como sitios críticos de autofosforilación y como reguladores positivos de la actividad de cinasa.

La fosforilación de estos residuos usualmente se asocia con un gran incremento en la actividad de cinasa, y, por el contrario, las mutaciones en estas Tyr resultan en un marcado decaimiento de la actividad catalítica. En contraste, la fosforilación de otros residuos de Tyr en las PTKs puede regular de manera negativa la actividad de cinasa; un sitio regulador negativo importante en c-Src es Y527, un sitio fuera del dominio catalítico.⁴²

En el caso de JAK3, el residuo Y980 regula positivamente la actividad de cinasa, mientras que el residuo Y981 lo hace negativamente.⁴²

Una diferencia importante entre JAK1 y JAK3, es que son reguladas de manera diferencial por fosforilación en tirosinas específicas dentro de sus respectivos dominios asas de activación (activation loop); para JAK1 se ha encontrado que la tirosina 1033 es requerida para la actividad de cinasa, mientras que la tirosina 1034 no es necesaria para la misma actividad.⁴⁶ En el caso de JAK3, existen ciertas diferencias entre los resultados presentados por dos grupos (41, 42); uno de ellos menciona un par de tirosinas diferentes dentro del asa de activación (las tirosinas 975-976), y a diferencia de JAK1, la presencia de estas tirosinas no es necesaria para la actividad de cinasa. Estos resultados divergentes, pueden deberse a que ambos utilizaron sistemas diferentes: en el sistema que utilizó células U4A⁴² todas las mutantes de JAK3 dentro del asa de activación fueron igual de eficientes en cuanto a su actividad catalítica, pero en el sistema de COS-7⁴¹, la mutante Y981F mostró mucho más actividad que la JAK3 normal, mientras que JAK3 Y980F tuvo una menor actividad.

Ya que se ha demostrado que la activación de JAK1 no es requerida para la activación de JAK3 y STAT5 en las células MOLT4³⁹ y la activación de JAK3 precede a la activación de JAK1⁴¹, estudios recientes se han enfocado a descubrir el mecanismo de la fosforilación de JAK1 por JAK3, utilizando un

péptido, que corresponde al asa de activación de JAK1 (J1L) (KAEITDKEY⁹Y¹⁰TVKD). JAK3 fosforila a J1L preferentemente en Y¹⁰, esto es, se fosforila primero una de las tirosinas (Y¹⁰) seguido de la liberación del péptido monofosforilado; para obtener el péptido difosforilado, es necesario que el péptido monofosforilado se vuelva a unir a JAK3. Este mecanismo se ha llamado distributivo. Además, el ATP y el péptido se unen de manera independiente a la cinasa, de manera similar a lo reportado para las cinasas Src.^{46, 47}

ESTRUCTURA DE LAS JANUS CINASAS

La familia de las Janus cinasas (JAK) consiste en cuatro proteínas homólogas en los mamíferos (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2), cada una consiste de 1100-1200 aminoácidos, organizados en siete dominios de homología Janus (JH), basados en su similitud en la secuencia entre los miembros de la familia.^{12, 48-50} Esta familia no posee los dominios clásicos de SH2 o SH3, y excepto por el dominio catalítico, exhiben poca homología con otras proteínas tirosina cinasas.^{12, 78} Las JAKs son únicas entre las proteínas tirosina cinasas, ya que presentan un dominio catalítico C-terminal (JH1) yuxtapuesto con un dominio de pseudocinasa (JH2).^{23, 51}

Dominio N-terminal

Aunque la mitad N-terminal de las cinasas JAK contienen los dominios JH3-JH7, los cuales son requeridos para la interacción con el receptor en varios sistemas, la naturaleza precisa de las interacciones aún no ha sido resuelta.¹² Experimentos de quimeras de JAK2-JAK1 en una línea deficiente de JAK2, sugieren que los dominios JH7-JH6 de JAK2 son suficientes para la asociación física con el IFN- γ R2 y para la activación de STAT1 inducible por IFN γ . Experimentos usando a una quimera de JAK1-JAK2, sugirieron que la mitad N-terminal (JH7-JH3) de JAK1 es requerida para unirse al IFN- γ RI y para la activación de STAT1 inducible por IFN.^{12, 52}

En el sistema del receptor de IL-2 (IL-2R), un fragmento de JAK3 que contenía a JH6 y JH7 pudo unirse a la cadena γ_c , pero la reconstitución de la respuesta inducida por IL-2 se mostró solo con la región larga, que consiste en los dominios JH7-JH4.⁵³ Aunque las regiones necesarias de las Janus cinasas para la asociación con el receptor se encuentran en la región N-terminal, aun no se han definido las regiones cortas o los dominios discretos requeridos para la unión.¹²

La región proximal a la membrana de la cola citoplásmica del receptor de citocina, conocida como Box1/Box2, es esencial para la transducción y activación de JAK. Las cinasas JAK se unen directamente con esas regiones.⁵⁴

Aunque la región Box1 es débilmente conservada, cada receptor presenta un motivo o región rica en prolina dentro de Box1, y las mutaciones dentro de esta región pueden interrumpir la asociación. Un punto de mutación (L271Q) en la región Box1 de la subunidad γ_c del receptor interrumpe la interacción JAK3- γ_c , y provoca inmutabilidad combinada ligada al cromosoma X

(XCID).⁵⁰ La única proteína JAK o STAT para la que se han reportado mutaciones “naturales” es para JAK3.^{2, 25,35,50,55,56}

Estudios estructurales recientes han determinado que la región JH3-JH4 muestra similitud con los dominios SH2, y que la región JH4-JH7 constituye un dominio de homología FERM (four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin); este dominio FERM media interacciones proteína-proteína.⁵⁷ El dominio FERM de JAK1 puede ser crítico para la interacción con la porción citoplásmica del receptor gp130.⁵⁸

Dominio de pseudocinasa

La presencia de un dominio de pseudocinasa distingue a las JAKs de otras tirosina cinasas.⁵¹ El dominio de pseudocinasa (KL, JH2) muestra todas las características de un dominio de cinasa, excepto la actividad catalítica. No es muy claro el papel de este dominio en la actividad de las JAKs, pero recientemente se ha propuesto que este dominio tiene funciones conservadas en JAK2 y JAK3. El dominio JH2 es requerido para dos funciones distintas en la señalización por citocinas: (i) para la inhibición de la actividad basal de JAK2 y JAK3, y (ii) para la activación de la señalización inducida por citocinas. Los mutantes por delección del dominio JH2 son catalíticamente activos, activan a STAT5 e interactúan con otras JAKs, pero el dominio JH2 se requiere para conectar estos eventos de señalización a la activación del receptor. Se ha propuesto que el dominio JH2 contribuye a la formación de complejos JAK-receptor en respuesta al ligando, donde JH2 actúa como un switch que regula la transducción de señales.⁵⁹

Dominio de cinasa

El dominio de cinasa se encuentra en JH1 y muestra las características clásicas de una tirosina cinasa.⁶⁰ Estas incluyen tirosinas conservadas que constituyen un componente crítico del asa de activación; Y1038/1039 en JAK1, Y1007/1008 en JAK2, Y980/981 en JAK3 y Y1054/1055 en Tyk2. La fosforilación de estas tirosinas lleva a cambios conformacionales que facilitan la unión del sustrato.

STATs

Las siete proteínas STAT identificadas en los mamíferos se encuentran en el rango de 750 a 800 aminoácidos. La distribución cromosómica, así como la identificación de las STATs en eucariotes más primitivos¹⁶, sugiere que esta familia surgió de un solo gene primordial.

Para que las STATs se activen, necesitan ser fosforiladas, usualmente por las JAKs. Los dominios JH2 de las JAK2 y 3 se asocian directamente con STAT5, 1 y 3.⁶¹ Pero también esta el modelo tradicional, el cual requiere que las STATs se asocien primero con el receptor.

Además de los residuos de tirosina en las STATs, algunas de las STATs también son fosforiladas en serina. Algunas STATs contienen una serina altamente conservada (Ser727 en STAT1), la cual es un sitio potencial para la fosforilación en el dominio

carboxi-terminal. En STAT 1 y STAT3, hay evidencia de fosforilación de esta serina *in vivo*, y se ha demostrado que esta fosfoserina es requerida para una máxima actividad transcripcional, aunque no todas las STATs requieren la fosforilación en Ser para ejercer su actividad transcripcional.⁶² Estudios posteriores demostraron que la fosforilación en tirosina de STAT1 no es un prerrequisito para la fosforilación en Ser, aunque una JAK2 activa es requerida para ambas fosforilaciones. Ya que la fosforilación en Ser puede ocurrir sin la fosforilación en Tyr, es muy probable que la fosforilación en Ser tenga lugar en el citoplasma.⁶³

Aún no es claro cual es la cinasa implicada en la fosforilación en Ser, pero existen algunas candidatas, por ejemplo, las cinasas activadas por mitógeno (ERK, JNK o p38MAPK) tienen un importante papel en la fosforilación del motivo PMSP. Este motivo, así como el PSP son secuencias que contienen sitios potenciales de fosforilación en Ser por cinasas dirigidas por prolina, particularmente la familia de las MAP cinasas. Las STATs 1, 3 y 4 contienen un motivo PMSP conservado entre los aminoácidos 720 y 730, lo que hace pensar que se trata de posibles candidatas para ser fosforiladas por la familia MAP.⁶⁴ Sin embargo, otros estudios indican que ERK2 activado por su cinasa río arriba, MEK1, reprime la actividad transcripcional de STAT3 inducida por Src o JAK2. ERK2 fosforila a STAT3 en tres serinas (ser 727, ser 705, y una tercera serina cuya posición no se ha determinado). Se ha propuesto que la cascada de la MAP cinasa puede regular negativamente las actividades de STAT3 tanto porque disminuye la fosforilación en Tyr, como por su asociación directa.⁶⁵ Tal vez diferentes niveles de fosforilación en Ser llevan a efectos opuestos en la actividad de las STATs.

Las proteínas STATs pueden interactuar consigo mismas y con otros factores de transcripción. Por ejemplo, el análisis mutacional de STAT3 indica que la formación del homodímero requiere residuos en las regiones C- y N-terminal.⁶⁶ Se ha encontrado actividad transcripcional cooperativa entre Jun y STAT3 β (esta STAT3 corta ha perdido 38 aminoácidos del extremo C-terminal de la forma larga (STAT3 α) y posee 7 aminoácidos más en este mismo extremo). Esta forma corta de STAT3 (STAT3 β) es transcripcionalmente activa bajo condiciones donde STAT3 α no lo es; STAT3 β y c-Jun son capaces de activar cooperativamente ciertos promotores.⁶⁷

Además de formar dímeros en respuesta al ligando, dos dímeros de STAT5 pueden interactuar en sitios de unión de baja afinidad en serie, como en el caso del gene del IL-2R α ⁶⁸; un residuo clave en la formación de tetrámeros de STAT es el Trp37. Este residuo se encuentra conservado en todas las STATs.²⁰ Otras regiones de las STATs pueden interactuar con otras proteínas, por ejemplo, la región de superenrollamiento (coiled-coil) de los residuos 150 a 200 de STAT1 está involucrada en la interacción con p48.⁶⁹ STAT1 también se une al factor USF-1, un miembro de la familia “ β zipper hélice-vuelta-hélice”, en la caja GAS/E⁷⁰ STAT1 y HSF-1 (factor de transcripción activado por estrés) se

unen junto a otros elementos al DNA para activar la transcripción de Hsp90.⁷¹

Por otro lado, también podemos encontrar activación de las STATs en condiciones patológicas. Un ejemplo lo encontramos en la línea Du-145 de cáncer de próstata, donde una mayor expresión de BRCA1 resulta en una fosforilación constitutiva de STAT3 tanto en Tyr como Ser. Además, JAK1 y JAK2 interactúan y son activados por BRCA1, indicándonos que esta molécula puede modular la vía JAK-STAT.⁷² Otro ejemplo lo hallamos en algunas líneas de cáncer de seno. En 6 líneas derivadas de carcinoma de seno se analizó la expresión de ErbB y STAT, la expresión y activación de las STATs fue consistente. Se descubrieron 2 niveles de activación de STAT3 en cuanto a su unión al DNA: (i) el efecto inducible por el EGF, requiere un alto nivel de actividad de ErbB1 y de JAK; (ii) un efecto que depende de un nivel alto de suero y es mantenida por una señal paracrina/autocrina y requiere a JAK, pero es independiente de ErbB1. La activación de STAT3 se correlacionó con proliferación.⁷³ También se ha encontrado una activación constitutiva de STAT3 y 5 en líneas de cáncer cervical; la fosforilación de las mismas aumenta con estímulo de IL-2.²³

La activación constitutiva de STAT1, 3 y 5 ha sido demostrada en leucemias crónicas y agudas, ya que estas proteínas median respuestas celulares para factores de crecimiento. En la leucemia crónica mielogénica, STAT5 es muy importante en la patogénesis de esta leucemia. Por el contrario, en la leucemia linfocítica crónica, no se ha encontrado una activación constitutiva de las STATs.⁷⁴

ESTRUCTURA DE LAS STATs

Al menos siete STATs han sido identificadas en los mamíferos, tienen un tamaño de entre 90 y 115kDa.

Las STATs comparten algunos dominios con alta homología. Para formar los dímeros, el dominio Src de homología 2 (SH2) de un monómero se une a una fosfotirosina opuesta de otra STAT o de alguna otra molécula; esta fosfotirosina se encuentra cerca de C-terminal y está altamente conservada. El dominio linker, tiene una función poco definida. Sin embargo, mutaciones en dos residuos dentro de este dominio en STAT1 eliminan la respuesta transcripcional del IFN- γ pero no del IFN- α .^{15,75} El dominio de unión al ADN es muy cercano al N-terminal, y el dominio N-terminal por si mismo está involucrado en muchas interacciones proteína-proteína y también en la translocación al núcleo así como en la desactivación de las STATs.⁷⁶

Dominio N-terminal

El dominio N-terminal comprende aproximadamente 130 aminoácidos, y está conservado entre las STATs. Algunos estudios sugieren que la dimerización de este dominio promueve la unión cooperativa a los elementos GAS.^{77, 78} Otros estudios han sugerido que el dominio N-terminal promueve la interacción con el co-activador transcripcional CBP/p300⁷⁹ y que puede regular la translocación nuclear.⁸⁰

Dominio de superenrollamiento (coiled-coil)

Una cadena polipeptídica flexible une al dominio N-terminal con el dominio de superenrollamiento. Este último dominio consiste en 4 hélices α (aminoácidos 135-315). Puede interactuar con proteínas como p48/IRF86, c-Jun, proteína de interacción con (Nmi) N-Myc y StIP.^{81,82} Estudios recientes muestran que este dominio está involucrado con la unión al receptor, con la fosforilación en Tyr y con la exportación nuclear.⁸³

Dominio de unión al DNA

El dominio de unión al DNA (aminoácidos 320-480) es un barril- β con un pliegue de inmunoglobulina. Esta estructura es una reminiscencia de los dominios de unión de las proteínas NF- κ B y p53. La cooperatividad en la unión al DNA parece ser importante para una actividad transcripcional efectiva. Además, probablemente el dominio de unión al DNA exhiba diferentes conformaciones antes de la activación, esto hace pensar en que tienen posiblemente actividades adicionales.⁸⁴

Dominio SH2 y motivo de activación en Tyr

El dominio SH2 (~ residuos 580-680) de las STATs juega un importante papel en la señalización, debido a su capacidad de unir fosfotirosinas que se encuentran en motivos específicos de otras proteínas; consistente con esta función, este es el dominio más altamente conservado en las STATs.

Este dominio consiste de hojas β antiparalelas flanqueadas por dos hélices α , las cuales forman un bolsillo. Una arginina conservada (Arg602 en STAT1, Arg609 en STAT3) interactúa con el fosfato.

Este dominio tiene tres papeles importantes en la señalización: (i) participa en el reclutamiento de las STATs al receptor de citocina a través del reconocimiento de fosfotirosinas específicas; (ii) asociación con las JAKs activadas⁸⁵ y (iii) para la homo o heterodimerización de las STATs.

Dominio de activación transcripcional

La primera evidencia de que el extremo carboxilo terminal contiene el dominio de activación transcripcional (TAD) proviene de los análisis comparativos entre la forma completa de STAT1 y una variante de empalme, la isoforma STAT1 β , la cual carece de los últimos 38 aminoácidos en el carboxilo terminal. Se han caracterizado isoformas truncadas en el C-terminal de STAT3, STAT4 y STAT5.⁶ Estas formas parecen funcionar como reguladores dominantes negativos.

Mecanismos de regulación negativa de JAK-STAT

Existen mecanismos de regulación para apagar la señal de transmisión después de la estimulación con citocinas; sin embargo, se conoce poco acerca de estos mecanismos reguladores negativos. Existe la regulación negativa por competencia del ligando con formas solubles del receptor de citocina, que se generan por rompimiento proteolítico o por empalmes alternos del ARNm. Otro mecanismo común utilizado por las células para prevenir la señalización continua

es la endocitosis del receptor.⁸⁰

Otro es el mecanismo de regulación es la proteólisis.⁸⁶ En particular, la vía ubiquitina-proteasoma, juega un papel importante en la degradación de un gran número de proteínas celulares incluyendo a los factores de transcripción.⁸⁶ Las proteínas blanco son primero cebadas con múltiples moléculas de la pequeña proteína ubiquitina y entonces son destruidas por el complejo del proteasoma.^{80,86} Existen reportes que indican el papel potencial de la proteólisis mediada por proteasoma en la regulación negativa de la actividad de STAT1 después de estimulación con IFN- γ , estos estudios se realizaron en células HeLa, las cuales se trataron con un inhibidor de proteasoma y la ubiquitinación y degradación de STAT1 se redujo. La ubiquitina puede también estar involucrada en la endocitosis de los receptores de la hormona del crecimiento (GH)⁸⁰, y los inhibidores de proteasoma también pueden prolongar la activación de las JAKs, sugiriendo que el sistema ubiquitina-proteasoma puede participar en varios pasos de la vía de señalización por citocinas.⁸⁰

En 1997, una proteína fue aislada, se inducía después de la estimulación por citocinas como la IL-6, IL-2, IL-3, IFN- γ , entre otras, e inhibía la transducción de señales desencadenada por estas citocinas, uniéndose a las JAKs. Estas proteínas son conocidas por diversos nombres: SSI-1 (Inhibidor de STAT-1), SOCS-1 (supresor de las señales de citocina)⁸⁷ o proteína de unión a JAK, JAB.^{88,89}

Se ha reportado que SSI-1 se une a las 4 JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) y posiblemente a otras tirosina cinasas como Tec, Pyk2 y otras⁸⁸, aunque existen otros reportes que indican que la especificidad *in vitro* de SSI-1 no ha sido bien definida.⁸⁷

Se conocen 8 proteínas relacionadas a SSI-1, las cuales tienen 2 dominios característicos, un dominio SH2 y un dominio carboxilo terminal conservado, el cual se ha llamado motivo SC (también llamado caja SOCS). Esta familia de proteínas muestra un nuevo tipo de inhibición de la actividad de tirosina cinasa, a través de la unión independiente en la tirosina crítica en el asa de activación (activation loop) del dominio catalítico y uniéndose al surco catalítico.^{89,24}

Fármacos inhibidores de la vía JAK-STAT

Ya que la inactivación de las STATs muy probablemente este relacionada con la inhibición del crecimiento celular, se han identificado una serie de inhibidores específicos para estas moléculas; por ejemplo, se ha reportado que el piceatanol, que es un inhibidor de tirosina cinasa, es capaz de inhibir selectivamente la activación de STAT3 y STAT5 a/b mediada por IFN- α , mientras que STAT1 no es afectado; el piceatanol también es capaz de inhibir a JAK1.⁹⁰

Una STAT1 activa es esencial para los efectos antiproliferativos del IFN- α ¹², mientras que STAT3 es un oncogene⁹¹, el uso de inhibidores específicos como el piceatanol pueden tener un uso

como agentes farmacológicos para inhibir a STAT3 y STAT5, pero no a STAT1, lo que probablemente desemboque en una inhibición específica de células tumorales. Esto en base a la observación de que la línea celular CALO, que representa un estadio menos avanzado, expresa más a STAT1 que INBL, una línea celular que proviene de un estadio más avanzado y expresa menos esta misma molécula (Valle Mendiola, datos no publicados).

Un inhibidor de la vía JAK-STAT es el AG-490, que es un miembro de la familia de las tirfostinas, las cuales son derivados del malonitrilo benzilideno. A concentraciones relativamente bajas puede bloquear las formas hiperactivas de JAK2 en leucemias linfoblásticas agudas (ALL), también bloquea efectivamente la activación de STAT3.^{92,93} Este inhibidor bloquea la proliferación mediada por IL-2 en células T e induce apoptosis en células de ALL y no ejerce un efecto aparente en el crecimiento de células T normales.⁹³ El AG-490 se ha considerado un inhibidor específico de JAK2 en estudios realizados en ALL, sin embargo, otros estudios sugieren que también es un inhibidor de JAK3 (inhibición de J3/S5a/b) y no tiene efectos sobre otras cinasas (Lck, Lyn, Btk, Syk o Src)⁹³

Esta tirfostina es bien tolerada *in vivo* y no afecta el crecimiento de células deficientes en JAK3 (Jurkat), por todos estos datos, el AG-490 promete ser un agente terapéutico potencial en enfermedades con JAK3 hiperactiva, alergias y desordenes autoinmunes.⁹³

Por otro lado, los glucocorticoides (GC) son utilizados como agentes inmunosupresores, los mecanismos moleculares de inmunosupresión han sido ampliamente investigados. Dos mecanismos importantes involucrados en este fenómeno son la inhibición de citocinas, quimiocinas y la producción de moléculas de adhesión, y la acción antagónica de citocinas anti-inflamatorias como la IL-1 y el TNF. Los GC también pueden tener interacción física directa con el AP-1 y el NF- κ B para inhibir su actividad transcripcional.⁹⁴ Recientemente se ha descrito que los GC pueden inhibir a la vía JAK-STAT por supresión de JAK3 e inactivación de STAT5 a nivel de su fosforilación. La señalización inducida por IL-2 fue suprimida en pacientes tratados con esteroides. Esta inhibición de la señalización por IL-2 probablemente contribuya a los efectos inmunosupresivos de los GCs y a la eficacia de estos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.⁹⁴

Recientemente, otras moléculas se han involucrado con la inhibición de la vía JAK-STAT; tal es el caso de la hidroxilamina derivada del sulfametoxazol (SMX-HA), este subproducto es capaz de producir supresión en el crecimiento de células T en concentraciones administradas durante el tratamiento; este metabolito fue capaz de prevenir la fosforilación de la vía JAK-STAT en células mononucleares de sangre periférica.⁹⁵

Un ejemplo de inhibidor diseñado para JAK3 lo encontramos con el compuesto 4-(3', 5'-dibromo-4'-hidrofenil) amino-6, 7-

dimetoxiquinazolina (WHI-P97), pero su mecanismo no ha sido bien establecido.⁹⁶ También se han desarrollado anticuerpos que pueden inactivar a algunas de las STATs, por ejemplo, el anticuerpo quimérico de ratón anti CD20 humano, llamado rituximab. Este anticuerpo y el anticuerpo anti-IL-10 disminuyen la habilidad de STAT3 para unirse al DNA. Esta disminución se correlaciona con la disminución de la expresión de Bcl-2.⁹⁷

La vía JAK-STAT ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, y se han logrado grandes avances en este campo, pero aún queda mucho por descubrir, por ejemplo, si se pueden utilizar las STATs como blanco para tratamientos de leucemias y de otras enfermedades con una vía JAK-STAT hiperactiva.

También es claro que las implicaciones de esta vía en la oncogénesis deben ser objeto de mayor atención.

BIBLIOGRAFÍA

1. Heim MH. The Jak-STAT pathway: cytokine signaling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res.* 1999 19:1-4 75-120.
2. Pellegrini S, John J, Shearer M, Kerr IM, Stark GR: Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1989, 9: 4605-4612.
3. Rodig S.J., Meraz M.A., White J.M., Lampe P.A., Riley J.K., Arthur C.D., King K.L., Sheehan K.C.F., Yin L., Pennica D., Johnson Jr. E.M. and Schreiber R.D. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998, 93: 373-383.
4. O'Shea J.J. Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity* 1997 7,1-11.
5. Habib T, Senadheera S, Weinberg K and Kaushnasky. The common γ chain is a required component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry.* 2002, 41: 8725-8731.
6. Schindler C, Strehlow I. Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol* 2000, 47: 113-174.
7. Sato N, Miyajima A. Multimeric cytokine receptors: common versus specific functions. *Current Opinion in Cell Biology* 1994, 6:174-179.
8. Murakami M, Narazali M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T: Critical Cytoplasmic Region of the Interleukin 6 Signal Transducer gp130 is Conserved in the Cytokine Receptor Family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88: 11349-11353.
9. Leonard W, O'Shea JJ. JAKs and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998, 16:293-322.
10. Azam M., Erdjument-Bromage H., Kreider B.L., Xia M., Quelle F., Basu R., Saris C., Tempst P., Ihle J.N., Schindler C. Interleukin-3 signals through multiple forms of Stat5. *EMBO J* 1995, 14, 1402-1411.
11. Liu K. D., Gaffen S. L., Goldsmith M.A. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Current Opinion in Immunology* 1998, 10, 271-278.
12. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr:

- Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both IFN- α and IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 7673–7678.
13. Horvath CM, Darnell JE Jr: The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *J Virol* 1996, 70: 647–650.
 14. Horvath CM, Darnell JE Jr: The state of the STATs: Recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Current Opinion in Cell Biology* 1997, 86: 233-239.
 15. Chatterjee-Kishore M., Van Der Akker F. and Stark G.R. Association of STATs with relatives and friends. *Trends in Cell Biology* 2000, 10: 106-111.
 16. Cosman D., Lyman S. D., Idzerda R. L., Beckmann M. P., Park L. S., Goodwin R. G., March C. J. A new cytokine receptor superfamily. *TIBS* 1990 15: 265.
 17. Cacalano N.A., Migone T.S., Bazan F., Hanson E.P., Chen M., Candotti F., O'Shea J.J., Johnston J.A. Autosomal SCID by a point mutation in the N-terminus of Jak3: mapping of the Jak3-receptor interaction domain. *EMBO J* 1999, 18: 1549.
 18. Taniguchi T. Cytokine signal transduction through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*. 1995 268: 251.
 19. Lin J.X., Leonard W.J. The role of the STAT5a and STAT5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 2000 19: 2566.
 20. Sehgal PB. STAT-signalling through the cytoplasmic compartment. Consideration of a new paradigm. *Cellular signaling* 2000 12: 525-535.
 21. Lai KS, Jin Y, Graham DK, Witthuhn, Ihle JN, Liu ET. A kinase-deficient splice variant of the human JAK3 is expressed in hematopoietic and epithelial cancer cells. *J Biol Chem* 1995 270: 25028-25036.
 22. Leticia Rocha-Zavaleta, Carlos Huitron, Julio R. Cacéres-Corté, José A. Alvarado-Moreno, Arturo Valle-Mendiola, Isabel Soto-Cruz, Benny Weiss-Steider, Rosalva Rangel-Corona interleukin-2 (IL-2) receptor-hg signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signaling* 2004 16(11); 1239-47.
 23. Chen E.H., Gadina M., Galon J., Chen M and O'Shea. Not just another meeting: the coming of age of JAKs and STATs. *Immunology Today* 1998, 186, 338-341.
 24. Yasukawa H., Misawa H., Sakamoto H., Masuhara M., Sasaki A., Wakioka T., Ohtsuka S., Imaizumi T., Matsuda T., Ihle J.N. and Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999, 18: 1309-1320.
 25. Notarangelo L.D. Immunodeficiencies caused by genetic defects in protein kinases. *Curr Op Immunol* 1996, 8:448-453.
 26. Miyazaki, Takaoka A, Nogueira L, Dikic I, Fujii H, Shiho, Mitani Y, Maeda M Schlessinger J and Taniguchi T. Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-cupled JAK signaling pathway. *Genes and Development* 1998 12: 770-775.
 27. Kawahara A, Minami Y, Miyazaki T, Ihle J, Taniguchi T: Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor γ -chain-associated Jak3 in the induced c-fos and c-myc, but not bcl-2, gen induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 92: 8724.
 28. Ahmed NN, Grimes LH, Bellacosa A, Chan TO, Tschilich PN. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997 94: 3627-3632.
 29. Mazière C, Conte MA, Mazière JC. Activation of the JAK/STAT pathway by ceramide in cultured human fibroblasts. *FEBS Lett* 2001 507: 163-168.
 30. Muller M, Briscoe J, Laxton C, Ziemiecki A, Schindler C. The protein tyrosine kinase JAK1 complements a mutant cell line defective in the interferon α/β and γ signal transduction pathways. *Nature* 1993 366:129-135.
 31. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC and Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromise innate immunity to viral infection. *Cell* 1996 84: 443-450.
 32. Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Campbell D. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1998, 93: 373-383.
 33. Leonard WJ, Shores EW and Love PE. Role of the common cytokine receptor γ chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* 1995 148:97-114.
 34. Ihle JN, Wittuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K and Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptor. *Annu Rev Immunol* 1995 13: 369-398.
 35. Thomis D.C., Berg L.J. The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling. *Curr Op Immunol* 1997, 9, 541-547.
 36. Thomis DC, Berg LJ. Peripheral expression of JAK3 is required to maintain T lymphocyte function. *J Exp Med* 1997, 185: 197–206.
 37. Oakes SA, Candotti F, Johnston JA, Chen Y-Q, Ryan JJ, Taylor N, Liu X, Hennighausen L, Notarangelo LD, Paul WE et al. Signaling via IL-2 and IL-4 in Jak3-deficient severe combined immunodeficiency lymphocytes: Jak3-dependent and independent pathways. *Immunity* 1996, 5: 605–615.
 38. Kirken RA, Rui H, Malabarba GM, Howard ZOM, Kawamura M, O'Shea JJ, Farrar WL. Activation of Jak3, but not Jak1 is critical for IL-2 induced proliferation and Stat5 recruitment by a COOH-terminal region of the IL-2 receptor γ -chain. *Cytokine* 1995; 7: 7.
 39. Oda K, Sugamura K. Regulation of IL-2 signaling. *Leukemia* 1997; 11 Suppl. 3: 416-7.
 40. Marx J: Forging a path to the nucleus. *Science* 1993, 260: 1588–1590.
 41. Wittuhn BA, Williams MD, Kerawalla H, Uckun FM. Differential substrate recognition capabilities of Janus family protein tyrosine kinases within interleukin 2 receptor(IL2R) system: Jak3 as an potential molecular target for treatment of leukemias with hiperactive Jak-Stat signaling machinery. *Leuk Lymphoma* 1999 32: 3-4 289-297.
 42. Zhou YJ, Hanson EP, Chen YQ, Magnuson K, Chen M, Swann PG, Wanger RL, Cahngelian PS, O'Shea JJ. Distinct tyrosine phosphorylation sites in Jak3 Kinase domain positively and negatively regulates its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 13850.
 43. Zhou YJ, Magnuson KS, Cheng TP, Gadina M, Frucht DM, Galon J, Candotti F, Geahlen RL, Changelian PS and O'Shea J. Hierachy of protein tyrosine kinases in interleukin-2 (IL-2) signaling: activation of Syk depends on JAK3; however, neither Syk nor Lck is required for

- IL-2-mediated STAT activation. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 4371-80.
44. Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, and White MF. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J Biol Chem*, 1992, 267.
45. Hubbard SR, Wei L, Ellis L and Hndrickson. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*, 1994, 372, 746-754.
46. Broener RJ, Barker WB, Knight. Kinetic mechanisms of the forward and reverse pp60c-src tyrosine kinase reactions. *Biochemistry*, 1995, 34: 16419-16423.
47. Wang R, Griffin PR, Small EC and Thompson JE. Mechanism of Janus kinase 3-catalyzed phosphorylation of a Janus kinase 1 activation loop peptide. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 2003, 410: 7-15.
48. Wilks A.F., Harpur A.G., Kurban R.R., Ralph S.J., Zurcher G. and Zimiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 1991 11, 2057-2065.
49. Harpur A.G., Andres A.C., Zimiecki A., Aston RR and Wilks A.F JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* 1992, 7, 1347-1353.
50. Sedlacek H.H. Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. *Drug* 2000 59, 435-476.
51. Ihle JN The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001 13 213-217.
52. Kohlhuber F. A. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol* 1997, 17, 695-706.
53. Chen M. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common γ chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94, 6910-6915.
54. Murakami M., Narazaki M., Hibi M., Yawata H., Yasukawa K., Hamaguchi M., Taga T., and Kishimoto T. Critical Cytoplasmic Region of the Interleukin 6 Signal Transducer gp130 is Conserved in the Cytokine Receptor Family *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88, 11349-11353.
55. Russell S.M., Johnston J.A., Noguchi M., Kawamura M., Bacon C.M., Friedman M., Berg M., McVicar D.W., Witthuhn B.A., Silvennoinen O. *Science*. 1994, 266, 1042-1045.
56. Suzuki K., Nakajima H., Saito T., Leonard W.J., Iwamoto I. Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (γ (c))-dependent signaling: comparative analysis of γ (c), Jak3, and γ (c) and Jak3 double-deficient mice. *Int Immunol* 2000, 12, 123-32.
57. Girault JA, Labesse G, Mornon JP. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol Med*, 1998, 4 751-769.
58. Catharinen M. U. Hilkens, Hayaatun Is'harc, Björn F. Lillemeier, Birgit Strobl, Paul A. Bates, Iris Behrmann and Ian M. Kerr region encompassing the FER domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130 *FEBS Lett* 2001, 505 87-91.
59. Saharinen P and Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002, 277 47954-47963.
60. Stevan R Hubbard, Jeffrey H Till. PROTEIN TYROSINE KINASE STRUCTURE AND FUNCTION *Annu Rev Biochem* 2000, 69 373-389.
61. Yoshio Fujitani, Masahiko Hibi, Toshiyuki Fukada, Mariko Takahashi-Tezuka, Hideyuki Yoshida, Takuya Yamaguchi, Kenji Sugiyama, Yojiro Yamanaka, Koichi Nakajima & Toshio Hirano An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT *Oncogene*, 1997, 14:751-761.
62. Wen Z, Zhong Z and Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995; 82: 241-250.
63. Zhu X, Wen Z, Xu ZL and Darnell JE Jr Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol Cell Biol* 1997 17 6618-6623.
64. Decker T, Kovarik P Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000 19 2628-2637.
65. Jain NJ, Zhang T, Fong SL, Lim ChP and Cao X. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene* 1998 17 3157-3167.
66. Sasse J. *et al.* Mutational analysis of acute-phase response factor/ Stat3 activation and dimerization. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17:4677-4686.
67. Schaefer TS, Sanders LK and Nathans D. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 92; 9097-9101.
68. Meyer W.K. *et al.* Interaction of STAT5 dimers on two low affinity binding sites mediates interleukin 2 (IL-2) stimulation of IL-2 receptor alpha gene transcription. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:31821-31828.
69. Horvath C.M. *et al.* Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol. Cell. Biol.* 1996, 16:6957-6964.
70. Muhlethaler-Mottet A. *et al.* Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity*, 1998, 8:157-166.
71. Stephanou A. and Latchman D.S. Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors. *Gene Expr*, 1999, 7:311-319.
72. Gao B, Shen X, Kunos G, Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM and Fan S. Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. *FEBS Lett* 2001, 488 179-184.
73. Li L and Shaw P. Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J Biol Chem* 2002 277 17397-17405.
74. Lin TS, Mahajan S and Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias *Oncogene* 2000, 19 2496-2504.
75. Shuai K. The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999, 71:405-422.

76. Edward Yang, Zilong Wen, Richard L. Haspel, Jue J. Zhang, and James E. Darnell, Jr. The Linker Domain of Stat1 Is Required for Gamma Interferon-Driven Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19:5106-5112.
77. Vinkemaier U, Cohen LR, Moaerefi U, Chait BT, Kuriyan J and Darnell JE. *EMBO J* 1996 15 5616-5626.
78. Vinkemaier U, Moaerefi U, Kuriyan J and Darnell JE. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 1998 , 279 1058-1052.
79. Horvath CM. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends in Biochem Sci* 2000, 25 496-502.
80. Strehlow I and Schindler C. Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem* 1998, 273 28049-28056.
81. Horvath CM, Stark GM, Kerr IM and Darnell JE Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol* 1996, 16 6957-6964.
82. Collum RG, Brutsaert S, Lee G, and Schindler C A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97 10120-10125.
83. Beggit A, Meyer T, van Rossum M and Vinkemaier U. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97 10418-10423.
84. McBride KM, McDonald C and Reich NC Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 2000, 19 6196-6206.
85. Barahmand-Pour F, Meinke A, Groner B and Decker T. Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast *J Biol Chem* 1998, 273 12567-12575.
86. Naka T, Fujimoto M and Kishimoto T. Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends in Biochemical Sciences* 1999, 24: 3864-3868.
87. Morita Y, Naka T, Kawazoe Y, Fujimoto M, Narazaki M, Nakagawa R, Fukuyama H, Nagata S and Kishimoto T. Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 5405-5410.
88. Naka T, Fujimoto M and Kishimoto T. Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends in Biochemical Sciences* 1999, 24: 394-398.
89. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle J, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J*, 1999, 18: 1309-1320.
90. Su L., David M. Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J. Biol Chem* 2000; 275: 12661-66.
91. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese Ch and Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98: 295-303.
92. Wang HL, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR and Farrar WL. JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrophostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol* 1999; 162: 3897-904.
93. Kirken RA, Erwin RA, Taub D, Murphy WJ, Behbod F, Wang L, Pericle F and Farrar WL. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells *J Leuk Biol* 1999; 65: 891-9.
94. Bianchi M, Meng C and Ivashkiv LB. Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9573-78.
95. Hess DA, O'Leary EF, Lee JT, Almawi WY, Madrenas J and Rieder MJ. Inhibition of cytokine production and interference in IL-2 receptor-mediated Jak-Stat signaling by the hydroxylamine metabolite of sulfamethoxazole. *FASEB* 2001 15 1855-1857.
96. Malaviya R, Chen CL, Navara C, Malaviya R, Liu XP, Keenan M, Waurzyniak B and Uckun FM. Treatment of allergic asthma by targeting janus kinase 3-dependent leukotriene synthesis in mast cells with 4-(3', 5'-dibromo-4'-hydroxyphenyl)amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P97). *J Phar Experimental therapeutics* 2000 3 912-926.
97. Alas S and Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Research* 2001 61 5137-5144.