

2m11. 2596.5

Université de Montréal

**SCL SPÉCIFIQUE L'EXPRESSION DE C-KIT ET LA SUPPRESSION
D'APOPTOSE PAR LE FACTEUR STEEL**

par

Gang He

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
eu vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire**

Juin, 1997

© **Gang He, 1997**



52928

QH
506
U54
1998
v.001

Université de Montréal

SCU SPÉCIFIQUE L'EXPRESSION DE C-KIT ET LA SUPPRESSION
D'APOPTOSE PAR LE FACTEUR STEEL

Gang He

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

juin 1997



Gang He, 1997

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

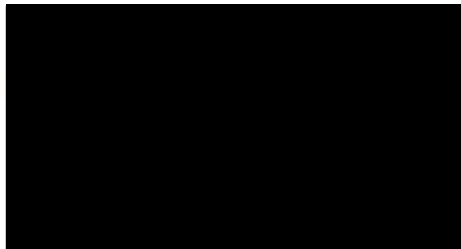
Ce mémoire intitulé:

**SCL SPÉCIFIE L'EXPRESSION DE C-KIT ET LA SUPPRESSION
D'APOPTOSE PAR LE FACTEUR STEEL**

présenté par:

Gang He

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:



Mémoire accepté le: 6 février 1998

SOMMAIRE

Le gène SCL a été identifié par l'analyse de la translocation de la leucémie lymphoblastique aiguë de type cellulaire T (T-ALL). Ce gène est activé dans ~30% des cas de T-ALL. La protéine SCL est un facteur de transcription de la famille d'hélice-boucle-hélice. Son ablation chez des souris transgéniques SCL^{-/-} mène à l'absence d'hématopoïèse et à la mort de ces souris.

Le patron d'expression de SCL est parallèle à celui de c-Kit, le récepteur du facteur Steel (SF). La perturbation d'expression de c-Kit mène à une hématopoïèse défectueuse. Dans ce mémoire, nous avons étudié la relation entre ces deux gènes.

Nous avons utilisé la lignée hématopoïétique CD34⁺ TF-1 dont la survie requiert le SF, l'interleukine-3 (IL-3) ou le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (GM-CSF). Nous y avons introduit un ADN complémentaire de SCL dans l'orientation antisense, ainsi, nous avons abaissé le niveau protéique de SCL et son activité de liaison à l'ADN dans les clones antisense.

Les clones antisense survivent et prolifèrent normalement sous le GM-CSF et l'IL-3. Pourtant, ces clones sont apoptotiques sous le SF. L'expression d'ARN messager de c-Kit est considérablement diminuée dans les clones antisense. Son expression et la réponse au SF sont rétablies lorsque j'ai réintroduit l'ADN complémentaire de SCL dans la clone antisense.

Nous avons aussi utilisé une sonde contenant deux boîtes E dérivée du promoteur c-Kit. Les essais de retard sur gel ont démontré une liaison spécifique de SCL avec cette sonde. Les essais de transactivation ont indiqué que la protéine SCL et ces deux boîtes E sont requises à la transactivation.

Finalement, l'expression ectopique de c-Kit dans la clone antisense SCL est suffisante à rétablir la survie cellulaire à la réponse au SF.

Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent que le gène c-Kit serait un gène cible de SCL et fournissent un mécanisme moléculaire par lequel SCL favorise l'hématopoïèse et la leucimogénèse.

TABLES DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xii
DÉDICACE.....	xiii
PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION.....	1
1. Hématopoïèse.....	2
2. Apoptose.....	3
3. Facteurs de transcription.....	7
4. SCL.....	9
4.1 Origine du gène SCL.....	9
4.2 Structure et expression du gène SCL.....	13
4.3 Protéine SCL.....	19
4.4 Effet biologique du gène SCL.....	24
5. Facteur Steel et c-Kit.....	30
6. Objectif.....	36
DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DU MANUSCRIT.....	37
1. Titre: Transcription factor SCL is required for c-Kit expression and the rescue of hemopoietic cells from apoptosis	

by Steel factor.....	38
2. Résumé.....	39
3. Introduction.....	40
4. Matériel et Méthodes.....	41
5. Résultats.....	48
6. Discussion.....	54
7. Références.....	58
8. Tableaux.....	65
9. Légendes des figures.....	67
10. Figures.....	71
TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION GÉNÉRALE.....	79
1. SCL favorise la survie des cellules souches hématopoïétiques via c-kit.....	80
2. SCL et ses partenaires.....	82
3. SCL et la différenciation érythrocytaire	85
4. SCL, c-Kit et la leucémie lymphoblastique aiguë de type cellulaire T...	86
5. Conclusion.....	88
BIBLIOGRAPHIE.....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Cell proliferation in response to GM-CSF or SF.....	65
Tableau 2.	Probes used in gel shift assays.....	66

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Decreased SCL protein in TF-1 cells expressing antisense SCL.... 71
- Figure 2.** Decreased SCL DNA binding activity in TF-1 cells expressing antisense SCL: rescue by ectopic SCL expression..... 72
- Figure 3.** SF suppresses apoptosis in TF-1 cells but not in A31 expressing an antisense SCL: rescue of A31 by wild type SCL..... 73
- Figure 4.** Comparison of the cytokine response profiles of antisense expressing cells and controls..... 74
- Figure 5.** Reduced c-Kit expression in cells expressing an antisense SCL: rescue with wild type SCL..... 75
- Figure 6.** Survival response to SF rescued by ectopic murine c-Kit expression in SCL antisense transfectants..... 76
- Figure 7.** Decreased clonal growth of multipotent progenitors following ectopic expression of a dominant negative SCL..... 77
- Figure 8.** Role of SCL in cell survival and cell proliferation: implication

	for leukemogenesis.....	78
Figure 9.	Les points de rupture dans le gène SCL.....	10
Figure 10.	La délétion entre le locus SIL et le locus SCL.....	11
Figure 11.	La structure du gène SCL.....	12

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	acide déoxyribonucléique
AP-1	"Activator protein-1"
ARN	acide ribonucléique
Bcl-2	"B-cell leukemia"
BFU-E	"Burst forming unit-erythroid"
CFU-E	"Colony forming unit-erythroid"
CFU-S	"Colony forming unit-splenic"
CML	"Chronic myelocytic leukemia"
EPO	érythropoïétine
G-CSF	"Granulocyte colony stimulating factor"
GM-CSF	"Granulocyte-macrophage colony stimulating factor"
HLH	"Helix-loop-helix"
HPCs	"Hematopoietic progenitor cells"
HTH	"Helix-turn-helix"
ICE	"Interleukin I β converting enzyme"
Id	"Inhibitor of DNA binding"
IL-	interleukine
KL	"Kit ligand"
LIF	"Leukemia inhibitory factor"
M-CSF	"Macrophage colony stimulating factor"

MEL	"Murine erythro-leukemia"
MGF	"Mastoid growth factor"
OSM	"Oncostatin M"
PODs	"PML oncogenic domains"
RT-PCR	"Reverse transcriptional polymerase chain reaction"
S	sérine
SCF	"Stem cell factor"
SCL	"Stem cell leukemia"
SF	"Steel factor"
SIL	"SCL interrupting locus"
TAL1	"T acute lymphoblastic leukemia"
T-ALL	"T acute lymphoblastic leukemia"
TCL5	"T cell leukemia/lymphoma 5"
TCR	"T cell receptor"
TNF	"Tumor necrosis factor"

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans le cadre de ce mémoire furent effectués dans le laboratoire d'hématopoïèse et leucémie, dirigé par le Dr. Trang Hoang, à l'Institut de recherches cliniques de Montréal.

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude à mon directeur du mémoire, le Dr. Trang Hoang, qui m'a orienté avec patience dans le chemin scientifique au cours de mes études graduées.

Je voudrais remercier spécialement André Haman pour ses conseils et son aide.

Je voudrais également présenter mes remerciements à Céline Cadieux pour son aide amicale au cours de la rédaction.

Finalement, je voudrais remercier tous les autres membres du laboratoire et les collaborateurs pour leurs supports techniques.

À ma mère,

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus de formation du sang durant toute la vie d'un individu. Elle se caractérise par un auto-renouvellement, une différenciation et une maturation constants de cellules souches hématopoïétiques dans les différentes lignées de différenciation érythroïde, mastoïde, lymphoïde (de type cellulaire T et B), granulocytaire, monocytaire et mégakaryocytaire, en passant par des stades intermédiaires de précurseurs multi et unipotentiels (revue par Orkin. 1995). Chez les mammifères, durant l'embryogénèse, l'hématopoïèse se développe en phases successives. Les premières cellules sanguines apparaissent dans les îlots sanguins du sac vitellin au jour embryonnaire 7.5 chez la souris et au jour 15 à 18 chez l'homme. C'est l'hématopoïèse primitive ou embryonnaire. Ensuite, l'hématopoïèse définitive se met en place dans le foie foetal au jour 11 chez la souris et au jour 35 à 42 chez l'homme. A partir de la naissance, la moelle osseuse devient et reste l'organe principal d'hématopoïèse durant toute la vie (Moore *et al.* 1970; Tavassoli *et al.* 1991; et Zon *et al.* 1995).

Les cellules hématopoïétiques sont dérivées du mésoderme ventral. Ces cellules souches hématopoïétiques se différencient ensuite en précurseurs multipotentiels. Le développement hématopoïétique se déroule en étapes successives: la spécification d'hématopoïèse à partir du mésoderme ventral, l'expansion/maintien des cellules souches hématopoïétiques, la sélection de la lignée, la différenciation et finalement, la maturation de la lignée hématopoïétique (revue par Orkin. 1995). Au cours de ce processus, les cellules perdent progressivement leur capacité de s'auto-renouveler et de proliférer. Seules, les cellules T, B et les macrophages conservent leur capacité de proliférer. Les chercheurs ont essayé de trouver des gènes qui pourraient orienter des cellules du mésoderme ventral vers un destin hématopoïétique, comme dans le cas de MyoD (Lasser *et al.* 1986) dans le développement musculaire et de neuroD (Valge-Archer *et al.* 1994) dans le développement neuronal. Mais jusqu'à présent, parmi une dizaine de candidats impliqués dans l'hématopoïèse, seul le gène SCL (Stem Cell Leukemia) semble être impliqué dans la production de toutes les lignées

hématopoïétiques (Porcher *et al.* 1996). Les cellules souches hématopoïétiques et les précurseurs multipotentiels se maintiennent et prolifèrent en réponse à différents facteurs de croissance hématopoïétiques comme le facteur Steel, l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-3, l'IL-6 et le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) (Williams *et al.* 1992). Les cellules souches hématopoïétiques se transforment en précurseurs bi et unipotentiels, prolifèrent, se différencient, deviennent des cellules matures (sauf les précurseurs de lymphocytes B et T qui se dirigent vers la rate et le thymus avant la maturation) qui seront finalement libérées dans la circulation sanguine. Les facteurs de croissance agissent sur différentes lignées: le facteur de croissance des granulocytes (G-CSF) et des macrophages (M-CSF) et l'érythropoïétine sont sélectivement actifs sur les lignées granulocytaire, monocytaire, et érythrocytaire respectivement (Williams *et al.* 1992). A défaut de facteurs de croissance hématopoïétiques, les cellules hématopoïétiques meurent par apoptose (Williams *et al.* 1990b; Rajotte *et al.* 1992; Cácerés-Cortés *et al.* 1994).

2. Apoptose

Le terme d'apoptose a été premièrement utilisé par Kerr, Wyllie et Currie en 1972 (Kerr *et al.* 1972) pour décrire le mécanisme d'autodestruction cellulaire par opposition au phénomène de nécrose. Durant l'apoptose, la taille cellulaire est diminuée, le noyau devient condensé, mais la cellule reste imperméable à l'entrée des colorants tels que le bleu de Trypan. A la phase tardive, le noyau et la cellule deviennent fragmentés, et les débris sont ensuite phagocytés par les macrophages (Wyllie *et al.* 1980a). Dans la plupart des cas, l'apoptose implique l'activation d'endonucléase et un clivage de l'ADN double-brin aux sites internucléosomiaux. Des fragments d'ADN multiples d'environ de 180 paires de base sont alors générés (Wyllie *et al.* 1980b; Arends *et al.* 1990). Ainsi, l'apoptose peut être révélée par une échelle d'ADN après migration sur gel (Arends *et al.* 1990).

L'apoptose est impliquée dans une variété de processus physiologiques et pathologiques. Elle joue un rôle crucial dans le développement musculosquelettique durant la morphogénèse (Hinchcliffe *et al.* 1974). Dans le système reproductif, l'involution du canal de Müller chez le mâle, ou sa persistance et son développement chez la femelle, sont dus à l'apoptose ou à l'absence d'apoptose respectivement (Price *et al.* 1977). L'apoptose joue aussi un rôle important dans le développement neuronal (Oppenheim *et al.* 1988; Martin *et al.* 1988).

Dans le système hématopoïétique, l'apoptose pourrait être impliquée dans trois domaines (revue par Koury. 1992): 1) le déplacement du site de l'hématopoïèse du sac vitellin au foie foetal, puis à la moelle osseuse. Durant la vie postnatale, elle pourrait être impliquée dans la diminution du nombre de cellules de la moelle osseuse observée lors du vieillissement. 2) la sélection de cellules T et B appropriées durant le développement du système immunitaire. L'apoptose est impliquée dans la sélection clonale dans le thymus (Smith *et al.* 1989; Shi *et al.* 1989; McConkey *et al.* 1989) et le nodule lymphoïde (Liu *et al.* 1989). L'absence d'apoptose est associée à la survie prolongée de cellules B infectées par le virus Epstein-Barr (Geogory *et al.* 1991) ou de cellules B malignes exprimant le gène BCL-2 (Vaux *et al.* 1988; Hockenbery *et al.* 1990). 3) l'atrophie des cellules et tissus hormono-dépendants. Les cellules T en développement deviennent apoptotiques quand elles sont privées d'interleukine 1 (McConkey *et al.* 1990) ou d'interleukine 2 (Duke *et al.* 1986). L'apoptose s'installe dans les lignées cellulaires spécifiques de type B lors du retrait d'interleukine 3 (IL-3) (Rodriguez-Tarduchy *et al.* 1990) ou interleukine 6 (Sabourin *et al.* 1990).

L'apoptose est un programme de mort cellulaire intrinsèque qui peut être contrôlé par l'environnement, soit par une interaction cellulaire directe, soit par l'intermédiaire de l'apparition ou de la disparition des médiateurs solubles. Par exemple, l'apparition des hormones glucocorticoïdes entraîne la mort programmée chez les thymocytes immatures. Le retrait de certains facteurs de croissance mène à l'apoptose chez certaines cellules hématopoïétiques. Leur apparition peut supprimer ce phénomène d'apoptose. Dans le système hématopoïétique, il a été

démontré que l'érythropoïétine (EPO) (Koury *et al.*, 1990; Spivak *et al.*, 1991), l'IL-3 (Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990), le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (Williams *et al.*, 1990), et le facteur Steel (Cácerés-Cortés *et al.* 1994) peuvent supprimer l'apoptose des cellules dont la survie dépend de ces facteurs.

Les molécules impliquées dans la transduction du signal de l'apoptose ou de la suppression d'apoptose des cellules hématopoïétiques sont devenues de plus en plus connues. Parmi lesquelles, la famille du gène bcl-2 et des caspases jouent un rôle critique dans la régulation de l'apoptose. Le gène bcl-2 a été premièrement identifié par l'analyse de la translocation des cellules du lymphome folliculaire B humain (Bakhshi *et al.*, 1985; Tsujimoto *et al.*, 1985; Cleary *et al.*, 1986). L'expression excessive du bcl-2 dans les souris transgéniques reproduit les caractéristiques de la maladie humaine (McDonnell *et al.*, 1989; McDonnell and Korsmeyer, 1991). Bcl-2 possède la propriété de maintenir la survie cellulaire au lieu de stimuler sa prolifération (Vaux *et al.*, 1988; Hockenbery *et al.*, 1990). Il a été désormais démontré que le gène bcl-2 assure la viabilité cellulaire par la suppression d'apoptose dans une variété de conditions suggérant son rôle d'inhibiteur ubiquitaire de la mort programmée déclenchée par des voies multiples.

Bcl-2 appartient à une famille des gènes dont les représentatifs dans les mammifères sont: bcl-x (Boise *et al.*, 1993), mcl-1 (Kozopas *et al.*, 1993), bax (Oltvai *et al.*, 1993), A1 (Lin *et al.*, 1993), bak (Chitenden *et al.*, 1995), bad (Yang *et al.*, 1995). Les membres des homologues d'espèces différentes contiennent le ced-9 des nématodes *Caenorhabditis elegans* et quelques homologues viraux (Hengartner *et al.*, 1992; Cleary *et al.*, 1986; Neilan *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1992). Ces membres contiennent trois régions conservées : les régions d'homologie du bcl-2 1, 2 et 3 (BH1, BH2, BH3), qui sont requises à la suppression d'apoptose et aux interactions protéiques.

Les transcrits du bcl-x sont épissés en formes longue et courte (bcl-x_L et bcl-x_S). Le produit de la forme longue sert à inhiber l'apoptose, tandis que celui de la forme courte antagonise l'inhibition de la mort déclenchée par les protéines bcl-x_L et bcl-2 (Boise *et al.*, 1993). L'expression du mcl-1 induit un délai de l'apoptose

provoquée par l'expression aberrante du gène c-myc (Reynolds *et al.*, 1994). Bak, dans la plupart des cas, accélère la mort cellulaire (Kiefer *et al.*, 1995). Bad stimule l'apoptose (Yang *et al.*, 1995). Le ced-9 est une substitution du bcl-2 dans les nématodes (Vaux *et al.*, 1992).

A part la famille bcl-2, la famille des caspases joue également un rôle essentiel dans la régulation d'apoptose des voies multiples. Le produit du gène ced-3 des *C. Elegans* est requis à la mort cellulaire; son clonage moléculaire prouve qu'il est l'homologue de la convertase de l'interleukine-1 β des mammifères (ICE, Yuan *et al.*, 1993). L'hybridation croisée a démontré 10 homologues du ICE classés en trois groupes selon leur homologie (Alnemri *et al.*, 1996). Ces produits sont des kinases de cystéine, contenant des séquences à la liaison et à la catalyse des substrats. Ils clivent les substrats après l'acide aspartique, et sont ainsi appelés caspases (aspases de la cystéine) (Alnemri *et al.*, 1996). Ces protéases fonctionnent en cascades dans l'apoptose induite par le facteur de nécrose de la tumeur (TNF) ou par le ligand de l'antigène Fas (revue par Nagata., 1997).

A part les gènes de la famille bcl-2 et ceux des caspases, l'échec de la régulation négative de gène c-myc en réponse à la déprivation de IL-3 accélère l'apoptose (Askew *et al.* 1993). De plus, l'expression excessive du gène p53 (type sauvage) induit l'apoptose chez une variété de types cellulaires, y compris les cellules hématopoïétiques (Yonish-Rovach *et al.* 1991).

Un déséquilibre entre la survie et la mort cellulaire pourrait participer à la pathogénèse de certaines maladies hématologiques, telle que la leucémie myéloïde chronique (CML) (Carlesso *et al.* 1994; Spooncer *et al.* 1994). La transfection de cellules myéloïdes murines avec le gène p210 bcr-abl ou le gène p160 v-abl a démontré que l'expression du gène abl est associée à une réduction de l'apoptose et à une réponse proliférative accélérée au facteur de croissance à faible dose. Ces deux mécanismes pourraient être responsables de l'augmentation de la croissance et du développement de la leucémie chez les cellules CML. Le phénomène d'apoptose est aussi observé dans la β -thalassémie (Anémie de Cooley) (Yuan *et al.* 1993). Les érythroblastes meurent d'apoptose au lieu de survivre jusqu'à la maturation.

3. Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription forment une classe de protéines dont le rôle essentiel est la régulation de l'expression des gènes (Latchman. 1991; Rosenthal.1994). Par des interactions directes ou indirectes avec l'ADN, les facteurs de transcription initient et stimulent (ou dans certains cas, inhibent) la transcription du gène et entraînent ainsi la formation d'ARN messenger correspondant. Les facteurs de transcription sont divisés en facteurs de transcription généraux (GTFs, general transcription factors) et facteurs de transcription séquence-spécifiques. Les derniers se lient à des éléments appelés promoteurs ou séquences amplificatrices. Les GTFs sont assemblés avec l'ARN polymérase II pour former le complexe de préinitiation (PIC) (Roeder. 1991). Ce complexe forme sur le cor du promoteur (qui est souvent une boîte TATA située à 30 paires de base en amont du site d'initiation de transcription). Les facteurs de transcription séquence-spécifiques modulent la formation du PIC par contact direct avec la protéine cible dans PIC ou affecter indirectement ce complexe par les co-activateurs (Krajewska. 1992). Avant l'initiation de la transcription d'un gène, la protéine TBP (TATA box binding protein) se lie à la séquence TATA, puis, les protéines TAF (TBP-associated factors) sont liées à la TBP et elles forment le facteur de transcription TFIID. Le TFIID recrute les autres facteurs de transcription généraux, l'ARN polymérase II et stabilisent le PIC. Les TAFs interagissent avec les facteurs de transcription séquence-spécifiques et transmettent leurs effets de transactivation à la machinerie transcriptionnelle. A part l'initiation, les facteurs de transcription influencent aussi l'élongation. L'ARN polymérase II pause à plusieurs endroits en aval du site d'initiation de transcription, cet effet est contrôlé par les facteurs de transcription (Duan *et al.*, 1995). Les facteurs de transcription possèdent des domaines distincts responsables de la liaison à l'ADN, de la liaison au ligand (e.g. les hormones stéroïdes), de la localisation nucléaire et des interactions protéine-protéine comme dimérisation et trans-activation (Wilson. 1996). Selon les motifs structuraux du domaine de liaison à l'ADN, 80% des

les facteurs de transcription séquence-spécifiques et transmettent leurs effets de transactivateurs à la machinerie transcriptionnelle. A part l'initiation, les facteurs de transcription influencent aussi l'élongation. L'ARN polymérase II pause à plusieurs endroits en aval du site d'initiation de transcription, cet effet est contrôlé par les facteurs de transcription (Duan *et al.*, 1995). Les facteurs de transcription possèdent des domaines distinctes responsables à la liaison à l'ADN, à la liaison au ligand (e.g. les hormones stéroïdes), à la localisation nucléaire et aux interactions protéine-protéine comme dimérisation et trans-activation (Wilson. 1996). Selon les motifs structuraux du domaine de liaison à l'ADN, 80% des facteurs de transcription sont classés en quatre familles différentes: famille d'hélice-tour-hélice (HTH), de doigt de zinc, de zipper de leucine, d'hélice-boucle-hélice (HLH) (Athanasios.1995). Typiquement, le domaine de liaison à l'ADN est formé d'acides aminés chargés positivement adjacents à l'hélice I. Ce domaine se lie spécifiquement et solidement à des segments double-brin d'ADN dans les promoteurs ou séquences amplificatrices. Certains facteurs de transcription requièrent l'homo ou l'hétérodimérisation pour générer un domaine de liaison à l'ADN fonctionnel (Krajewska. 1992). Les motifs structuraux impliqués dans la dimérisation comprennent souvent des domaines de zipper de leucine ou des domaines d'hélice-boucle-hélice. Quelques autres domaines facilitent les interactions directes avec le PIC ou avec les protéines intermédiaires. Par former des hétérodimères avec les protéines inhibitrices qui ne lient pas l'ADN, les facteurs de transcription potentiellement actifs pourraient être prévenus à la liaison au promoteur ou aux séquences amplificatrices. Souvent, des facteurs de transcription forment des complexes. Dans ces complexes, plusieurs facteurs interagissent pour réguler la transcription. Le domaine de transactivation sert de médiateur de ces associations coopératives (Athanasios. 1995).

La phosphorylation exerce un rôle très important pour les facteurs de transcription. La phosphorylation influence leurs capacités de translocation nucléaire (Jans *et al.*, 1995), de liaison à l'ADN (Li *et al.*, 1992) et leurs activités de transactivation (ou transrepression) (Marais *et al.*, 1993, Ofir *et al.*, 1990). Cette

phosphorylation est souvent déclenchée par la phosphorylation et l'activation d'une cascade de kinases à partir du récepteur membranaire sous des stimuli extracellulaires différents. Ces stimuli différents déterminent quels sont les membres de facteurs de transcription à phosphoryler, quelles sortes d'homo, d'hétéro ou d'oligodimères à former et quelles séquences cibles intranucléaires à lier (Darnell Jr *et al.*, 1994). Certains kinases pourraient induire la déphosphorylation et ainsi influencer la fonction de certains facteurs de transcription (Boyle *et al.*, 1991). Le facteur de transcription peut aussi agir lui-même comme kinase et phosphoryle un autre facteur de transcription dans le complexe de préinitiation (Dikstein *et al.*, 1996).

La liaison au ligand est critique pour le fonctionnement des facteurs de transcription de la superfamille de récepteur nucléaire (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Ces récepteurs présentent un domaine central de liaison à l'ADN (DBD, DNA binding domain) et un C-terminal contenant un domaine de liaison au ligand (LBD, ligand binding domain). La liaison du ligand au récepteur induit un changement allostérique qui facilite le complexe hormone-récepteur à se translocaliser et/ou à se lier à haute affinité à l'ADN et à moduler la transcription (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Par exemple, la liaison d'hormone glucocorticoïde à son récepteur provoque la translocation du complexe hormone-récepteur du cytoplasme au noyau où ce complexe se lie à l'ADN et stimule la transcription des gènes inductibles par glucocorticoïdes. Le récepteur de l'hormone thyroïdienne, au lieu de loger dans le cytoplasme, se localise dans le noyau et se lie à l'ADN en présence ou en absence du ligand. Pourtant, en absence du ligand, il fonctionne comme un represser. La liaison au ligand lui a converti en un activateur et stimule la transcription des gènes inductibles par des hormones thyroïdiennes (Cooper, 1993)

La translocalisation nucléaire des facteurs de transcription est souvent dépendante d'une séquence spéciale appelée la séquence de localisation nucléaire (NLS, nuclear localization sequence). La NLS contient souvent des sites de phosphorylation. La phosphorylation ou la déphosphorylation de ces sites

influencent l'activité de translocation nucléaire (Jans *et al.*, 1995). Certains facteurs de transcription forment des hétérodimères. La présence d'un facteur de transcription favorise la localisation de son partenaire correspondant (Sawa *et al.*, 1996). Le retrait de la NLS peut convertir un facteur de transcription en une protéine cytoplasmique. Pourtant, il pourrait être redirigé dans le noyau après l'hétérodimérisation avec son partenaire doté d'une séquence NLS (Goldfarb *et al.*, 1992, 1994).

Dans le système hématopoïétique, les facteurs de transcription jouent un rôle dans toutes les étapes de l'hématopoïèse: de l'établissement du destin hématopoïétique à partir du mésoderme ventral à la sélection, la différenciation et la maturation d'une lignée spécifique (revue par Orkin, 1995). Une dizaine de facteurs de transcription sont impliqués dans l'hématopoïèse. Ces facteurs ont été identifiés par l'analyse de translocations chromosomiques de leucémie humaine ou par leur liaison à des éléments de régulation cis de gènes spécifiques aux lignées hématopoïétiques (revue par Shivdasani *et al.* 1996). Parmi ces facteurs de transcription, le facteur SCL de la famille bHLH est critique à la production des cellules hématopoïétiques de toutes les lignées. Il servirait à établir le destin hématopoïétique des cellules ventro-mésodermes, à former et à maintenir les précurseurs immatures (Porcher *et al.* 1996). Ce gène est supposé agir aussi dans la différenciation érythrocytaire tardive (Aplan *et al.* 1992). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de plusieurs facteurs de transcription dans le processus d'hématopoïèse. La protéine Rbtn2 qui possède 2 domaines LIM (dont le nom est dérivé des gènes Lin-11, Isl-1 et Mec-3 et qui contient le motif C-X₂-C-X₁₇₋₁₉-H-X₂-C-X₂-C-X₇₋₁₁-(C)-X₈-C riche en cystéine) fonctionne à un stade très précoce de l'hématopoïèse. Son ablation chez la souris cause la mort due à une anémie sévère (Warren *et al.* 1994). Le facteur GATA-1, membre de la famille à doigt de zinc, est critique à la survie et à la maturation terminale des précurseurs érythroïdes (Weiss *et al.* 1994; Pevny *et al.* 1995; Weiss *et al.* 1995). Un autre facteur de la même famille GATA-2, est important pour l'érythropoïèse et pour la production des précurseurs d'autres lignées (Tsai *et al.* 1994; Chen *et al.* 1993).

De plus, la protéine C-myb influence les précurseurs d'érythrocytes et d'autres lignées (Mucenski *et al.* 1991). En outre, AML-1 est impliqué dans le développement définitif des lignées hématopoïétiques, y compris les mégakaryocytes (Okuda *et al.* 1995). Par ailleurs, l'ablation du facteur de transcription PU.1 mène à l'absence de monocytes, de granulocytes, et de lymphocytes T et B chez la souris (Scott *et al.* 1994). La déficience du gène EKLF produit un syndrome thalassémique (Nuez *et al.* 1995; Perkins *et al.* 1995). Le développement normal des mégakaryocytes requiert la fonction du facteur de transcription NF-E2 (Shivdasani *et al.* 1995). Hox 11 est critique à la splénogénèse (Dear *et al.* 1995). Au moins cinq gènes sont impliqués dans le développement lymphoïde: Ikaros, E2A, Oct-2, TCF-1 et LEF-1 (revue par Shivdasani *et al.* 1996). Ces facteurs de transcription peuvent s'associer pour former des complexes (Valge-Archer *et al.* 1994; Wadman *et al.* 1994) ou des hétérodimères, se lier à l'ADN et exercer leur fonction (Hsu *et al.* 1994).

4. SCL

4.1. Origine du gène Scl

Le gène Scl (Stem Cell Leukemia) a été identifié par l'analyse de la translocation réciproque des chromosomes 1 et 14, t(1;14) (p33; q11) de la lignée cellulaire leucémique DU.528 (Begley *et al.*, 1989a, 1989b). Cette lignée cellulaire est dérivée d'un patient de leucémie lymphoblastique aiguë de type cellulaire T (T-ALL). Elle est capable de se différencier en cellules myéloïde et lymphoïde. Le point de rupture du chromosome 14 a lieu dans le locus de la chaîne δ du récepteur des cellules T, entre les segments de la région de divergence (D) de la chaîne δ , D δ 1 et D δ 2. D δ 2 est translocalisé au chromosome 1 aberrant alors que D δ 1 reste dans le bras long du chromosome 14. Ainsi, un segment d'ADN de 10Kb

infantile (Carroll *et al.*, 1990). A part cette translocation t(1;14), deux autres types de translocation: t(1;7) (p32;q35) et t(1;3) (p34;q21) impliquent aussi le gène SCL. Dans le premier cas, le locus TCR β est translocalisé à 35 Kb dans la région 3' du gène SCL (Fitzgerald *et al.*, 1991). Dans le deuxième cas, l'expression du gène SCL serait maintenant placée sous le contrôle d'éléments du promoteur ou de séquences amplificatrices (enhancer) situés sur le chromosome 3 (Aplan *et al.*, 1992c).

L'expression aberrante du gène SCL dans plusieurs cas de T-ALL est causée par un autre événement de recombinaison chromosomique. Il s'agit d'une délétion spécifique à un site du chromosome 1 qui entraîne la perte d'un fragment d'environ 90 Kb entre le locus SIL (SCL interrupting locus) et le locus SCL (Brown *et al.*, 1990; Aplan *et al.*, 1990b) (Fig10).

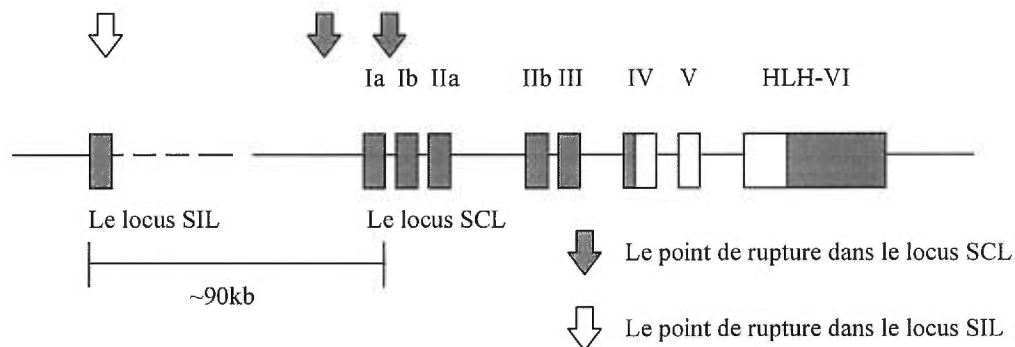


Figure 10: La délétion entre le locus SIL et le locus SCL. La délétion entraîne la perte d'un fragment d'environ 90Kb entre le locus SCL et le locus SIL. Les points de rupture du locus SCL précèdent l'exon Ia ou l'exon Ib.

La délétion SIL/SCL est l'anomalie chromosomique la plus fréquente dans la T-ALL avec une fréquence de 6% à 26% (Brown *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1991; Aplan *et al.*, 1992a; Borkhardt *et al.*, 1992; Bash *et al.*, 1993; Breit *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1993; Kikuchi *et al.*, 1993). Le point de rupture du locus SIL est constant, mais ceux du locus SCL sont variables. La plupart de ces points se situent dans la région 5' non traduite du gène, dans l'intron qui précède l'exon Ib (Type A/TAL^{d1}) ou en amont de l'exon Ia (Type B/TAL^{d2}) (Macintyre *et al.*, 1992;

Breit *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1993). Cette délétion génère une jonction de la région régulatrice 5' du SIL et le gène SCL, qui cause l'expression aberrante du gène SCL dans la T-ALL (Bernard *et al.*, 1991; Aplan *et al.*, 1992a). La délétion se produit préférentiellement dans les lignées CD3⁻ et CD3⁺ α/β ⁺ de la T-ALL et s'accompagne d'une délétion du gène TCR- δ dans une ou deux allèles. Cette délétion ne se produit pas dans les lignées TCR $\gamma\delta$ ⁺ de la T-ALL. Cette différence est probablement attribuable au fait que l'état de méthylation du locus SCL diffère dans ces deux groupes de T-ALL (Breit *et al.*, 1993, 1994).

L'expression du gène SCL dans la T-ALL infantile a été étudiée. Dans 37 cas étudiés, 10 possèdent le réarrangement du gène SCL et 13 présentent son expression. L'expression monoallélique est observée dans les cellules leucémiques de tous les patients possédant un réarrangement du SCL. Chez les patients manquant un réarrangement détectable, la transcription du gène SCL présente un patron d'expression monoallélique ou biallélique. Ainsi, l'activation du SCL dans ce dernier cas pourrait être due à une altération des séquences régulatrices en cis ou à des changements dans des facteurs qui contrôlent la transcription du SCL en trans (Bash *et al.*, 1995).

Dans la T-ALL chez l'adulte, la fréquence d'expression ectopique du gène SCL reste incertaine. Au cours d'une étude, on a détecté l'activation du gène SCL par la délétion SIL/SCL dans plusieurs échantillons de patients adultes (Macintyre *et al.*, 1992). Pourtant, dans une autre série de 33 patients adultes atteints de T-ALL, la délétion SIL/SCL n'est pas détectable. Dans ce groupe, la fréquence d'expression du gène en absence d'anomalie chromosomique n'est pas connue. L'altération du locus SCL n'est pas trouvée dans d'autres types de néoplasie de type cellulaire T comme les lymphomes T non-Hodgkiniens, les lymphomes T cutanés, les leucémies aiguës lymphoblastiques de type cellulaire B ou encore avec des antigènes myéloïdes (Bernard *et al.*, 1990; Bash *et al.*, 1993; Kikuchi *et al.*, 1993). Un cas de leucémie de type cellulaire B avec une translocation t(1;14) impliquant le gène SCL a été rapporté (Bernard *et al.*, 1993). Une autre étude a

déte t  un réarrangement du locus SCL dans une lignée de mélanome (Finger *et al.*, 1989). Pourtant, dans une grande série de 120 tumeurs primaires humaines, y compris des mélanomes, des leucémies lympho ides, my lo ides et des tumeurs solides, il n'y a pas d'évidence de réarrangement impliquant SCL (Rochman *et al.*, 1992). Ces résultats sont d'ailleurs appuyés par le faible niveau d'expression du gène SCL, observé dans ces tumeurs. Ainsi, le réarrangement/translocation avec l'activation du gène SCL se produit rarement dans les autres leucémies et les myélomes.

4.2. Structure et expression du gène SCL

Le gène SCL humain est localisé sur le bras court du chromosome 1, dans la bande 3 de la zone 3 (1p33). Il est composé de huit exons qui sont distribués sur une longueur de plus de 16 Kb d'ADN (Fig11).

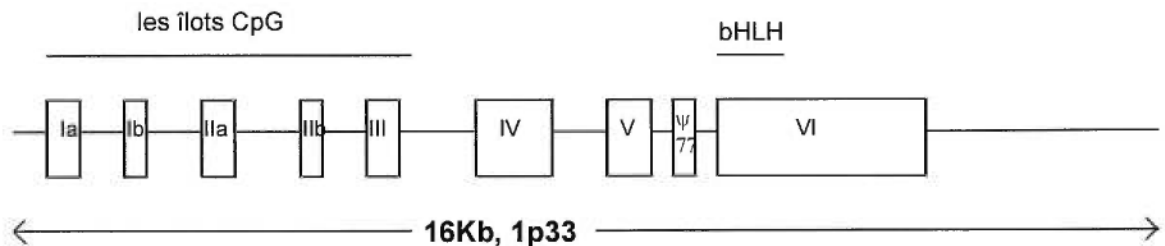


Figure 11. La structure du gène SCL. Les exons du gène SCL sont distribués dans une longueur d'ADN de plus de 16Kb dans la région 1p33.

Parmi les huit exons (Ia, Ib, IIa,IIb, III, IV,V,VI et le pseudo-exon ψ 77), les exons IV, V, VI codent pour la protéine SCL qui contient une région hélice-boucle-hélice basique (bHLH) hautement conservée dans différentes espèces(Fig11). La plus grande hétérogénéité se trouve dans la région 5' non traduite des ADNs complémentaires. Divers transcrits du gène SCL sont générés à cause, soit de diff rent sites d'initiation de la transcription, soit de différentes utilisations des cinq exons non codants. Les deux sites d'initiation principaux se trouvent dans l'exon Ia et Ib, le troisième se situe dans l'exon IV (Aplan *et al.*, 1990a; Bernard *et al.*, 1990; Begley *et al.*, 1994). La transcription est initiée dans les lignées cellulaires

multipotentielles HEL et K562 dans les exons Ia et Ib, tandis qu'elle est initiée seulement dans l'exon Ib dans les lignées cellulaires T Jurkat et HSB-2. Dans la lignée lymphoblastique, DU.528, le site d'initiation se trouve dans l'exon IV. Des études ont aussi démontré que l'utilisation des deux promoteurs Ia et Ib dépend de la lignée cellulaire. Ils sont tous deux actifs dans les cellules ou les lignées cellulaires érythroïdes. Le promoteur Ia est aussi utilisé dans les cellules mégakaryocytaires et granulocytaires, mais est inactif dans les cellules T. L'inactivation du promoteur Ia dans les cellules T est probablement due à l'absence du facteur de transcription GATA-1 dans l'environnement intracellulaire (Bockamp *et al.*, 1995). Par ailleurs, le promoteur Ib est utilisé dans les cellules lymphoïdes T et B et d'autres lignées cellulaires (Aplan *et al.*, 1990a; Mouthon *et al.*, 1993). Dans la translocation t(1;14) où le point de rupture se situe en aval de la région codante du gène SCL, la transcription est initiée dans l'exon IV. Cette initiation est observée aussi dans quelques cas de T-ALL exempts d'altération évidente du locus SCL et dans un cas de T-ALL avec une translocation t(1;14) où le point de rupture se situe dans la région 5' non traduite du gène SCL (Aplan *et al.*, 1990a; Bernard *et al.*, 1992). L'analyse de la séquence de l'exon Ia à l'exon III a démontré que cette région est riche en guanosine et cytidine. Ceci permet la formation d'un îlot CpG qui est une région génomique impliquée dans la régulation du gène. Cette région n'est pas méthylée dans les lignées cellulaires exprimant SCL, mais est méthylée dans les lignées cellulaires n'exprimant pas SCL. Ainsi, cette région et son état de méthylation semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'expression du gène SCL. De plus, elle est atteinte dans la plupart des aberrations chromosomiques touchant le gène SCL (Aplan *et al.*, 1990a; Bernard *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1990a; Breit *et al.*, 1993). Ces observations suggèrent que la translocation chromosomique ne se produit pas aléatoirement, mais survient avec préférence dans des régions actives transcriptionnellement. De plus, les exons non codants sont également utilisés de façon différente dans diverses lignées cellulaires. L'analyse des ADNs complémentaires de différentes lignées cellulaires T, Jurkat, et HSB-2 et de deux lignées érythroïdes HEL et K562,

révèle la présence de différents transcrits générés par la combinaison des exons non-codants avec des exons codants suivante: (1) Ia+IIa+III, (2) Ia+III, (3) Ib+IIb+III, (4) Ib+III, (5) III. Un autre transcrit spécial est généré par la jonction directe de l'exon Ia avec l'exon V et VI. Enfin, un dernier transcrit mineur est généré par la combinaison du pseudo-exon ψ 77 avec l'exon VI (Aplan *et al.*, 1990a). Bien que la région 5' des ADNc complémentaires soit variable, la région 3' des transcrits est plutôt constante, et contient une longue région non-codante. Dans la région 3' non-codante de l'ADNc du gène SCL humain, il existe beaucoup de codons d'arrêt avec quelques motifs TTATTTAT. Ces motifs se retrouvent dans les ARNs messagers codant pour des cytokines (Caput *et al.*, 1986) et serviraient à déstabiliser les ARNs messagers cytoplasmiques (Schibler *et al.*, 1983). On note aussi, un signal de polyadénylation AATAAA à une distance de 20 nucléotides du côté 5' de la queue de poly(A). L'ADN complémentaire complet du gène SCL humain a une longueur d'environ 4.2Kb (Aplan *et al.*, 1990a). Le gène SCL murin possède une grande homologie avec le gène SCL humain, soit 88% d'homologie dans la séquence en nucléotide et 94% d'homologie dans la séquence protéique. Les régions hélice-boucle-hélice basiques chez ces deux espèces sont identiques (Begley *et al.*, 1991) de même que celle des oiseaux, et 73% d'homologie est observée avec celle de la drosophile (Doodwin *et al.*, 1992; Varterasian *et al.*, 1993).

Chez l'homme, à l'extrémité 5' de l'exon Ia et Ib, on note la présence de boîtes TATA et CCAAT, de sites de reconnaissance SP-1, et d'un site potentiel de liaison AP-1. En amont de l'exon Ia, il existe un site proximal et un site distal de liaison aux facteurs de transcription GATA (TTATCT et TTATCG respectivement) (Aplan *et al.*, 1990a; Lecointe *et al.*, 1994). Les sites GATA (le site proximal en particulier) et SP-1 sont requis pour générer l'activation complète du promoteur Ia du gène SCL humain dans les cellules érythroïdes (Lecointe *et al.*, 1994).

L'expression du gène SCL a été premièrement identifiée dans une lignée lymphoblastique bipotentielle DU.528 d'un patient atteint de T-ALL. Les sondes dérivées du chromosome 1 et 14 ont détecté un transcrit de fusion aberrant,

d'environ 2 Kb. Ce transcrit n'est pas observé dans le cerveau, le foie, le placenta, le thymus, ni dans les lymphocytes activés et les diverses tumeurs de cellules B. Curieusement, dans la moëlle osseuse, un autre transcrit de taille différente est détecté (Begley *et al.*, 1989b). L'étude suivante a examiné son expression dans cinq lignées cellulaires: 730-3 et TALL-101, les lignées dérivées de T-ALL; Peer, la lignée cellulaire T γ^+/δ^+ ; Jurkat, la lignée T α^+/β^+ et 697, la lignée leucémique de type cellulaire pré-B. Un transcrit de 5.4 Kb et possiblement deux transcrits (2.2 Kb et 2.6 Kb) de faible niveau d'expression sont détectés dans les lignées Jurkat et TALL-101. Tandis que la lignée cellulaire 730-3 exprime fortement les transcrits de 2.2 et 2.6 Kb (Finger *et al.*, 1989). Une troisième étude confirme la présence d'un transcrit de plus de 4Kb (dont la migration sur gel coïncide avec celle de l'ARN de 28S) dans la moëlle osseuse, dans la lignée myéloïde K562 et la lignée DU.528, mais dans cette dernière lignée, le transcrit prédominant est d'environ 2 Kb. Dans les tissus normaux, l'expression du transcrit complet se présente dans le foie foetal et la moelle osseuse après la chimiothérapie. Le foie adulte, le cerveau (l'hippocampe), le thymus et les cellules T activées sont négatifs. Dans deux cas de leucémie myéloïde sur trois et un cas de T-ALL, le transcrit de SCL a été détecté dans les tissus malins, alors qu'il était absent dans des tumeurs épithéliales et de cellules T et B. En ce qui concerne les lignées cellulaires, le transcrit est présent dans la lignée K562, deux lignées cellulaires DU.528 et HSB 2 (CD7⁺, CD3⁻, CD4⁻, CD8⁻), deux lignées dérivées du médulloblastome et une lignée dérivée du carcinome du poumon (Begley *et al.*, 1989c). Une autre étude révèle la présence de deux transcrits de 5.0/4.8 Kb dans certaines lignées cellulaires dérivées de T-ALL (Chen *et al.*, 1990). De plus, il a été démontré qu'un transcrit de 5 Kb est présent dans les lignées T Kd, CEM, la lignée leucémique érythroïde/mégakaryocytaire HEL et la lignée K562, mais est absent dans la lignée T γ^+/δ^+ , les cellules leucémiques myéloïdes et les cellules lymphoïdes B (Bernard *et al.*, 1990).

Dans le système hématopoïétique humain, SCL est transcrit dans le foie foetal, les précurseurs CD34⁺/CD38⁺, les précurseurs érythroïdes et

mégakaryocytaires et les granulocytes basophiles. Le transcrit est absent dans les précurseurs CD34⁺/CD38⁻, les cellules granulocytaires de la moëlle osseuse (myélocytes, métamyélocytes et polymorphes), les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles du sang périphérique. De plus, SCL est exprimé dans les lignées cellulaires HEL, K562, la lignée pluripotentielle UT-7, la lignée bipotentielle (érythroïde/mégakaryocytaire) TF-1, les lignées érythroïdes/mégakaryocytaires CMK, DamI, Meg-01, la lignée cellulaire pré-B Nalm-6, et dans les lignées de T-ALL exemptes d'un réarrangement génique. D'ailleurs, le transcrit est observé dans les échantillons de leucémie de type M4 (selon la classification de FAB) et de T-ALL (Mouthon *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1992; Hoang *et al.*, 1996). Les lignées leucémiques myéloïdes, lymphoïdes B, les lignées du stroma de la moëlle osseuse, les cellules synoviales primaires et les fibroblastes dermaux primaires n'expriment pas SCL (Green *et al.*, 1991b).

En utilisant un anticorps anti-SCL humain, les chercheurs ont localisé la protéine SCL dans le noyau des cellules des lignées HEL, K562, Jurkat, CEM, RPMI 8402 et DU.528. La protéine est également présente dans le cytoplasme de cellules en mitose. Aucune expression n'a été notée dans d'autres lignées T, B, ou myéloïdes. Dans le système hématopoïétique, la protéine nucléaire se présente dans le foie foetal dans les précurseurs érythroïdes et mégakaryocytaires mais est absente dans les monocytes, les neutrophiles, les cellules lymphoïdes et les hépatocytes. Enfin, l'expression de SCL est observée dans une souspopulation d'endothélium des grands vaisseaux de l'amygdale, de la rate; dans certaines cellules endothéliales du thymus, du placenta, du rein; dans quelques macrophages du poumon, de l'amygdale, du rein, du cérébellum; dans le muscle lisse de l'utérus et dans les endothéliums en culture de la veine ombilicale (Lecointe *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1993).

Chez la souris, le transcrit du gène SCL est détectable dans les précurseurs hématopoïétiques pluripotentiels, mais persiste seulement dans les cellules érythroïdes, mégakaryocytaires et mastoïdes en maturation (Brady *et al.*, 1995). Le niveau d'expression est le plus élevé dans les précurseurs bipotentiels

érythroïde/mégakaryocytaire (E/Meg, ou burst-forming units BFU-E/Meg), mais est aussi détectable dans les précurseurs érythroïdes unipotentiels à un stade précoce (E, ou BFU-E) et avancé (E1, pro-érythroblaste ou CFU-E). Son niveau diminue dans les cellules rouges en maturation terminale. Le messenger est présent, mais à un niveau plus bas dans les précurseurs des neutrophiles et des macrophages et disparaît dans ces lignées cellulaires au cours de la maturation terminale (Hoang *et al.*, 1996). Le transcrit est aussi observé dans le foie, et la rate foetaux, dans quelques lignées myéloïdes, dans une minorité de lignées B, dans toutes les lignées érythroïdes, dans les lignées mastoïdes et dans les mastocytes normaux dérivés de la rate. Chez l'adulte, le transcrit n'est pas détectable dans le thymus, le coeur, le foie, les nodules lymphatiques, les testicules, le muscle lisse, les fibroblastes et les cellules synoviales. Durant le développement du cerveau, l'expression du gène SCL est observé dans le métencéphale, le mésencéphale, le diencéphale et possiblement dans le cerebellum au jour 14.5 de l'embryon (Green *et al.*, 1991b, 1992). Une autre étude a relevé la présence de la protéine SCL par l'utilisation d'anticorps anti-SCL dans des embryons post-implantation, et aux stades néonatal et adulte. La protéine SCL est détectable au jour 7.5 post-coïtal, approximativement 24h avant la formation des structures hématopoïétiques, soit dans des sites embryonnaires ou extra-embryonnaires. L'expression est ensuite localisée dans les îlots sanguins du sac vitellin puis dans le foie foetal et la rate. Ce patron d'expression est parallèle à celui de la localisation de l'activité hématopoïétique dans divers sites au cours du développement. La protéine est détectable dans les érythroblastes de la rate foetale et adulte; dans les cellules myéloïdes, mégakaryocytaires de la rate et de la moelle osseuse; dans les mastocytes de la peau et dans les cellules rares du thymus foetal et adulte. Aussi, SCL est observé dans les précurseurs endothéliaux des îlots sanguins, et dans les cellules endothéliales et les angioblastes de quelques organes au cours de la vascularisation. En outre, SCL est exprimé dans le système nerveux et squelettique au cours du développement (Kallianpur *et al.*, 1994).

Bref, dans les tissus murins et humains, l'expression de SCL est restreinte au système hématopoïétique. Ce gène est exprimé dans les cellules érythroïdes, mégakaryocytaires, mastoïdes, myéloïdes précoces et les précurseurs commis (CD34⁺/CD38⁺). Il est exprimé le long des sites d'hématopoïèse embryonnaire. De plus, il est exprimé dans les systèmes nerveux et squelettiques au cours du développement. Finalement, il est exprimé dans les endothéliums vasculaires de quelques organes.

4.3. Protéine SCL

Le produit du gène SCL est homologue à des protéines impliquées dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Il s'agit d'une famille de protéines dotées d'une région hélice-boucle-hélice (HLH) (Begley *et al.*, 1989c; Chen *et al.*, 1990a) et qui comprend plus de 60 membres. La région hautement homologue est restreinte à un domaine d'environ 60 acides aminés qui ont le potentiel de former deux hélices α amphipathiques séparées d'une boucle (Murr *et al.*, 1989). La plupart des protéines hélice-boucle-hélice possèdent aussi des acides aminés basiques (appelés bHLH) du côté amino-terminal du domaine HLH qui seraient responsables de la reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN. On croit que les protéines HLH seraient des facteurs de transcription puisqu'elles sont capables de se lier *in vitro* à des motifs d'ADN (la boîte E: CANNTG), trouvés dans des séquences amplificatrices de la transcription chez les eucaryotes. En plus, *in vivo*, plusieurs études suggèrent que ces protéines bHLH contrôlent la transcription (Beckmann *et al.*, 1990; Blackwell *et al.*, 1990a, 1990b; Braun *et al.*, 1990; Brennan *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1990; Gregor *et al.*, 1990; Henthorn *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1990; Lassar *et al.*, 1989; Murr *et al.*, 1989a, 1989b). Parmi les membres de cette famille, notons entre autre, les produits des gènes *achaete-scute* chez la drosophile, et chez les organismes supérieurs: *twist*, *daughter-less*, *c-*, *N-* et *L-myc*, les protéines du groupe MyoD impliquées dans la différenciation musculaire, et les protéines E12 et E47 (Benezra

et al., 1990; Murre *et al.*, 1989a). Les protéines E12 et E47 se lient aux séquences amplificatrices des immunoglobulines sous forme d'homodimère. Cet homodimère est stabilisé par des interactions protéine-protéine impliquant les hélices amphipathiques des domaines HLH. Les produits du gène E2A (E47 ou E12) peuvent aussi former des complexes hétérogènes, probablement des hétérodimères, avec d'autres membres de la famille HLH (e.g. MyoD1). Ces hétérodimères lient aussi les séquences de la boîte E avec une forte affinité. La famille des protéines HLH peut se diviser en trois classes: A, B et C (Murr *et al.*, 1989b). La classe A contient les protéines qui sont largement exprimées dans divers tissus et cellules. Les protéines de la classe B sont exprimées d'une façon lignée- ou histo-spécifique. Les protéines de la classe C présentent une structure en tandem du domaine bHLH avec un motif de leucine zipper adjacent (bHLH-Zip). Pour les protéines de la famille HLH, la formation des dimères est essentielle pour la liaison à l'ADN. L'activité d'une protéine bHLH dépend en grande partie de son partenaire de dimérisation. En général, les protéines de la classe A possèdent le potentiel de former des homodimères en s'autoassociant. Ces protéines peuvent aussi former des hétérodimères en interagissant avec des protéines de la classe B. Les protéines ubiquitaires de la classe A, comme E47 et E12 peuvent éventuellement influencer l'expression de gènes histo-spécifiques par l'interaction avec une protéine de la classe B. Les protéines HLH dépourvues de région basique, comme les protéines Id, peuvent inhiber la capacité de lier à l'ADN des homodimères ou hétérodimères des autres protéines HLH, étant donné qu'elles compétitionnent à forment des complexes hétérodimériques non fonctionnelles avec ces dernières protéines (Benezra *et al.*, 1990). Pourtant, les protéines Id n'atténuent pas l'activité de liaison à l'ADN des homo et hétérodimères déjà formés. Les protéines de la classe B ne s'homodimérisent pas efficacement *in vivo*, ainsi, leur propriété fonctionnelle dépend de leur association avec une protéine de la classe A (Murre *et al.*, 1989a, 1989b; Ferrè-D'Amaré *et al.*, 1993; et Kdesch *et al.*, 1993). Par exemple, MyoD1, une protéine HLH musculo-spécifique qui gouverne la spécification myogénique des cellules mésodermes forme un

hétérodimère avec les produits du gène E2A (E47 ou E12) (Murre *et al.*, 1989b). MyoD1 partage une forte homologie avec trois protéines HLH musculo-spécifiques capables d'induire la myogénèse (Braun *et al.*, 1989, 1990; Edmondson *et al.*, 1989; Miner *et al.*, 1990; Rhodes *et al.*, 1989; et Wright *et al.*, 1989). Il a été aussi démontré que chaque membre de la sousfamille des protéines HLH myogéniques se lie à l'ADN sous forme d'hétérodimères liés avec les produits du gène E2A. Chez la drosophile, les produits du complexe génique achaete-scute qui contrôlent le développement neuronal, forment des hétérodimères avec l'homologue de E47/E12 (Cabrera *et al.*, 1987; Caudy *et al.*, 1988; Murre *et al.*, 1989b; Villares *et al.*, 1987). Considérant le rôle des protéines myogéniques dans la myogénèse et des protéine achaete-scute dans la neurogénèse, il semble que les protéines HLH de classe B, en interagissant avec une protéine de la classe A, spécifient le destin et induisent la différenciation de certains tissus ou organe. L'expression normale du gène SCL et la présence de sa protéine se concentrent dans le système hématopoïétique tant foetal qu' adulte, ce qui suggère un rôle particulier du SCL dans l'hématopoïèse.

Diverses protéines SCL ont été observées dans les échantillons leucémiques et dans les lignées cellulaires. Ces différences sont probablement dues aux différents sites d'initiation de traduction (Aplan *et al.*, 1990a; Bernard *et al.*, 1991; Goldfarb *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1993b; et Elwood *et al.*, 1994). Un cadre de lecture ouvert, qui correspond à 331 acides aminés, est distribué dans les exons IV, V et VI (Bernard *et al.*, 1991; et Aplan *et al.*, 1990a). L'analyse mutationnelle a identifié trois codons AUG qui servent d'initiateur de traduction *in vitro* (Bernard *et al.* 1991). Les codons de la méthionine 1 et 26 sont situés dans l'exon IV et le codon de la méthionine 176 est localisé dans l'exon V. L'initiation de la traduction de ces codons génère des polypeptides de 42, 39 et 22 KDa respectivement (Bernard *et al.*, 1991; et Cheng *et al.*, 1993b). La région amino-terminale, composée des 190 premiers acides aminés est riche en proline. Les acides aminés 191 à 203 constituent la région basique, laquelle est suivie de la région HLH (aa 204 à aa 244). La région carboxyl-terminale est composée des

acides aminés 245 à 331. Les essais de fusion GAL 4 ont démontré un potentiel modéré d'activation transcriptionnelle de la région amino-terminale (Wadman *et al.*, 1994). En utilisant un anticorps anti-SCL, les auteurs ont montré la présence de phosphoprotéines du SCL: pp42^{TAL1} et pp22^{TAL1} dans des lignées érythroleucémiques et de T-ALL. Les protéines pp42^{TAL1} et pp22^{TAL1} sont des formes phosphorylées des produits complet et tronqué du gène SCL respectivement. Elles contiennent toutes les deux le motif HLH basique. L'analyse des acides phosphoaminés a révélé que pp42^{TAL1} contient des résidus de phosphosérine. Les phosphoprotéines sont détectables dans toutes les lignées cellulaires de la T-ALL qui contiennent un réarrangement du gène SCL. Ces protéines sont aussi présentes dans quelques lignées de T-ALL sans altération détectable du gène SCL (Cheng *et al.*, 1993b). La sérine 122 (S122) est un site majeur de phosphorylation dans les lignées cellulaires leucémiques et les cellules COS transfectées par l'ADN_c du gène SCL. La phosphorylation de la sérine 122 est induite *in vivo* par le facteur de croissance épidermale. Elle suit l'activation des kinases de protéines, ERK/MAP2. En plus, S122 est phosphorylée *in vitro* par la kinase ERK1. Ainsi, la sérine 122 de la protéine SCL servirait *in vivo* de substrat aux kinases ERK/MAP2, comme ERK1. Puisque les kinases ERK/MAP2 répondent strictement à une variété de signaux extracellulaires, la phosphorylation de la sérine 122 pourrait fournir un mécanisme de la régulation fonctionnelle des protéines SCL par des stimuli extracellulaires (Cheng *et al.*, 1994a). La mutagénèse dirigée de la S122 montre, en effet, l'importance de cet acide aminé puisque son remplacement entraîne une réduction de l'activité transcriptionnelle de la région amino-terminale (Wadman *et al.*, 1994b). La phosphoprotéine pp22^{TAL1} ne contient pas cette sérine et inhibe l'activité transcriptionnelle de la protéine pp42^{TAL1} de façon dominant-négative. La protéine SCL appartient à la classe B de la famille des protéines HLH. Son domaine HLH basique présente 53% d'homologie avec celui du gène *achaete-scute* T8 de la drosophile, et 30% avec celui du MyoD (Begley *et al.*, 1989c). Toutefois, c'est avec les domaines HLH des gènes Lyl-1 et Tal2 que l'on note la plus forte homologie (84 et 80%,

respectivement). Ces deux derniers gènes ont aussi été identifiés par des analyses de translocation génique dans des cellules leucémiques de T-ALL (Melletin *et al.*, 1989; Xia *et al.*, 1991). Les études ont démontré que les protéines SCL sont incapables de lier l'ADN, probablement parce qu'elles ne peuvent pas former d'homodimères HLH basiques. Mais SCL interagit avec toutes les protéines HLH de la classe A (E12, E47, E2-2 et HEB) pour former des hétérodimères et ensuite lier l'ADN à une séquence spécifique. Les hétérodimères du SCL reconnaissent préférentiellement une sous-population des éléments de la boîte E (CANNTG) qui pourraient être représentés par la séquence consensus AACAGATGGT. Ce consensus est composé du demi-site AACAG connu pour les polypeptides HLH de la classe A et du demi-site ATGGT connu pour la protéine SCL. La liaison à l'ADN des hétérodimères du SCL est détectable dans l'extrait nucléaire de la lignée cellulaire Jurkat de T-ALL. Ainsi, SCL semble lier et contrôler la transcription de certains gènes dont quelques-uns pourraient être impliqués dans la leucimogénèse de T-ALL (Hsu *et al.*, 1991, 1994a, 1994c).

Dans une étude utilisant un gène de reportage contenant des sites de liaison pour les hétérodimères SCL/E47, il a été démontré que ces hétérodimères exercent une transactivation moins forte que les homodimères E47/E47. Ainsi, dans un environnement qui favorise la formation des homodimères E47/E47 (e.g. en absence des protéines Id), SCL réprimerait la transcription en recrutant E47, et en formant donc des hétérodimères E47/SCL moins actifs. Toutefois, en présence des protéines Ids, SCL peut activer la transcription, parce que les hétérodimères SCL/E47 sont plus résistantes à la dissociation causée par les protéines Id_s que les homodimères E47/E47 (Hsu *et al.*, 1994b). La présence inappropriée de la protéine SCL dans les cellules T pourrait induire la leucémie en influençant le patron normal d'expression des gènes. Cet effet pourrait être direct ou indirect. Par exemple, les complexes SCL/E2A (e.g. SCL/E47) pourraient se lier directement aux éléments régulateurs cis des gènes, ou encore, la présence du SCL pourrait indirectement perturber les interactions entre les protéines HLH dans les cellules T.

Le domaine basique joue un rôle crucial dans la localisation nucléaire de la protéine SCL. Son retrait a converti SCL en une protéine cytoplasmique. Cependant, cette protéine SCL tronquée peut être redirigée dans le noyau par la coexpression d'une autre protéine HLH dotée d'un domaine basique intact. Ainsi, l'hétérodimérisation de SCL peut avoir lieu avant sa translocalisation nucléaire (Goldfarb *et al.*, 1992, 1994). SCL se localise dans des structures macromoléculaires du noyau appelées les domaines PODs, qui ont été récemment découverts dans les cellules de leucémie promyélocytaire aiguë (Pulford *et al.*, 1995; Dyck *et al.*, 1994).

La région carboxyl-terminale de la protéine SCL contient plusieurs sérines qui pourraient être les cibles des kinases de sérine. La troncation de ce domaine diminue significativement l'interaction de la protéine SCL avec les oncoprotéines RBTN (Wadman *et al.*, 1994).

Mises à part les formes de 42, 39 et 22KDa, les produits du gène SCL de 49, 44, 41, 37 et 24KDa sont aussi détectés dans différentes lignées cellulaires, dans les cellules COS transfectées et dans des essais de traduction *in vitro* en utilisant l'ADNc complet de SCL (Elwood *et al.*, 1991; Pulford *et al.*, 1995; Leroy-Viard *et al.*, 1995; Goldfarb *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1991). Ces différences sont dues au fait qu'il y a au total sept codons d'initiation ATG dans le cadre de lecture ouvert (Aplan *et al.*, 1990a; Begley *et al.*, 1989c), et que la modification post-traductionnelle peut aussi y jouer un rôle important.

4.4. Effet biologique du gène SCL

L'analyse des facteurs de transcription membres de la famille HLH basique suggère que SCL serait impliqué dans la régulation de la détermination et de la différenciation cellulaires dans le système hématopoïétique (revue par Jan et Jan., 1993; Kadesch, 1993). En utilisant la lignée leucémique myéloïde murine M1 qui peut se différencier en cellules monocytaires en présence d'interleukine 6, du facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) ou d'oncostatine M (OSM), les auteurs ont

démontré une diminution persistente du niveau de l'ARN messager et de la protéine du gène SCL au cours de la différenciation monocytaire induite par ces cytokines. La surexpression de SCL dans cette lignée cause une diminution de la réponse aux facteurs LIF et OSM (Tanigawa *et al.*, 1993). La différenciation monocytaire est aussi empêchée quand on surexprime SCL dans une lignée bipotentielle TF1 (Hoang *et al.*, 1996). Ainsi, la régulation négative du SCL peut être requise pour la différenciation monocytaire. L'hétérodimérisation de SCL avec E47 réprime la transactivation induite par E47 et pourrait prévenir l'expression des gènes d'immunoglobuline dans les cellules autres que les lymphocytes B. La liaison à l'ADN des hétérodimères E2A/SCL dans la lignée M1 est abolie au cours de la différenciation monocytaire induite par l'interleukine 6. Notons que cette différenciation monocytaire induite par l'IL-6 s'accompagne d'une augmentation de l'expression des protéines HLH dominant-négatives: Id_s. À des concentrations élevées, Id inhibe la liaison à l'ADN des hétérodimères E2A/SCL des cellules M1 non différenciées (Voronova *et al.*, 1994). L'expression ectopique de SCL bloque la différenciation des précurseurs musculaires C2C12. La caractérisation du mécanisme correspondant a démontré que la protéine SCL réprime l'activation transcriptionnelle déclenchée par le facteur myogénique HLH basique: MyoD. L'analyse de l'interaction protéique révèle que SCL et MyoD sont en compétition pour lier des partenaires communs (protéines HLH basique E). Ainsi, SCL est efficace comme Id dans la suppression transcriptionnelle et l'inhibition de la différenciation musculaire (Goldfarb *et al.*, 1995). Dans une autre étude, l'expression ectopique de SCL bloque la différenciation musculaire des cellules C3H10T1/2. La co-transfection de SCL avec la myogénine ou E2A supprime l'activation transcriptionnelle de ces deux gènes. Le retrait du domaine amino-terminal de SCL réduit ou abolit sa capacité de suppression transcriptionnelle. Ainsi, le domaine amino-terminal de SCL pourrait séquestrer directement le domaine de transactivation des protéines reliées à E2A. Comme les protéines reliées au E2A sont impliquées dans la différenciation lymphocytaire, l'inhibition

dominant-négative de ces protéines pourrait être le mécanisme par lequel le gène SCL favorise la leucimogénèse (Hofmann *et al.*, 1996).

Des études ont aussi démontré un rôle important de SCL dans la différenciation érythrocytaire. Dans la lignée bipotentielle TF1, le niveau d'ARN messager de SCL reste élevé durant la différenciation érythrocytaire. L'expression excessive de SCL dans la lignée TF1 stimule la différenciation érythrocytaire spontanée et celle qui est induite par l'acide delta-aminolevulinique (Hoang *et al.*, 1996). L'ARN messager de SCL augmente au cours de la différenciation érythrocytaire des cellules érythro-leucémiques murines (MEL). L'expression excessive de SCL dans les lignées MEL et K562 augmente le taux de différenciation érythrocytaire spontanée. Alors que, la différenciation est inhibée dans les cellules MEL transfectées avec un ADN complémentaire antisense SCL ou avec un mutant de SCL exempt du domaine basique (Aplan *et al.*, 1992b). En exprimant un ADN complémentaire antisense SCL dans la lignée K562, on réprime la croissance cellulaire. Les cellules K562 contenant l'antisense SCL produisent des colonies plus petites en agar et présentent une clonogénicité réduite. En plus, des expériences où les colonies de K562 sont reclonees ont démontré que l'antisense SCL réprime considérablement l'auto-renouvellement des cellules K562. Ces résultats suggèrent que le gène SCL peut contrôler la prolifération des cellules érythroïdes normales (Green *et al.*, 1991a). Le patron d'expression du gène Id_2 et des gènes SCL/E2A dans l'hématopoïèse normale humaine a été examiné. Dans les précurseurs cellulaires hématopoïétiques purifiés (HPCs), l'ARN messager de Id_2 est détectable par RT-PCR, tandis que les ARN_m de SCL et de E2A sont indétectables. Au commencement de la différenciation érythroïde, l'ARN_m de Id_2 est faible, tandis que les ARN_m de E2A et de SCL sont élevés jusqu'au stade d'érythroblaste. Le patron d'expression des hétérodimères SCL/E2A, évalué par retard sur gel, coïncide avec les résultats obtenus par RT-PCR des ARN_m de SCL et de E2A. Les oligomères anti- Id_2 stimulent la formation des colonies érythroïdes en fonction de la dose, tandis que les oligomères antisense SCL l'inhibent. Les polypeptides de fusion GST- Id_2 sont

en compétition avec les hétérodimères SCL/E2A et inhibent la liaison à l'ADN de ces dernières protéines dans des extraits nucléaires de cellules érythroïdes. Ainsi, Id₂ et SCL/E2A semblent jouer un rôle dans la différenciation érythroïde (Condorelli *et al.*, 1995). L'événement final de l'érythropoïèse est contrôlé par l'érythropoïétine (EPO). Cette hormone, une glycoprotéine provoque une augmentation rapide des ARN_m de SCL en stimulant la transcription et en stabilisant les ARN_m. Cette activité dépend de la dose d'EPO. De plus, l'EPO est capable d'induire la liaison de SCL à l'ADN dans des extraits nucléaires de cellules murines FVA. Cet effet s'accompagne d'une phosphorylation de la protéine SCL. Il a été ainsi démontré que l'EPO contrôle le gène SCL tant au niveau transcriptionnel que posttranscriptionnel, et un lien a donc été établi entre l'EPO et un membre des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des diverses lignées cellulaires (Prasad *et al.*, 1995).

Des souris hétérozygotes portant une mutation nulle au locus SCL ont été produites par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires. Puis des animaux homozygotes pour cette mutation (SCL^{-/-}) ont été obtenus par croisement des souris hétérozygotes. Les embryons SCL^{-/-} meurent au jour embryonnaire 9.5. Ils sont pâles, oedémateux et présentent le retard de croissance au jour embryonnaire 8.75. Les études histologiques révèlent l'absence complète d'hématopoïèse dans le sac vitellin. Toutefois, les étapes précoces de l'organogénèse semblent normales. La culture des cellules du sac vitellin des homozygotes SCL^{-/-} a confirmé l'absence de cellules hématopoïétiques. Deux facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse, GATA-1 et PU-1, ne sont pas détectables dans l'ARN dérivé du sac vitellin et des embryons totaux (Robb *et al.*, 1995a). Une autre étude corrobore ces résultats. Dans ce cas, la perte de SCL entraîne la mort des embryons SCL^{-/-} entre les jours 8.5 à 10.5. Au jour 9.5 à 10, ces embryons sont pâles et plus petits et ils ont un sac péricardiaque dilaté et n'ont aucune cellule rouge embryonnaire dans le sac vitellin et dans le placenta. L'expression de GATA-1, de c-myb et des gènes de globine n'est pas détectable. La culture des cellules du sac vitellin révèle l'absence de colonies

érythroïdes et une réduction marquée des cellules myéloïdes (Shivdasani *et al.*, 1995). Les études suivantes ont confirmé que les produits du gène SCL sont requis pour générer toutes les lignées hématopoïétiques chez la souris adulte (Robb *et al.*, 1996). En plus, les auteurs ont étudié le potentiel de différenciation des cellules souches embryonnaires portant la mutation nulle de SCL *in vitro* et *in vivo* dans des souris chimériques. En absence de SCL, il n'y a pas d'hématopoïèse, c'est à dire qu'il y a absence totale de cellules rouges, de cellules myéloïdes, de mégakaryocytes, de mastocytes, et de cellules lymphoïdes T et B. Ces résultats suggèrent que SCL fonctionne à un stade très précoce de l'hématopoïèse: lors de la spécification des cellules du mésoderme ventral à un destin hématopoïétique, et lors de la formation et du maintien des précurseurs immatures (Porcher *et al.*, 1996).

La perte de l'activité de la protéine SCL induit l'apoptose de la lignée leucémique lymphoblastique T Jurkat en déplétion du milieu (Leroy-Viard *et al.*, 1995). SCL joue-t-il aussi un rôle dans l'apoptose ou la suppression d'apoptose dans les cellules souches hématopoïétiques? Ce rôle reste à être élucidé.

Les souris avec la mutation nulle de GATA-1 ou GATA-2 ont aussi des défauts du système hématopoïétique. Les membres des gènes de la famille GATA sont exprimés très précocement dans les cellules hématopoïétiques (Weiss et Orkin, 1995). Le patron d'expression de GATA-1 et celui de SCL sont très semblables (Green *et al.*, 1992; Mouthon *et al.*, 1993). Les cellules souches embryonnaires nulles pour GATA-1 ne sont pas capables de générer des cellules érythroïdes dans des souris chimériques (Pevny *et al.*, 1991). En culture, ces cellules souches se différencient normalement en colonies myéloïdes et mégakaryocytaires, mais les colonies érythroïdes sont bloquées au stade pro-érythroblastique (Pevny *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1994). Les souris homozygotes pour la mutation nulle de GATA-2 meurent entre le jour embryonnaire 10 et 11 et ont des défauts hématopoïétiques dans le sac vitellin et dans le foie foetal. Le sac vitellin mis en culture a montré une réduction du nombre de colonies de tous les types cellulaires (Tsai *et al.*, 1994). En comparant ces résultats avec l'absence

complète d'hématopoïèse dans les souris SCL^{-/-}, il a été suggéré que les produits du gène SCL pourraient fonctionner en amont des facteurs GATA durant l'hématopoïèse du sac vitellin (Warren *et al.*, 1994). En utilisant le système de deux hybrides dans les cellules C3H10T1/2, un complexe impliquant SCL, GATA-1, RBTN2 et E47 a été identifié. Ainsi, ces protéines pourraient interagir durant l'hématopoïèse (Osada *et al.*, 1995).

L'expression aberrante de SCL, due à l'insertion de la particule intracisternale A a été détectée dans la leucémie myéloïde murine. La croissance excessive de ces clones leucémiques suggère que SCL favorise la prolifération de ces cellules (Tanigawa *et al.*, 1994). Pourtant, les souris transgéniques qui expriment SCL sous le contrôle des séquences amplificatrices de CD2 et qui produisent les protéines SCL à haut niveau dans les lignées cellulaires T ne développent pas de tumeur (Robb *et al.*, 1995b). En plus, quand ces souris sont infectées par un virus leucémique murin de Moloney, dans le but de recruter les oncogènes coopératifs, le taux de développement des tumeurs est le même que celui des contrôles. En utilisant un rétrovirus contenant SCL et un modèle de reconstitution de moelle osseuse, il n'y a pas d'évidence de leucémie liée à l'expression de SCL (Elwood and Begley, 1995). Lorsqu'un rétrovirus contenant SCL est utilisé pour infecter les lignées cellulaires T transformées par v-abl, les cellules infectées présentent une clonogénicité plus élevée *in vitro* et une tumorigénicité plus élevée quand elles sont injectées dans des animaux (Elwood *et al.*, 1993). Pourtant, même dans ce modèle qui a tendance à révéler un effet de SCL, le développement tumoral apparaît tardivement et chez seulement 60% des animaux injectés. Ce qui suggère que des événements génétiques additionnels sont requis pour l'émergence d'un phénotype malin. Certains patients atteints de T-ALL possèdent des anomalies chromosomales touchant à la fois le gène SCL et le gène RBTN2 (Wadman *et al.*, 1994). Des souris transgéniques qui co-expriment RBTN2 et SCL dans les cellules T sont produites. Les dimères protéiques RBTN2/SCL sont formés dans les thymocytes des souris transgéniques doubles (CD2-SCL/CD2-RBTN2). Dès la naissance, les thymus de ces souris sont

presqu'entièrement constitués de cellules T immatures. En suite, ces souris développent des tumeurs de cellule T jusqu'à 3 mois avant celles observées chez les souris transgéniques de RBTN2. Ainsi, l'interaction entre ces deux protéines peut influencer le développement des cellules T et potentiellement favoriser la tumorigénèse. La preuve directe de la capacité de transformation de SCL a été fournie par une étude où des souris transgéniques de SCL ont été produites. Le gène SCL est sous le contrôle d'un promoteur proximal de *lck* et son expression est ainsi dirigée principalement dans les thymus des souris transgéniques. L'expression ectopique de SCL entraîne le développement de leucémies lymphoblastiques de type cellulaire T ou de lymphomes T dans ces souris transgéniques. De plus, la tumorigénèse est accélérée par la co-expression de SCL et de l'unité catalytique de la kinase de la caséine II α (CKII α). Cette dernière est une kinase de sérine/ thréonine qui module l'activité des facteurs de transcription HLH (Kelliher *et al.*, 1996). Ainsi, les produits du gène SCL sont des oncogènes, c'est-à-dire des protéines dont l'expression inadéquate transforme les cellules normales et permet le développement de tumeurs malignes.

5. Facteur Steel et c-Kit

Trois groupes ont réalisé le clonage des ADN_s complémentaires codant pour un nouveau facteur de croissance pléiotropique appelé le facteur Steel (Williams *et al.*, 1990; Copeland *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1990; Zsebo *et al.*, 1990a; Zsebo *et al.*, 1990b; Martin *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990). Le facteur Steel est aussi connu sous le nom de facteur de croissance des mastocytes (MGF, Williams *et al.*, 1990; Copeland *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1990), le facteur des cellules souches (SCF, Zsebo *et al.*, 1990a; Zsebo *et al.*, 1990b; Martin *et al.*, 1990), ou le ligand de Kit (KL, Huang *et al.*, 1990). Ces noms différents illustrent les diverses propriétés de cette molécule. Les ADN_s complémentaires du facteur Steel du rat, de la souris et de l'homme codent tous pour un facteur de croissance formé d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un

domaine cytoplasmique (Anderson *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990).

Le gène codant pour le facteur Steel murin se localise au locus Sl du chromosome 10 (Copeland *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; et Zsebo *et al.*, 1990). Son homologue humain est situé sur le chromosome 12, dans la région 12q22-12q24 (Anderson *et al.*, 1991). Plusieurs formes d'ARN messager codant pour le facteur Steel ont été rapportées, certaines ayant une taille de 6.5 Kb et d'autres plus courtes (Anderson *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; et Zsebo *et al.*, 1990). L'expression de l'ARN messager du facteur Steel a été étudiée dans des embryons murins en développement (Matsui *et al.*, 1990). Le facteur Steel est exprimé dans les tissus hématopoïétiques (le sac vitellin, le foie foetal et la moelle osseuse), dans les gonades (les testicules et l'ovaire), dans le coeur, le poumon, le rein et le cerveau (Matsui *et al.*, 1990; Keshet *et al.*, 1991). L'ADN complémentaire du facteur Steel humain code pour une protéine avec un polypeptide signal de 25 acides aminés, un domaine extracellulaire de 185 acides aminés, un segment transmembranaire de 27 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 36 acides aminés (Anderson *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990). Cette protéine est très conservée, avec 83% d'homologie entre l'homme et la souris. Le poids moléculaire observé oscille entre 37 et 42 KDa, dû à l'addition de chaînes latérales de carbohydrates (Martin *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1993). Les surnageants des cellules exprimant la forme membranaire du facteur Steel sont aussi dotés d'activité biologique, car le facteur Steel soluble est produit par clivage protéolytique du domaine extracellulaire. Le clivage a lieu à l'alanine 164 ou 165 et génère un facteur Steel soluble de 30-35 KDa après les autres modifications post-traductionnelles (Anderson *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1991). Les formes solubles de cette protéine forment des dimères non covalents (Anderson *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; Zsebo *et al.*, 1990). Ce ligand dimérique serait requis pour initier la dimérisation des récepteurs, qui est nécessaire à la transduction du signal par les récepteurs de la famille des kinases de tyrosine (Williams *et al.*, 1989). L'analyse par hybridation *in situ* des embryons murins en développement a démontré un

patron d'expression complémentaire entre le facteur Steel et son récepteur, c-Kit (Keshet *et al.*, 1991). Par exemple, c-Kit est exprimé à haut niveau dans l'ovocyte et absent dans les cellules de la granulosa, tandis que le facteur Steel est fortement exprimé dans la granulosa, et absent dans l'ovocyte (Keshet *et al.*, 1991). Ces patrons d'expression suggèrent un rôle du facteur Steel dans le maintien de la viabilité des cellules exprimant c-Kit lors des étapes précoces du développement embryonnaire. Ensuite, au cours du développement, le facteur Steel semble stimuler la prolifération, la différenciation et la survie des précurseurs d'une variété de lignées cellulaires. Sans le facteur Steel, les souris souffrent de problèmes de pigmentation, de développement des cellules germinales et d'érythropoïèse (revue par Russell., 1979). Les animaux homozygotes dotés d'une déficience de ce gène dans les deux allèles meurent d'une anémie sévère, à un stade prénatal (Copeland *et al.*, 1990).

En ce qui concerne le système hématopoïétique, le facteur Steel stimule la croissance de cellules en colonies dans des tests *in vitro* réalisés, soit avec de la moelle osseuse saine, soit avec des cellules souches et/ou précurseurs enrichies de moelle osseuse. De plus, une activité synergique remarquable a été démontrée avec une variété de cytokines, y compris l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-3, l'IL-6, l'IL-7, l'érythropoïétine, le facteur de croissance des granulocytes (G-CSF), le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) et le facteur de croissance des macrophages (M-CSF), qui se traduit par l'augmentation du nombre et de la taille des colonies en culture *in vitro* (Martinet *et al.*, 1990; Zsebo *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1990; Muench *et al.*, 1992; Heywoth *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992; Metcalf *et al.*, 1991; Tsuji *et al.*, 1991; et Lowry *et al.*, 1991). Lorsque le facteur Steel est utilisé *in vitro* avec l'IL-3 et/ou l'IL-6, le nombre des unités de formation des colonies spléniques (CFU-S) est augmenté et la capacité à régénérer diverses lignées cellulaires à partir de colonies primaires en culture *in vitro* est maintenue (Anderson *et al.*, 1990; Copeland *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990). Quand le facteur Steel est administré *in vivo*, le nombre de neutrophiles, de lymphocytes en circulation, de CFU-S, de cellules spléniques et de moelle

osseuse augmente (Anderson *et al.*, 1990). Le facteur Steel est donc un facteur de croissance et de survie avec un potentiel mitogénique minimal (Li et Johnson., 1994).

Le facteur Steel supprime l'apoptose des cellules hématopoïétiques précoces exprimant l'antigène de surface CD34 (Li et Johnson., 1994; Abramson *et al.*, 1995), et des cellules de la lignée CD34⁺ TF-1 (Caceres-Coetes *et al.*, 1994). Il a aussi un effet synergique avec l'IL-7 dans le délai de l'apoptose des thymocytes primitifs (Godfrey *et al.*, 1992; Palacios *et al.*, 1992). De plus, il a été démontré qu'en absence de sérum ou d'autres facteurs de croissance, le facteur Steel augmente le niveau protéique de SCL par une stimulation de la transcription et par un mécanisme post-transcriptionnel (Miller *et al.*, 1994).

Le proto-oncogène c-Kit est l'équivalent humain du proto-oncogène v-Kit du virus du sarcome du chat, et il code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase (Yarden *et al.*, 1987; Qiu *et al.*, 1988). Il est le récepteur du facteur Steel et le produit du locus *W* murin (Huang *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990). La mutation de ce locus cause un effet pléiotropique lors du développement murin avec des altérations de la couleur de la peau, des anémies de degrés différents et un défaut dans le développement des gonades (revue par Russell., 1979). Ces effets sont semblables à ceux observés lors d'une déficience du facteur Steel, causée par des mutations dans son gène (Russell, 1979; Nakayama *et al.*, 1988a; Nakayama *et al.*, 1988b). L'ADN complémentaire humain codant pour l'homologue du c-Kit murin a été isolé à partir d'une librairie dérivée du placenta humain. L'analyse de la localisation montre sa position au bras long du chromosome 4 humain (Yarden *et al.*, 1987; Qiu *et al.*, 1988). Le gène c-Kit est exprimé en un simple ARN messenger de 5Kb qui contient un cadre de lecture ouvert codant pour une protéine de 976 acides aminés. Le c-Kit humain est doté d'une séquence signale de 23 acides aminés qui précède le domaine de liaison au ligand. Le domaine de liaison est constitué de la région amino-terminale extracellulaire qui comprend 497 acides aminés. La séquence signale hydrophobe sert à attacher le ligand du c-Kit, tandis que le domaine de liaison extracellulaire contient le domaine

enzymatique et les autres structures impliquées dans la génération, le contrôle et possiblement dans la maturation des signaux intracellulaires (Yarden., 1987). Le domaine cytoplasmique de c-Kit jouerait un rôle dans la reconnaissance et la liaison spécifique des substrats protéiques, et la séquence carboxyl-terminale déterminerait la spécificité du signal du récepteur ou régulerait l'activité enzymatique du domaine de la kinase de la tyrosine (revue par Yarden et Ullrich., 1988).

Dans l'embryon de la souris, c-Kit est exprimé dans le placenta maternel (jour 61/2-71/2 postcoïtal) et dans des sites ectodermaux et endodermaux. Les transcrits sont présents plus tard dans les îlots sanguins du sac vitellin et dans le foie foetal. A mi-gestation, les transcrits s'accumulent dans le cul-de-sac bronchique et dans les cellules germinales primordiales. C-Kit est aussi exprimé dans des structures différenciées, comme la région cranio-faciale, les mélanoblastes et le système nerveux central (Orr-Urtreger *et al.*, 1990). Dans le système hématopoïétique, l'ARN messager de c-Kit est présent aux stades précoces de la différenciation érythroïde et myéloïde, mais absent dans les lignées lymphoïdes. C-Kit est exprimé dans les lignées érythroleucémiques humaines, et est absent dans les lignées myéloïdes, myélomonocytiques ou macrophagiques humaines. En utilisant un anticorps anti-c-Kit, il a été démontré que 7.8% des cellules de la moelle osseuse murine expriment c-Kit à leur surface. La moitié des cellules c-Kit+ n'expriment pas de marqueurs spécifique à une lignée. L'autre moitié exprime les marqueurs des lignées myéloïdes. Après avoir éliminé les cellules c-Kit+, les précurseurs hématopoïétiques qui répondent à l'IL-3, au GM-CSF, au M-CSF et qui produisent des colonies spléniques sont complètement absents après la transplantation de la moelle osseuse exempte de cellules c-Kit+ dans des récipients irradiés. Ainsi, la plupart des précurseurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse expriment c-Kit. En utilisant un anticorps monoclonal anti-c-Kit qui inhibe sa fonction, presque tous les précurseurs hématopoïétiques disparaissent de la moelle osseuse, et il n'y a pas de cellules érythroïdes et myéloïdes dans la moelle osseuse (Ogawa *et al.*, 1991). Ces résultats indiquent

que c-Kit serait une molécule essentielle dans l'hématopoïèse constitutionnelle de la moelle osseuse, particulièrement pour la maintenance des précurseurs aux différents stades de différenciation. Dans l'hématopoïèse foetale de la souris, l'hématopoïèse du sac vitellin et du foie foetal est initiée par des cellules qui expriment c-Kit. Les précurseurs hématopoïétiques cultivés *in vitro* (CFU-E, BFU-E et cellules formant des colonies de granulocyte/macrophage [GM-CFC]) sont riches en cellules c-Kit+. Cette étude a aussi montré deux vagues d'hématopoïèse embryonnaire murine reliées à la dépendance du c-Kit. Ainsi, c-Kit joue un rôle essentiel dans la croissance des précurseurs hématopoïétiques dans le foie foetal après 12.5 jours de gestation. Notons toutefois que les précurseurs du foie et du sac vitellin de l'embryon précoce ne dépendent pas de c-Kit, ni de son ligand, le facteur Steel (Ogawa *et al.*, 1993). En utilisant des oligomères antisense c-Kit *in vitro*, on note une inhibition de la formation des colonies érythroïdes à partir des cellules CD34+ ou des cellules mononucléaires de la moelle osseuse humaine normale. La croissance cellulaire est également inhibée dans des cultures *in vitro* de cellules leucémiques myéloïdes chroniques ou de cellules de patients atteints de polycythémie vraie (Ratajczk *et al.*, 1992). Dans le système lymphopoïétique, les clones Pro-T, Pro-B et pré-B dérivés du thymus ou du foie de l'embryon murin au jour 14 expriment c-Kit. Dans la souris adulte, l'expression de c-Kit est restreinte aux stades très précoces du développement des lymphocytes B et T (les précurseurs multipotentiels, les précurseurs B/myélocytaires, et les précurseurs des lymphocytes pro-T et Pro-B). La plupart des lymphocytes aux stades Pre-T, Pre-B et ceux aux stades plus tardifs n'expriment pas c-Kit (Palacios *et al.*, 1992). Dans les souris transgéniques où l'expression de l'antigène SV40Tag est dirigée spécifiquement dans les épithéliums thymiques, on a détecté l'expression du c-Kit dans la lignée cellulaire dérivée de ces épithéliums. L'expression ectopique de c-Kit coïncide avec un nombre exagéré d'épithéliums immortels et une augmentation de 100 fois du nombre des thymocytes dans le thymus hyperplasique (Moll *et al.*, 1992).

6. Objectif

Le gène SCL est requis pour générer les cellules hématopoïétiques de toutes les lignées (Porcher *et al.*, 1996). Cet effet se réalise probablement par sa capacité à supprimer l'apoptose des cellules souches hématopoïétiques (Leroy-Viard *et al.*, 1995).

Le facteur Steel est aussi capable de supprimer l'apoptose des cellules hématopoïétiques précoces (Li et Johnson., 1994; Abramson *et al.*, 1995). Le patron d'expression du gène SCL dans les cellules hématopoïétiques suit celui de c-Kit, le récepteur du facteur Steel (Brady *et al.*, 1995). L'inhibition fonctionnelle de c-Kit cause aussi une déficience hématopoïétique (Ogawa *et al.*, 1991). Une augmentation de 2 à 4 fois du niveau protéique de SCL est observée dans les précurseurs érythroïdes en maturation sous la stimulation du facteur Steel (Miller *et al.*, 1994).

Toutes ces observations proposent qu'il existe une relation entre le gène SCL et la voie de signalisation du facteur Steel.

Dans notre projet de recherche, nous nous proposons de confirmer le rôle de SCL dans la suppression de l'apoptose des cellules hématopoïétiques précoces déficientes en facteurs de croissance, notamment lorsqu'elles sont déficientes en facteur Steel. Nous voulons également étudier la position de SCL dans la cascade d'événements moléculaires et préciser si SCL agit en amont ou en aval de c-Kit. Pour ce faire, nous utilisons un vecteur d'expression antisense SCL et nous abaissons le niveau de la protéine SCL dans une lignée hématopoïétique bipotentielle, la lignée TF-1.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

Transcription factor SCL is required for c-kit expression and the rescue of hemopoietic cells from apoptosis by Steel factor

G. He^{1,5}, G. Krosi¹, F. Charron^{1,7}, M. Lefrancois^{1,5}, P.H. Roméo⁸, P. Jolicoeur^{1, 4, 5},
I.R. Kirsch⁶, M. Nemer^{1, 2, 3, 5}, T. Hoang*^{1, 2, 3, 5}

from the ¹ Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Ave. W., Montreal (Que.) Canada H2W 1R7; the Departments of ² Pharmacology, ³ Biochemistry, ⁴ Microbiology-Immunology and the ⁵ Program of Molecular Biology, University of Montreal, Montreal (Que.) Canada H3C 3J7; the ⁶ National Cancer Institute, Naval Medical Center, Bethesda, Md, 20892 USA; the ⁷ Department of Medicine, McGill University, Montreal (Que.) Canada H3A 2A7; the ⁸ INSERM U.91, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France.

¹ Equal contribution by the first two authors.

Running title: SCL-dependent cell survival and c-kit expression

This work was supported by grants from the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society and a research traineeship from the Heart and Stroke Foundation of Canada to F.C. M.N. is a Senior Scientist of the Medical Research Council of Canada and T.H. is Senior Scientist from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and a Visiting Scientist of the NCI (USA).

Correspondance to: Trang Hoang, Ph.D., Clinical Research Institute of Montreal, 110 West, Pine Avenue, Montreal H2W 1R7, Canada. Fax: 514-987 5585, EMail: hoangt@ircm.umontreal.ca

ABSTRACT

SCL/Tal1 is a basic helix-loop-helix transcription factor that was first identified at chromosomal breakpoints in T cell leukemias and later found to be essential for blood cell formation *in vivo*. In normal hemopoietic cells which are dependent on specific growth factors for cell survival, SCL expression correlates with that of c-Kit, the receptor for Steel factor (SF) or stem cell factor. In order to address the possibility that SCL may function upstream of c-kit, we sought to modulate endogenous SCL protein levels in the CD34⁺ hemopoietic cell line TF-1, which requires SF, GM-CSF or IL-3 for survival. Ectopic expression of an antisense SCL cDNA in these cells decreased SCL protein levels, impaired SCL DNA binding activity, and prevented the suppression of apoptosis by SF without affecting GM-CSF or IL-3-mediated cell survival. Thus, SCL is required for c-Kit-dependent cell survival while pathways triggered by GM-CSF and IL-3 receptors are SCL-independent. Consistent with the lack of response to SF, the level of c-kit mRNA was drastically reduced in SCL antisense expressing cells whereas that of GATA-1 transcript was unaffected. Both c-kit mRNA and the response to SF were restored by SCL overexpression in the antisense transfectants. Furthermore, sequence analysis of the c-kit promoter revealed the presence of two adjacent E boxes at -300 that fit the core binding motif of tissue specific (myogenic, MyoD) and ubiquitous (E2A, HEB) bHLH heterodimers. We show by gel shift assays that SCL binds a c-kit probe covering these two E boxes. Binding is supershifted with anti-SCL and is specifically displaced by the TAL1 consensus probe in both Jurkat and TF-1 nuclear extracts. Deletion of these two E boxes in the proximal c-kit promoter reduced promoter activity in TF-1 cells but not in antisense SCL expressing cells. Finally, ectopic c-kit expression in antisense SCL transfectants is sufficient to restore cell survival in response to SF. Together, these results indicate that c-kit, a gene which is essential for the survival of primitive cells, is a direct target of the hemopoietic transcription factor SCL.

KEYWORDS

SCL, Tal-1, c-kit, apoptosis, Steel factor, Kit ligand.

INTRODUCTION

SCL, also known as Tal-1, Tcl-5, is associated with 25% of chromosomal rearrangements in childhood T cell acute lymphoid leukemia (2, 4, 5, 7, 12, 18). SCL codes for a hemopoietic-specific transcription factor of the basic helix-loop-helix family, and can enhance or suppress transcription (26). SCL expression is detected in primitive pluripotent hemopoietic precursors (9, 25), in a subset of CD34⁺ cells, in mast cells and megakaryocytes (9, 38) and in maturing erythroid cells (3, 6, 22, 25, 38). Consistent with a role for SCL in establishing the hemopoietic lineage, a targeted disruption of the SCL gene specifically abrogates blood cell formation, resulting in embryonic lethality at day E8.5 (47, 52). Moreover, *scl*^{-/-} embryonic stem cells fail to contribute to hemopoietic stem cells and blood cells in chimeric mice, further suggesting a critical role of SCL for the development of all hemopoietic lineages (44, 49). Together, these results suggest that SCL is required for mesodermal cell commitment into hemopoietic stem cells and/or is essential for the survival of hemopoietic stem cells.

SCL binds DNA only upon interaction with E2A or HEB *in vitro* and *in vivo* (26, 27), and preferentially binds the TAL1 consensus AACAGATGGT defined by *in vitro* binding site selection. SCL represses the E2A-dependent activity directed from the TAL1 consensus in front of the minimal promoter E1BTATA, but relieves the inhibition conferred by Id1 on E2A (26). However, the TAL1 consensus has not been found in any known hemopoietic promoter. SCL also associates with Lmo-2 or RBTN-2, a RING finger protein (56-58) and, in T-ALL, upregulates the expression of a cell surface marker, TALLA-1 (39). It is not clear, however, whether TALLA1 is a direct target of SCL. Thus, despite observations that indicate a crucial role for SCL in normal hemopoiesis and T-cell leukemogenesis, no natural binding site or SCL target gene has been as yet reported.

The survival of hemopoietic cells both in culture and *in vivo* is critically dependent on the presence of hemopoietic growth factors that act to suppress apoptosis (10, 46, 58). The

importance of such growth factors for blood cell development was first revealed by the genetics of hereditary anemias in mice. Perhaps the best studied examples are white spotting (W) and Steel (Sl) mice which are severely anemic due to mutations in the genes encoding the tyrosine kinase receptor c-kit (11) or its ligand Steel factor (SF) (1, 14), respectively. Severe alleles result in lethality in homozygotes (reviewed in references 19, 51), indicating a crucial role for these two genes in hemopoiesis. We, and others, have previously shown that SF suppresses apoptosis in early hemopoietic cells that express the surface antigen CD34 (1, 32, Caceres and Hoang, in preparation), and in the CD34⁺ cell line TF-1 (10). SF has also been shown to synergize with IL-7 in delaying apoptosis in primitive thymocytes (19, 41).

The expression pattern of SCL in primary hemopoietic cells parallels that of c-kit (9), suggesting that SCL functions in concert with c-kit. Furthermore, a two to four fold augmentation of SCL protein was observed in maturing erythroid progenitors stimulated with SF (36). It is not known, however, whether upregulation of SCL is a cause or consequence of either c-Kit activation, cell survival or cell proliferation. Because of the correlation between c-Kit and SCL expression, we directly investigated the relationship of SCL function relative to c-kit through the attenuation of SCL protein levels in TF-1 cells using an antisense SCL expression vector.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, growth factors and antibodies

The TF-1 cell line was a kind gift of Dr T. Kitamura (DNAX, Palo Alto, Ca). The cells were maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco, Long Island, NJ) supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco) and 5 ng/ml human GM-CSF. The cells were passaged every second day at $1,5 \times 10^5$ /mL. Jurkat T cells were also maintained in IMDM

supplemented with FCS (10%) and were passaged three times weekly at concentrations of $1,5 \times 10^5$ /mL.

Purified recombinant human GM-CSF was a generous gift of Dr Steve Clark (Genetics Institute, Cambridge, Ma), recombinant Epo from Dr G. Krystal (Terry Fox laboratories, Vancouver, British Columbia), and purified recombinant SF from Dr K. Langley (Amgen). The monoclonal antibody 2TL136 specific for human SCL was kindly provided by Dr Danièle Mathieu-Mahul (31, 38). The monoclonal antibody ACK2 is specific for murine c-Kit (GIBCO/Gaithersburg, Md). The monoclonal anti-human c-Kit was from Cedarlane (Hornby, Ontario).

Plasmids and transfection

The human SCL cDNA was cloned in the antisense orientation under the control of the metallothionein promoter by digesting the plasmid pMSCL (3) with EcoRI and religation. The EcoRI sites come from the plasmid polylinker.

Stable TF-1 transfectants harbouring the antisense SCL were obtained through Lipofectin-mediated DNA transfer as described previously (3; 25). Cells were cloned immediately after gene transfer by limiting dilution and the selective pressure applied the following day, at a concentration of 1 mg/ml G418 (Gibco). GM-CSF was present throughout the gene transfer procedure. After selection, G418 concentrations were lowered to 400 μ g/ml in order to expand the cells and prepare a large stock of frozen cells immediately after characterization. Each cell line was not kept for more than 2 months in culture.

Retrovirus production and infection

The MSCVpac retroviral vector (24) was used to express the human Bcl-2 cDNA. The 1 Kb EcoRI Bcl-2 cDNA fragment was introduced into the EcoRI site of the MSCVpac vector.

The MSCV/Bcl-2 DNA was transfected on BOSC 23 cells, essentially as described by Pear et al (42) to generate ecotropic infectious retroviruses. Viruses were collected in culture supernatant 48 h after transfection and used to re-infect Am12 packaging fibroblasts to generate amphotropic stocks of the virus (Markovitz, 1988). Clones were selected with puromycin (5 $\mu\text{g/ml}$) and were used for co-culture with TF-1 cells. Murine c-kit cloned in the LXSN retroviral vector was a generous gift of Dr A. Bernstein (Toronto). Amphotropic viruses were produced by transfection into the BING packaging cell line (42). Both the human SCL cDNA and the dominant negative SCL (dnSCL) (3) were cloned in the EcoRI site of the MSCV-neo vector (24). High titer viruses (10^6 pfu/ml) were produced by transient transfection into BOSC23 cells (42).

For retroviral infection, 10^6 exponentially growing cells (TF-1 or A31) were presensitized with polybrene at 2 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h and co-cultured cells with virus-producing clones for another 24 h. Non adherent TF-1 cells were separated from the infected fibroblasts. Cloning was performed as above and puromycin selection was applied at 1 $\mu\text{g/ml}$.

Primary bone marrow cells from adult B6C3F1 mice injected 4 days before with 5 fluorouracil were prestimulated for 48 h with 100 ng/ml murine SF (muSF), 4 ng/mL IL-3, and 10 ng/mL IL-6 in IMDM (Gibco) supplemented with 15% FCS (complete medium) and then infected as described previously (24). Briefly, the cells were cocultured with confluent monolayers of irradiated MSCV-SCL, MSCV-dnSCL, or MSCV-neo retrovirus producing BOSC-23 cells for 48 hours in complete medium with 6 $\mu\text{g/ml}$ polybrene. Following this, the cells were maintained in suspension culture for an additional 24 hours prior to plating in 1 mL of IMDM viscified with 0.8% methylcellulose (Methocel MC, Fluka Chemie AG, Switzerland) and supplemented with 10% FCS, 2.5% bovine serum albumin (Sigma), 1U/mL erythropoietin, 1% WEHI conditioned medium, 50 ng/mL mSF, 230 $\mu\text{g/ml}$ iron saturated transferrin (Sigma), 5×10^{-7}

⁵ M α -monothioglycerol (Sigma), and 0.8 mg/mL G418 (GIBCO). The colonies were scored 12 days later.

Northern blotting

RNA was isolated by homogenisation of cells in the presence of guanidium and acid-phenol extraction as described previously (13, 25). Northern blotting and hybridization were performed as described (25). Probes used were the 1.2Kb HindIII-XbaI human SCL cDNA fragment (nucleotides 109-1293) (3), the 1.4 Kb SalI-XbaI fragment of human GATA-1 cDNA (54), a 1.5 Kb DraI-KpnI human c-kit cDNA fragment from human c-kit-BS plasmid (a generous gift from Dr J. Simms, Immunex, Seattle) and the 1.2 Kb PstI-XbaI fragment of the rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA (43, 55). Blots were exposed to a PhosphorImager screen for quantitation.

Western blotting

Cell lysates were prepared as described previously (31). Protein concentrations were determined with the Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Equal amounts of proteins (20 μ g) were loaded on a 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose using the mini "Transblot" (Bio-Rad) for 1h at 100 V.

Membranes were blocked in 5% non-fat dry milk and 1% bovine serum albumin, incubated with 2TL13G hybridoma tissue culture medium diluted 1:300 for 2.5 h at room temperature, washed, incubated with a goat anti-mouse alkaline phosphatase-linked antibody (Bio-Rad) diluted 1:1000 for 1.5 h and washed extensively. Western-blotting was then developed by incubating membranes in the dark with 10 ml of BCIP (165 μ g/ml) and NBT (330

µg/ml) (GIBCO/BRL) for 2 minutes and the reaction was terminated by several washes with water as described previously (31).

Electrophoretic mobility shift assays

Nuclear extracts were prepared as previously described (53). Protein concentrations were assayed with the Bio-Rad Protein Assay reagent. Binding reactions for electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed as described (31). Briefly, the binding reactions were incubated at room temperature for 15 min in the presence of 0.5 µg of poly(dI-dC) as non-specific competitor DNA in 20 mM HEPES (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 % glycerol, 10 µg of bovine serum albumine (BSA), 100,000 cpm of double-stranded synthetic oligonucleotide and using 25 µg of nuclear extract in a total volume of 10 µl. Fifty-fold molar excess of unlabelled oligonucleotides were used for self competition and added before nuclear extracts. For antibody supershift assays, 200 ng of affinity purified anti-E2A (Santa Cruz Biotechnology), 1 µl of the monoclonal anti-SCL antibody (31), or an unrelated antibody as control was incubated with nuclear extract 1 h prior to addition of the probe. The binding reactions were analysed by electrophoresis on 4 % polyacrylamide gel buffered in 0.25 x TBE, 195 mM glycine (pH 8.5) at 4°C. The sequences of the probes (sense) used are: 5' ACCTGAACAGATGGTCGGCT 3' (Tal-1 consensus, 27), 5' CTAGGGAGCACCTGCCAGGTGGCTGGCCC 3' (murine c-kit probe, Tsujimura et al, 1996) and 5' AGGCAGATGGACG (rat POMC E box also referred to as DE2c, 53).

c-kit promoter constructs, transfection protocols and luciferase assay

The human c-kit promoter was cloned by PCR from genomic DNA to generate a fragment that extends 398 bp upstream of the transcription initiation site to 60 bp down stream. The PCR product was blunt ended, digested with BamHI which cuts at position +43, and

cloned into the SmaI and BglII sites of the promoterless luciferase expression vector pXP2 (kit 398). To generate the kit361 luciferase construct, the PCR product was cut with ApaI, blunt-ended and then digested with BamHI prior to cloning into pXP2 as above. TF-1 and A31 cell lines were transfected by electroporation. Cells were passaged 24 hours before gene transfer at a concentration of 3×10^5 cells/mL. Exponentially growing cells were then concentrated at 2.5×10^7 cells/mL and electroporated at 900 μ F and 350 mV using a Bio-Rad electroporator with 12 μ g of reporter DNA, 2 μ g of RSV-GH used as an internal control for the experiment, with or without different molar ratios of dnSCL expression vectors; the total amount of transfected DNA was then filled to 30 μ g with pGEM4 as a carrier. Cell lysates were prepared 12 hours after transfection, normalised for growth hormone content and assayed for luciferase activity. RSV-luc was used as an external control for all the transfections and pXP2 as a negative control as described previously (16).

Apoptosis assays

Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis was performed as previously described (10). Briefly, equal cell numbers were lysed in Sarkosyl buffer, treated with Proteinase K and RNase A prior to loading on a 1.2% agarose gel (20x20 cm) followed by a 16h electrophoresis at 40 V. Cell viability was independently confirmed through trypan blue exclusion and counting (10, 51), or the double fluorochrome staining assay, as described underneath.

Double fluorochrome staining assay

A stock solution of dye mix containing 100 μ g/ml acridine orange and 100 μ g/ml ethidium bromide was prepared in phosphate buffered saline. Cell were suspended at 5×10^5 to 5×10^6 in IMDM medium. 1 μ l of dye mix was added to 25 μ l of cell suspension and 10 μ l of

the mixture was placed on a microscope slide for examination by fluorescent microscopy (Leica, Germany). Cells with bright green chromatin were considered as viable cells while those with bright orange chromatin or collapsed chromatin were considered as dead cells. A minimum of 200 cells were counted.

Cell cycle analysis

Cells were resuspended at a concentration of $1-2 \times 10^6$ /ml in sample buffer, centrifuged, and resuspended in 100 μ l of propidium iodide (PI) staining solution in Krishnam buffer (0.5 μ g/ μ l PI, 0.02 mg/ml RNase, 0.1% Na citrate adjusted to pH 7.4) for 30 min. at room temperature, prior to flow cytometry analysis on a Coulter XL (Miami, FL) using the System II software for acquisition. The cell cycle analysis was done using Multicycle AV software from Phoenix Flow System, San Diego, Ca, to discriminate the G1/Go, S and G2/M phases. DNA check beads (Coulter) were used for calibration.

RESULTS

Decreased SCL protein levels and SCL DNA binding activity in TF-1 cells expressing an SCL antisense cDNA

In order to address SCL function and to define SCL target genes in primitive hemopoietic cells, we chose to disrupt SCL function in the CD34⁺/c-kit⁺ cell line TF-1. We reasoned that loss of SCL function may be detrimental to the cells and therefore decided to place the antisense SCL under the influence of an inducible element, the mouse metallothionein promoter, shown previously to confer moderate Zn-inducible SCL expression in the sense orientation in both MEL cells (3) and TF-1 cells (25). The selective pressure was applied in the absence of ZnCl₂, in order to minimize transgene expression. Despite this, most of the fifty clones that were screened displayed weak levels of transgene expression, consistent with the reported difficulty in obtaining stable antisense SCL clones in K562 cells (21, 25, Kirsch *et al.*, unpublished). The two highest expressors A30 and A31 were selected for further analysis. Western blotting (Figure 1) indicated that there was a two fold decrease in SCL protein levels in both A30 and A31 cells as compared to parental TF-1 cells, or to control cells harboring the vector alone (TF-1pac and G10) (data shown for A31, TF-1 and TF-1pac in Figure 1: compare lanes 2, 5 and 7, respectively), whereas TF-1 and A31 transfectants expressing a sense SCL construct displayed a two-three fold increase in SCL protein, relatively to parental TF-1 cells (Figure 1, lanes 8 and 9). Western blotting also revealed the presence of a faster migrating SCL protein, which corresponds to the shorter form reported earlier (31). In contrast to the differing levels of SCL between TF-1 and the antisense or sense subclones, the levels of the eukaryotic translation initiation factor eIF-4E were not significantly different (Figure 1, lower panel). Finally, in clone A31, mRNA levels for two other transcription factors, GATA-1,

an erythroid transcription factor and Lyl-1, a bHLH gene also involved in chromosomal translocation in T-ALL, were not affected (data not shown).

In order to determine whether the changes in SCL protein expression also affected SCL DNA binding, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed using the TAL1 probe (27) (Figure 2A). Clones were either left untreated or cultured with $ZnCl_2$ for 24h. TF-1 nuclear extracts produced three specific complexes, as shown by self competition (Figure 2A, left panel). These complexes were also found using nuclear extracts from Jurkat cells (Figure 2A, right panel). In contrast, a probe with divergent sequences (mDE2C) did not compete for binding (Figure 2A, right hand panel) indicating that these complexes were specific. The identity of each complex was verified by antibody supershifting. Preincubation of Jurkat extracts with an anti-E2A antibody supershifted the most slowly migrating complex (Figure 2A, right panel). The same results were obtained with TF-1 cells (data not shown). The results therefore indicate that this slowly migrating complex contains SCL/E2A heterodimers as previously described (31). This specific complex was absent in HL-60 cells which are also devoid of detectable SCL (as shown in Figure 1) whereas the two higher mobility complexes were present in HL-60 nuclear extracts and possibly represent DNA binding by E12/E47. In the antisense expressing clone A31, the SCL containing complex decreased significantly following zinc treatment (Figure 2A, left panel). Rescue with wild type SCL recapitulated binding to the TAL1 probe, which, in clone A31-S9 was even stronger than that observed in parental TF-1 cells (Figure 2A). These results correlate precisely with protein levels as determined by Western blotting, and indicate that SCL DNA binding activity is markedly decreased in the antisense A31 clone, and significantly increased in A31-S9, relative to parental cells.

Disrupted SCL function specifically prevents SF-mediated cell survival but not the suppression of apoptosis by GM-CSF or IL-3

We have previously shown that SF efficiently suppresses apoptosis in TF-1 cultures. We therefore compared the suppression of apoptosis by SF in several SCL-antisense clones exhibiting moderate (A30, A31) to low (A8, A36) decreases in SCL protein levels, to that of parental TF-1 cells, and a control clone harboring the expression vector alone (G13). Apoptotic death was revealed by the presence of a DNA ladder following agarose gel electrophoresis (Figure 3). In the absence of growth factor, there was an intense DNA ladder, suggesting that the cells underwent apoptosis. At a concentration of 100 pM of SF, chosen to be near maximal suppression of apoptosis, parental TF-1 cells and the control G13 line behaved similarly, with no detectable DNA degradation. Under identical conditions, apoptosis was evident in three of four antisense clones, A30, A31 and, to a lesser extent, A8.

Cell viability was therefore quantitated using the double fluorochrome staining technique (Figure 4). Full dose-response curves for SF and GM-CSF were performed in the two antisense clones A30 and A31, as well as in control cells. Data are shown for growth factor concentrations that provide 80% survival in TF-1 cells (Figure 4). As observed with agarose electrophoresis, TF-1 and G-13 lines remained viable with SF while A30 and A31 underwent apoptosis (Figure 4). Even at saturating concentrations of SF (4 nM), cell viability did not exceed 45% in A31, as compared to 95%-100% in control cell lines (data not shown). In contrast, cell survival was unaffected in GM-CSF or IL-3 stimulated cultures (Figure 4). Similarly, cell cycling and proliferation, as assessed by FACS analysis and viable cell count (Table 1), revealed no significant differences between antisense clones and their controls in GM-CSF stimulated cultures. Consistent with these observations, the output in cell numbers in the presence of GM-CSF was not affected by antisense SCL. In contrast, cell counts were significantly lower in response to SF, due to apoptotic death in antisense clones. Together,

these data indicate that SCL is specifically required for the suppression of apoptosis by SF, but not for the attenuation of apoptosis by GM-CSF and IL-3.

SCL protein levels specifies c-kit expression.

Because of the drastic decrease in the response of A31 cells to SF, we first sought to determine whether c-kit expression was affected. Parental TF-1 cells or TF-1 cells harbouring the vector alone exhibited comparable levels of c-kit mRNA. In contrast, c-kit expression was significantly lower in A31 (Figure 5A). Decreased c-kit mRNA in clone A31 was directly correlated with decreased surface protein levels as quantitated by flow cytometry analysis of A31 and TF-1 cells using a monoclonal antibody to human c-kit (Figure 5B). To exclude the possibility that the site(s) of integration in these antisense clones affected c-kit expression, we attempted to rescue c-kit expression by wild type SCL through retroviral mediated gene transfer (MSCV, 24). To this end, we chose to use puromycin resistance as a second selective marker since A31 cells were already transduced with the neomycin resistance gene. Expression of the puromycin resistance gene (pac) alone did not affect c-kit expression in TF-1 cells nor in A31 cells (Figure 5A). In contrast, elevating SCL expression (as shown in Figures 1 and 2) restored c-kit expression in clone A31 and further increased c-kit mRNA levels in parental TF-1 cells (Figure 5A). These results indicate that the targeted attenuation of SCL protein levels and DNA binding activity in A31 lead directly to decreased c-kit expression.

SCL binds to two tandem E boxes in the c-kit promoter

Sequence analysis of the c-kit promoter revealed two adjacent E boxes at -374 and -380 that are conserved between human and mouse (Tsujiura et al, 1996), and fit the core binding motif of MyoD/E2A. These E boxes form a perfect palindromic sequence on opposite strands (Table 2). In order to directly address the possibility that these E boxes are SCL binding sites, we derived a probe for electrophoretic mobility shift assays (Figure 2B). Several complexes were formed using nuclear extracts from TF-1 cells, four of which were specifically

displaced by self competition but not by the mDE2C probe at a 50 fold molar excess. As with the TAL1 consensus probe, the most slowly migrating complex was supershifted with anti-SCL in both TF-1 and Jurkat cells (Figure 2B, left and middle panels), indicating that it contains SCL protein. The identity of the SCL-containing bands were further confirmed through cross competition with the TAL1 probe, but not a divergent probe mDE2C, in both Jurkat and TF-1 cells (Figure 2 B, left and middle panels). Conversely, the c-kit probe efficiently competed for SCL/E2A binding to the TAL-1 consensus probe in both Jurkat and TF-1 nuclear extracts (Figure 2A, right panel). The specificity of binding to the c-kit probe was further confirmed through the inability of a mutant probe to displace SCL/E2A binding (Figure 2B, right panel). SCL/E2A binding to the c-kit probe is, however, of lower apparent affinity than that observed with the TAL1 consensus which was derived by CASTING (27) (Compare Figure 2A and B). However, these sequences were also selected *in vitro*, albeit at a much lower frequency than the TAL1 element (less than 5%; 27), consistent with our observation of lower affinity binding. The contribution of each E box was further tested by mutating each box separately or together. Data shown in Figure 2B (right hand panel) indicate that each E box individually competed for SCL binding to the wild type probe, although not as efficiently as the self competition, whereas a double mutant was unable to displace SCL binding to the wild type probe. The results therefore indicate that SCL-containing complexes directly bind to each of these two adjacent E box elements, a finding consistent with their palindromic nature.

We next addressed the possibility that these E boxes contribute to the SCL-dependent promoter activity of the c-kit gene in TF-1 cells (Figure 5C). The proximal c-kit promoter (kit399) was sufficient to confer moderate expression of the luciferase reporter gene in TF-1 cells. When normalized to RSV basal promoter activity, luciferase activity driven by kit399 in A31 cells was half of that observed in TF-1 cells, consistent with lower levels of c-kit mRNA and protein in A31 cells. In TF-1 cells, co-transfection of the dominant negative SCL (dnSCL) with

kit399 resulted in a 40% reduction in luciferase activity, further indicating that the proximal promoter contains SCL-responsive elements. Similarly, deletion of the two E boxes in kit361 reduced luciferase activity to levels comparable to that evoked by wild type kit399 following co-expression of dnSCL. Hence, this 40-50% contribution of the tandem E boxes to c-kit promoter activity in TF-1 appears to be SCL-dependent. This observed level is consistent with the 2 fold decrease in c-kit mRNA and c-Kit protein induced by expression of the antisense SCL in clone A31, as determined by Northern blotting and FACS analysis (Figure 5A and B), respectively. Finally, in clone A31 in which SCL function is disrupted, luciferase activity between kit399 and kit361 did not reach significant difference. These preliminary results suggest that SCL positively regulates c-kit transcription through direct binding to two adjacent E boxes in the c-kit promoter.

Cell survival in response to SF is rescued by ectopic SCL or ectopic c-kit expression

A31 clones, in which c-kit expression was restored, were further tested for their survival in response to SF. The DNA laddering assay shown in Figure 3B indicates that ectopic SCL expression in clone A31 was sufficient to restore c-kit expression and their survival response to SF. We therefore addressed the possibility whether c-kit expression by itself was sufficient to restore cell viability. Murine c-kit was delivered to A31 cells through retroviral-mediated gene transfer, using the LXSJ retroviral vector. Despite a high homology between murine and human c-kit, ligand binding is species specific such that cells expressing human c-Kit require 5-8 fold higher concentrations of murine SF. Following a 2 day selection in mSF, c-kit infected A31 and TF-1 cells (A31-kit and TF-1-kit, respectively) were expanded with huGM-CSF. Flow cytometry analysis indicated that more than 75% of TF-1kit or A31kit clones express murine Kit (Figure 6B). In GM-CSF-containing cultures, all clones behaved similarly (data not shown) as described in Figure 4. As expected, TF-1-kit responded better than parental TF-1 to murine SF (Figure 6A). At all concentrations of murine SF tested, the response of A31-kit to muSF was similar to that of TF-1 kit, indicating that c-kit overexpression was sufficient to overcome the

effect of reduced SCL expression. Thus, our results suggest that the major survival function of SCL in TF-1 cells is mediated through c-kit expression.

Consequences of decreased SCL levels in primary hemopoietic cells

Previous results indicate that SF synergizes with IL-3 and Epo to support the clonal growth of multipotent progenitors. Since pluripotential progenitors express high levels of SCL (9), we addressed the possibility that SCL may also be required for their response to SF. To this end, we infected murine bone marrow with a retrovirus harbouring either dominant negative or wild type SCL sequences. Cells were then plated in selective medium in the presence of an optimal combination of SF, IL-3 and Epo. After 12 days, multipotent colonies were individually picked and their cellularity determined by viable cell counting (Figure 7). Ectopic expression of dnSCL caused a 3 fold decrease in colony size as compared to cells expressing either the vector alone (MSCV) or SCL in the sense orientation. These results indicate that further elevating SCL levels in CFU-GEMM did not affect their response to growth factors, whereas disruption of SCL function significantly decreased colony size which, in light of our observations with TF-1 cultures, may be due to an inability to respond to the survival effect of SF.

DISCUSSION

Role of SCL as a survival gene: upregulation of c-kit expression

The lack of yolk sack hemopoiesis and the early embryonic lethality of *scl*^{-/-} embryos (47, 52), as well as the failure of *scl*^{-/-} embryonic stem cells to contribute to the generation of hemopoietic cells *in vivo*, provide unequivocal evidence for an essential role for SCL in the development of the hemopoietic lineage *in vivo*. These findings, nonetheless, need to be complemented by *in vitro* culture assays that permit a direct investigation on the mechanism and pathways that involve SCL both at the cellular and molecular levels. It was previously

shown that loss of SCL function is associated with premature apoptosis upon nutrient deprivation in the lymphoid cell line Jurkat (31) and decreased colony formation in the erythroid cell line K562 (21), suggesting a role for SCL mediating in cell survival. SCL target genes however, remained unknown. We reasoned that SCL function is likely to be determined by the nature of its binding partners, which are as yet to be defined in CD34⁺ cells. We therefore chose to investigate this through the disruption of endogenous SCL function in a CD34⁺ hemopoietic cell line. These cells most likely express appropriate SCL binding partners and have retained several properties of primary hemopoietic cells, including their potential for differentiation into at least two lineages, the macrophage and the erythroid pathways (25, 29), and their requirement in hemopoietic growth factors for cell survival (10, 46, 50). Our approach to define SCL function and SCL target(s) was to disrupt SCL in TF-1 cells and to screen stable transfectants with a functional assay, cell survival in response to different growth factors. This has allowed us to define the role of SCL at the cellular level and to identify c-kit as a molecular target for SCL. Finally, we have identified the first natural binding site for SCL. These sequences will now permit identification of SCL binding partners in a biologically relevant context, in regulating expression of c-kit, a gene which is essential for the survival of primitive hemopoietic cells.

SCL is normally found in association with Rbtl-2/Lmo2 (40; 58) and, in leukemic cells, in association with E2A (27). It is therefore likely that SCL forms part of larger transcription complexes and, through its association with Lmo2, may serve to recruit additional transcription factors such as GATA-1 in erythroid cells (58) and GATA-3 in T-ALL (39). Under these conditions, a 2 to 3 fold disruption in SCL levels may be amplified through direct protein-protein interactions and have profound effects on basic cellular processes such as cell survival. Interestingly, SCL function is required both at an early stage in hemopoietic cell development (44, 47), and at a much later stage in erythroid maturation (3) in response to erythropoietin (15,

25, 45). These observations suggest that SCL fulfills different functions through diverse and varied partners. Thus, the nature of the proteins that are recruited into SCL-containing complexes, as well as the target genes that are dependent on these factors, depends on the stage of cell differentiation.

Implication for leukemogenesis

Although SCL transcription is frequently activated as a consequence of chromosomal aberrations in T-ALL, elevating SCL expression in thymocytes is not sufficient to cause tumors in transgenic mice (48). Directing SCL expression in the thymus can nonetheless shorten the time of appearance of T cell tumors in RBTN-2 (30) or casein kinase II transgenic mice (28). While these observations suggest a role for SCL in leukemogenesis, its target genes remain unknown.

The cells that repopulate the thymus are CD34⁺ and c-Kit⁺ (Figure 8). At an early stage in thymocyte development, prior to expression of the CD4/CD8 lineage markers and of the CD3/T cell receptor complex, ex vivo explanted CD25⁺ proT cells have been shown to survive and proliferate in response to IL-7 and SF (20). Interestingly, SF is expressed by foetal thymic stromal cells and epithelial cells (37, 41, 60). More direct evidence indicating the importance of SF/c-Kit in thymocyte development comes from the demonstration that T cell differentiation in thymic lobe reconstitution with foetal liver precursors is inhibited by anti-Kit (60). In parallel, the presence of SCL mRNA in a subset of thymocytes (38) and the absolute requirement in SCL for the generation of T cells *in vivo* (44, 49) are indicative of the importance of SCL for thymocyte development. Our observations suggest that SCL may also specify c-Kit expression early in thymocyte development to sustain cell survival in response to SF. Consistent with this, elevating SCL levels in thymocytes in double CD2-SCL and CD2-Lmo2 transgenics results in a twofold expansion of the double negative CD4⁻/CD8⁻ thymocyte population relative to CD2-

Lmo2 transgenics (30) which, in light of our results, may be due to an increase in c-Kit⁺ subpopulations. Conversely, in transgenic mice in which expression of the SV40 large T antigen was specifically found in the thymic epithelium, there was increased SF expression by thymic stromal cells and a concomittent 100 fold increase in thymocytes (37). These observations suggest that increased c-Kit stimulation in thymocytes results in thymic hyperplasia, a pre-neoplastic condition. We propose that constitutive SCL expression in the T cell lineage caused by chromosomal rearrangements results in constitutive c-kit expression in primitive thymocytes and prolongs their survival, which may represent an initiating event in T cell ALL (Figure 8). Secondary events are likely involved in the full development of T cell leukemia (17, 48) mechanism commonly observed in tumor biology (8).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Alan Bernstein (Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Ontario) for critical reading of the manuscript, André Haman for help with Northern blotting and Magali Domin for expert secretarial assistance.

REFERENCES

1. Abrahamson, J.L., Lee, J.M., and Bernstein, A. (1995). Regulation of p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest by Steel factor. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6953-6960.
2. Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Ginsberg, A.M., Cossman, J., Bertness, V.L., and Kirsch, I.R. (1990). Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* 250, 1426-1429.
3. Aplan, P.D., Nakahara, K., Orkin, S.H., and Kirsch, I.R. (1992a). The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* 11, 4073-4081.
4. Aplan, P.D., Raimondi, S.C., and Kirsch, I.R. (1992b). Disruption of the SCL gene by a t(1;3) translocation in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* 176, 1303-1310.
5. Begley, C.G., Aplan, P.D., Davey, M.P., Nakahara, K., Tchorz, K., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Haynes, B.F., Cohen, D.I., Waldmann, T.A., et al (1989a). Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2031-2035.
6. Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A., and Kirsch, I.R. (1989b). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10128-10132.
7. Bernard, O., Guglielmi, P., Jonveaux, P., Cherif, D., Gisselbrecht, S., Mauchauffe, M., Berger, R., Larsen, C.J., and Mathieu-Mahul, D. (1990). Two distinct mechanisms for the SCL gene activation in the t(1; 14) translocation of T-cell leukemias. *Genes Chromosom. Cancer* 1, 194-208.
8. Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. [Review]. *Cell* 64, 235-248.

9. Brady, G., Billia, F., Knox, J., Hoang, T., Kirsch, I.R., Voura, E.B., Hawley, R.G., Cumming, R., Buchwald, M., Siminovitch, K., et al (1995). Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr. Biol.* 5, 909-922.
10. Cácerés-Cortes, J., Rajotte, D., Dumouchel, J., Haddad, P., and Hoang, T. (1994). Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 269, 12084-12091.
11. Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* 335, 87-89.
12. Chen, Q., Cheng, J.T., Tasi, L.H., Schneider, N., Buchanan, G., Carroll, A., Crist, W., Ozanne, B., Siciliano, M.J., and Baer, R. (1990). The *tal* gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *EMBO J.* 9, 415-424.
13. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
14. Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Cho, B.C., Donovan, P.J., Jenkins, N.A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S.D., and Williams, D.E. (1990). Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 63, 175-183.
15. Cross, M.A., Heyworth, C.M., Murrell, A.M., Bockamp, E.O., Dexter, T.M., and Green, A.R. (1994) Expression of lineage specific restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene* 9, 3013-3016.
16. Durocher, D. and Nemer, M. (1996). *Mol Cell Biol* 16: 4648

17. Elwood, N.J. and Begley, C.G. (1995). Reconstitution of mice with bone marrow cells expressing the SCL gene is insufficient to cause leukemia. *Cell Growth Differ* 6, 19-25.
18. Finger, L.R., Kagan, J., Christopher, G., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1989). Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5039-5043.
19. Fleischman, R.A. (1993). From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. [Review]. *Trends in Genetics* 9, 285-290.
20. Godfrey, D.I., Zlotnik, A., and Suda, T. (1992). Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol* 149, 2281-2285.
21. Green, A.R., DeLuca, E., and Begley, C.G. (1991a). Antisense SCL suppresses self-renewal and enhances spontaneous erythroid differentiation of the human leukaemic cell line K562. *EMBO J* 10, 4153-4158.
22. Green, A.R., Salvaris, E., and Begley, C.G. (1991b). Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* 6, 475-479.
23. Green, A.R., Lints, T., Visvader, J., Harvey, R., and Begley, C.G. (1992). SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain [published erratum appears in *Oncogene* 1992 Jul;7(7):1459]. *Oncogene* 7, 653-660.
24. Hawley, R.G., Fong, A.Z.C., Lu, M., and Hawley, T.S. (1994). The Hox-11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. *Oncogene*. 9, 1-12.
25. Hoang, T., Paradis, E., Brady, G., Billia, F., Nakahara, K., Iscove, N.N., and Kirsch, I.R. (1996). Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 87, 102-111.
26. Hsu, H.L., Wadman, I., Tsan, J.T., and Baer, R. (1994a). Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5947-5951.

27. Hsu, H.L., Huang, L., Tsan, J.T., Funk, W., Wright, W.E., Hu, J.S., Kingston, R.E., Baer, R. (1994b). Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1256-1265.
28. Kelliher, M.A., Seldin, D.C., and Leder, P. (1996). Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase II α . *EMBO J.* 15, 5160-5166.
29. Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140, 323-334.
30. Larson, R.C., Lavenir, I., Larson, T.A., Baer, R., Warren, A.J., Wadman, I., Nottage, K., and Rabbitts, T.H. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* 15, 1021-1027.
31. Leroy-Viard, K., Vinit, M.A., Lecointe, N., Jouault, H., Hibner, U., Romeo, P.H., and Mathieu-Mahul, D. (1995). Loss of TAL-1 protein activity induces premature apoptosis of Jurkat leukemic T cells upon medium depletion. *EMBO J* 14, 2341-2349.
32. Li, C.L., and Johnson, G.R. (1994). Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* 84, 408-414.
33. Mahajan, M.A., Park, S.T., and Sun, X.-H. (1996). Association of a novel GTP binding protein, DRG, with TAL oncogenic proteins. *Oncogene* 12, 2343-2350.
34. Markowitz, D., Goff, S., Bank, A. (1988). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167, 400-406.
35. Matzinger, P. (1991). The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* 145, 185-192.
36. Miller, B.A., Floros, J., Cheung, J.Y., Wojchowski, D.M., Bell, L., Begley, C.G., Elwood, N.J., Kreider, J., and Christian, C. (1994). Steel factor affects SCL expression during normal erythroid differentiation. *Blood* 84, 2971-2976.

37. Moll, J., Eibel, H., Schmid, P., Sansig, G., Botteri, F., Palacios, R., and Van der Putten, H. (1992). Thymic hyperplasia in transgenic mice caused by immortal epithelial cells expressing c-kit ligand. *Eur J Immunol* 22, 1587-1594.
38. Mouthon, M.A., Bernard, O., Mitjavila, M.T., Romeo, P.H., Vainchenker, W., and Mathieu-Mahul, D. (1993). Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81, 647-655.
39. Ono, Y., Fukuhara, N., and Yoshie, O. (1997) Transcriptional activity of Tal1 in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) requires RBTN1 or -2 and induces TALLA1, a highly specific tumor marker of T-ALL. *J Biol Chem* 272, 4576-4581.
40. Osada, H., Grutz, G., Axelson, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1995). Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9585-9589.
41. Palacios, R. and Nishikawa, S. (1992). Developmentally regulated cell surface expression and function of c-kit receptor during lymphocyte ontogeny in the embryo and adult mice. *Development* 115, 1133-1147.
42. Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1990). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8392-8396.
43. Picchazyk, M., Blanchard, J.M., Marty, L., Dani, Ch., Panabieres, F., El Sabouty, S., Fort, Ph., Jeanteur, P. (1984) Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res.* 12, 6951-6963.
44. Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., Orkin, S.H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.
45. Prasad, K.S., Jordan, J.E., Koury, M.J., Bondurant, M.C., and Brandt, S.J. (1995). Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J Biol Chem* 270, 11603-11611.

46. Rajotte, D., Haddad, P., Haman, A., Cragoe, E.J., Jr., and Hoang, T. (1992). Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J Biol Chem* 267, 9980-9987.
47. Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R.P., Metcalf, D., Begley, C.G. (1995a). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the SCL gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 7075-7079.
48. Robb, L., Rasko, J.E., Bath, M.L., Strasser, A., and Begley, C.G. (1995b). SCL, a gene frequently activated in human T cell leukaemia, does not induce lymphomas in transgenic mice. *Oncogene* 10, 205-209.
49. Robb, L., Elwood, N.J., Elefanty, A.G., Kontgen, F., Li, R.L., Barnett, L.D., and Begley, C.G. (1996). The SCL gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 15, 4123-4129.
50. Rodriguez, C., Lacasse, C., and Hoang, T. (1996). Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in CD34 positive bone marrow cells through activation of the type I IL-1 receptor. *J Cell Physiol* 166, 387-396.
51. Russel, E. (1979). Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv. Gen.* 20, 357-459.
52. Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.
53. Therrien M, M., Drouin, J. (1993). Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2342-2346.
54. Tsai, S.F., Martin, D.I., Zon, L.I., D'Andrea, A.D., Wong, G.G., and Orkin, S.H. (1989). Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339, 446-451.
55. Tso, J.Y., Sun, X.H., Kao, T.H., Reece, K.S., and Wu, R. (1985). Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs:

- genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 2485-2502.
56. Valge-Archer, V.E., Osada, H., Warren, A.J., Forster, A., Li, J., Baer, R., and Rabbitts, T.H. (1994). The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8617-8621.
 57. Wadman, I., Li, J., Bash, R.O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T.H., Baer, R. (1994). Specific *in vivo* association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J.* 13, 4831-4839.
 58. Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J., and Rabbitts, T.H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein *rbtn2* is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.
 59. Williams, G.T., Smith, C.A., Spooncer, E., Dexter, T.M., and Taylor, D.R. (1990). Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343, 76-79.
 60. Wolf, S.S. and Cohen, A. (1992). Expression of cytokines and their receptors by human thymocytes and thymic stromal cells. *Immunology* 77, 362-368.
 61. Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.Y., Birkett, N.C., Okino, K.H., Murdock, D.C., and et al (1990). Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63, 213-224.

Table 1

Cell proliferation in response to GM-CSF or SF

clone	Cell concentration on day 2 ($\times 10^6$ /ml)		% cells in S/G2/M
	GM-CSF	SF	GM-CSF
TF-1	0.905	1.035	59.7
G13	0.975	1.305	-
A30	1.075	0.85	62.7
A31	0.835	0.44	62.2
TF-1/Scl	-	-	70.0

Cells were seeded at a concentration of 1.5×10^5 /ml, maintained with GM-CSF (200pM) or seeded at a concentration of 3×10^5 /ml and maintained with SF (200pM) in the presence of $ZnCl_2$. Cells were stained with propidium iodide for cell cycle analysis by flow cytometry after 24 h or counted by trypan blue exclusion after 48 h.

Table 2

Probes used in gel shift assays

Probes	Sequences
TAL consensus	ACCTGAA CAGATG GTCGGCT
c-kit	CTAGGGAG CACCTG C CAGGTG GCTGGCCC
mutant E1	CTAGGGAG ^{xx} ACCCTG C CAGGTG GCTGGCCC
mutant E2	CTAGGGAG CACCTG C ^{xx} CAGGGT GCTGGCCC
mutant E1/2	CTAGGGAG ^{xx} ACCCTG C ^{xx} CAGGGT GCTGGCCC
mDE2C	GATCAAGGAAGG CAGAAC GACGCACACAGG

The wild type c-kit probe contains two everted E boxes. All probes are as described in Materials and Methods.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Decreased SCL protein in TF-1 cells expressing antisense SCL

Cells were maintained in GM-CSF containing medium. Western blot analysis was performed using 30 μ g of whole cell lysate from exponentially growing cells, with the monoclonal anti-human SCL (Upper panel) or a monoclonal anti-eIF4E (Lower panel). The intensities of the bands were quantified by scanning densitometry (not shown). Similar results were observed in cells maintained in the presence of SF. HL-60: promyelocytic leukemic cells; A31: TF-1 expressing an antisense SCL, driven by the metallothionein promoter, induced with 0.1 mM $ZnCl_2$ for 24 h (lane 2); A31-bcl2: A31 cells expressing human bcl-2 (lane 3); A31-pac: A31 expressing the puromycin resistance gene (lane 4); TF-1: parental TF-1 cells (lane 5); TF-1-bcl2: TF-1 cells expressing the human bcl-2 gene (lane 6); TF-1-pac: control TF-1 cells expressing the puromycin resistance gene (lane 7); TF-1/S5: TF-1 infected with MSCV-SCL, clone 5 (lane 8); A31/S9: A31 infected with MSCV-SCL, clone 9.

Figure 2. Decreased SCL DNA binding activity in TF-1 cells expressing antisense SCL: rescue by ectopic SCL expression

TF-1 cells and the different transfectants were maintained in GM-CSF containing medium. Exponentially growing cells were treated with $ZnCl_2$ for 24 h prior to nuclear extraction. A double stranded ^{32}P -labelled Tal-1 consensus probe (Panel A) or c-kit probe (Panel B) was incubated with 25 μ g nuclear extracts from TF-1, A31, A31-S9, Jurkat and HL-60 as described in Materials and Methods. Unlabelled double stranded oligonucleotide probes used as competitors were added at 50 fold molar excess. SCL containing complexes (arrows) formed on both the TAL1 consensus probe and the c-kit probe were supershifted by the monoclonal antibody anti-TAL1 and were displaced by a 50 fold molar excess of self and of the

c-kit probe (Panel A) or TAL1 probe (Panel B), respectively, but not by a control probe with divergent sequences (mDE2C). Mutant c-kit probes in which either one (E1, E2) or both E boxes (E1/2) were mutated were also added at a 50 fold molar excess. The single mutants were almost as efficient as the self competitor, whereas the double mutant does not compete for SCL binding to the wild type c-kit probe.

Figure 3. SF suppresses apoptosis in TF-1 cells but not in A31 expressing an antisense SCL: rescue of A31 by wild type SCL.

TF-1 cells were deprived of growth factor for 48 h (lane 1), or stimulated with 100 pM of SF (lane 2). Control cells harboring the vector alone (G13) and antisense SCL transfectants (A30, A31, A8, A36) were exposed to SF (100 pM) under the same conditions as TF-1 cells. Note the absence of the DNA ladder in parental TF-1 or control G13 cells exposed to SF, and the presence of apoptotic DNA in antisense clones A30 and A31 (Panel A). DNA integrity in response to 100 pM of SF was restored in A31 subclones through ectopic expression of bcl-2 or wild type SCL (Panel B). Data shown are representative of three independent experiments.

Figure 4. Comparison of the cytokine response profiles of antisense expressing cells and controls

Cells (3×10^5 /ml) were maintained with SF, GM-CSF or IL-3 for 2 days in the presence of 0.1 mM $ZnCl_2$. Cell viability was determined by staining with propidium iodide and acridine orange. Full dose-response curves were performed for SF and GM-CSF, although a single suboptimal concentration is shown that provides 60-80% viability. At optimal concentrations of growth factors, cell viability was higher than 83 % in A31 stimulated with GM-CSF or IL-3. In contrast, in the presence of SF, cell viability did not exceed 45% even at 4 nM (not shown).

experiments. Both A30 and A31 displayed impaired viability in response to SF but not to GM-CSF or IL-3.

Figure 5. Reduced c-kit expression in cells expressing an antisense SCL; rescue with wild type SCL

Cells were maintained in culture with 200 pM GM-CSF in the presence of $ZnCl_2$ for 24h. RNA extraction and Northern blotting were performed as described in Materials and Methods. The blots were sequentially hybridized with full length cDNA for human c-kit, GATA-1, Lyf-1 (not shown) and GAPDH. The blots were exposed for 24 h to a PhosphorImager screen (Panel A). Indirect immunofluorescence detection of c-Kit by flow cytometry with the monoclonal antibody against human c-Kit also indicates decreased surface expression of human c-Kit in A31 as compared to parental TF-1 cells (Panel B). Cells labelled with the second antibody alone (goat anti-mouse FITC) served as controls, which were similar for A31 and TF-1 (data shown for TF-1). The two c-kit promoter constructs driving the luciferase reporter gene are delivered into exponentially growing TF-1 cells or A31 cells by electroporation, as described in Materials and Methods. Data shown are normalized to that of RSV-GH, co-transfected as an internal control, and expressed as percent of RSV-luciferase, used as an external standard. Data are the mean of two experiments that were performed in duplicates (Panel C).

Figure 6. Survival response to SF rescued by ectopic murine c-kit expression in SCL antisense transfectants

TF-1 cells and the antisense SCL expressing cells A31 were infected with MSCV harboring the murine c-kit gene, or with the pac resistance gene (control) as described in Materials and Methods. For apoptosis assay, cells were maintained with the indicated concentrations of murine SF for 2 days. Viable cells were determined by trypan blue exclusion. The half efficient concentration of muSF for the different clones were: TF-1, 17.8 ± 2.1 ; TF-

1kit, 3.5 ± 0.5 ; *A31-kit*, 4.3 ± 0.6 (Panel A). A31-Kit and TF-1Kit were labelled with ACK2, a monoclonal antibody specific for murine Kit, and a goat anti rat Ig coupled to FITC. Cells labelled with the second antibody alone served as negative controls (Panel B).

Figure 7. Decreased clonal growth of multipotent progenitors following ectopic expression of a dominant negative SCL

Individual colonies arising from multipotent progenitors were aspirated from methylcellulose cultures 12 days after plating and resuspended in 150 μ L PBS/FCS. The number of cells per colony was determined by counting. Each symbol represents cell count from a single colony and the horizontal lines, the group median which were: 9.75 ± 8.3 (SCL), 3.15 ± 1.7 (dnSCL), and 9.35 ± 5.8 (MSCV). The difference between dnSCL and MSCV is statistically significant ($p < 0.01$; two tailed t-test).

Figure 8. Role of SCL in cell survival and cell differentiation: implication for leukemogenesis

In normal cell differentiation, SCL functions upstream of c-Kit to specify cell survival in response to SF. Chromosome translocations or internal deletions of chromosome 1 result in the constitutive expression of c-Kit in primitive thymocytes and increased survival, which is a first step in leukemogenesis.

DN: double negative CD4⁻/CD8⁻ thymocytes. DP: double positive CD4⁺/CD8⁺ thymocytes.

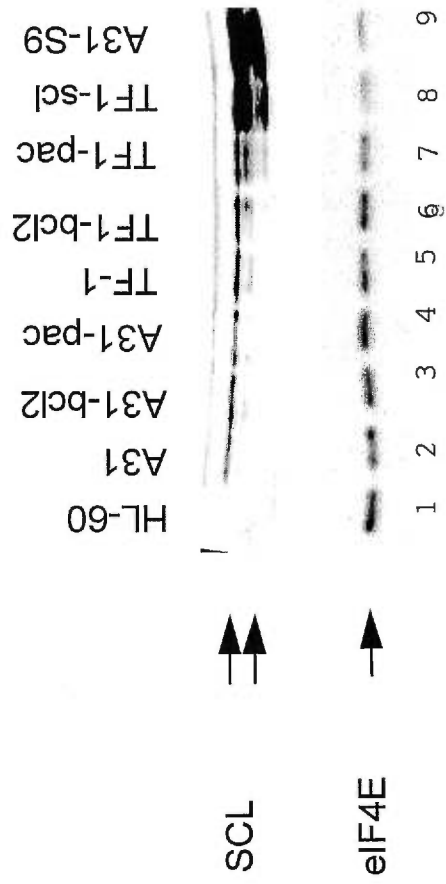


Figure 1

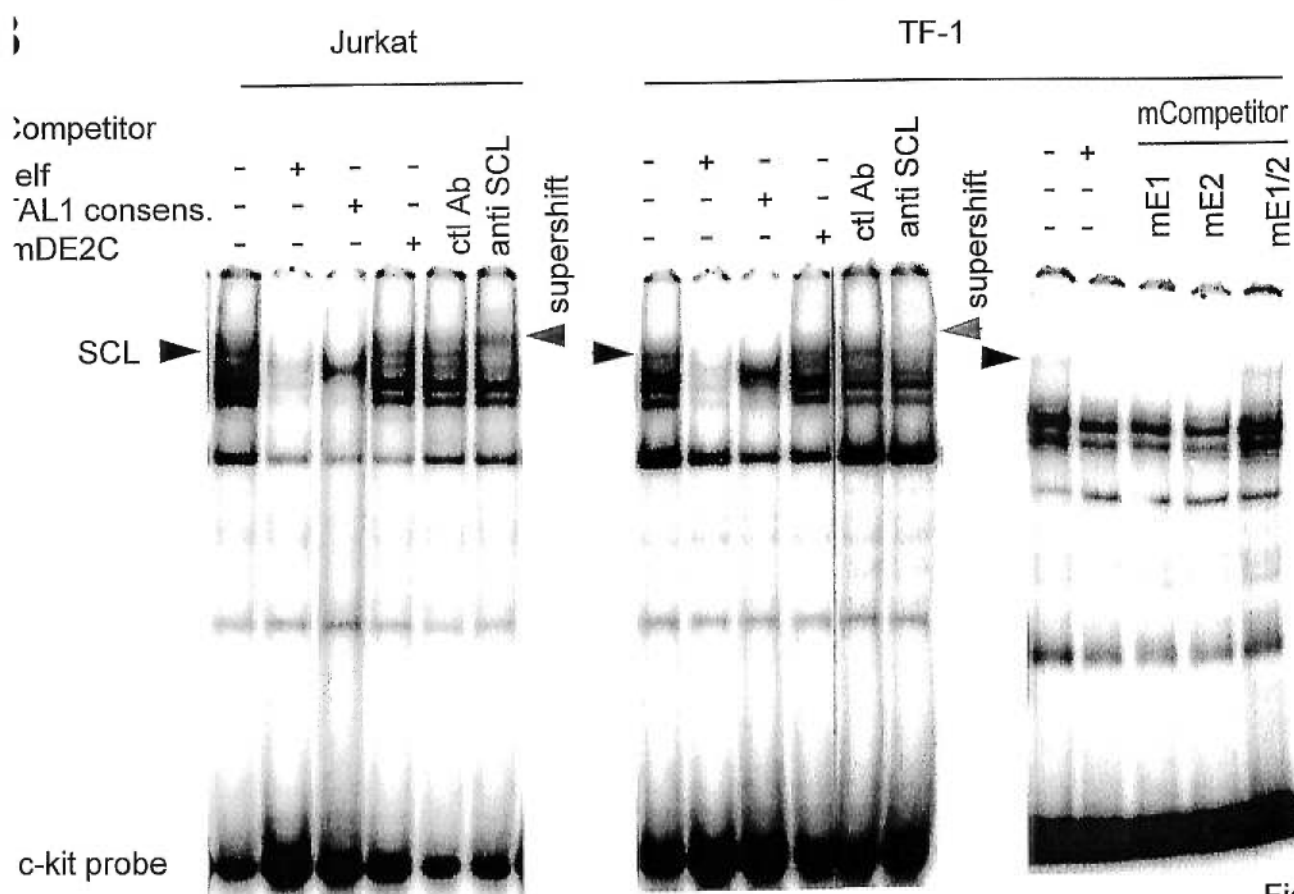
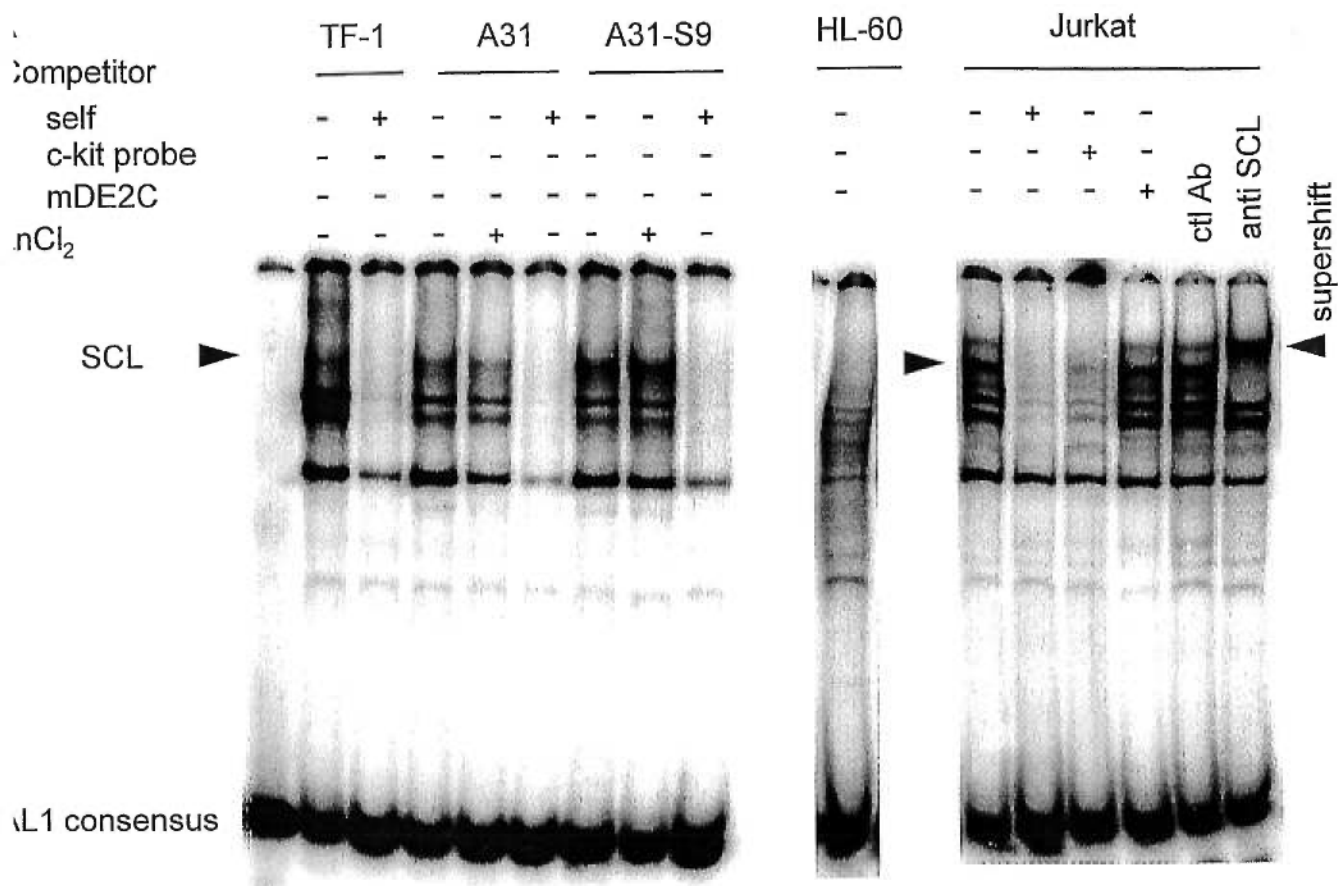


Figure 2

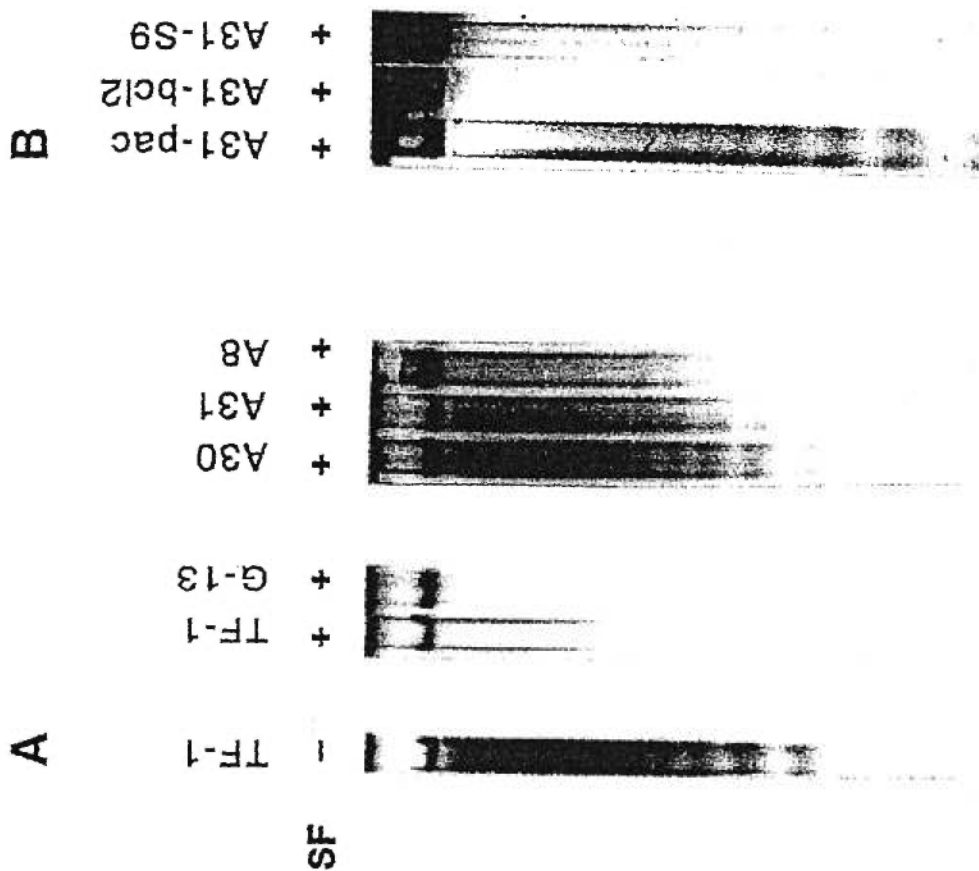


Figure 3

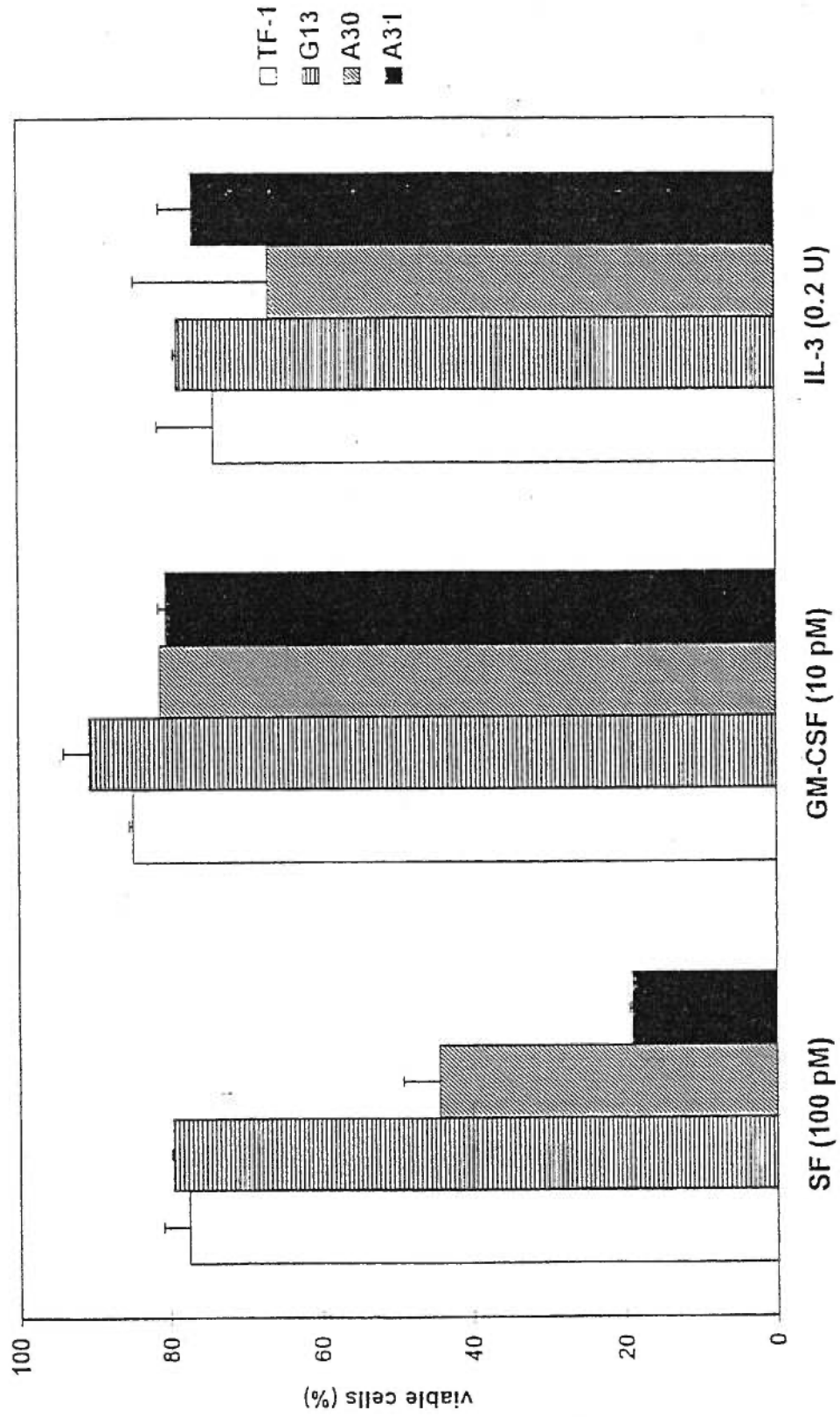


Figure 4

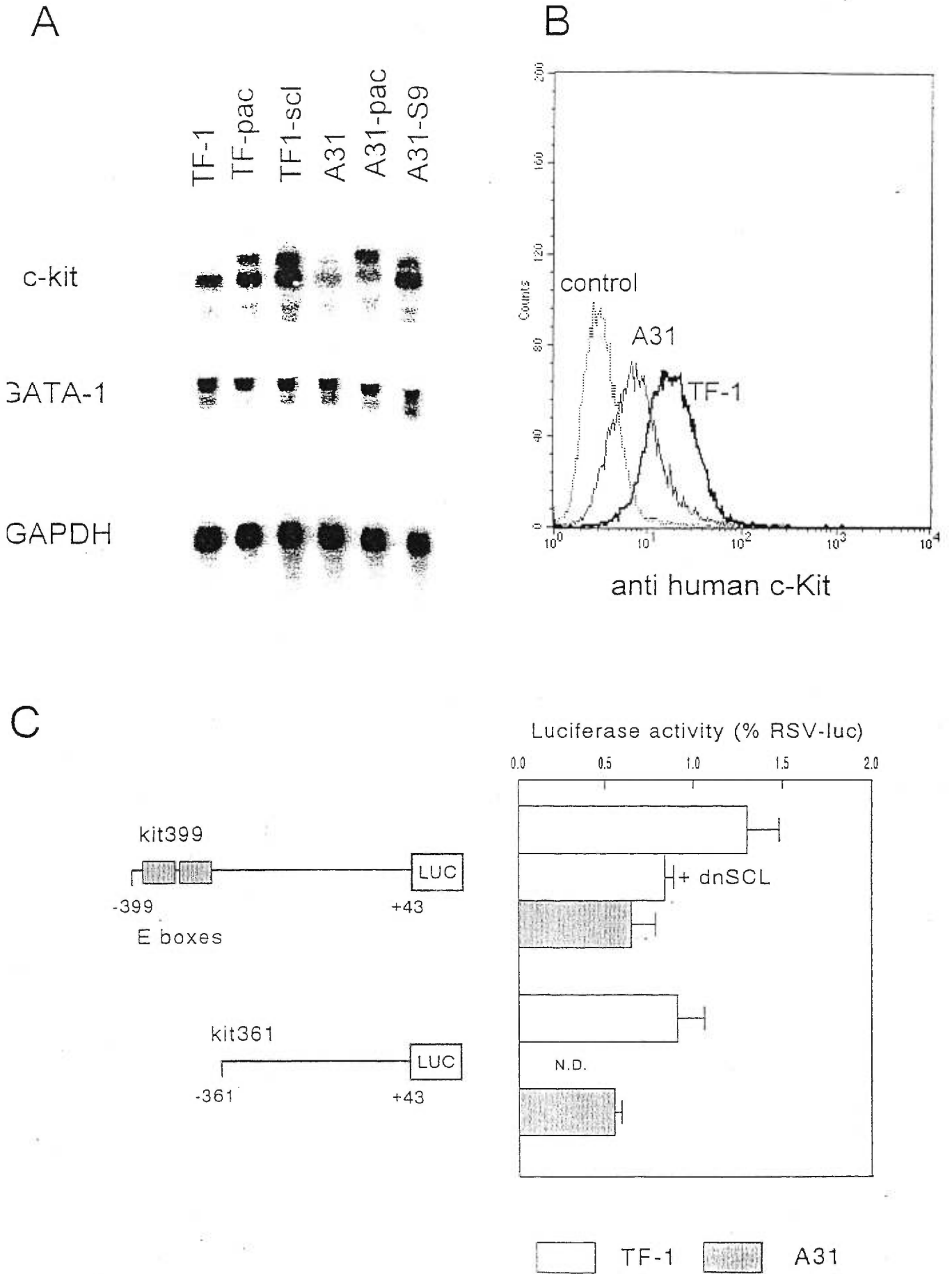
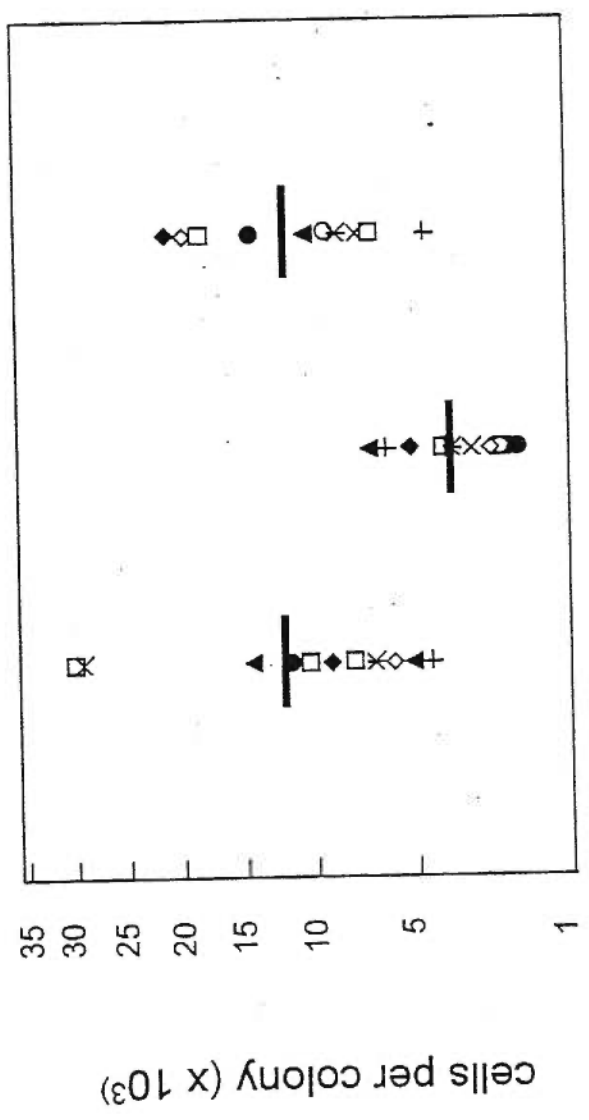


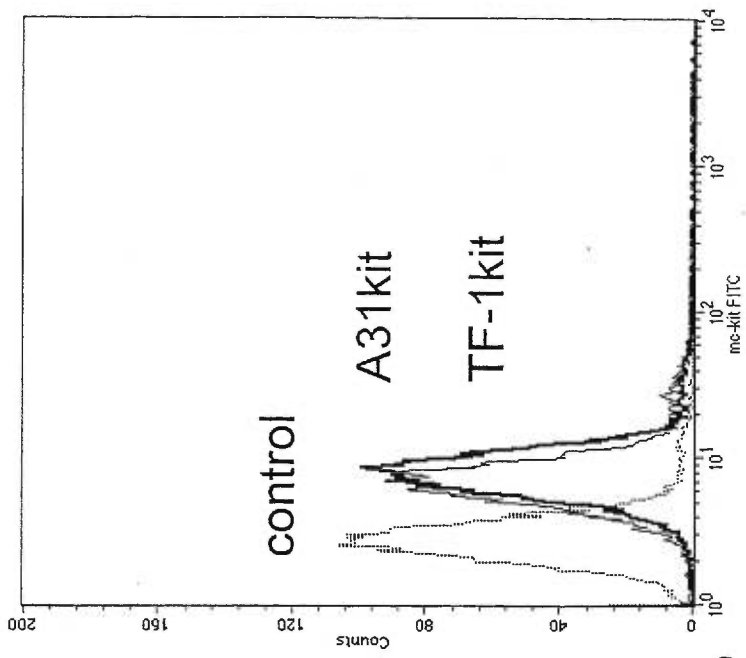
Figure 5



SCL dnSCL MSCV

Figure 7

B



anti murine c-Kit

A

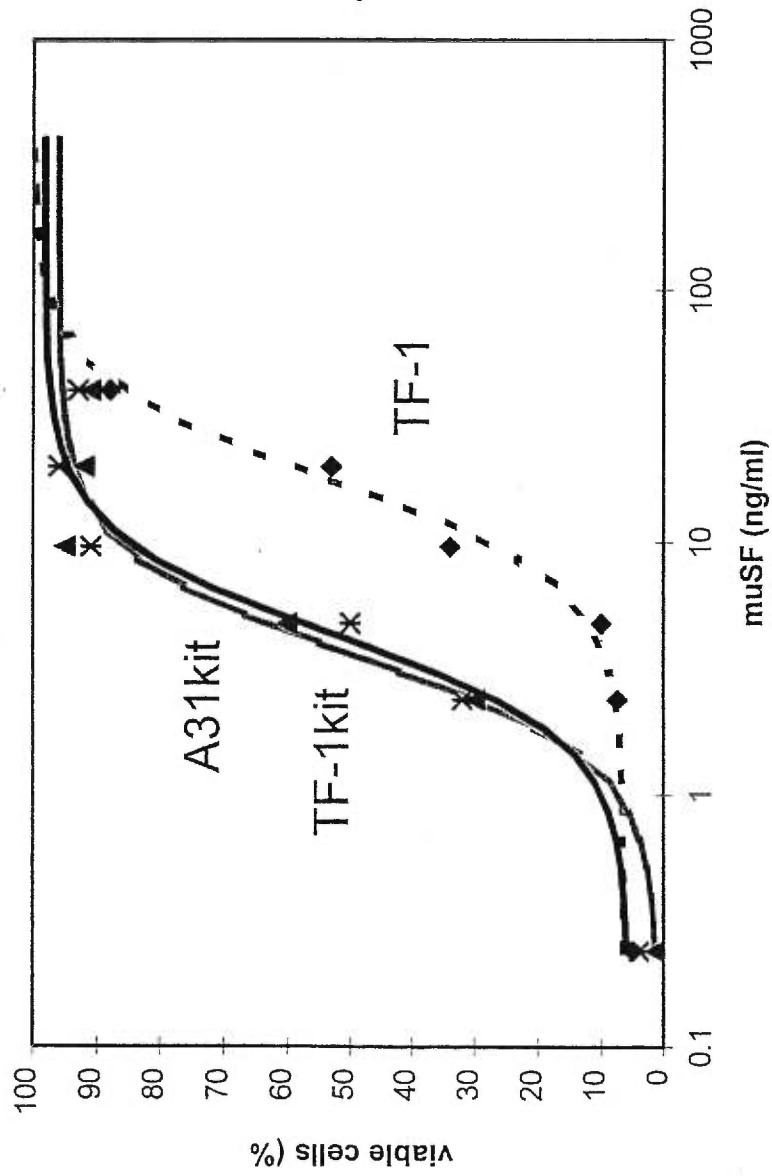


Figure 6

Implication in leukemia

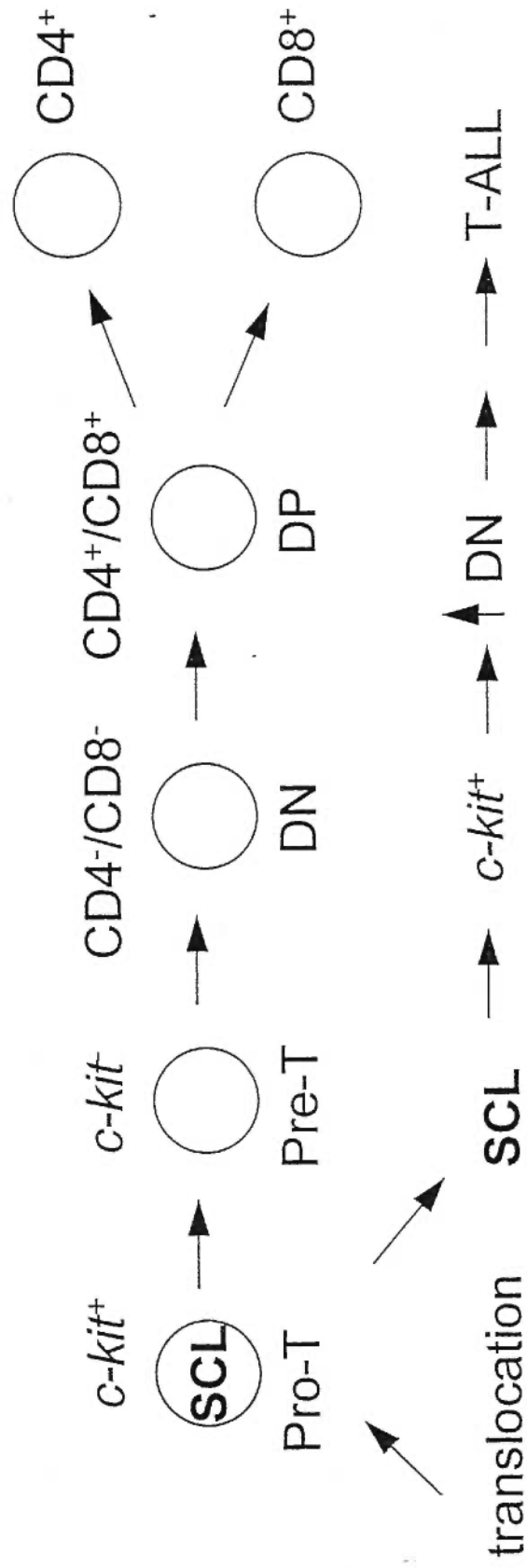


Figure 8

TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION GÉNÉRALE

1. SCL favorise la survie des cellules souches hématopoïétiques via c-Kit

Le facteur Steel et son récepteur c-Kit sont impliqués dans l'hématopoïèse. Le facteur Steel est exprimé dans le sac vitellin, le foie embryonnaire, la moelle osseuse et même avant l'initiation d'hématopoïèse, dans la granulosa à l'entour de l'ovotide fécondé au cours de l'embryogénèse (Matsui *et al.*, 1990; Keshet *et al.*, 1991). Ce facteur de croissance supprime l'apoptose des précurseurs hématopoïétiques (Li et Johnson, 1994; Abramson *et al.*, 1995). Ainsi, il semblerait que le facteur Steel assure la survie de ces cellules souches hématopoïétiques. Le c-kit, récepteur du SF est exprimé dans l'ovotide fécondé, par la suite est exprimé dans le sac vitellin, le foie embryonnaire et la moelle osseuse (Orr-Urtreger *et al.*, 1990). Les précurseurs hématopoïétiques générant les cellules descendantes de toutes les lignées sont c-Kit⁺. La perte de la fonction du c-Kit mène à la mort des précurseurs (Ogawa *et al.*, 1991). Ainsi, la voie de signalisation SF/c-Kit est importante pour le maintien de la survie de ces précurseurs hématopoïétiques. Le gène SCL est essentiel à la formation et à la survie des cellules souches hématopoïétiques. Son ablation entraîne la mort chez des souris transgéniques SCL^{-/-} causée par la déficience d'hématopoïèse. (Shivdasani *et al.*, 1995; Robbs *et al.*, 1995a., Porcher *et al.*, 1996). Les cellules souches embryonnaires SCL^{-/-} sont incapables de régénérer les cellules hématopoïétiques de toutes les lignées *in vivo* (Porcher *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent un rôle du gène SCL dans la survie des cellules souches hématopoïétiques. Mais aucun lien direct entre le gène SCL et le gène c-Kit n'a été établi avant notre étude.

Dans la présente étude, en utilisant TF-1, une lignée hématopoïétique bipotentielle CD34⁺, nous avons démontré que la diminution d'expression de la protéine SCL cause l'apoptose chez trois clones antisense indépendants en présence du SF, alors que les clones contrôles exprimant le vecteur seul se comportent comme la lignée parentale. Ce phénotype a été corrigé par une

surexpression de la protéine SCL. Aussi, cette étude a révélé que le niveau d'expression de la protéine SCL contrôle l'expression transcriptionnelle de c-Kit. Les résultats de retard sur gel indiquent que ce contrôle se réalise par l'interaction directe de la protéine SCL avec les séquences situées dans le promoteur de c-Kit. Ces résultats sont d'ailleurs renforcés par les données des essais de transactivation. Ainsi, le gène c-Kit serait un gène cible du gène SCL. Le facteur Steel stimule l'expression du gène SCL (Miller *et al.*, 1994) dont le produit stimule la transcription de c-Kit (la présente étude). Ces observations indiquent que le gène c-kit et le gène SCL font partie d'une boucle de rétrocontrôle positif. D'après tous ces résultats, nous avons proposé que durant l'embryogénèse, l'expression de c-Kit et son interaction avec le facteur Steel pourraient induire et stimuler l'expression du gène SCL qui ensuite stimule l'expression de c-Kit et ainsi favorise la survie des cellules souches hématopoïétiques. L'effet biologique des produits du gène SCL dans la suppression d'apoptose déclenchée par l'interaction SF/c-Kit se situe en amont de c-Kit, car d'après nos résultats, l'introduction du c-Kit dans le clone antisense est suffisante pour corriger le phénotype en présence du SF. Il reste à élucider s'il existe d'autres mécanismes moléculaires par lesquels SCL assure la survie des cellules souches hématopoïétiques. Il serait aussi intéressant de renforcer ou empêcher l'expression de c-Kit (ou antagoniser sa fonction) dans les cellules souches embryonnaires par les techniques transgéniques pour voir s'il y aurait un effet sur l'expression de SCL et sur l'hématopoïèse. D'après notre hypothèse, SCL stimule l'expression de c-Kit et favorise la survie des cellules souches hématopoïétiques *via* c-Kit. Ainsi, la surexpression du gène c-Kit dans les souris transgéniques SCL^{-/-} arriverait à établir l'hématopoïèse qui serait pourtant défectueuse. SCL est requis à un stage précoce du développement hématopoïétique cellulaire (Porcher *et al.*, 1996; Robb *et al.*, 1995a) et à un stade beaucoup plus tardif dans la maturation érythroïde (Aplan *et al.*, 1992b). Ainsi, SCL possède des multifonctions dans l'hématopoïèse. Nous suggérons qu'il les réaliserait par l'intermédiaire des gènes cibles différents. La régulation d'expression de c-Kit n'est qu'une de ses fonctions, ainsi, la surexpression de c-Kit

pourrait seulement corriger partiellement le phénotype, mais n'arriverait pas à établir l'hématopoïèse normale.

Dans notre étude, une diminution d'environ 50% au niveau protéique de SCL dans les cellules TF-1 entraîne une diminution d'expression considérable de c-Kit et ainsi une apoptose en réponse au facteur Steel. Ce phénomène n'a jamais été décrit dans la littérature, la relation entre SCL et c-Kit n'a pas encore étudiée avant notre étude. Comme SCL est un facteur de transcription et que les facteurs de transcription forment normalement des complexes de régulation, la diminution de SCL dans le complexe pourrait déclencher un déséquilibre entre ses partenaires, entraîner un patron d'interaction protéique différent et stimuler (ou inhiber) l'expression des gènes différents. Les produits correspondants de ces gènes pourraient en revanche influencer le complexe de régulation contenant SCL. Ainsi, l'effet de la diminution minimale de la protéine SCL pourrait être amplifié par une cascade de réactions biochimiques. L'expression de c-Kit serait influencée sous SCL suivant ce modèle.

La présente étude suggère aussi une relation entre le gène SCL et le gène de survie: bcl-2. En effet, l'apoptose des clones antisense SCL maintenus en présence du facteur Steel est corrigée par l'introduction du gène bcl-2. Il serait possible que bcl-2 fonctionne en aval de SCL dans la suppression de l'apoptose causée par l'interaction SF/c-Kit. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par l'observation suivante: le facteur Steel supprime l'apoptose d'un groupe de lymphocytes NK exprimant constitutivement le c-Kit et stimule l'expression de la protéine bcl-2. En présence d'un anticorps anti-c-Kit, d'un inhibiteur de la tyrosine kinase ou des oligonucléotides antisense bcl-2, l'effet du SF sur la survie de ces lymphocytes est dramatiquement réduit (Carson *et al.*, 1994). Il serait intéressant de répéter les mêmes expériences avec nos clones antisense pour déterminer le lien entre ces deux oncogènes.

2. SCL et ses partenaires

La séquence consensus TAL1 AACAGATGGT est liée par le complexe contenant SCL d'après les essais de CASTing (Hsu *et al.*, 1994a). Ces expériences ont montré des hétérodimères de SCL avec plusieurs protéines de la classe A de la famille des facteurs de transcription HLH: E12, E47, E2-2, HEB. Les gènes E12 et E47 sont impliqués dans le développement des lymphocytes et dans la myogénèse. Ces produits forment des hétérodimères avec SCL dans les cellules érythroïdes et myéloïdes (Voronova *et al.*, 1994). Au cours de la différenciation macrophagique, l'activité de liaison à l'ADN des hétérodimères SCL-E2A est abolie, accompagnée d'une expression élevée de Id2. Au cours de la différenciation érythrocytaire, l'activité de liaison à l'ADN devient élevée, tandis que l'expression de Id2 est diminuée (Condorelli *et al.*, 1995), il a été aussi démontré dans cette étude que, Id2 compétitionne pour lier SCL ou E2A. Dans les autres études, la protéine RBTN2 est associée avec SCL dans les noyaux des cellules érythroïdes (Valge-Archer *et al.*, 1994) et dans les thymocytes des souris transgéniques SCL/RBTN2 (Larson *et al.*, 1996). Par les essais de deux hybrides, Osada *et al.* (1995) ont démontré que SCL, RBTN2, GATA-1 et E47 pourraient former un complexe *in vitro*. Dans les autres études suivantes, les auteurs ont montré une autre séquence par CASTing, la séquence E-box-GATA qui est représentée par CAGGTG suivie d'un site GATA en aval après une distance de 9 paires de bases. En plus, dans la même étude, il a été démontré que SCL, GATA-1, RBTN2, E2A et une autre protéine LIM Ldb1/NL1 forment un complexe *in vivo* et lient uniquement la séquence E-box-GATA (Wadman *et al.*, 1997). A part ces protéines, SCL pourrait associer avec DRG (une protéine qui lie GTP et qui est exprimée à haut niveau dans le thymus de la souris adulte avec une fonction encore inconnue)(Mahajan *et al.*, 1996). D'après ces données, il semble que la protéine SCL fait partie d'un ou de plusieurs larges complexes de transcription. SCL pourrait influencer l'expression du gène cible par une interaction directe avec le promoteur du gène correspondant (comme dans la régulation de c-Kit) ou SCL pourrait capturer ou libérer ses partenaires différents et exercer sa fonction en *trans* par l'effet biologique de ses partenaires. SCL est requis à un stage précoce

du développement hématopoïétique cellulaire (Porcher *et al.*, 1996; Robb *et al.*, 1995a) et à un stade beaucoup plus tardif dans la maturation érythroïde (Aplan *et al.*, 1992b) en réponse à l'érythropoïétine (Cross *et al.*, 1994; Hoang *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent que SCL complète ses différentes fonctions avec des partenaires différents. Ainsi, l'identification des partenaires de SCL est importante pour connaître le rôle du SCL dans différents stades de l'hématopoïèse. Bien qu'avec CASTing on ait découvert la séquence TAL1 et E-Box-GATA, il n'a pas été prouvé qu'une de ces séquences pourrait être présente dans les promoteurs ou les séquences amplificatrices de certains gènes. Ainsi, elles ne représentent pas de site de liaison à l'ADN physiologique ou pathologique du SCL. Dans notre étude, nous avons démontré la présence d'un site de liaison naturel du complexe SCL qui contient deux E-box: CTAGGGAGCACCTGCCAGGTGGCTGGCCC dans le promoteur c-Kit. Selon nos résultats de retard sur gel, au moins un complexe est formé et est lié à cette séquence. Il serait intéressant d'identifier les protéines de ce complexe, d'étudier leur patron d'expression et leur relation avec SCL au cours de l'hématopoïèse. En plus, nous n'avons utilisé qu'une séquence très courte située dans le promoteur c-Kit. En utilisant les séquences les plus longues et complètes, nous pourrions identifier plus de protéines qui interagissent avec SCL et régulent l'expression de c-kit. La séquence contenant E-box située dans le promoteur de c-Kit pourrait être liée par différents complexes contenant SCL et serait occasionnellement située dans le promoteur des autres gènes cibles de SCL avec une variation mineure de nucléotides. Il serait intéressant de voir si avec la même séquence, on pourrait identifier les autres partenaires de SCL dans les cellules hématopoïétiques de différents stades. L'analyse des promoteurs de c-Kit et de SCL a révélé deux sites communs: celui de GATA-1 et celui de SP1 (Lecointe *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 1995). Il est possible que les protéines GATA-1 et SP-1 exercent un effet dans l'expression de ces deux gènes et en plus fassent partie du grand complexe contenant SCL. Bref, les partenaires connus ou potentiels de SCL sont nombreux,

leurs fonctions restent à être élucidées pour mieux connaître les différents rôles de SCL dans l'hématopoïèse.

3. SCL et la différenciation érythrocytaire

Plusieurs études ont montré un effet de SCL sur la différenciation érythrocytaire. SCL est fortement exprimé dans les précurseurs érythroïdes (Green *et al.*, 1991), le niveau d'expression reste élevé durant la différenciation terminale (Hoang *et al.*, 1996), l'érythropoïétine stimule la transcription du gène SCL et la phosphorylation de ses produits protéiques (Prasad *et al.*, 1995). Le renforcement du niveau d'expression de SCL augmente le taux de différenciation érythrocytaire spontanée, tandis que l'antisense SCL inhibe la différenciation érythrocytaire induite par le DMSO des cellules érythro-leucémiques murines (Aplan *et al.*, 1992b). Nos résultats (pas présentés dans ce mémoire) ont montré que les clones antisense SCL sont morts en présence de l'érythropoïétine à faible concentration et la différenciation érythrocytaire induite par l'érythropoïétine de ces cellules antisense est inhibée par rapport aux cellules contrôles. Les mêmes résultats ont été obtenus avec un ADNc SCL dominant négatif manquant le domaine basique, au lieu d'un ADNc antisense SCL dans les cellules TF-1. Ainsi, nous avons confirmé que SCL est un régulateur positif de la différenciation érythrocytaire. Le facteur Steel et son récepteur c-Kit peuvent aussi affecter l'érythropoïèse. Une mutation dans c-Kit diminue la quantité des précurseurs érythroïdes CFU-E (Nocka *et al.*, 1989). La survie et la prolifération des CFU-E pour mener à une différenciation érythrocytaire complète dépendent absolument de l'érythropoïétine (Gregory *et al.*, 1976). C-kit est associé physiquement avec le domaine cytoplasmique du récepteur EPO et pourrait activer le récepteur EPO suite à une stimulation par le facteur Steel et ainsi induire la prolifération et la maturation des CFU-E (Wu *et al.*, 1995). Le facteur Steel stimule l'expression de SCL dans les précurseurs érythroïdes au cours de la différenciation érythrocytaire (Miller *et al.*, 1994). Dans nos études, nous avons démontré que le SCL régule

l'expression du c-Kit. Nous proposons ainsi que SCL assure son effet sur l'érythropoïèse du moins en partie via c-Kit. Il a été connu que la différenciation cellulaire dépend de la survie cellulaire assurée par certains facteurs de croissance et de quelques facteurs de transcription spécifiques qui servent à induire l'expression successive des gènes spécifiques à la différenciation. Récemment, d'après le cas de GATA-1 et celui de GATA-4, il a été démontré que les facteurs de transcription spécifiques à la différenciation jouent également un rôle dans la suppression d'apoptose (Pevny *et al.*, 1995; Weiss et Orkin, 1995; Grépin *et al.*, 1995,1996). Nous proposons que SCL joue deux rôles dans l'érythropoïèse. Dans l'érythropoïèse précoce, SCL assure la survie des précurseurs érythroïdes CFU-E *via* c-Kit. Ensuite, dans la différenciation terminale, SCL favorise la survie cellulaire et induit l'expression des gènes spécifiques de la lignée érythroïde par l'activation du récepteur EPO. Il serait intéressant de renforcer ou d'empêcher l'expression de SCL ou antagoniser sa fonction dans une lignée cellulaire érythro-potentielle pour voir l'effet sur le récepteur EPO et sur les gènes spécifiques érythroïdes (comme GATA-1) au cours de la différenciation érythrocytaire.

4. SCL, c-Kit et la leucémie lymphoblastique aiguë de type cellulaire T

Le facteur Steel induit l'internalisation et ensuite la dégradation du récepteur c-Kit, ce qui suggère que l'existence restreinte du récepteur c-Kit est requise pour exercer certaines fonctions cellulaires normales et que l'expression et l'existence aberrantes du récepteur c-Kit pourraient causer certaines pathologies cellulaires (Yee *et al.*, 1994). L'expression aberrante du c-Kit est détectée dans le mélanome, le cancer du poumon et surtout dans les leucémies de types cellulaires myéloïdes, mastoïdes, lymphoïdes ou mégakaryocytaires (Mattei *et al.*, 1994; Sekido *et al.*, 1993; Morita *et al.*, 1994; Siitonen *et al.*, 1994; Wells *et al.*, 1996). L'activation constitutive du c-Kit a transformé les cellules hématopoïétiques normales en des cellules leucémiques (Kitayama *et al.*, 1996). L'expression ectopique renforcée du

c-Kit dans la lignée myéloïde 32D (une lignée IL-3 dépendante) stimule son potentiel leucimogénique et rend ces cellules indépendantes de IL-3 pour leur survie (Hu *et al.*, 1995). L'interaction du c-Kit avec son ligand stimule la formation des colonies leucémiques tandis que les oligonucléotides antisense c-Kit inhibent l'expression de l'oncogène bcr-abl et la prolifération des cellules leucémiques myéloïdes chroniques. Ces oligonucléotides antisense c-Kit exercent aussi un effet négatif envers la clonogénicité des cellules myéloblastiques aiguës *in vitro* (Siitonen *et al.*, 1996; Gewirtz 1993; Kubota *et al.*, 1994; Murorashi *et al.*, 1995). Toutes ces données indiquent que l'oncogène c-kit favorise la leucimogénèse. Cet effet serait dû en grande partie à sa capacité de supprimer l'apoptose après son activation par le facteur Steel (Li et Johnson., 1994; Abramson *et al.*, 1995)

Les précurseurs qui entrent dans le thymus et génèrent les cellules T sont CD34+ et c-Kit+. C-Kit est exprimé dans une sous-population de thymocytes précoces CD3-CD4-CD8- indiquant son rôle dans la lymphogénèse précoce de cellules T (deCastro *et al.*, 1994). Les cellules pro T CD25+ sont des thymocytes très précoces n'exprimant pas de marqueurs des lignées CD4/CD8 et où la recombinaison du récepteur des cellules T (TCR) est absente. Ces cellules pro T CD25+ survivent et prolifèrent *ex vivo* en réponse à l'IL-7 et au facteur Steel (Godfrey *et al.* , 1992). Une autre preuve démontrant l'importance de SF/c-Kit dans le développement du thymus est apportée par le fait qu'un anticorps anti-c-Kit inhibe la différenciation des cellules T du lobe thymique reconstitué par les précurseurs hématopoïétiques du foie foetal (Wolf *et al.*, 1992). Dans les souris transgéniques où l'expression de l'antigène SV40 Tag est dirigée dans les épithéliums du thymus, une expression aberrante de c-Kit est détectée et qui coïncide avec un nombre exagéré d'épithéliums immortels ainsi qu'avec une augmentation de 100 fois de thymocytes dans le thymus hyperplasique (Moll *et al.*, 1992). Des lignées leucémiques lymphoïdes de type cellulaire T, au lieu de type B expriment le messager de c-Kit. L'interaction du récepteur avec le facteur Steel stimule la prolifération de la lignée leucémique lymphoïde T tandis que la perte de la fonction du c-Kit par un antagoniste mène à son inhibition (Kees *et al.*, 1995).

Le gène SCL est activé par aberration chromosomale dans environ 30% des cas de T-ALL (Robbs *et al.*, 1995b), mais le mécanisme qui favorise la leucimogénèse (la suppression de l'apoptose, l'arrêt de la différenciation et la stimulation de la prolifération) n'a pas été encore bien étudié, le gène cible de SCL restait encore inconnu avant notre étude. SCL est exprimé dans les précurseurs des cellules T du thymus (Mouthon *et al.*, 1993) et est requis pour générer les cellules T *in vivo* dans des souris chimériques (Porcher *et al.*, 1996; Robb *et al.*, 1996). Nos observations suggèrent que la protéine SCL peut contrôler l'expression de c-Kit et favoriser la survie des précurseurs en réponse au facteur Steel qui supprime l'apoptose à un stade précoce durant le développement du thymus. L'expression aberrante de SCL dans les thymocytes de souris transgéniques doubles CD2-SCL/CD2-RBTN2 cause une duplication du nombre de thymocytes primitifs CD4⁺/CD8⁻ par rapport aux souris simples transgéniques CD2-RBTN2 (Larson *et al.*, 1996). Cette expansion serait due, d'après la présente étude, à un nombre plus élevé de précurseurs c-Kit⁺. Dans le développement de la T-ALL, nous proposons que l'expression ectopique de SCL dans les lignées T cause une expression constitutive de c-Kit. L'expression excessive de c-Kit favorise la suppression de l'apoptose et l'hyperplasie des thymocytes primitifs, une condition pré-néoplasique. Des événements supplémentaires seraient ensuite requis pour le développement de la leucémie aiguë de type cellulaire T (Robb *et al.*, 1995b; Elwood et Begley, 1995), comme ce qui a été observé dans la biologie des tumeurs (revue par Bishop, 1991).

4. Conclusion

Nous avons confirmé le rôle du gène SCL dans la suppression de l'apoptose des cellules hématopoïétiques précoces. De plus, nous avons montré que le SCL est relié à la voie de signalisation de SF/c-Kit, tandis que les voies de l'IL-3 et du GM-CSF ne dépendent pas de SCL. Nous avons trouvé que le gène c-Kit serait un gène cible du SCL et que ces deux gènes fonctionnent dans une

boucle de rétro-contrôle positif. Nous avons identifié une séquence de liaison naturelle du complexe contenant SCL qui favoriserait l'identification des partenaires de SCL. Nous avons proposé au niveau cellulaire et moléculaire un mécanisme par lequel SCL favorise d'une part, la survie des cellules souches hématopoïétiques et d'autre part, l'initiation de la leucémie lymphoblastique aiguë de type cellulaire T causée par l'expression aberrante du gène SCL. La présente étude a aussi montré un effet de SCL dans la différenciation érythrocytaire et a proposé un mécanisme moléculaire correspondant.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abrahamson J. L., Lee J. M. and Bernstein A. (1995) Regulation of p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest by Steel factor. *Mol Cell Biol* 15, 6953-6960.

Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W. and Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.

Anderson D. M., Lyman S. D., Baird A., Wignall J. M., Eisenman J., Rauch C., March C. J., Boswell H. S., Gimpel S. D., and Cosman D. (1990) Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms [published erratum appears in *Cell* 1990 Nov 30;63(5):following 1112]. *Cell* 63, 235-243.

Aplan P. D., Begley C. G., Bertness V., Nussmeier M., Ezquerra A., Coligan J. and Kirsch I. R. (1990a) The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol. Cell Biol.* 10, 6426-6435.

Aplan P. D., Lombardi D. P., Ginsberg A. M., Cosman J., Bertness V. and Kirsch I. R. (1990b) Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* 250, 1426-1429.

Aplan P. D., Lombardi D. P., Reaman G. H., Sather H. N., Hammond G. D. and Kirsch I. R. (1992a) Involvement of the putative hemopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79, 1327-1333.

Aplan P. D., Nakahara K., Orkin S. H. and Kirsch I. R. (1992b) The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J.* 11, 4073-4081.

Aplan P. D., Raimondi S. C. and Kirsch I. R. (1992c) Disruption of the SCL gene by a t(1:3) translocation in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* 176, 1303-1310.

Ardens M. J., Morris R. G. and Wyllie A. H. (1990) Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 32, 223-254.

Askew D. S., Ihle J. N. and Cleveland J. L. (1993) Activation of apoptosis associated with enforced myc expression in myeloid progenitor cells is dominant to the suppression of apoptosis by interleukin-3 or erythropoietin. *Blood* 82, 2079-2087.

Bkhshi A., Jensen J. P., Goldman P., Wright J. J., McBride O. W., Epstein A. L. and Korsmeyer S. J. (1985) Cloning the chromosomal break-point of the t(14:18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 889-906.

Bash R. O., Hall S., Timmons C., Crist W., Amylon M., Smith R. and Baer R. (1995) Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A Pediatric Oncology Group study. *Blood* 86, 666-676.

Bash R. O., Crist W. M., Shuster J. J., Link M. P., Amylon M., Pullen J., Carroll A. J., Buchanan G. R., Smith R. G. and Baer R. (1993) Clinical features and outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the TAL1 locus: A Pediatric Oncology Group study. *Blood* 81, 2110-2117.

Beckmann H., Su L. K. and Kadesch T. (1990) TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer μ E3 motif. *Genes Dev* 4, 167-179.

Begley C. G., Aplan P. D., Davey M. P., De Villartay J. P., Cohen D. I., Waldmann T. A. and Kirsch I. R. (1989a) Demonstration of a δ rec-pseudo $J\alpha$ rearrangement with deletion of the locus in a human stem-cell leukemia. *J. Exp. Med.* 170, 339-342.

Begley C. G., Aplan P. D., Davey M. P., Nakahara K., Tchorz K., Kurtzberg J., Hershfield M. S., Haynes B. F., Cohen D. I., Waldmann T. A. and Kirsch I. R. (1989b) Chromosomal translocation in a human leukemic stem cell line disrupts the T-cell antigen receptor δ -chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc. Natl Aca. Sci. U.S.A.* 86, 2031-2035.

Begley C. G., Aplan P. D., Denning S. M., Haynes B. F., Waldmann T. A. and Kirsch I. R. (1989c) The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc. Natl Aca. Sci. U.S.A.* 86, 2031-2035.

Begley C. G., Robb L., Rockman S., Visvader J., Bockamp E. O., Chan Y. S. and Geen A. R. (1994) Structure of the gene encoding the murine SCL protein. *Gene* 138, 93-99.

Begley C. G., Visvader J., Geen A. R., Aplan P., Metcalf D., Kirsch I. R. and Gough N. M. (1991) Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *Proc. Natl Aca. Sci. U.S.A.* 88, 869-873.

Bernard O., Azogui O., Lecointe N., Mugneret F., Berger R., Larson C. J. and Mathieu-Mahuld D. (1992) A third tal-1 promoter is specifically used in human T cell leukemias. *J. Exp. Med.* 176, 919-925.

Bernard O., Gugliehmi P., Jonveaux P., Cherif D., Gisselbrecht S., Mauchauffe M., Berger R., Larson C. J. and Mathieu-Mahuld D. (1990) Two distinct mechanisms for the SCL gene activation in the t(1:14) translocation of T-cell leukemias. *Genes Chrom. Cancer* 1, 194-208.

Bernard O., Lecointe N., Jonveaux P., Suori M., Mauchauffe M., Berger R., Larson C. J. and Mathieu-Mahuld D. (1991) Two site-specific deletions and t(1:14) translocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the tal-1 gene. *Oncogene* 6, 1477-1488.

Bernard O., Lecointe N., Jonveaux P., Suori M., Mauchauffe M., Berger R., Larson C. J. and Mathieu-Mahuld D. (1993) Characterization of translocation t(1:14)(p32;q11) in a T and in a B acute leukemia. *Leukemia* 7, 1509-1513.

Benezra R., Davis R. L., Lockshon D., Turner D. L. and Weintraub H. (1990) The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59.

Bishop J. M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. (Review) *Cell* 64, 235-248.

Blackwell T. K., Kretzner L., Blackwood E. M., Eisenman R. N. and Weintraub H. (1990a) Sequence-specific DNA binding by the c-myc protein. *Science* 250, 1149-1151.

Blackwell T. K. and Weintraub H. (1990b) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104-1110.

Bockamp E. O., Mclaughlin F., Murrell A. M., Gottgens B., Robb L., Begley C. G. and Green A. R. (1995) Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter. *Blood* 86, 1502-1514.

Boehm T., Feroni L., Kaneko Y., Perutz M. F. and Rabbitts T. H. (1991) The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosome 11p15 and 11p13. *Proc. Natl Aca. Sci. U.S.A.* 88, 4367-4371.

Boise L. H., Gonzalez-Garcia M., Postema C. E., Ding L., Lindsten Y., Turka L. A., Mao X., Nunez G. and Thompson C. (1993) *Cell* 74, 597-608.

Borkhardt A., Reep R., Harbott J., Keller C., Berner F., Ritterbeach J. and Lampert F. (1992) Frequency and DNA sequence of tal-1 rearrangement in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Hematol.* 64, 305-308.

Boyle W. J., Smeal T., Defize L. H., Angel P., Woodgett J. R., Karin M. and Hunter T. (1991) Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64, 573-584.

Brady G., Billia F., Knox J., Hoang T., Kirsch I. R., Voura E. B., Hawley R. G., Cumming R., Buchwaid M., Siminovitch K., *et al* (1995) Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* 5, 909-922.

Braun T., Buschhausen-Denker G., Bober E., Tannich E. and Arnold H. H. (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J* 8, 701-709.

Braun T., Bober E., Winter B., Rosenthal N. and Arnold H. H. (1990) Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J* 9, 821-831.

Breit T. M., Mel E. J., Wolvers-Tettero T. I., Ludwig W. D., van Wering E. R. and van Dongen D. J. (1993) Site-specific deletions involving the tal-1 and SIL genes are restricted to cells of the T-cell receptor α/β lineage: T cell receptor δ gene deletion mechanism affects multiple genes. *J. Exp. Med.* 177, 965-977.

Breit T. M., Wolvers-Tettero I. L. M. and van Dongen J. J. M. (1994) Lineage specific demethylation of tal-1 gene breakpoint region determines the frequency of tal-1 deletion in $\alpha\beta$ lineage T-cells *Oncogene* 9, 1847-1853.

Brennan T. J. and Olson E. N. (1990) Myogenin resides in the nucleus and acquires high affinity for a conserved enhancer element on heterodimerization. *Genes Dev* 4, 582-595.

Brown L., Cheng J. T., Chen Q., Siciliano M., Crist W., Buchanan G. and Baer R. (1990) Site specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in the human T cell leukemia. *EMBO J* 9, 1847-1853.

Caceres-Cortes J., Rajotte D., Dumouchel J., Haddad P. and Hoang T. (1994) Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison

with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 269, 12084-12091.

Carlesso N., Dexter T. M., Lord B. I., Cragoe E. J. J. and Whetton A. D. (1994) Use of a temperature-sensitive mutant to define the biological effects of the p210^{bcr-abl} tyrosine kinase on proliferation of a factor-dependent murine myeloid cell line. *Oncogene* 9, 149-156.

Carr C. S. and Sharp P. A. (1990) A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins. *Mol Cell Biol* 10, 4384-4388.

Carson W. E., Haldar S., Baiocchi R. A. and Croce C. M. (1994) The c-Kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7553-7557.

Chabot B., Stephenson D. A., Chapman V. M., Besmer P. and Bernstein A. (1988) The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 87-89.

Carroll A. J., Crist W. M., Link M. P., Amylon M. D., Pullen J., Gagab A. H., Buchanan G. R., Wimmer R. S. and Vietti T. J. (1990) The t(1;14)(p34;q11) is nonrandom and restricted to T-cell acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 76, 1220-1224.

Chen Q., Cheng J. T., Tsai L. H., Schneider N., Buchanan G., Carroll A., Crist W., Ozanne B., Siciliano M. and Baer R. (1990a) The tal gene undergoes chromosomal translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *EMBO J* 9, 415-424.

Chen J., Lansford R., Stewart V., Young F. Alt F. W. (1993) An assay of gene function in lymphocyte development. *Proc. Natl Aca. Sci. U. S. A.* 90, 4528.

Cheng J. T., Cobb M. H. and Baer R. (1993a) Phosphorylation of the TAL1 oncoprotein by extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Mol. Cell Biol.* 13, 801-808.

Cheng J. T., Hsu H. L., Hwang L. Y. and Baer R. (1993b) Products of the TAL1 oncogene: basic helix-loop-helix proteins phosphorylated at serine residue. *Oncogene* 8, 677-683.

Chittenden T., Harrington E. A., O' Connor R., Flemington C., Lutz R. J., Evans J. I. and Guild B. C. (1995) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 733-736.

Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Chu T. Y. and Besmer P. (1994) Characterization of the Promoter of the Proto-oncogene c-Kit. *Proceedings of The National Science Council, ROC Part B: Life Sciences* 19, 8-18.

Cleary M. L., Smith S. D. and Sklar J. (1986) Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19-28.

Condorelli G., Vitelli L., Valtieri M., Marta I., Montesoro E., Lulli V., Baer R. and Peschle C. (1995) Coordinate expression and development role of Id2 protein and TAL1/E2A heterodimer in erythroid progenitor differentiation. *Blood* 86, 164-175.

Cooper G. M. (1993) *Oncogenes*, second edition, Jones and Bartlett Publishers, Boston, U. S. A.

Copeland N. G., Gilbert D. J., Cho B. C., Donovan P. J., Jenkins N. A., Cosman D., Anderson D., Lyman S. D. and Williams D. E. (1990) Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 63, 175-183.

Cross M. A., Heyworth C. M., Murrell A. M., Bockamp E. O., Dexter T. M. and Green A. R. (1994) Expression of lineage specific restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene* 9, 3013-3016.

Darnell Jr J. E., Kerr I. M. and Stark G. R. (1994) Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins *Science* 264, 1415-1421.

David S. and Latchman D. S. (1996) Transcription-factor mutations and diseases *N Engl J Med* 334, 28-33.

Davis R. L., Cheng P. F., Lassar A. B. and Weintraub H. (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.

Dear T. N., Colledge W. H., Carlton M. B. L., Lavenir I., Larson T., Smith A. J. H., Warren A. J., Evans M. J., Sofroniew M. V. and Rabitts T. H. (1995) The Hox 11 gene is essential for cell survival during spleen development. *Development* 121, 2909.

deCastro C. M., Denning S. M., Langdon S., Vandenbark G. R., Kurtzberg J., Searce R., Haynes B. F. and Kaufman R. E. (1994) The c-kit proto-oncogene receptor is expressed on a subset of human CD3-CD4-CD8- (triple-negative) thymocytes. *Experimental Hematology* 22, 1025-1033.

Dikstein R., Ruppert S. and Tjian R. (1996) TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell* 84, 781-790.

Duan R. D., Pause A., Burgess W. H., et al. (1995) Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* 269, 1402-1406.

Duke R. C. and Cohen J. J. (1986) IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 5, 289-299.

Dyck J. A., Maul G. G., Miller W. H. J., Chen J. D., Kakizuka A. and Evans R. M. (1994) A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76, 333-343.

Edmondson D. G. and Olson E. N. (1989) A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* 3, 628-640.

Elwood N. J. and Begley C. G. (1995) Reconstitution of mice with bone marrow cells expressing the SCL gene is insufficient to cause leukemia. *Cell Growth and Diff.* 6, 19-25.

Elwood N. J., Cook W. D., Metcalf D. and Begley C. G. (1993) SCL, the gene implicated in human T-cell leukaemia, is oncogenic in a murine T-lymphocyte line. *Oncogene* 8, 3093-3101.

Elwood N. J., Green A. R., Melder A., Begley C. G. and Nicola N. A. (1994) The SCL protein displays cell-specific heterogeneity in size. *Leukemia* 8, 106-114.

Finger L. R., Kagan J., Christopher G., Kurtzberg J., Hershfield M. S., Nowell P. C. and Croce C. M. (1989) Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5039-5043.

Ferrè-D'Amaré A. R., Prendergast G. C., Ziff E. B. and Burley S. K. (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 363, 38-45.

Fitzgerald T., Neale G., Raimondi S. and Goorha R. (1991) C-tal, a helix-loop-helix protein, is juxtaposed to the T-cell receptor- β chain gene by a reciprocal chromosomal translocation: t(1;7)(p32;q35). *Blood* 10, 2686-2695.

Fleischman R. A. (1993) From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. (Revue) *Trends in Genetics* 9, 285-290.

Gewirtz A. M. (1993) Potential therapeutic applications of antisense oligodeoxynucleotides in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 11 suppl, 131-137.

Godfrey D. I., Zlotnik A. and Suda T. (1992) Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol* 149, 2281-2285.

Goldfarb A. N., Goueli S., Mickelson D. and Greenberg J. M. (1992) T-cell acute lymphoblastic leukemia-the associated gene SCL/tal codes a 42kd nuclear phosphoprotein. *Blood* 80, 2858-2866.

Goldfarb A. N. and Lewandowska K. (1994) Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein *via* heterodimerization with a nuclear localizing partner. *Experimental Cell Research* 214, 481-485.

Goldfarb A. N. and Lewandowska K. (1995) Inhibition of cellular differentiation by the SCL/Tal oncoprotein: transcriptional repression by an Id-like mechanism. *Blood* 85, 465-471.

Green A. R., Deluca E. and Begley C. G. (1991a) Antisense SCL suppresses self-renewal and enhances spontaneous erythroid differentiation of the human leukaemic cell line K562. *EMBO J.* 10, 4153-4158.

Green A. R., Lints T., Visvader J., Harvey R. and Begley C. G. (1992) SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* 7, 653-660.

Green A. R., Salvaris E. and Begley C. G. (1991b) Erythroid expression of the "helix-loop-helix" gene SCL. *Oncogene* 6, 475-479.

Gregor P. D., Sawadogo M. and Roeder R. G. (1990) The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev* 4, 1730-1740.

Gregory C. D., Dive C., Henderson S., Smith C. A., Williams G. T., Gordon J. and Rickinson A. B. (1991) Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature* 349, 612-614.

Gregory C. J. (1976) Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J. Cell Physiol* 89, 289-302.

Grepin C., Robitaille L., Antakly T. and Nemer M. (1995) Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks *in vitro* cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 15, 4095-4102.

Grepin C. and Nemer M. (1996) Development arrest and apoptosis of precardiac muscle cells deficient in the GATA-4 transcription factor. Submitted

Hawley R. G., Lieu F. H. L., Fong A. Z. C. and Hawley T. S. (1995) Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther* 1, 136-138.

Henthorn P. M., Kiledjian M. and Kadesch T. (1990) Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer μ E5/ κ E2 motif. *Science* 247, 467-470.

Hinchliffe J. R. and Thorogood P. V. (1974) Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of *talpid3* (*ta3*) mutant chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 31, 747-760.

Hengartner M. O., Ellis R. E. and Hovitz H. R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.

Hoang T., Paradis E., Brady G., Billia F., Nakahara K., Iscove N. N. and Hirsch I. R. (1996) Opposing effects of the basic Helix-Loop-Helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 87, 102-111.

Hockenbery D. G., Nunez G., Milliman C., Schreiber R. D. and Korsmeyer S. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.

Hofmann T. J. and Cole M. D. (1996) The TAL1/SCL basic helix-loop-helix protein blocks myogenic differentiation and E-box dependant transactivation. *Oncogene* 13, 617-624.

Hsu H. L., Cheng J. T., Chen Q. and Baer R. (1991) Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* 11, 3037-3042.

Hsu H. L., Huang L., Tsan T., Funk W., Wright W. E., Hu J. S., Kingston R. E. and Baer R. (1994a) Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* 14, 1256-1265.

Hsu H. L., Wadman I., Tsan J. T. and Baer R. (1994b) Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5947-5951.

Hsu H. L., Wadman I. and Baer R. (1994c) Formation of *in vivo* complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3181-3185.

Hu Q., Trevisan M., Xu Y., Dong W., Berger S. A., Lyman S. D. and Minden M. D. (1995) C-Kit expression enhances the leukemogenic potential of 32D cells. *Journal of Clinical Investigation* 95, 2530-2538.

Hu Y. E., Luscher B., Admon A., Mermod N. and Tijan R. (1990) Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev* 4, 1741-1752.

Huang E., Nocka K., Beier D. R., Chu T. Y., Buck J., Lahm H. W., Wellner D., Leder P. and Besmer P. (1990) The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the Wlocus. *Cell* 63, 225-233.

Hwang L. Y., Siegelman M., Davis L., Oppenheimer-Marks N. and Baer R. (1993) Expression of the TAL1 proto-oncogene in cultured endothelial cells and blood vessels of the spleen. *Oncogene* 8, 3043-3046.

Jan Y. N. and Jan L. Y. (1993) HLH proteins, fly neurogenesis and vertebrate myogenesis. *Cell* 75, 827-830.

Jans D. A., Moll T., Nasmyth K and Jans P. (1995) Cyclin-dependent kinase site-regulated signal-dependent nuclear localization of the SW15 yeast transcription factor in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17064-17067.

Janssen J. W. G., Ludwig W. D., Sterry W. and Bartram C. R. (1993) SIL-TAL1 deletion in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 7, 1204-1210.

Kadesch T. (1993) Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Diff* 4, 49-55.

Kallianpur A. R., Jordan J. E. and Brandt S. J. (1994) The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hemopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83, 1200-1208.

Kees U. R. and Asman L. K. (1995) Synergistic action of interleukin-2 and Steel factor (SLF) on a human T lymphoblastoid cell line. *Leukemia* 9, 1046-1050.

Kelliher M. A., Seldin D. C. and Leder P. (1996) Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by sasein kinase II α . *EMBO J* 15, 5160-5166.

Kerr J. F., Wyllie A. H. and Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. (Revue) *Br J Cancer* 26, 239-257.

Keshet E., Lyman S. D., Williams D. E., Anderson D. M., Jenkins N. A., Copeland N. G. and Parada L. F. (1991) Embryonic RNA expression patterns of the c-Kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO Journal* 10, 2425-2435.

Kiefer M. C., Brauer M. J., Powers V. C., Wu J. J., Umansky S. R., Tomei L. D. and Barr P. J. (1995) Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homolog Bak. *Nature* 374, 736-739.

Kitamura T., Tange T., Terasawa T., Chiba S., Kuwaki T., Miyagawa K., Piao Y. F., Miyazono K., Urabe A. and Takaku F. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependly on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140, 323-334.

Kitayama H., Tsujimura T., Matsumura I., Oritani K., Ikeda H., Ishikawa J., Okabe M., Suzuki M and Yamamura K. (1996) Neoplastic transformation of normal hematopoetic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase. *Blood* 88, 995-1004.

Koury M (1992) Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis (Revue) *Exp Hematol* 20, 391-394.

Kikuchi A., Hayashi Y., Kobayashi S., Hanada R., Moriwaki K., Yamamoto K., Fujimoto J., Kaneko Y. and Yamamori S. (1993) Clinical significance of TAL1 gene alteration in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Leukemia* 7, 933-938.

Kozopas K. M., Yang T., Buchan H. L., Zhou P. and Craig R. W. (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL-2. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S. A.* 90, 3516-3520.

Krajewska W. A. (1992) Regulation of transcription in eukaryotes by DNA-binding proteins. *Int J Biochem* 25, 1885-1898.

Kubota A., Okamura S., Shimoda K., Harada M. and Niho Y. (1994) The c-Kit molecule and the surface immunophenotype of human acute leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 14, 421-428.

Latchman D. S. (1991) *Eukaryotic transcription factors*. London: Academic Press.

Lassar A. B., Patterson B. M. and Weintraub H. (1986) Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* 47, 649-656.

Lassar A. B., Buskin J. N., Lockshon D., Davis R. L., Apone S., Hauschka S. D. and Weintraub H. (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-831.

Lecointe N., Bernard O., Naert K., Joulin V., Larson C. J., Romeo P. H. and Mathieu-Mahul D. (1994) GATA- and SP1-binding sites are required for full activity of the tissue specific promoter of the tal-1 gene. *Oncogene* 9, 2623-2632.

Lee J. E., Hollenberg S. M., Snider L., Turner D. L., Lipnick N. and Weintraub H. (1995) Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844

Leroy-Viard K., Vinit M. A., Lecointe N., Jouault H., Hibner U., Romeo P. H. and Mathieu-Mahul D. (1995) Loss of TAL-1 protein activity induces premature apoptosis of Jurkat leukemic T cells upon medium depletion. *EMBO J* 14, 2341-2349.

Li L., Zhou J., James G., Heller-Harrison R., Czech M. P. and Olson E. N. (1992) FGF inactivates myogenic Helix-Loop-Helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains. *Cell* 71, 1181-1194.

Li C. L. and Johnson G. R. (1994) Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* 84, 408-414.

Lin E. Y., Orlofski A., Berger M. S. and Prystowski M. B. (1993) Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early response gene with sequences similarity to bcl-2. *Immunol* 151, 1979-1988.

Linette G. P. and Korsmeyer S. J. (1994) Differentiation and cell death: lessons from the immune system. (Revue) *Curr Opin Cell Biol* 6, 809-815.

Liu Y. J., Joshua D. E., Williams G. T., Smith C. A. Gordon J. and MacLennan I. C. (1989) Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342, 929-931.

Macintyre E. A., Smit L., Ritz J., Kirsch I. R. and Strominger J. A. (1992) Disruption of the SCL locus in T-lymphoid malignancies correlates with commitment to the T-cell receptor $\alpha\beta$ lineage. *Blood* 80, 1511-1520.

Mahajan M. A., Park S. T. and Sun X. H. (1996) Association of a novel GTP binding protein, DRG, with TAL oncogenic proteins. *Oncogene* 12, 2343-2350.

Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner K., Mark M., Chambon P. and Evans R. M. (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835-839.

Marais R., Wynne J. and Treisman R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-393.

Markowitz D., Goff S. and Bank A. (1988) Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167, 400-406.

Martin D. P., Schmidt R. E., DiStefano P. S., Lowry O. H., Carter J. G. and Johnson E. M. (1988) Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 106, 829-844.

Martin F. H., Suggs S. V., Langley K. E., Lu H. S., Ting J., Okino K. H., Morris C. F., McNiece I. K., Jacobsen F. W., and Mendiaz E. A. (1990) Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* 63, 203-211.

Mattei S., Colombo M. P., Melani C., Silvani A., Pharmiani G. and Herlyn M. (1994) Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *International Journal of Cancer* 56, 853-857.

Matsui Y., Zsebo K. M. and Hogan B. L. M. (1990) Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* 347, 667-669.

Matzinger P. (1991) The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* 145, 185-192.

McConkey D. J., Hartzell P., Amador-Perez J. F., Orrenius S. and Jondal M. (1989) Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol* 143, 1801-1806.

McConkey D. J., Hartzell P., Chow S. C., Orrenius S. and Jondal M. (1990) Interleukine 1 inhibits T cell receptor-mediated apoptosis in immature thymocytes. *J Biol Chem* 265, 3009-3011.

McDonnell T. J. and Korsmeyer S. J. (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14:18). (1991) *Nature* 349, 281-283.

McDonnell T. J., Deane N., Platt F. M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J. P. and Korsmeyer S. J. (1989) *Cell* 57, 79-88.

Mellentin J. D., Smith S. D. and Cleary M. L. (1989) Lyl-1, a novel gene altered by a chromosomal translocation in a T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell* 58, 77-83.

Miller B. A., Floros J., Cheung J. Y., Wojchowski D. M., Bell L., Begley C. G., Elwood N. J. and Kreider J. and Christian C. (1994) Steel factor affects SCL expression during normal erythroid differentiation. *Blood* 84, 2971-2976.

Miner J. H. and Wold B. (1990) Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1089-1093.

Moll J., Eibel H., Schmid P., Sansig G., Botteri F., Palacios R. and Putten H. V. (1992) Thymic hyperplasia in transgenic mice caused by immortal epithelial cells expressing c-Kit ligand. *Eur. J. Immunol.* 22, 1587-1594.

Moore MSA. and Metcalf D. (1970) Ontogeny of the haemopoietic system: Yolk sac origin in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279.

Mouthon M. A., Bernard O., Mitjavila M. T., Romeo P. H., Vainchenker W. and Mathieu-Mahul D. (1993) Expression of tal-1 and GATA binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81, 647-655.

Mucenski M. L., McLain K., Kier A. B., Swerdlow S. H., Schreiner C. M., Miller T. A., Ptetryga D. W., Scott J. W. Jr and Potter S. S. (1991) A functional c-myb gene is required for normal fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677.

Murohashi I., Endoh K., Feng M., Yoshida K., Hirota H., Yoshida S., Jinnai I., Bessho M. and Hirashima K. (1995) Roles of stem cell factor in the vitro growth of

blast clonogenic cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Journal of Interferon & Cytokine research* 15,829-835.

Murre J. H., McCaw P. S. and Baltimore D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughter-less, MyoD, and myc protein. *Cell* 56, 777-783.

Murre C., McCaw P. S., Vaessin H., Caudy M., Jan L. Y., Jan Y. N., Cabrera C. V., Buskin J. N., Hauschka S. D., Lassar A. B., Weintraub H. and Baltimore D. (1989b) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor (Revue) *Cell* 88, 355-365.

Nakayama H., Kuroda H., Fujita J. and Kitamura Y. (1988a) Studies of SI/SId in equilibrium with +/+ mouse aggregation chimaeras. I. Different distribution patterns between melanocytes and mast cells in the skin. *Development* 102, 107-116.

Nakayama H., Kuroda H., Onoue H., Fujita J., Nishimune Y., Matsumoto K., Nagano T., Suzuki F and Kitamura Y. (1988b) Studies of SI/SId in equilibrium with +/+ mouse aggregation chimaeras. II. Effect of the steel locus on spermatogenesis. *Development* 102, 117-126.

Neilan J. G., Lu Z., Afonzo C. L., Kutish G. F., Sussman M. D. and Rock D. L. (1993) An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and Epstein-Barr virus gene BHRF1. *J. Virol* 67, 4391-4394.

Nocka K., Majumder S., Chabot B., Ray P., Cervone M., Bernstein A. and Besmer P. (1989) Expression of c-Kit gene products in known cellular targets of W

mutations in normal and *W* mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes & Development* 3, 816-826.

Nuez B., Michalovich D., Bygrave A., Ploemacher R. and Grosveld F: (1995) Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLf gene. *Nature* 375, 316.

Ofir R., Dwarki V. J., Rashid D. and Verma I. M. (1990) Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* 348, 80-86.

Ogawa M., Matsuzaki Y., Nishikawa S., Hayashi S., Kunisada T., Sudo T., Kina T., Nakauchi H. and Nishikawa S. (1991) Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 174, 63-71.

Ogawa M., Nishikawa S., Yoshinaga K., Hayashi S. I., Kunisada T., Nakao J., Kina T., Sudo T., Kodama H. and Nishikawa T. S. I. (1993) Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* 117, 1089-1098.

Okuda T., van Deursen J., Hiebert S. W., Grosveld G. and Downing J. R. (1995) AML-1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal murine fetal liver hematopoiesis. *Blood* 86, 596a.

Oltvai Z. N., Millman C. L. and Korsmeyer S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.

Oppenheim R. W., Haverkamp L. J., Prevet D., McManaman J. L. and Appel S. H. (1988) Reduction of naturally occurring motoneuron death in vivo by a target-derived neurotrophic factor. *Science* 240, 919-922.

Orkin S. H. (1995) Hematopoiesis: how does it happen? (Review) *Current Opinion in Cell Biology* 7, 870-877.

Orr-Urtreger A., Avivi A., Zimmer Y., Givol D., Yarden Y. and Lonai P. (1990) A proto-oncogene encoded by the *W* locus. *Development* 109, 911-923.

Osada H., Grutz G., Axelson H., Forster A. and Rabbitts T. H. (1995) Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9585-9589.

Palacios R and Nishikawa S. I. (1992) Developmentally regulated cell surface expression and function of c-Kit receptor during lymphocyte ontogeny in the embryo and adult mice. *Development* 115, 1133-1147.

Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L. and Baltimore D. (1990) Production of high-titer helper free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8392-8396.

Perkins A. C., Sharpe A. H. and Orkin S. H. (1995) Lethal β -thalassemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375, 318.

Pevny L., Lin C., D'Agati V., Simon M. C., Orkin S. H. and Costantini F. (1995) Development of hemopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121, 163-172.

Pevny L., Simon M. C., Robertson E., Klein W. H., Tsai S. F., D'Agati V., Orkin S. H. and Costantini F. (1991) Erythroid differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.

Picchazyk M., Blanchard J. M., Marty L., Dani C. Panabieres F., El Sabouty S., Fort P. and Jeanteur P. (1984) Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res* 12, 6951-6963.

Porcher C., Swat W., Rockwell K., Fujiwara Y., Alt F. W. and Orkin S. H. (1996) The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 85, 47-57.

Prasad K. S. S., Jordan J. E., Koury M. J., Bondurant M. C. and Brandt S. J. (1995) Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 11603-11611.

Price J. M., Donahoe P. K., Ito Y. and Hendren W. H. (1977) Programmed cell death in the Mullerian duct induced by Mullerian inhibiting substance. *Am J Anat* 170, 123-134.

Pulford K., Lecoite N., Leroy-Viard K., Jones M., Mathieu-Mahul D. and Mason D. Y. (1995) Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* 85, 675-684.

Qiu F. H., Ray P., Brown K., Barker P. E., Jhanwar S., Ruddle F. H. and Besmer P. (1988) Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family-oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 7, 1003-1111.

Rajotte D., Haddad P., Haman A., Cragoe E. J. and Hoang T. (1992) Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J Biol Chem* 267, 9980-9987.

Rao L., Debbas M., Sabbattini P., Hockenberry D., Korsmeyer S. and White E. (1992) The adenovirus E1A proteins induces apoptosis which is inhibited by the E1B 19K and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7742-7746.

Ratajczak M., Luger S. M., Deriel K., Abraham J., Calabretta B. and Gewirtz A. M. (1992) Role of the Kit protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1710-1714.

Reynolds J. E., Yang T., Qian L. P., Jenkinson J. D., Zhou P., Eastman A. and Craig R. W. (1994) MCL-1, a member of the bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 54, 6348-6352.

Rhodes S. J. and Konieczny S. F. (1989) Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* 3, 2050-2061.

Robb L., Lyons I., Li R., Hartley L., Harvey R. P., Kontgen F. and Begley C. G. (1995a) Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the SCL gene. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7075-7079.

Robb L., Rasko J. E., Bath M. L., Strasser A. and Begley C. G. (1995b) SCL, a gene frequently activated in human T cell leukemia, does not induce lymphomas in transgenic mice. *Oncogene* 10, 205-209.

Robb L., Elwood N. J., Elefanty A. G., Kontgen F., Li R., Barnett L. D. and Begley C. G. (1996) The Scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J* 15, 4123-4129.

Rockman S., Begley C. G., Kannourakis G., Mann G. J., Dobrovic A. N., Kefford R. F. and McGrath K. (1992) SCL gene in human tumours. *Leukemia* 6, 623-625.

Rodriguez-Tarduchy G., Collins M. and Lopez-Rivas A. (1990) Regulation of apoptosis in interleukine-3-dependent hemopoietic cells by interleukine-3 and calcium ionophores. *EMBO J* 9, 2997-3002.

Roeder R. G. (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci* 16, 402-408.

Rosenthal N. (1994) Regulation of gene expression. (revue) *N Engl J Med* 331,931-933.

Royer-Pokora B., Loos U. and Ludwig W. D. (1991) Tgt-2, a new gene encoding a cystein-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukemia with the t(11;14)9p13;q11). *Oncogene* 6, 1887-1893.

Russell E. S. (1979) Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. (revue) *Adv Genet* 20, 357-459.

Sabourin L. A. and Hawley R. G. (1990) Suppression of programmed death and G1 arrest in B-cell hybridomas by interleukin-6 is not accompanied by altered expression of immediate early response genes. *J Cell Physiol* 145, 564-574.

Sanchez-Garcia I. and Rabbitts T. H. (1994) Transcriptional activation by TAL-1 and FUS-CHOP proteins expressed in acute malignancies as a result of chromosomal abnormalities. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7869-7883.

Sawa C., Goto M., Suzuki F., Watanabe H., Sawada J. and Handa H. (1996) Functional domains of transcription factor hGABP beta1/E4TF1-53 required for nuclear localization and transcription activation. *Nucleic Acids Research* 24, 4954-4961.

Scott E. W., Simon M. C., Anastasi J. and Singh H: Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineage. *Science* 265, 1573.

Sekido Y., Takahashi T., Ueda R., Takahashi M., Suzuki H., Nishida K., Tsukamoto K., Hida T., Shimokata K. and Zsebo K. M. (1993) Recombinant human stem cell factor mediates chemotaxis of small-cell lung cancer cell lines aberrantly expressing the c-kit receptor protooncogene. *Cancer Research* 53, 1709-1714.

Shivdasani R. A., Mayer E. L. and Orkin S. H. (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-434.

Shivdasani R. A., Rosenblatt M. F., Zucker-Franklin D., Jackson C. W., Hunt P., Saris C. and Orkin S. H. (1995b) Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 81, 695.

Shivdasani B. A. and Orkin S. H. (1996) The transcriptional control of hematopoiesis (*Revue*) *Blood* 87, 4025-4039.

Shi Y., Sahai B. M. and Green D. R. (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 339, 625-626.

Siitonen T., Savolainen E. R. and Koistinen P. (1994) Expression of the c-kit proto-oncogene in myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 8, 631-637.

Siitonen T., Lundstrom M., Zheng A., Savolainen E. R. and Koistinen P. (1996) Effect of mast cell growth factor on clonogenic blast cell growth in acute myelogenous leukemia. *Annals of Hematology* 73, 71-78.

Smith C. A., Williams G. T., Kingston R., Jenkinson E. J. and Owen J. J. (1989) Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 337, 181-214.

Spivak J. L., Pham T., Isaacs M. and Hankins W. D. (1991) Erythropoietin is both a mitogen and a survival factor. *Blood* 77, 1228.

Spooer E., Fairbairn L. J., Cowling G. J., Dexter T. M., Whetton A. D. and Owen-Lynch P. J. (1994) Biological consequences of p160v-abl protein tyrosine kinase activity in a primitive, multipotent haemopoietic cell line. *Leukemia* 8, 620-630.

Stock W., Westbrook C. A., Sher D. A., Dodge R., Sobol R. E., Wurster-Hill D., Davey F. R., Larson R. A., LeBeau M. M., Aplan P. D., Frankel S. R., Stewart C. C. and Bloomfield C. D. (1995) Low incidence of TAL1 gene rearrangements in adult acute lymphoblastic leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Clin. Cancer Res.* 1, 459-463.

Tanigawa T., Elwood N. E., Metcalf D., Cary D., Deluca E., Nicola N. A. and Begley C. G. (1993) The SCL gene product is regulated by and differentially

regulates cytokine responses during myeloid leukemic cell differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7864-7868.

Tanigawa T., Robb L., Green A. R. and Begley C. G. (1994) Constitutive expression of the putative transcription factor SCL associated with proviral insertion in the myeloid leukemic cell line WEHI-3BD. *Cell Growth Diff.* 5, 557-561.

Tavassoli M (1991) Embryonic and fetal hemopoiesis: An overview. (Review) *Blood Cells* 1, 269.

Therrien M. M. and Drouin J. (1993) Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13, 2342-2346.

Tsai S. F., Martin D. I., Zon L. I., D'Andrea A. D., Wong G. G. and Orkin S. H. (1989) Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339, 446-451.

Tsai F. Y., Keller G., Kuo F. C., Weiss M., Chen J., Rosenblatt M., Alt F. W. and Orkin S. H. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

Tso J. Y., Sun X. H., Kao T. H., Reece K. S. and Wu R. (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13, 2485-2502.

Tsulis Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E. and Croce C. M. (1985) The t(14;18) chromosome translocations involved in B cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229, 1390-1393.

Valger-Archer V. E., Osada H., Warren A. J., Forster A., Li J., Baer R. and Rabbitts T. H. (1994) The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8617-8621.

Vaux D. L., Cory S. and Adams T. N. (1988) Bcl-2 promotes the survival of haemopoietic cells and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.

Vaux D. L., Weissman I. L. and Kim S. K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Nature* 258, 1955-1957.

Voronova A. F. and Lee F. (1994) The E2A and tal-1 helix-loop-helix proteins associate *in vivo* and are modulated by Id proteins during interleukin 6-induced myeloid differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5952-5956.

Wadman I., Li J., Bash R. O., Forster A., Osada H., Rabbitts T. H. and Baer R. (1994a) Specific *in vivo* association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J.* 13, 4831-4839.

Wadman I. A., Hsu H. L., Cobb M. H. and Baer R. (1994b) The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* 9, 3713-3716.

Wadman I. A., Osada H., Grütz G. G., Agulnick A. D., Westphal H., Forster A. and Rabbitts T. H. (1997) The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NL1 proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.

Warren A. J., Colledge W. H., Carlton M. B. L., Evans M. J., Smith A. J. H. and Rabbitts T. H. (1994) The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein Rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.

Weiss M. J., Keller G. and Orkin S. H. (1994) Novel insights into erythroid development revealed through *in vitro* differentiation of GATA-1-embryonic stem cells. *Genes Dev.* 8, 1184-1197.

Weiss M. J. and Orkin S. H. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hemopoiesis. *Exp. Hematol.* 23, 99-107.

Weiss M. J. and Orkin S. H. (1995b) Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9623-9627.

Wells S. J., Bray R. A., Stempora L. L. and Farhi D. C. (1996) CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *American Journal of Clinical Pathology* 106, 192-195.

Williams D. E., Eisenman J., Baird A., Rauch C., Van Ness K., March C. J., Park L. S., Martin U., Mochizuki D. Y., and Boswell H. S. (1990) Identification of a ligand for the c-Kit proto-oncogene. *Cell* 63, 167-174.

Williams G. T., Smith C. A., Spooner E., Dexter T. M. and Taylor D. R. (1990b) Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343, 76-79.

Williams M. E., Quesenberry P. J. (1992) Hematopoietic growth factors. In Stass SA (ed) Marcel Dekker, Inc., New York: Hematologic Pathology. 6, 105-124.

Wilson D. E. (1996) Transcription Factor: Regulators of gene expression in normal and pathological states. *Annals of Medicine* 28, 1-3.

Wolf S. S. and Cohen A. (1992) Expression of cytokines and their receptors by human thymocytes and thymic stromal cells. *Immunology* 77, 362-368.

Wright W. E., Sasson D. A. and Lin V. K. (1989) Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607-617.

Wu H., Klingmüller U., Besmer P. and Lodish H. F. (1995) Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors *Nature* 377, 242-246.

Wyllie A. H., Kerr J. F. R. and Currie A. R. (1980a) Cell death, the significance of apoptosis. (*Revue*) *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Wyllie A. H. (1980b) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.

Xia Y., Brown L., Tsan J. T., Yang C. Y., Siciliano M. J., Crist W. M., Carroll A. J. and Baer R. (1992) The translocation (1;14)(p34;q11) in human T-cell leukemia: chromosome breakage 25 kilobase pairs downstream of the TAL1 protooncogene. *Genes Chrom. Cancer* 4, 211-216.

Yang T., Kozopas K. M. and Craig R. W. (1995) The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-2 overlap with but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol* 128, 1173-1184.

Yarden Y., Kuang W. J., Yang-Feng T., Coussens L., Munemitsu S., Dull T. J., Chen E., Schlessinger J., Francke U. and Ullrich A. (1987) Human pro-oncogene

c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6, 3341-3351.

Yarden Y. and Ullrich A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. (revue) *Ann Rev Biochem* 57, 443-478.

Yee N. S., Hsiao C. W. M., Serve H., Vosseller K. and Besmer Peter. (1994) Mechanism of Down-regulation of c-Kit Receptor. *J. Biol. Chem* 269, 31991-31998.

Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A. and Oren M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.

Yuan J., Angelucci E., Lucarelli G. *et al.* (1993a) Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors with severe β -thalassemia. *Blood* 82, 374-377.

Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M. and Horvitz H. R. (1993b) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian-interleukin- 1β -convertingenzyme. *Cell* 75, 641-652.

Zon L. (1995) Developmental biology of hematopoiesis. (Revue) *Blood* 86, 2876.

Zsebo K. M., Williams D. A., Geissler E. N., Broudy V. C., Martin F. H., Atkins H. L., Hsu R. Y., Birkett N. C., Okino K. H., and Murdock D. C. (1990a) Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63, 213-224.

Zsebo K. M., Wypych J., McNiece I. K., Lu H. S., Smith K. A., Karkare S. B., Sachdev R. K., Yuschenkoff V. N., Birkett N. C., and williams L. R. (1990b) Cell 63, 195-201.