

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2320-B-038-051

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：黃惠美 台北醫學大學細胞及分子生物研究所

計畫參與人員：林宜豐、張庭維、陳幼禰、張綠萍 台北醫學大學細胞及分子生物研究所

一、摘要

細胞激素誘導不同的訊號途徑來調控血球細胞的形成。Janus kinases (JAKs)被發現在一些訊號途徑中扮演著重要的角色。在大部份的例子中特定的細胞激素可以同時活化一個以上的 JAK。然而同時活化的 JAK 如何影響細胞的活性並不清楚。我們之前的實驗結果顯示同時轉殖 CDJAK1 和 CDJAK2 的血球幹原母細胞株於抗體聚集後可偵測到磷酸化訊號包括 STAT5、MAPK 和 Akt 的酪胺酸磷酸化。在現今的研究,進一步地利用 JAK1 或 JAK2 inactive mutants (KE)取代其中一個 JAK, 所得到的兩個細胞株分別為 Ba/F3-JAK1KE+2 和 Ba/F3-JAK1+2KE。確實於抗體聚集後可以抑制或降低 STAT5, MAPK 和 Akt 的酪胺酸磷酸化以及細胞增生的活性。這些結果顯示, JAK1 和 JAK2 被活化所產生的協同作用可以提供訊號傳遞和細胞增生的活性。

關鍵詞：JAK、酪胺酸磷酸化、訊號傳遞

Abstract

Cytokines are able to induce various signaling pathways during hematopoiesis. Janus kinases (JAKs) were found to play a very important role in some signaling pathways. In most cases, more than one JAK will be simultaneously activated by specific cytokine. However, it is not clear that how simultaneous activated-JAKs can affect cellular activity. Our previous results have shown that phosphorylation signaling,

including tyrosine phosphorylation of STAT5, MAPK and Akt, can be detected after antibody cross-linking in hematopoietic progenitor cells co-transfected with CDJAK1 and CDJAK2. In present study, one of JAKs was replaced by JAK1 or JAK2 inactive mutants (KE). The resulted two cell lines, Ba/F3-JAK1KE+2 and Ba/F3-JAK1+2KE, respectively, indeed produce either inhibited or reduced phosphorylation profiles of STAT5, MAPK and Akt, as well as proliferation activity of cells after antibody cross-linking. These results show that both JAK1 and JAK2 need to be activated to produce synergistic effect for signal transduction and cellular proliferation.

Keywords: JAK, Tyrosine phosphorylation, Signal transduction

二、緣由與目的

血球細胞的生成需要透過許多細胞激素 (cytokine) 和細胞激素受體 (cytokine receptor) 的結合, 利用訊號傳遞 (Signal transduction) 來活化轉錄因子, 進而達成調節標地細胞不同時期的活性(1)。其中, JAK-STAT 途徑於細胞激素調控細胞的增生、分化、抑制細胞凋亡的活性上扮演著重要的角色。在哺乳類細胞中發現 4 個 JAK (Janus kinase) 家族成員: JAK1, JAK2, JAK3 和 TYK2; 及 7 個 STAT (Signal transducers and activators of transcription) 家族成員: STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a, STAT5b 和 STAT6。當細胞激素和受體結合後, 活化的 JAK 蛋白質會進一步的活化細胞激素受體, 受磷酸化的細胞

激素受體會產生一個蛋白質的接受位置 (Docking site)，結合到這個 docking site 的蛋白質包括了 STAT 蛋白質，STAT 蛋白質是一種轉錄因子，當 STAT 蛋白質結合到此一位置後，會被 JAK 蛋白質活化，產生磷酸化的現象，且形成同複合雙體 (homodimers) 或異複合雙體 (heterodimers)。進一步到細胞核中，結合到特定的 DNA 序列上，表現特定的蛋白質(2)。

過去的研究發現，不正常的表現 JAK 和 STAT 蛋白質，會造成血球方面的疾病。例如：JAK1、JAK2、STAT3 和 STAT5 不正常的活化會造成 T 細胞的淋巴腫瘤；不正常的活化 STAT1 和 STAT5 則會造成急性骨髓血癌(3)。此外細胞株中 JAK 蛋白質缺乏 kinase 活性，即使在細胞激素的刺激下，細胞株也會失去細胞增生和抑制細胞凋亡的活性(4)。根據以上的研究可以知道 JAK 蛋白質於細胞激素的訊號傳遞中扮演著重要的角色，一旦發生不正常，即造成嚴重的疾病。因此，了解 JAK 蛋白質於訊號傳遞中所扮演之機制是非常重要的。

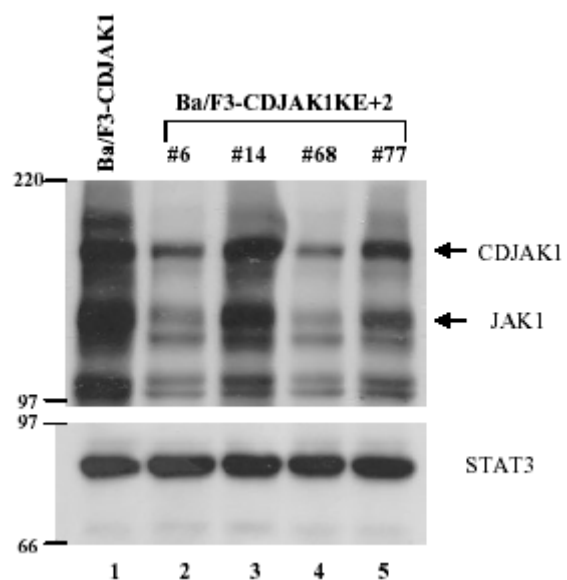
細胞激素刺激下通常會活化兩種或兩種以上的 JAK 蛋白質。例如 GM-CSF, IL-3 或 IL-5 會同時活化 JAK1 和 JAK2 (5,6)。過去研究利用 CD16-JAK2 及 EGF-JAK2 的融合蛋白質探討活化 JAK2 蛋白質對於細胞生長的影響(7,8,9)。結果發現含 wild type JAK2 融合蛋白質並無法有效維持細胞的生長及抑制細胞凋亡的能力。但是這些融合蛋白質只含 JAK2 的 kinase domain 時，則可以有效維持細胞的活性。此外，細胞表現 α , β /JAK2 融合蛋白質比細胞表現 β /JAK2 融合蛋白質有較好的細胞生長和抑制細胞凋亡的能力(10)。由於這些研究所用的細胞皆是 IL-3 依賴型幹原母細胞。因此，進一步推測，同時活化的 JAK1 和 JAK2 是支持細胞活性所必需的。

之前本實驗室已建立的穩定細胞株：Ba/F3-CDJAK1 細胞，穩定表現 CD16/CD7/JAK1 融合蛋白質；Ba/F3-CDJAK2 細胞，穩定表現 CD16/CD7/JAK2 融合蛋白質；和 Ba/F3-CDJAK1+2 細胞，穩定表現 CD16/CD7/JAK1+2 融合蛋白質。過去實驗證明，Ba/F3-CDJAK1+2 細胞

的 CDJAK1 和 CDJAK2 可以協同活化細胞內的酪胺酸磷酸化(tyrosine phosphorylation) 訊號。本計劃進一步的利用發生點突變的 CDJAK KE 和 wild type 的 CDJAK 同時表現於細胞時，探討細胞缺乏細胞激素，以抗體聚集細胞膜上的 CDJAK 融合蛋白質，其對於細胞增生及訊號傳遞的影響。

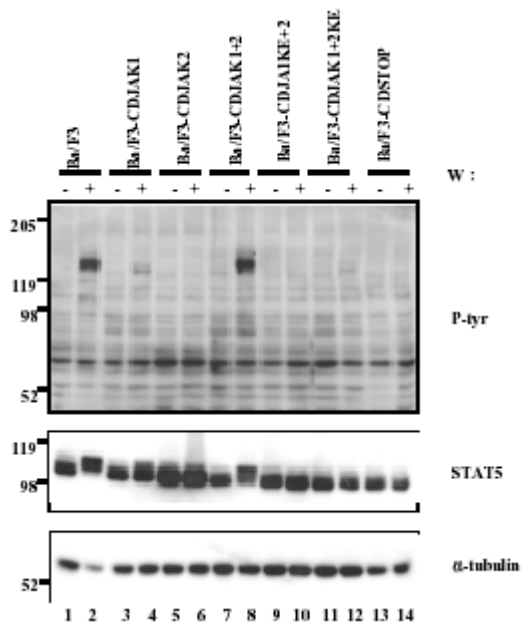
三、結果與討論

過去實驗發現 CDJAK1 和 CDJAK2 協同活化作用會受到 CDJAK KE 抑制。這些 KE 突變為 JAK kinase inactive mutant，當和 wild type 的 CDJAK 一起表現時，會影響原來 wild type 之 CDJAK1 和 CDJAK2 協同活化的作用。其中穩定細胞株 Ba/F3-CDJAK1KE+2 的融合蛋白質表現量較低，因此，重新挑選穩定細胞株，將表現 CDJAK1KE 的質體轉殖至 Ba/F3-CDJAK2 細胞，以 western blotting 分析，如圖所示：#14 和 #77 細胞與 Ba/F3-CDJAK1 細胞表現相當的 CDJAK1。STAT3 為 internal control，因此利用 Ba/F3-CDJAK1KE+2 #14 或 #77 細胞進行以下的實驗。

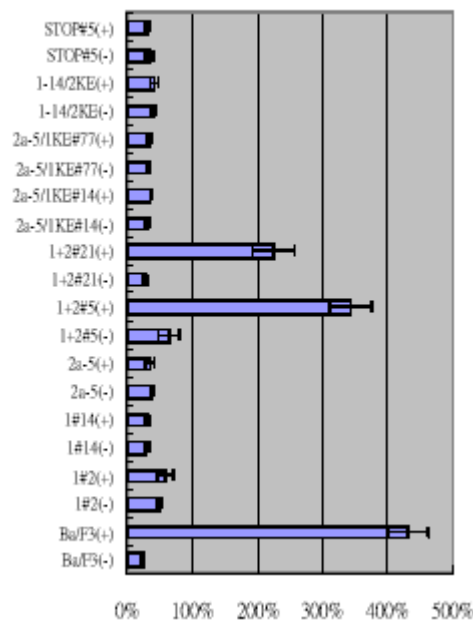


不同的穩定細胞株以 CD16 抗體聚集後，分析其 tyrosine phosphorylation 訊號。Western blotting 結果如圖所示，抗體聚集 "+" 後 Ba/F3-CDJAK1 細胞有較微弱的 tyrosine phosphorylation 訊號 (lane 4)，Ba/F3-CDJAK1+2 細胞有最強的訊號 (lane 8)，與 Ba/F3 細胞以細胞激素 "+" 刺激後的磷酸化訊號相當 (lane 2)。而 Ba/F3-

CDJAK2 之細胞並無可測得的 tyrosine phosphorylation 訊號(lane 6) 此結果與先前實驗室的結果一致。由 lane 9~12 發現, Ba/F3-CDJAK1KE+2 細胞及 Ba/F3-CDJAK1+2KE 細胞於抗體聚集 “+”, 其 tyrosine phosphorylation 的訊號和 Ba/F3-CDJAK1+2 細胞相較有大幅度的下降或抑制。利用 STAT5 抗體分析發現 Ba/F3-CDJAK1+2 細胞的 STAT5 蛋白質有往上移動的現象(lane 8), 與 Ba/F3 細胞以細胞激素刺激有相同的結果(lane 2)。這是由於磷酸化的 STAT5, 使得在明膠上移動較無磷酸化的 STAT5 蛋白質來的慢。α-tubulin 抗體分析注入蛋白質的量是等量。以 MTT 分析方法, 觀察在抗體聚集 “+” 下, 這些穩定表現不同 CDJAK 蛋白質的細胞其增生的活性。為了證實這些穩定細胞株之細胞活性不受抗生素挑選過程中, 所篩選出之特殊細胞株, 而多選擇另一穩定細胞株來分析(Ba/F3-CDJAK1 # 2、Ba/F3-CDJAK1 # 14、Ba/F3-CDJAK1 + 2 # 5、Ba/F3-CDJAK1 + 2 # 21、Ba/F3-CDJAK1KE + 2 # 14、Ba/F3-CDJAK1KE + 2 # 77)。實驗結果發現 Ba/F3CDJAK1+2 細胞增生能力最好。細胞增生的情況和以 IL-3 刺激下的 Ba/F3 細胞相似。以上結果顯示, 細胞的 tyrosine phosphorylation 訊號及良好的增生能力需要 CDJAK1 和 CDJAK2 所引起的協同活化作用(11)。此外, 此協同活化作用可以活化 MAPK 和 Akt 的酪胺酸磷酸化(data not shown)。



MTT Assay



四、計畫成果自評

原計畫為申請二年進行此研究, 但是只通過為一年之計劃。原計畫有三個研究目的 Specific Aim#1: To identify the synergistic activation effect of both JAK1 and JAK2 is necessary for integral signaling. Specific Aim#2: To explore the synergistic activation effect of both JAK1 and JAK2 is required for the proliferation activity in cytokine-dependent cells. Specific Aim#3: To explore the downstream components of synergistic activation effect of both JAK1 and JAK2. 目前已達成大部份預期目標, 並且正在收集最後研究成果, 希望能儘快發表於學術期刊。詳細研究成果可參考碩士論文(11)。

JAK1 and JAK2 are activated at the same time that both should be thought playing the important role in cytokine signaling. Although in the recent years the role of JAK2 has been studied to participate in proliferation and in anti-apoptosis activity, little is known about JAK1 function. We purpose that JAK1 enhance the threshold of activated signaling with the JAK2, then integral activated-JAKs pathway can be delivered. Analysis of the synergistic effect of both JAK1 and JAK2 in our system should enable us to achieve following goals, 1) The establishment of central role of JAK1 and JAK2 in signaling. 2) Investigation of

regulation mechanism of JAKs pathway. 3) Identification of downstream components of JAKs. JAK/STAT pathway is widely used by members of the cytokine receptor superfamily. These cytokines are central for hematopoietic cell biology and hematopoietic therapy alike, including EPO, GM-CSF, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), thrombopoietin (TPO), interferons etc. Indeed, to study this pathway has provides wealth of information on hematopoiesis and hematopoietic diseases.

五、參考文獻

1. Orkin SH. Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem* (1995) 270: 4955-4958.
2. Aaronson DS and Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* (2002) 296:1653-1655.
3. Schindler CW. JAK-STAT signaling in human disease. *J. Clin. Invest.*(2002) 109: 1133–1137.
4. O'Shea JJ, Gadina M and Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. (2002) 109:S121-S131.
5. Huang HM, Huang CJ, and Jeffrey Yen JY. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood* (2000) 96: 1764-1771.
6. Ishikawa and Kiyoshi T. JAK2 and JAK1 constitutively associate with an interleukin-5 (IL-5) receptor subunit, respectively, and are activated upon IL-5 stimulation. *Blood* (1998) 91: 2264-2271.
7. Ikuya S, Lisle N, and Andrew SK. Signal transduction by a CD16/CD7/Jak2 fusion protein. *J. Biol. Chem.* (1995) 270: 18420-18427.
8. Ikuya S and Andrew SK. The kinase domain of Jak2 mediates induction of Bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* (1997) 272: 12350-12358
9. Norihiko N, Chin H, Nobuyuki M, and Osamu M. An Epidermal growth factor receptor/Jak2 tyrosine kinase domain Chimera induces tyrosine phosphorylation of Stat5 and transduces a growth signal in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* (1996)

271: 19483-19488.

10. Liu CB, Itoh T, Arai KI, and Watanabe S. Constitutive activation of JAK2 confers murine interleukin-3 independent survival and proliferation of Ba/F3 cells. *J. Biol. Chem.* (1999) 274:6342-6349.
11. 林宜豐。協同活化 JAK1 和 JAK2 於造血幹原母細胞中功能角色的探討。台北醫學大學細胞及分子生物研究所碩士論文。(2002)

附件：封面格式

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

同時活化的 JAK1 和 JAK2 於細胞激素依賴型之幹原母 細胞中功能角色的探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 90 - 2320 - B - 038 - 051 -

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃惠美 台北醫學大學細胞及分子生物研究所

計畫參與人員：林宜豐、張庭維、陳幼禰、張綠萍 台北醫學大學
細胞及分子生物研究所

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台北醫學大學細胞及分子生物研究所

中 華 民 國 91 年 10 月 4 日