

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

協同活化的 Janus Kinases 於幹原母細胞中功能角色及訊號  
傳遞的探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-038-028-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學細胞及分子生物研究所

計畫主持人：黃惠美

計畫參與人員：張庭維、鄭詩韻

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

## 成果報告 期中進度報告

### (計畫名稱)

協同活化的 Janus Kinases 於幹原母細胞中功能角色及訊號傳遞的探討  
The Functional Role and Signal Transduction of Synergistic Activation of Janus  
Kinases in Hematopoietic Progenitor Cells

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91 - 2320 - B - 038 - 028 -

執行期間： 91 年 08 月 01 日 至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：黃惠美

共同主持人：

計畫參與人員：張庭維、鄭詩韻

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢  
涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學細胞及分子生物研究所

中 華 民 國 92 年 10 月 30 日

## 中文摘要

血球細胞的增殖，分化及預防凋亡受到細胞激素的調控。細胞激素受體不含 kinase activity，因此需要細胞質內的 Janus kinase (JAK)來幫忙傳遞訊號。許多細胞激素可以活化兩個或兩個以上的 JAKs。目前的研究大多集中於單一 JAK 於細胞激素的訊息傳遞下所扮演的角色，而對於同時活化的 JAKs 如何影響訊息傳遞和細胞活性的作用機轉卻不清楚。此實驗利用有條件的活化系統，CD16/CD7/JAK (CDJAK)，於 IL-3 依賴型細胞中同時活化兩個 CDJAKs。此融合蛋白包含 CD16 的膜外區域，CD7 的膜間區域，以及 JAK1 (CDJAK1)或 JAK2 (CDJAK2) cDNA 作為細胞質內的區域。我們建立以下幾種穩定細胞株：同時表現野生型 CDJAK1 和 CDJAK2 (CDJAK1+2)，同時表現野生型 CDJAK 和 kinase mutant CDJAKKE (CDJAK1KE+2 or CDJAK1+2KE)，或單獨表現 CDJAK1 或 CDJAK2 的 Ba/F3 cells。利用抗 CD16 抗體單獨聚集 CDJAK1 或 CDJAK2 都可以造成其本身 tyrosine phosphorylation，但是並不會進一步傳遞訊號和提供細胞活性。同時聚集 CDJAK1 和 CDJAK2 的融合蛋白，引發 Ba/F3-CDJAK1+2 細胞的酪胺酸磷酸化訊號及 STAT5，MAPK，Akt 的磷酸化以及支持增殖和預防細胞凋亡的活性。此結果顯示必需聚集 JAK1 和 JAK2 才會協同活化訊息傳遞。以 kinase 活性突變的 CDJAKKE 更進一步的證明 JAK1 和 JAK2 協同活化訊息傳遞的作用，需要正常的 kinase activity。此外，CDJAK1 和 CDJAK2 的協同活化作用會活化 $\beta_c$ 的磷酸化。再者，CDJAK1 和 CDJAK2 分別與 $\beta_c$ 和 IL-3R $\alpha$ 結合。因此，此結果顯示 CDJAK1 和 CDJAK2 的協同活化作用可能經由聚集兩個複合體 CDJAK1- $\beta_c$  和 CDJAK2-IL-3R $\alpha$ 形成更大的複合體並進一步誘導 $\beta_c$ 酪胺酸磷酸化和訊息傳遞。

**關鍵詞：**JAK，細胞激素，協同活化作用，酪胺酸磷酸化，細胞激素訊號

## Abstract

The proliferation, differentiation, and apoptosis prevention of hematopoietic cells are regulated by multiple cytokines. Cytokine receptors possess no kinase activity, the cytoplasmic Janus kinase (JAK) play a very important role for cytokine signaling pathways. Most cytokines can activate two or more than two JAKs; the role of only one JAK has concentrated among cytokine signaling on many researches. However, the mechanism of simultaneous activated-JAKs how to affect the signaling and cell activity are not clear. The present study used a conditional activated system, CD16/CD7/JAK (CDJAK), for JAK activation in IL-3 dependent cells. The fusion proteins consist of CD16 external domain, CD7 transmembrane region, and JAK1 (CD16/7/JAK1; CDJAK1) or JAK2 (CD16/7/JAK2; CDJAK2) cDNA as cytoplasmic domain. We established several stable cell lines: CDJAK1 and CDJAK2 (CDJAK1+2) co-expression, CDJAK and kinase mutant CDJAKKE (CDJAK1KE+2 or CDJAK1+2KE) co-expression, and CDJAK1 or CDJAK2 alone expression in Ba/F3 cells. Anti-CD16 antibody cross-linking induced CDJAK tyrosine phosphorylation of Ba/F3-CDJAK1 or Ba/F3-CDJAK2 cells, but no signal transduction and cell activity. Antibody cross-linking induced signaling of tyrosine phosphorylation and phosphorylation of STAT5, MAPK and Akt in the Ba/F3-CDJAK1+2 cells clustered the chimerical proteins of stable cell lines. These results suggested that synergistic activation of signal transduction need to cluster JAK1 and JAK2. The mutant of kinase activity, CDJAKKE, was further proved the normal kinase activity was essential for JAK1 and JAK2 to activate the synergistic effect of signal transduction. In addition, synergistic effect of both JAK1 and JAK2 activate  $\beta c$  phosphorylation. Furthermore, CDJAK1 and CDJAK2 are constitutively associated with  $\beta c$  and IL-3R $\alpha$ , respectively. Therefore, the data suggest that synergistic activation effect of CDJAK1 and CDJAK2 may be through cluster two complexes, CDJAK1- $\beta c$  and CDJAK2-IL-3R $\alpha$  to form big complexes, and further activate  $\beta c$  tyrosine phosphorylation and signal transduction.

Keywords: JAK, Cytokine, Synergistic Effect, Tyrosine Phosphorylation, Signal Transduction

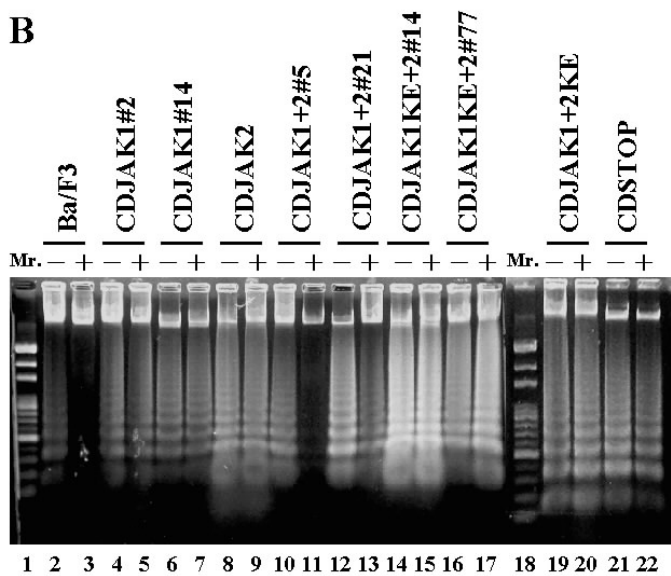
Janus tyrosine kinase (JAK) 家族由 JAK1, JAK2, JAK3 和 Tyk2 所組成, 它們於細胞激素的訊息傳遞中扮演著重要的角色例如 EPO (erythropoietin), IL-3 (interleukin-3), IL-5 和 GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)<sup>1-4</sup>。這些 kinases 參與調控重要的許多生物功能包括細胞增殖, 分化, 預防凋亡及免疫反應<sup>4-7</sup>。JAK 活化的機制於 EPO signaling 有較清楚的研究<sup>8</sup>。EPO receptor 為 single chain 的 homodimer, 當 EPO 與 receptor 的 dimer 結合造成 receptor 結構改變使細胞內區域更靠近, 而 pre-associated JAK2 能透過近距離的接觸進行 cross phosphorylation。活化的 JAK2 進一步傳遞訊號並提供細胞的活性<sup>9-11</sup>。此外, 於 jak2-/- knockout mouse 的研究了解 JAK2 於 IL-3, IL-5 和 GM-CSF, TPO 及 IFN- $\gamma$  的訊息傳遞也扮演著重要的角色<sup>12</sup>。

許多細胞激素可以活化兩個或兩個以上的 JAKs。目前同時活化的 JAKs 如何影響訊息傳遞和細胞活性的作用機轉並不清楚。以 IL-3 subfamily (包含 IL-3, IL-5 和 GM-CSF) 為例。IL-3, IL-5 和 GM-CSF 會活化 JAK1 和 JAK2<sup>14-19</sup>。IL-3, IL-5 和 GM-CSF 的 receptor 為 heterodimer 包含一個  $\alpha$  chain, 特定於每一個細胞激素, 和一個 common  $\beta$  ( $\beta$ c) chain, 為此三個細胞激素共用<sup>13</sup>。大部份的實驗利用生物化學方法主要探討 JAK2 的角色。這些實驗利用 conditional activation system 活化 JAK2 並且皆可活化其下游的 proteins。The chimeric molecule,  $\beta$ /JAK2, 包含  $\beta$ c extracellular 和 transmembrane regions 與 JAK2 融合, 此融合蛋白於細胞中會持續的磷酸化<sup>20</sup>。然而,  $\beta$ /JAK2-overexpressed cells 與 IL-3 dependent parental cells 相較之下有較低的 proliferated activity 和 apoptotic activity。此外, CD16 融合 JAK2 的蛋白於聚集的條件下, 雖然有訊息傳遞, 卻無法提供細胞生存能力<sup>21,22</sup>。這些結果顯示僅有 JAK2 活化是不足夠於支持細胞增殖能力。其它對 JAK1 角色的研究也得到相似的實驗結果, 於 FDCP-1 cells 表現  $\alpha\alpha\beta$  chimera, 由 extracellular and membrane domains of mIL-5R $\alpha$  and the cytoplasmic domain of  $\beta$ c 所組成, 於 mIL-5 刺激下只會活化 JAK1 並且無法支持細胞的增殖活性<sup>16</sup>。最近研究顯示 JAK1 and JAK2 的活化會互相影響於 IL-5 system<sup>23</sup>。IL-5 刺激下, dominant-negative (DN) mutants of JAK2 大量表現的細胞無法偵測到 JAK1 and  $\beta$ c 的 tyrosine phosphorylation, 於 DN-JAK1 表現的細胞, 可偵測到 JAK2 and  $\beta$ c 的 tyrosine phosphorylation, 但是訊號被降低。然而, 到目前為止並不清楚 JAK1 and JAK2 被 IL-3 同時活化的機制是否透過類似 EPOR-JAK2 system。此外, 不同的 JAKs 同時活化是否對訊號傳遞及細胞活性是必需的。為了回答這個問題, 我們同樣地利用 CD16/CD7 molecule 做為 conditional activation system 來活化 JAKs。這些 chimeric proteins 包含 CD16 extracellular domain, CD7 transmembrane domain, 和以 JAK1 (designated as CDJAK1), JAK2 (designated as CDJAK2), JAK1KE (designated as CDJAK1KE), or JAK2KE (designated as CDJAK2KE) 的 cDNA 做為 cytoplasmic domain。所建立的穩定細胞株, 有單獨表現, 或同時表現 wild type 的 CDJAK1 and CDJAK2, 或同時表現 a wild type 的 CDJAK and a dominant negative mutant CDJAKKE; 並分析這些 chimeric proteins 對訊號及細胞活性的影響 in Ba/F3 cells。我們的實驗證據顯示, JAK1 或 JAK2 皆可以透過 cross-link 造成 transphosphorylation。但是對於支持 cell proliferation and anti-apoptosis and signal transduction 則需要聚集 both wild type JAK1 and JAK2。

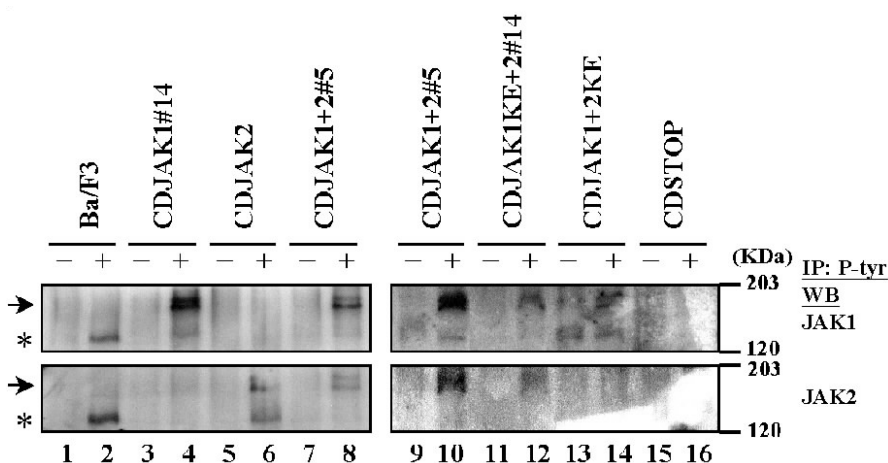
## Results and Discussion

過去實驗結果顯示聚集的 CDJAK1 和 CDJAK2 對細胞(CDJAK1+2)的 tyrosine 磷酸化訊號及細胞活性有協同活化的作用，此協同活化作用是否具有防止細胞凋亡的能力。細胞凋亡時，染色體會斷裂成不同大小的片段，因此我們將抗體聚集與否“-”“+”的 CDJAK1 # 2、CDJAK1 # 14、CDJAK2、CDJAK1+2 # 5、CDJAK1+2 # 21、CDJAK1KE+2 # 14、CDJAK1KE+2 # 77、CDJAK1+2KE、CDSTOP 細胞的染色體抽出後注入洋菜膠中，分析染色體斷裂的情況。Ba/F3 細胞以細胞激素“-”“+”刺激與否作為控制組。結果發現抗體聚集“+”後的 Ba/F3-CDJAK1+2 # 5 細胞(lane 8)，其染色體斷裂的情況相較無抗體聚集“-”的細胞有明顯的抑制，這個情況和以 IL-3 刺激下的 Ba/F3 細胞相似(lane 2)。另一穩定細胞株 Ba/F3-CDJAK1+2 # 21 於抗體活化後僅有部分抑制細胞凋亡之現象。此結果與細胞增殖活性一致。其餘穩定表現 CDJAK 的 Ba/F3 細胞在抗體聚集與否“-”“+”都有嚴重的染色體斷裂的情況。

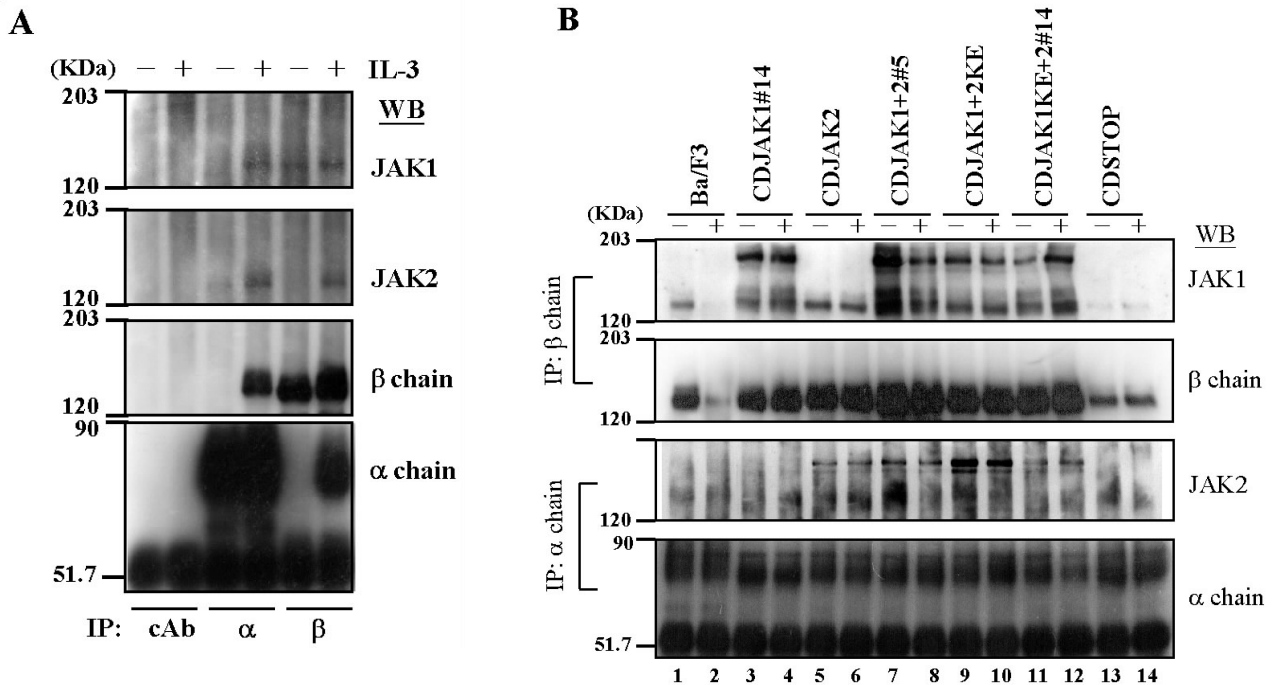
### B



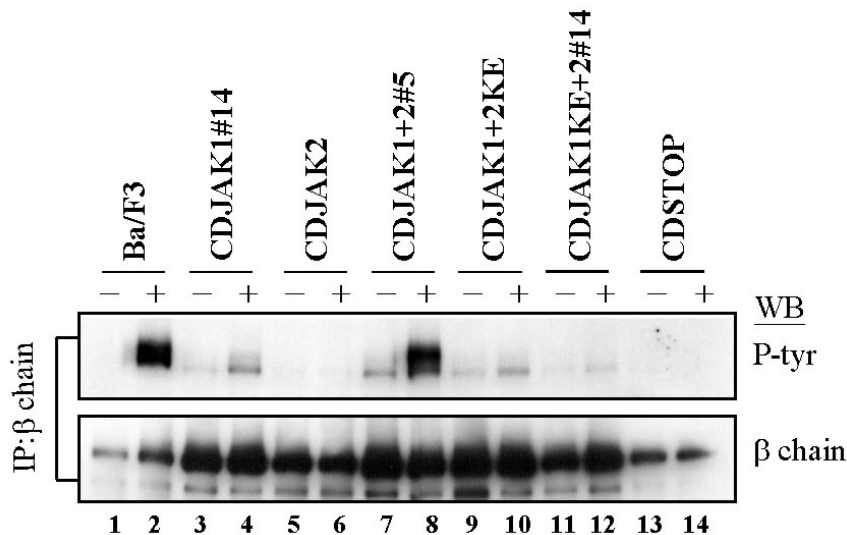
抗體聚集是否活化這些融合蛋白？將抗體聚集與否“-”“+”的穩定細胞株和 Ba/F3 細胞以細胞激素“-”“+”刺激與否的細胞萃取液利用 anti-phosphotyrosine antibody 做免疫沈澱法，再以 anti-JAK1 antibody 和 anti-JAK2 antibody 進一步以 western blotting 做分析。實驗結果顯示單獨聚集 CDJAK1 或 CDJAK2 皆可以活化此融合蛋白的磷酸化(lane 4 and lane 6)，同時聚集 CDJAK1 和 CDJAK2 並不會增加其磷酸化訊號(lane 8)。當同時聚集 Kinase mutant, CDJAK1KE 或 CDJAK2KE, 與 wild type CDJAK1 或 CDJAK2 時，這些 KE mutants 融合蛋白會減弱 wild type 融合蛋白的磷酸化(lane 12 and lane 14)。



過去的實驗顯示, JAK pre-associated with cytokine receptor, 因此我們想要更進一步的知道 CDJAK1 and CDJAK2 synergistic effect 是否與 IL-3 receptor  $\alpha$ 及 $\beta_c$  結合. 首先分析內生性的 JAK1 和 JAK2 與 IL-3 receptor 結合的情形. 利用 IP (免疫沉澱法) 將細胞內的 IL-3R $\alpha$ 、 $\beta_c$  收集和再以 JAK1、JAK2 抗體 western blotting 分析結果顯示, JAK1 與  $\beta_c$  pre-association, JAK2 與  $\alpha$  chain pre-association. 在 CDJAK 穩定細胞株中, 以 CD16 抗體有無聚集, 再利用 IP 和 western blotting 分析結果, 發現在抗體聚集與否 “-” “+” CDJAK1 皆會和  $\beta_c$  結合. CDJAK2 會和  $\alpha$  chain 結合, 此穩定的細胞株與 parental cells 的內生性 JAK1 和 JAK2 皆分別與  $\beta_c$  and  $\alpha$  chain interaction. 由以上的實驗結果顯示 CDJAK1 和 CDJAK2 分別與  $\beta_c$  次單位與  $\alpha$  次單位接受子結合後, 所形成的複合體才可以傳遞完整的訊號及細胞活性。



在細胞激素刺激下, 受體會 tyrosine 磷酸化, 而進一步的將生長訊號往下傳遞, 以維持細胞的正常生長及防止細胞凋亡。而以上實驗觀察到 CDJAK1 和 CDJAK2 和 receptor 接合, 因此其所影響的協同活化作用是否透過受體傳遞訊號使 Ba/F3-CDJAK1+2 細胞有良好生長狀況。首先我們將利用  $\beta_c$  抗體做免疫沉澱法將其全部收集, 再利用 tyrosine 磷酸化抗體分析。結果發現抗體聚集 “+” 後 Ba/F3-CDJAK1+2 細胞  $\beta_c$  tyrosine 磷酸化的程度與以 IL-3 刺激下的 Ba/F3 細胞相似。而當 JAK1KE 或 JAK2KE 存在時(Ba/F3-CDJAK1KE+2、Ba/F3-CDJAK1+2KE),  $\beta_c$  並不會 tyrosine 磷酸化, 結果顯示 CDJAK1 and CDJAK2 蛋白質受抗體活化後的細胞, 其  $\beta_c$  有 tyrosine 磷酸化的現象。



在這個實驗中，我們得到以下幾個結論。第一，單獨聚集 CDJAK1 or CDJAK2 即可造成其本身 tyrosine phosphorylation, 但是同時聚集 CDJAK1 and CDJAK2 並不會增加其 tyrosine phosphorylation 的程度。第二，只有同時聚集 CDJAK1 and CDJAK2 可以 induce tyrosine phosphorylation 的 signal, and activate STAT5, Akt and MAPK; 並且 provide cell proliferation and apoptosis suppression. 第三，同時聚集 CDJAK1 and CDJAK2 可以 induce  $\beta c$  tyrosine phosphorylation. 第四，CDJAK1 and CDJAK2 are constitutively interacted with IL-3R $\alpha$  and  $\beta c$ , respectively. 因此，CDJAK1 and CDJAK2 可能透過聚集兩個複合體 CDJAK1- $\beta c$  和 CDJAK2-IL-3R $\alpha$  形成更大的複合體並進一步誘導  $\beta c$  酪胺酸磷酸化和訊息傳遞。



## 計劃成果自評

過去兩年的國科會計劃已經完成質體的建構，穩定細胞株的篩選，有條件活化系統的建立及部份訊息傳遞和細胞活性的分析。過去實驗結果顯示 JAK1 和 JAK2 協同活化作用對訊息傳遞和細胞活性是需要的。在這個計劃中，我們持續將訊息傳遞和細胞活性做了完整的分析，並證實同時活化的 JAK1 和 JAK2 對訊息傳遞和細胞活性的協同活化作用的分子機制。

目前已達成大部份預期目標，並且正在修改此研究成果之文章，希望能儘快發表於學術期刊。

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.

## References

1. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:222-227.
2. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 1995;11:69-74.
3. Watanabe S, Arai K. Roles of the JAK-STAT system in signal transduction via cytokine receptors. *Curr Opin Genet Dev.* 1996;6:587-596.
4. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:293-322.
5. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene.* 2002;21:3334-3358.
6. Igaz P, Toth S, Falus A. Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflamm Res.* 2001;50:435-441.
7. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* 2002;109 Suppl:S121-131.
8. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science.* 1999;283:990-993.
9. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell.* 1993;74:227-236.
10. Zhuang H, Patel SV, He TC, Sonstebly SK, Niu Z, Wojchowski DM. Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase-deficient form of Jak2. *J Biol Chem.* 1994;269:21411-21414.
11. Gouilleux F, Pallard C, Dusanter-Fourt I, Wakao H, Haldosen LA, Norstedt G, Levy D, Groner B. Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *EMBO J.* 1995;14:2005-2013.
12. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998;93:385-395.

13. Kitamura T, Sato N, Arai K, Miyajima A. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell*. 1991;66:1165-1174.
14. Callus BA, Mathey-Prevot B. Interleukin-3-induced activation of the JAK/STAT pathway is prolonged by proteasome inhibitors. *Blood*. 1998;91:3182-3192.
15. Silvennoinen, O., Witthuhn, B. A., Ouelle, F. W., Cleveland, J. L., Yi, T., Ihle, J. N. Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90:8429-8433.
16. Kouro, T., Kikuchi, Y., Kanazawa, H., Hirokawa, K., Harada, N., Shiiba, M., Wakao, H., Takaki, S., Takatsu, K. Critical proline residues of the cytoplasmic domain of the IL-5 receptor chain and its function in IL-5-mediated activation of the JAK kinases and STAT5. *Int. Immunol.* 1996;8:237-245.
17. van der Bruggen, T., Caldenhoven, E., Kanters, D., Coffey, P., Raaijmakers J. A. M., Lammers, J. J., Koenderman, L. Interleukin-5 signalling in human eosinophils involves JAK2 tyrosine kinase and STAT1 . *Blood*. 1995;85:1442-1448.
18. Huang HM, Huang CJ, Yen JJ. 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.
19. Quelle FW, Sato N, Witthuhn BA, Inhorn RC, Eder M, Miyajima A, Griffin JD, Ihle JN. JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol Cell Biol*. 1994;14:4335-4341.
20. Liu, C. B., Itoh, T., Arai, K. I., 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.
21. Sakai, I., Nabell, L., Kraft, A. S. Signal transduction by a CD16/CD7/Jak2 fusion protein. *J. Biol. Chem*. 1995;270:18420-18427.
22. Sakai, I., Kraft, A. S. The kinase domain of Jak2 mediates induction of Bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem*. 1997;272:12350-12358.
23. Ogata, N., Kouro, T., Yamada, A., Koike, M., Hanai, N., Ishikawa, T., and Takatsu, K. JAK2

and JAK1 Constitutively Associate With an Interleukin (IL-5) Receptor  $\alpha$  and  $\beta$ c Subunit, Respectively, and Are Activated Upon IL-5 Stimulation. *Blood*. 1998;91:2264-2271.