

## 特约综述



哺乳动物出生后组织器官的更新和再生均依赖于成体干细胞。成体干细胞的静息、激活、增殖和分化均受到严格的调控,以保障有机体组织器官更新和再生的有序进行,避免细胞癌化。本课题组利用生物化学、细胞生物学、生理学、基因组和蛋白质组学以及显微成像技术,以肌肉干细胞为模式系统,研究成体干细胞的命运调控机制,以及成体干细胞在病理条件下命运决定的改变。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=136>

## Forkhead转录因子调控干细胞的命运决定

尹杰 易玉吟 傅鑫 胡苹\*

(细胞生物学国家重点实验室(筹),中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

**摘要** Forkhead蛋白是一类在进化上高度保守的重要转录因子家族。目前,已经发现超过100种编码Forkhead蛋白的基因, Forkhead蛋白的典型结构特征是含有Forkhead结构域,即一段由100个氨基酸组成的进化上保守的“Forkhead”DNA结合序列。Forkhead蛋白的主要功能包括调控与胚胎发育、细胞生长、增殖、分化、干细胞干性保持、应激反应、语言形成以及长寿相关基因的表达。Forkhead基因的突变或者调控异常会导致发育缺陷以及肿瘤形成。因此,对于不同Forkhead蛋白家族成员功能的深入研究,有助于更好地揭示相关疾病的发病机制,为针对这些疾病的预防和治疗提供理论依据。该文对国内外Forkhead蛋白在干细胞中的主要功能方面的研究成果进行了总结,综述了近年来的最新研究成果。

**关键词** Forkhead蛋白; 干细胞; 转录调控; FoxO蛋白; 信号通路

Forkhead转录因子在果蝇中首次发现,它们都携带100个氨基酸的称为“Winged helix”或者“Forkhead”的DNA结合结构域。Forkhead结构域在真核生物中十分保守,存在于从酵母到人类已发现的超过100个Forkhead蛋白中<sup>[1-2]</sup>。Forkhead蛋白的种类在进化过程中逐渐增多,例如:酿酒酵母基因组中仅含有6个具有Forkhead结构域的蛋白,而人类基因组则含有超过40种Forkhead蛋白<sup>[3]</sup>。Forkhead转录因子在调控个体发育、代谢、免疫、癌症发生、应激反应、语言形成以及细胞周期方面均发挥重要的作用。除了可以直接结合DNA之外, Forkhead转录因子还与多种信号通路中的激酶或其它成员有直接的相互作用,从而在信号转导与转录调控之间发挥承上启下的桥梁作用。近年来的研究阐明了一些指导Forkhead转录因子发挥功能的信号通路,以及Forkhead转录因子调控基因表达的机制,使得我们可以

深入了解Forkhead家族不同成员在不同细胞类型中的功能<sup>[4]</sup>。本文将详细介绍Forkhead功能研究的一些最新进展。

### 1 Forkhead家族成员的分类

自从在果蝇中发现了Forkhead家族的第一个成员,越来越多的编码Forkhead蛋白的基因在不同物种中被发现。然而,各个实验室使用的命名和分类方式并不相同,使得相关文献阅读和命名新的Forkhead家族成员变得十分困难。1998年11月,在美国加利福尼亚La Jolla举办的有关Forkhead/Winged helix的国际会议上提出了对Forkhead蛋白进行标准化命名的

国家自然科学基金(No.31171420)、中国科学院“百人计划”(No.2012OHTP02)、中国科学院干细胞战略先导科技专项(No.XDA01010204)和上海市“浦江人才”(No.12PJ1409700)资助项目

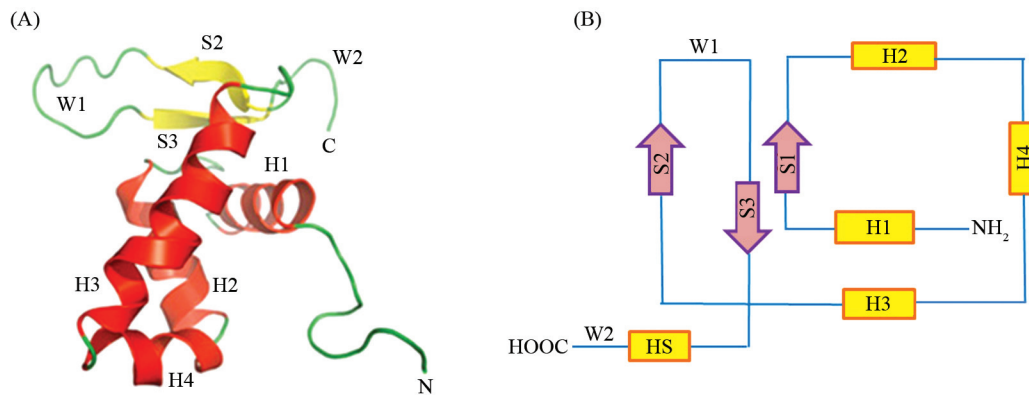
\*通讯作者。Tel: 021-54921254, E-mail: hup@sibcb.ac.cn

系统<sup>[3]</sup>。目前, 研究人员统一采用Fox(Forkhead box)代表所有脊索动物的Forkhead转录因子。根据系统生物学分析将Forkhead蛋白按照DNA结合结构域的氨基酸序列的特征分为独立的19个亚类<sup>[3,5]</sup>, 以英文字母(A-S)区别; 同一个亚类的不同成员则以阿拉伯数字进行区分, 即“Fox, subclass N, member X”。蛋白名字所有字母大写表示人源(FOXD3), 仅首字母大写代表鼠源(Foxd3), 首字母和子类字母大写代表所有其他脊索动物的FOX蛋白(FoxD3)<sup>[3]</sup>。例如: Foxd3代表鼠源Forkhead因子, D亚家族, 成员3。

## 2 Forkhead蛋白的结构特征

所有Forkhead蛋白都有高度保守的DNA结合结构域, 研究人员已经通过X射线结晶学和核磁共振(NMR)的方法解析出多种Forkhead转录因子的DNA结合结构域的三维结构。这些Forkhead DNA结合结构域的三维结构高度保守, 十分像蝴蝶的形状, 含

有螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix)结构, 与两侧的环共同形成“翼状螺旋(winged-helix)”结构域。大部分Forkhead结构域由三个 $\alpha$ -螺旋、三个 $\beta$ -折叠和两个环以 $\alpha 1-\beta 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 2-W 1-\beta 3-W 2$ 的顺序组成(图1)<sup>[4,6-8]</sup>。Forkhead蛋白之间序列特异性区别的结构基础依然不清楚。与大多数螺旋-环-螺旋蛋白相反, Forkhead蛋白以单体形式结合DNA, 它们的识别位点大约有15~17个碱基对, 是非对称的<sup>[5]</sup>。大多数Forkhead蛋白识别的核心序列是RYMAAYA(R=A或G; Y=C或T; M=A或C)一致序列, 核心区域旁边的DNA序列也对保证Forkhead转录因子的高特异性结合具有重要作用。三维结构分析表明, Forkhead蛋白与DNA的特异性结合是通过第三个螺旋与DNA大沟(major groove)直接结合而实现的。另外, 第二个环与小沟结合也可以影响蛋白-DNA相互作用(图2)<sup>[4,9-10]</sup>。与Forkhead结构域的高度保守性相反, Forkhead蛋白家族成员在DNA结合结构域外不存在任何相似性。



长方形代表 $\alpha$ -螺旋, 箭头代表 $\beta$ -折叠。

The yellow squares represent  $\alpha$ -helix, arrows represent  $\beta$ -sheet.

图1 Forkhead DNA结合结构域的三维结构示意图(根据参考文献[4,6-8]修改)

Fig.1 3D structure of Forkhead DNA binding domain(modified from references [4,6-8])

## 3 Forkhead蛋白的主要功能

Forkhead蛋白的结合DNA结构域和DNA识别基序有着高度的相似性, 但不同子类家族有着不同的功能。Forkhead蛋白的序列在Forkhead结构域以外几乎不存在相似性。尤其在进化过程中, 随着基因复制事件, 会产生新的成员并获得不同的功能。然而, Forkhead蛋白在长期的进化过程中功能上依然存在重叠和冗余。例如: Foxa1和Foxa2在肝脏发育和肺部发育中共同发挥作用。Forkhead蛋白功能上的差异一方面取决于与之相互作用原件, 如修饰酶和辅

助因子, 另一方面取决于Forkhead基因的时空表达形式<sup>[11]</sup>。下面主要讨论Forkhead蛋白在细胞周期、代谢过程、免疫过程以及胚胎发育中的调控作用。

### 3.1 细胞周期

*FoxM1*基因在增殖细胞中高表达, *FoxM1*蛋白的活性也受细胞周期的调控。从*Foxm1*基因敲除的小鼠中分离出的细胞表现出有丝分裂的缺陷, 调控进入有丝分裂的相关基因表达异常, 包括CCNB(细胞周期蛋白B)、Plk1(Polo样激酶1)、cdc25(细胞分裂周期素25)以及CENP-F(动力蛋白F)。另外, *FoxM1*

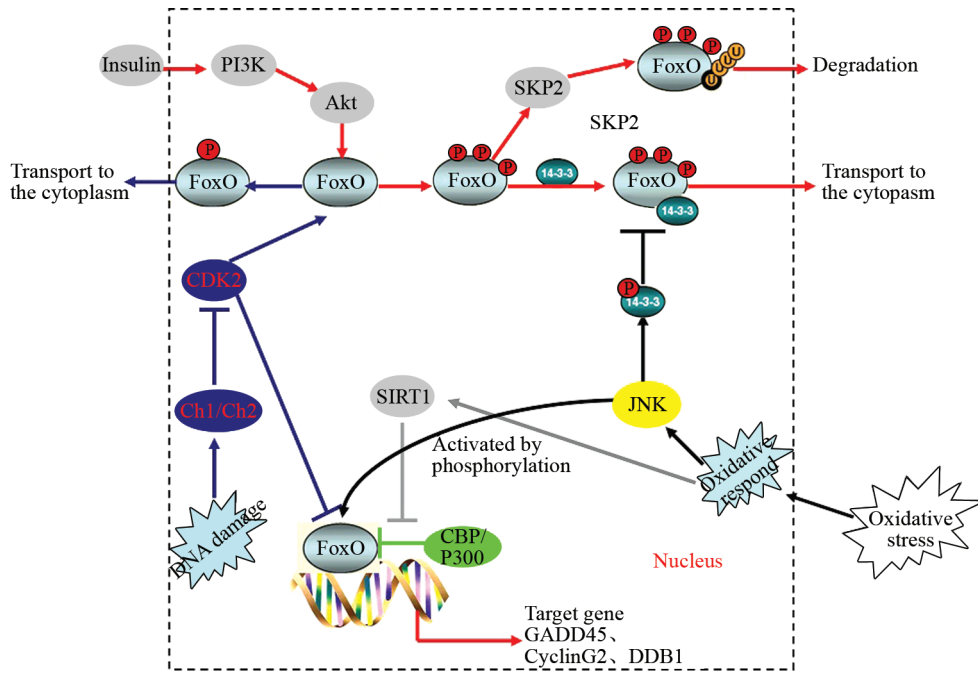


图2 FoxO蛋白的转录后修饰

Fig.2 Post translational modification of FoxO transcription factors

通过上调CDK2-激活磷酸酶*Cdc5*基因的表达和下调CKI蛋白水平调控细胞进入S期<sup>[4]</sup>。

FoxO因子在两种水平上影响细胞分裂。首先, FoxO转录因子阻止细胞进入细胞周期, 这一过程是通过调控整个细胞周期介质进行的。另一方面, 在G<sub>2</sub>期FoxO因子促进进入细胞分裂所需的*CCNB*和*Plk1*基因的表达。然而, Fox因子也能通过调控GADD45a(生长停止和DNA损伤诱导因子34)延迟G<sub>2</sub>期并组织细胞进入分裂期。FoxO因子精确调控G<sub>2</sub>期到M期的转变的机制还需要进一步研究进行探讨。另外, FoxO还通过调控促凋亡靶基因的转录, 以及阻止细胞进入细胞周期诱导细胞凋亡。

除了FoxO和FoxM1因子, 其他Fox蛋白家族成员, 例如FOXA1、Foxg1和Foxk1, 都能影响p21<sup>Cip1</sup>或p27<sup>Kip1</sup>的表达, 进而调控细胞周期, 尽管它们的激活和抑制效应不一样<sup>[12-14]</sup>。

### 3.2 代谢

包括Foxa、Foxc、Foxo亚家族在内的多种Forkhead蛋白能在细胞以及器官水平上调控代谢过程。*Foxa1*和*Foxa2*基因敲除小鼠均有低血糖症状出现。在胰岛β细胞中敲除*Foxa2*基因, 会导致低血糖和胰岛素分泌紊乱<sup>[15-16]</sup>。在肝脏中特异性敲除*Foxa2*或*Foxa3*基因都会导致葡萄糖异生途径缺陷, 造成糖代

谢紊乱, 禁食后会发生严重的低血糖现象<sup>[17-19]</sup>。进一步的研究表明, Foxa通过直接调控G6pc(glucose-6-phosphatase)、Pepck(phosphoenolpyruvate carboxykinase)、Tat(tyrosine aminotransferase)等多种参与糖代谢的酶的表达式, 在胰岛素分泌和体内葡萄糖平衡的调节过程中起到重要的作用<sup>[16,20]</sup>。最近研究表明, 在肝脏中Foxa2与脂肪代谢也有关<sup>[21]</sup>。

FoxO亚家族成员在代谢调控中占有重要地位<sup>[22-23]</sup>。FoxO因子的活性受到胰岛素及其下游信号通路的调控, 在高胰岛素情况下, FoxO被胰岛素下游的Akt激酶磷酸化, 转运至细胞质中, 从而失去转录活性<sup>[24]</sup>。FoxO直接调控G6pc、Pepck等糖代谢相关酶的表达, 同时可以通过激活PGC-1的表达, 抑制PPARγ的表达, 而促使细胞在营养缺乏的条件下, 由主要消耗糖转为主要消耗脂肪<sup>[25-26]</sup>。在调控糖代谢的过程中, FoxO与Foxa的关系如何目前还不清楚。

Foxc2主要在白色和棕色脂肪中表达, 对能量储存和脂肪代谢的调控起重要作用。Foxc与Foxo、foxa共同调控机体的胰岛素反应和脂肪代谢<sup>[27]</sup>。*Foxc2*转基因小鼠的脂肪含量极低, 并且对胰岛素非常敏感<sup>[28-29]</sup>; 同时, Foxc2还可以通过调节蛋白激酶A(protein A kinase)信号通路, 减少脂肪组织中的白色脂肪含量, 提高褐色脂肪含量<sup>[29]</sup>。

### 3.3 胚胎发育

多种Forkhead转录因子对早期胚胎发育起重要的调控作用。例如, Foxh作为Nodal信号通路下游的转录因子负责执行激活Nodal靶基因的任务<sup>[30]</sup>。Mix2、lim1、gooseoid、lefty2、Nodal、pitr2等对原肠胚发育和中线结构的形成起关键作用的基因都受到Foxh的直接调控<sup>[31]</sup>。Foxh1基因缺失的小鼠表现多种体轴发育缺陷<sup>[32-33]</sup>。另一个Forkhead因子——Foxj1在纤毛细胞中特异表达, 通过调控多种纤毛细胞的功能而影响左右对称性的建立和其它早期发育过程<sup>[34]</sup>。

在早期器官形成过程中, Forkhead蛋白决定三胚层, 特别是内胚层和中胚层的形成。Foxa2缺失会导致内胚层缺陷, 进而导致前肠畸变, 相似的表型在Foxh1基因敲除小鼠中也可以观察到<sup>[32,35]</sup>。Foxc、Foxf、foxl和Foxq在中胚层细胞中高表达, 在中胚层发育过程中, Foxc因子在背部中胚层(dorsal mesoderm)及其进一步分化成的中轴和四肢骨骼、心血管等细胞中特异性表达, 诱导轴旁中胚层(paraxial mesoderm)发育成体节<sup>[36]</sup>。Foxf则促进侧板中胚层(lateral plate mesoderm)向脏壁中胚层(splanchnic mesoderm)的分化, 进而促进间叶细胞组织和血管的形成<sup>[37]</sup>。另外, Foxf1也可能在胚外中胚层组织, 包括胎盘、羊膜、卵黄囊发育阶段起调控作用<sup>[38-39]</sup>。Foxl1在前肠的发育过程中起决定作用, Foxl1基因敲除小鼠表现出肠结构紊乱<sup>[40]</sup>。

在器官发育晚期, 许多Forkhead蛋白诱导组织特异性基因的表达, 起到调控细胞和组织分化的作用, 多种Forkhead基因突变的小鼠均表现出分化相关的发育缺陷。例如, Foxd1缺失影响支管形态形成, 肾单元形成与分化<sup>[41]</sup>; Foxi1缺失对小鼠内耳发育影响严重, 导致听力和平衡能力受损; 同时, Foxi1在肾脏发育过程中也发挥重要调控功能, 基因敲除小鼠表现出远端肾小管性酸中毒症状<sup>[42]</sup>。Foxj1在纤毛发育过程中占中心地位, 其缺失导致呼吸系统、生殖系统和中枢神经系统的发育异常<sup>[34]</sup>。Foxl2是层粒细胞分化的关键因子, 精确调控卵泡激活的时间。Foxl2缺失小鼠雌性不育<sup>[43]</sup>。Foxm1和Foxn直接介导成肝细胞分化为成胆上皮细胞群<sup>[44]</sup>。同时, Foxn1还调控胸腺和上皮细胞有丝分裂后的分化<sup>[45]</sup>; 而Foxn4则控制视网膜和脊髓神经中细胞的命运决定<sup>[46-47]</sup>。

此外, Forkhead因子还对干细胞的干性保持起重要的调控作用。例如: Foxd3可以阻止胚胎干细胞

的分化<sup>[48]</sup>; 在晶状体中Foxe3通过刺激增殖细胞分裂从而阻止其分化<sup>[49]</sup>; 神经上皮细胞中的Foxg1也起到相似作用<sup>[50]</sup>; Foxk1则可以促进肌肉祖细胞的增殖<sup>[51]</sup>。

## 4 FoxO蛋白在干细胞中的作用

FoxO在细胞周期调控、抑制癌症发生、应对氧自由基压力、代谢调控等细胞过程中发挥重要的作用<sup>[52-53]</sup>。近年来的研究表明, FoxO在干细胞的保持和分化过程也起着决定性的调控作用。下面将集中重点介绍FoxO在干细胞中的功能。

### 4.1 FoxO蛋白在胚胎干细胞中的作用

FoxO1在鼠源胚胎干细胞(mESC)和人源胚胎干细胞(hESC)中均高表达, 随着分化的起始, 其表达水平显著降低, 提示FoxO1可能会调控胚胎干细胞的干性保持<sup>[54]</sup>。Zhang等<sup>[54]</sup>通过染色质免疫沉淀(ChIP)等方法证实, 在人源和鼠源ES细胞中, FoxO1可以直接结合于Oct4和Sox2的启动子区域, 进而激活Oct4和Sox2的表达, 从而促进ES细胞的干性保持, 抑制胚胎干细胞的分化。与之相对应, 在hESC中, FoxO1基因缺失会造成干性分子标记表达降低, Branchry、GATA4、Sox17等中内胚层分子标记表达升高。虽然在FoxO1 RNAi之后的短时间内重新表达FoxO1可以使干细胞的表型恢复正常, 但是在干细胞长期缺失FoxO1的之后, 即使重新表达FoxO1也无法重新获得干细胞的干性, 说明FoxO1的长期缺失会不可逆地改变人源干细胞的性质<sup>[54]</sup>。虽然Foxo1与Foxo3在体外识别相同的DNA序列, 但是在mESC中Foxo3只结合在Oct4启动子上, 并部分调控Oct4的表达, 而不与Sox2的启动子结合。在mESC中, Foxo3缺失会造成干性分子标记表达降低, 但是与Foxo1缺失不同, 在干性丧失后Cdx2和Fgf5等外胚层分子标记表达升高。值得注意的是, Foxo3基因缺失在hESC中对干细胞干性保持和分化倾向未表现出任何影响, 提示虽然FoxO转录因子高度保守, 但是在ESC中的功能仍然具有种属特异性。与体外细胞实验不同, Foxo1基因敲除小鼠在原肠期(gastrulation)之前未表现出明显的异常, 而死于心血管发育缺陷<sup>[55]</sup>, 提示在体内的发育过程中, FoxO1促进干细胞干性保持的功能可以由FoxO3或FoxO4等其他家族成员代为行使。对于FoxOs在胚胎干细胞中的功能及其分子机制的深入研究将进一步深化我们对于胚胎干细胞干性保持调控的理解。

## 4.2 FoxOs在成体干细胞中的作用

FoxO转录因子在成体干细胞中也发挥重要的调控作用。目前的研究分别揭示了FoxO在神经、血液和肌肉干细胞中的功能。本文将逐一介绍FoxO转录因子在上述三种成体干细胞中的不同功能。

在神经干细胞(NSC)中同时敲除*Foxo1*、*Foxo3*和*Foxo4*后,在初生小鼠中,处于静息状态的NSC数量减少,进入细胞周期的NSC数目增多,导致在出生后的较短时间内小鼠大脑体积显著大于正常小鼠,同时干细胞储备减少。随着时间的推移,由于干细胞储备在出生后早期消耗过大,导致成年后小鼠的神经系统再生能力显著减弱<sup>[56-57]</sup>,提示FoxO转录因子在神经干细胞的干性保持中发挥重要的作用。基因表达谱分析表明,FoxOs通过调控多种与NSC功能相关的下游靶基因而参与NSC的干性维持。例如,FoxO1和FoxO3可以直接抑制ASPM(决定人大脑皮层大小的关键因子)的表达,从而阻止在发育过程中神经前体细胞的过度增殖,避免成体NSC的过早消耗<sup>[58]</sup>。基因芯片分析表明,FoxO在NSC中的靶基因谱与其他细胞种类(如造血干细胞、内皮细胞等)中的FoxO靶基因谱有较大的区别,提示FoxO转录因子调控NSC功能的机制具有细胞特异性<sup>[57,59-60]</sup>。基因表达谱分析表明,与氧自由基代谢相关的基因DNA损伤诱导转录因子4(Ddit4)、N-Myc下游调节基因1(*Ndr1*)、质氧化还原-1样蛋白(Ero1)和血管内皮生长因子A(*Vegfa*)在NSC中均受FoxO的调控,因而FoxO也可以通过帮助NSC抵抗氧自由基压力,促进NSC的存活,进而维持体内始终保有一定数量的NSC<sup>[56]</sup>。

FoxO转录因子是维持造血干细胞(HSC)处于静息状态及调节其细胞周期(G<sub>0</sub>到G<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>到S以及G<sub>2</sub>到M期)转换的重要分子<sup>[60-61]</sup>。在小鼠造血系统中特异性敲除*Foxo1*、*Foxo3*和*Foxo4*后,处于非静息状态的HSC的比例显著增加,同时细胞凋亡比例也显著增加,说明FoxO对于保持HSC处于静息状态,发挥至关重要的作用<sup>[60]</sup>。基因表达谱分析显示,FoxO通过调控与细胞周期相关的基因参与对HSC细胞周期的调控,如p21、p27、Rb/p130、Cyclin G2、Cyclin D2等<sup>[62-64]</sup>。同时,FoxO调节氧自由基压力是其维持HSC储备的另一个重要机制。小鼠模型证实,HSC需要微环境中低水平的氧自由基浓度以维持静息状态和自我更新<sup>[65-66]</sup>。FoxO通过上调MnSOD、catalase、

GADD45等抗氧化基因的表达,从而维持HSC的静息状态,避免HSC过早分化对HSC储备的消耗<sup>[60]</sup>。

通过对H2K-BCL-2转基因小鼠的研究发现,细胞凋亡在调节限制HSC数量上发挥重要作用。过表达抗细胞凋亡蛋白Bcl2可以使HSC数量增加,细胞周期速率大大减慢,而FoxO正是调控上述过程的重要因子<sup>[67]</sup>。在成体小鼠中特异性敲除*Foxo1*、*Foxo3*和*Foxo4*后大大增加了HSC的凋亡水平,说明FoxO可能通过降低HSC的细胞凋亡水平,而维持一定的HSC数量,并促进这些HSC保持在静息状态<sup>[60,68]</sup>。同时,FoxO1、FoxO3和FoxO4通过调节HSC的静息与增殖转换,对于血液系统的稳态维持和白血病的发生起重要的调控作用<sup>[3,69]</sup>。

FoxO转录因子在肌肉干细胞分化过程中起重要的调控作用。*Foxo3*和*Foxo4*基因敲除小鼠具有严重的肌肉再生缺陷<sup>[70]</sup>。FoxO3通过直接调控MyoD的表达参与肌肉干细胞的命运决定<sup>[70]</sup>。同时,FoxOs也是肌肉能量代谢的重要调节者。在机体能量摄入受到限制的状态下,肌肉细胞中FoxO1和FoxO3的表达增加,导致一系列与糖代谢相关的基因的表达增加,如:PDK-4、PPAR $\delta$ 、PGC1 $\alpha$ 等,进而促进肝脏糖原分解,降低胰岛素分泌,增加糖异生来维持肌肉细胞内葡萄糖水平的平衡,进而维持肌肉细胞的稳态<sup>[71-74]</sup>。虽然在分化起始时FoxO3活性是必需的,但是分化之后在核内持续表达FoxO3会造成肌肉萎缩<sup>[7,75-76]</sup>,说明同一FoxO因子在不同的细胞环境下具有不同的功能,其背后的分子机制尚有待深入研究。

## 5 FoxO蛋白的翻译后修饰

Forkhead蛋白的活性除了基因表达水平的调控外,还有一系列翻译后修饰调控,如磷酸化、乙酰化和泛素化修饰等。这一系列的翻译后修饰会影响Forkhead转录因子在细胞内的定位、稳定性及DNA结合能力,从而影响Forkhead蛋白的功能。本文将重点介绍FoxO蛋白的翻译后修饰对于其功能的影响。

### 5.1 磷酸化修饰

5.1.1 PI3K/Akt信号通路对FoxO的磷酸化修饰 FoxO1、FoxO3和FoxO4中存在3个保守的Akt识别位点,即Thr-24、Ser-256以及Ser-319。在FoxO6中,Ser-319磷酸化位点在进化中消失了,但是其他两个保守的Akt识别位点依然存在<sup>[77]</sup>。在胰岛素和胰岛素样生长因子(IGF)的刺激下,Akt通过PI3K信号通

路被激活,活化的Akt可以磷酸化FoxO。FoxO被磷酸化之后,与14-3-3蛋白结合被转运至细胞质中,并维持定位于细胞质内,因而其作为转录因子的活性就被抑制了<sup>[78]</sup>。研究表明,Akt通过磷酸化并抑制FoxO转录因子的转录活性,可以避免细胞凋亡,是细胞癌变过程中不可缺少的一步;同时,也可以籍此调控细胞的糖代谢<sup>[8,79]</sup>。

**5.1.2 CDK2对FoxO的磷酸化调节** FoxO1能被细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase 2, CDK2)在Ser-249位点磷酸化,这一磷酸化位点位于一个CDK识别的保守序列[(K/R)(S/T)PX(K/R)]中,除存在于FoxO因子中外,也存在于CDK2的已知下游因子如RB和组氨酸H1B中。目前已经证实,在鼠和人的FoxO1和FoxO6中均存在CDK2识别位点。CDK2介导的FoxO1磷酸化不仅能降低FoxO1的本底转录活性,而且能抑制PTEN诱导的FoxO1的激活,并且以不依赖于Akt的形式负调控FoxO1的活性。当DNA受到损伤时,CDK2依赖的FoxO1磷酸化可在Chk1和Chk2的作用下被解除<sup>[80]</sup>。

**5.1.3 JNK信号通路对FoxO的磷酸化调节** 与Akt介导的磷酸化不同,JNK介导的磷酸化能拮抗insulin/IGF-1信号通路的作用,并促进JNK磷酸化的FoxO蛋白的细胞核内定位。FoxO的JNK磷酸化位点在进化上高度保守,存在于从果蝇到人的FoxO转录因子中,并在被JNK磷酸化后行使重要的生理功能<sup>[81-82]</sup>。在氧自由基压力下,FoxO蛋白的Thr-447和Thr-451能被JNK磷酸化,该磷酸化促使FoxO蛋白定位于细胞核内,进而激活其下游基因的转录<sup>[83]</sup>。除了能直接磷酸化FoxO之外,JNK还能通过作用于14-3-3蛋白而促进FoxO的激活。JNK能催化14-3-3蛋白Ser-184位的磷酸化,导致细胞质中的FoxO从14-3-3蛋白上解离,并被转运入核,从而促进FoxO3a的激活<sup>[84]</sup>。JNK信号通路与其他信号通路如何共同调控FoxO是目前研究的热点。

## 5.2 乙酰化修饰调节

除了被磷酸化之外,FoxO转录因子还可以被乙酰化<sup>[85]</sup>。转录共激活因子结合蛋白(co-activator binding protein, CBP)和p300以及与之相关的蛋白p300、CBP相关因子(PCAF)都具有乙酰转移酶活性。这些蛋白通过乙酰化组蛋白和其他转录因子,进而影响转录因子的活性<sup>[86]</sup>。

**5.2.1 乙酰化修饰对FoxO功能的调节** FoxO的

Lys-242、Lys-245以及Lys-262残基可以被CBP和p300乙酰化。乙酰化修饰对于FoxO的活性调节起着重要作用。FoxO被CBP乙酰化后,可以转运进核,但是由于乙酰化的FoxO蛋白的DNA结合能力降低,其转录活性显著降低<sup>[87]</sup>。关于CBP对于FoxO蛋白乙酰化修饰调节的机理及其作用还需要进一步的研究。

**5.2.2 去乙酰化对FoxO功能的调节** CBP和p300对FoxO蛋白的乙酰化修饰可以导致FoxO在细胞核内的积聚,进而引发包含SIRT在内的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylation catalase, HADC)对于FoxO的去乙酰化。SIRT不仅能够去除组蛋白的乙酰化修饰,而且能够催化其他蛋白的去乙酰化。在受到生长因子刺激的情况下,SIRT1定位于细胞核内,通过其去乙酰化酶活性,将核内的FoxO去乙酰化<sup>[88-89]</sup>。目前的研究表明,与乙酰化相反,去乙酰化能够提高FoxO的活性。例如,过表达SIRT1能增强FoxO3a的活性,从而引起的细胞周期暂停<sup>[89]</sup>。另一个SIRT家族去乙酰化酶SIRT2也可以除去FoxO的乙酰化修饰,并增强FoxO的转录调节活性<sup>[90-92]</sup>。上述结果也从另外一面证实了CBP乙酰化FoxO蛋白能抑制FoxO的转录功能。但是与上述结论相反,通过使用III型HADC抑制剂烟碱和I型/II型HADC抑制剂曲古柳菌素A抑制SIRT1的活性之后,FoxO3a诱导的细胞凋亡基因如BIM的表达量进一步增强,而过表达SIRT1则会抑制BIM启动子的活性<sup>[89]</sup>。这既有可能是由于HDAC抑制剂的非特异性作用而引起的,也有可能是乙酰化的FoxO在不同的细胞背景和不同的启动子上的功能不同。乙酰化与去乙酰化如何影响FoxO的功能,还有待于进一步研究。

## 5.3 泛素化修饰对FoxO功能的调节

最近的研究表明,FoxO转录因子可以被泛素化修饰,下面简介泛素化修饰对于FoxO蛋白功能的影响。

**5.3.1 依赖于Akt信号通路的泛素化修饰** FoxO蛋白能够被泛素化,进而影响其活性。F-Box蛋白Skp2作为E3连接酶(E3 ligase)能够介导FoxO1的泛素化。Skp2依赖的FoxO1多泛素化依赖于Akt首先磷酸化FoxO1的Ser-256位点<sup>[93]</sup>。在稳定表达Akt的前B淋巴细胞中,FoxO1和FoxO3的泛素化水平升高,并导致FoxO1和FoxO3的蛋白水平降低<sup>[93]</sup>,表明Akt可以促进泛素化介导的FoxO降解。与此类似,在对HepG2细胞进行胰岛素刺激后,随着Akt被胰岛素激

活, FoxO1的Ser-256位点被磷酸化, 磷酸化的FoxO1进而被Skp2介导的泛素化所降解, 从而导致FoxO1的蛋白水平降低<sup>[94]</sup>。用血小板生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)处理鸡的胚胎成纤维细胞后, Akt被PI3K信号通路活化, 磷酸化FoxO1, 磷酸化的FoxO1被进一步泛素化降解, 这一作用能显著降低鸡胚胎成纤维细胞中的FoxO1蛋白水平<sup>[95]</sup>。综上所述, 蛋白酶体介导的FoxO1泛素化及其降解依赖于Akt信号通路。

5.3.2 其他泛素化调节 FoxO转录因子还可以被单泛素化。位于FoxO4 Forkhead结构域C-端的赖氨酸位点K199和K211是FoxO4的单泛素化位点<sup>[96]</sup>。在针对氧自由基压力的应激反应中, FoxO4可以被单泛素化修饰, 促使FoxO4入核, 并增强其转录活性<sup>[96]</sup>。这一由氧自由基压力应激反应所引起FoxO4单泛素化提供了另一个调节FoxO细胞内定位和功能的途径, 其具体的调控机制尚有待于进一步的深入研究。

## 6 展望

Forkhead蛋白能调控多种生物学过程, 参与调控了几乎所有与细胞周期有关的基因的表达, 因而它们的活性和功能必须受到严格的调控。正是由于Forkhead蛋白受到多种信号通路和激酶的严格调控, 使其作为转录因子的功能受到严格的控制, 才能保证细胞乃至整个机体的稳态平衡。Forkhead转录因子如何综合各个信号通路的信息, 最终调控其下游基因的表达; Forkhead因子的磷酸化、乙酰化、泛素化之间的相互关系如何, 及是否存在新的翻译后修饰, 这些翻译后修饰如何影响Forkhead转录因子的活性, 是Forkhead研究领域的热点问题。Forkhead转录因子在干细胞中的功能研究目前还刚刚起步, 对于Forkhead家族在干细胞中功能及其调控机理的深入研究将会揭示干细胞增殖、分化调控与营养、氧自由基压力等环境因素之间的关系, 从而为干细胞在再生医学中的应用提供理论指导。

### 参考文献 (References)

- 1 Tuteja G, Kaestner KH. SnapShot: Forkhead transcription factors I. *Cell* 2007; 130(6): 1160.
- 2 Tuteja G, Kaestner KH. Forkhead transcription factors II. *Cell* 2007; 131(1): 192.
- 3 Xie L, Ushmorov A, Leithäuser F, Guan H, Steidl C, Färber J, *et al.* FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; 119(15): 3503-11.
- 4 Wijchers PJ, J Burbach JP, Smidt MP. In control of biology: of mice, men and Foxes. *Biochem J* 2006; 397(2): 233-46.
- 5 Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: Key players in development and metabolism. *Dev Biol* 2002; 250(1): 1-23.
- 6 Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 1993; 364(6436): 412-20.
- 7 Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, *et al.* FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004; 117(3): 399-412.
- 8 Andjelković M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, *et al.* Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997; 272(50): 31515-24.
- 9 Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 2002; 9(2): 279-89.
- 10 Friedman JR, Kaestner KH. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(19/20): 2317-28.
- 11 Hannenhalli S, Kaestner KH. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat Rev Genet* 2009; 10(4): 233-40.
- 12 Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 2004; 117(2): 211-23.
- 13 Hawke TJ, Jiang N, Garry DJ. Absence of p21CIP rescues myogenic progenitor cell proliferative and regenerative capacity in Foxk1 null mice. *J Biol Chem* 2003; 278(6): 4015-20.
- 14 Williamson EA, Wolf I, O'Kelly J, Bose S, Tanosaki S, Koeffler HP. BRCA1 and FOXA1 proteins coregulate the expression of the cell cycle-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 2006; 25(9): 1391-9.
- 15 Lee CS, Sund NJ, Behr R, Herrera PL, Kaestner KH. Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells. *Dev Biol* 2005; 278(2): 484-95.
- 16 Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* 2004; 114(4): 512-20.
- 17 Shen W, Searce LM, Brestelli JE, Sund NJ, Kaestner KH. Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. *J Biol Chem* 2001; 276(46): 42812-7.
- 18 Kaestner KH, Hiemisch H, Schutz G. Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 1998; 18(7): 4245-51.
- 19 Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, *et al.* Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 457-65.
- 20 Wang H, Gauthier BR, Hagenfeldt-Johansson KA, Iezzi M, Woll-

- heim CB. Foxa2 (HNF3beta) controls multiple genes implicated in metabolism-secretion coupling of glucose-induced insulin release. *J Biol Chem* 2002; 277(20): 17564-70.
- 21 Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 2004; 432(7020): 1027-32.
- 22 Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004; 117(4): 421-6.
- 23 Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(4): 183-9.
- 24 Asher G, Schibler U. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab* 2011; 13(2): 125-37.
- 25 Gomes AR, Brosens JJ, Lam EW. Resist or die: FOXO transcription factors determine the cellular response to chemotherapy. *Cell Cycle* 2008; 7(20): 3133-6.
- 26 Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature* 2008; 454(7203): 463-9.
- 27 Gerin I, Bommer GT, Lidell ME, Cederberg A, Enerback S, Macdougald OA. On the role of FOX transcription factors in adipocyte differentiation and insulin-stimulated glucose uptake. *J Biol Chem* 2009; 284(16): 10755-63.
- 28 Kim JK, Kim HJ, Park SY, Cederberg A, Westergren R, Nilsson D, *et al.* Adipocyte-specific overexpression of FOXC2 prevents diet-induced increases in intramuscular fatty acyl CoA and insulin resistance. *Diabetes* 2005; 54(6): 1657-63.
- 29 Cederberg A, Grønning LM, Ahrén B, Taskén K, Carlsson P, Enerbäck S. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 2001; 106(5): 563-73.
- 30 Whitman M. Nodal signaling in early vertebrate embryos: Themes and variations. *Dev Cell* 2001; 1(5): 605-17.
- 31 Schier AF. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 589-621.
- 32 Hoodless PA, Pye M, Chazaud C, Labbé E, Attisano L, Rossant J, *et al.* FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev* 2001; 15(10): 1257-71.
- 33 Yamamoto M, Meno C, Sakai Y, Shiratori H, Mochida K, Ikawa Y, *et al.* The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes Dev* 2001; 15(10): 1242-56.
- 34 Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J Clin Invest* 1998; 102(6): 1077-82.
- 35 Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH. The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* 2005; 435(7044): 944-7.
- 36 Wilm B, James RG, Schultheiss TM, Hogan BL. The forkhead genes, Foxc1 and Foxc2, regulate paraxial versus intermediate mesoderm cell fate. *Dev Biol* 2004; 271(1): 176-89.
- 37 Mahlapuu M, Ormestad M, Enerbäck S, Carlsson P. The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development* 2001; 128(2): 155-66.
- 38 Kalinichenko VV, Lim L, Stolz DB, Shin B, Rausa FM, Clark J, *et al.* Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead box f1 transcription factor. *Dev Biol* 2001; 235(2): 489-506.
- 39 Mahlapuu M, Enerback S, Carlsson P. Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development* 2001; 128(12): 2397-406.
- 40 Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG, Schütz G. The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* 1997; 11(12): 1583-95.
- 41 Levinson RS, Batourina E, Choi C, Vorontchikhina M, Kitajewski J, Mendelsohn CL. Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. *Development* 2005; 132(3): 529-39.
- 42 Blomqvist SR, Vidarsson H, Fitzgerald S, Johansson BR, Ollerstam A, Brown R, *et al.* Distal renal tubular acidosis in mice that lack the forkhead transcription factor Foxi1. *J Clin Invest* 2004; 113(11): 1560-70.
- 43 Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, *et al.* Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 2005; 14(14): 2053-62.
- 44 Baxter RM, Brissette JL. Role of the nude gene in epithelial terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 2002; 118(2): 303-9.
- 45 Su DM, Navarre S, Oh WJ, Condie BG, Manley NR. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol* 2003; 4(11): 1128-35.
- 46 Li S, Misra K, Matise MP, Xiang M. Foxn4 acts synergistically with Mash1 to specify subtype identity of V2 interneurons in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(30): 10688-93.
- 47 Luo H, Jin K, Xie Z, Qiu F, Li S, Zou M, *et al.* Forkhead box N4 (Foxn4) activates Dll4-Notch signaling to suppress photoreceptor cell fates of early retinal progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(9): E553-62.
- 48 Tompers DM, Foreman RK, Wang Q, Kumanova M, Labosky PA. Foxd3 is required in the trophoblast progenitor cell lineage of the mouse embryo. *Dev Biol* 2005; 285(1): 126-37.
- 49 Blixt A, Mahlapuu M, Aitola M, Pelto-Huikko M, Enerbäck S, Carlsson P. A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes Dev* 2000; 14(2): 245-54.
- 50 Hanashima C, Shen L, Li SC, Lai E. Brain factor-1 controls the proliferation and differentiation of neocortical progenitor cells through independent mechanisms. *J Neurosci* 2002; 22(15): 6526-36.
- 51 Garry DJ, Meeson A, Elterman J, Zhao Y, Yang P, Bassel-Duby R, *et al.* Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(10): 5416-21.
- 52 Hribal ML, Nakae J, Kitamura T, Shutter JR, Accili D. Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol* 2003; 162(4): 535-41.
- 53 Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adi-



- pocyte differentiation. *Dev Cell* 2003; 4(1): 119-29.
- 54 Zhang X, Yalcin S, Lee DF, Yeh TY, Lee SM, Su J, *et al.* FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13(9): 1092-9.
- 55 Hosaka T, Biggs WH 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cave-nee WK, *et al.* Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9): 2975-80.
- 56 Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, *et al.* FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 2009; 5(5): 527-39.
- 57 Paik JH, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, *et al.* FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 2009; 5(5): 540-53.
- 58 Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, *et al.* ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet* 2002; 32(2): 316-20.
- 59 Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, *et al.* FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 2007; 128(2): 309-23.
- 60 Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, *et al.* FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128(2): 325-39.
- 61 Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, *et al.* Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 101-12.
- 62 Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat Med* 2000; 6(11): 1235-40.
- 63 Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, *et al.* Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 2000; 287(5459): 1804-8.
- 64 Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, *et al.* Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 2004; 118(4): 477-91.
- 65 Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, *et al.* Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004; 431(7011): 997-1002.
- 66 Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, *et al.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006; 12(4): 446-51.
- 67 Domen J, Cheshier SH, Weissman IL. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *J Exp Med* 2000; 191(2): 253-64.
- 68 Jonsson H, Allen P, Peng SL. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat Med* 2005; 11(6): 666-71.
- 69 Sykes SM, Lane SW, Bullinger L, Kalaitzidis D, Yusuf R, Saez B, *et al.* AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias. *Cell* 2011; 146(5): 697-708.
- 70 Hu P, Geles KG, Paik JH, DePinho RA, Tjian R. Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Dev Cell* 2008; 15(4): 534-46.
- 71 Gross DN, Wan M, Birnbaum MJ. The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr Diab Rep* 2009; 9(3): 208-14.
- 72 Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116(3): 571-80.
- 73 Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, *et al.* Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem* 2004; 279(39): 41114-23.
- 74 Furuyama T, Kitayama K, Yamashita H, Mori N. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem J* 2003; 375(Pt 2): 365-71.
- 75 Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 2007; 6(6): 472-83.
- 76 Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, *et al.* PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(44): 16260-5.
- 77 Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* 2003; 278(38): 35959-67.
- 78 Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96(6): 857-68.
- 79 Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, *et al.* DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002; 296(5567): 530-4.
- 80 Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, *et al.* Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(5): 1649-54.
- 81 Vrnilas-Mortimer A, del Rivero T, Mukherjee S, Nag S, Gaitanidis A, Kadas D, *et al.* A muscle-specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD pathway regulates stress, motor function, and life span in *Drosophila*. *Dev Cell* 2011; 21(4): 783-95.
- 82 Xu P, Das M, Reilly J, Davis RJ. JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes Dev* 2011; 25(4): 310-22.
- 83 Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, *et al.* FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* 2004; 23(24): 4802-12.
- 84 Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol* 2005; 170(2): 295-304.
- 85 Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; 24(50): 7410-25.
- 86 Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 2002; 277(52): 50607-11.
- 87 Matsuzaki H, Ichino A, Hayashi T, Yamamoto T, Kikkawa U. Regulation of intracellular localization and transcriptional activi-

- ty of FOXO4 by protein kinase B through phosphorylation at the motif sites conserved among the FOXO family. *J Biochem* 2005; 138(4): 485-91.
- 88 Kitamura T, Kitamura YI, Funahashi Y, Shawber CJ, Castrillon DH, Kollipara R, *et al.* A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2477-85.
- 89 Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 303(5666): 2011-5.
- 90 Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, *et al.* Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(27): 10042-7.
- 91 Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Hou J. Clever cancer strategies with FoxO transcription factors. *Cell Cycle* 2008; 7(24): 3829-39.
- 92 Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. OutFOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol Med* 2008; 14(5): 219-27.
- 93 Plas DR, Thompson CB. Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278(14): 12361-6.
- 94 Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20): 11285-90.
- 95 Aoki M, Jiang H, Vogt PK. Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(37): 13613-7.
- 96 van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, *et al.* FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* 2006; 8(10): 1064-73.

## Forkhead Transcription Factors Control Stem Cell Fate Determination

Yin Jie, Yi Yuyin, Fu Xin, Hu Ping\*

(State Key Lab of Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Forkhead family, a group of conserved transcription factors existing from yeast to human, is marked by the presence of a 100aa Forkhead DNA binding domain. There have been over 100 genes encoding Forkhead transcription factors being found to date. Forkhead transcription play important roles in regulating many important cell processes including development, cell proliferation, differentiation, stemness maintenance, stress response, language acquirement, and longevity. Disruption of normal functions of forkhead factors resulted in developmental defects and tumorigenesis. Elucidation of the mechanism governing functions of Forkhead transcription factors will help developing therapies for many human diseases. This review is mainly focused on the functions of forkhead transcription factors, especially Foxo subfamily, in stem cells.

**Key words** Forkhead transcription factor; stem cell; transcription regulation; Foxo; signaling pathways

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31171420), One Hundred Talents Program of Chinese Academy of Sciences (No.2012OHTP02), Chinese Academy of Sciences (No.XDA01010204), and "Pujiang Talents" from Shanghai Municipal (No.12PJ1409700)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-54921254, E-mail: hup@sibcb.ac.cn