

特约综述

转录因子 NF- κ B 的核内活性调控楼希文^{1,2} 孙绍刚^{1,2} 王琛^{1*}¹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分子细胞生物学重点实验室, 上海 20003;²中国科学院研究生院, 北京 100864)

摘要 NF- κ B 家族蛋白是一类在免疫、炎症、发育和肿瘤的发生发展中具有至关重要作用的转录因子。因此,它在细胞核内的活性受到了复杂而严密的调控。本文综合近年来的研究成果,描述了 NF- κ B 转录因子与 DNA 之间动态结合的过程,以及相互选择的关系;总结了组蛋白修饰以及 NF- κ B 转录因子自身翻译后修饰对于 NF- κ B 转录活性的影响;列举了对于 NF- κ B 活性起到正调控作用的共激活因子和负调控作用的共抑制因子;最后还描述了 NF- κ B 在核内被降解的过程。

关键词 NF- κ B; 核内调控; 组蛋白修饰; 翻译后修饰; 共转录因子

核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一类转录因子,在体内各种类型细胞中普遍存在,因其在 1986 年最初发现时可与免疫球蛋白的 κ 链基因结合而被命名为 NF- κ B^[1]。它在免疫、炎症、发育及肿瘤的发生中都发挥至关重要的作用。它的失调与许多免疫疾病以及一些癌症直接相关,在风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、哮喘(asthma)、慢性肠炎(chronic enteritis)的病人的病灶部位通常会观察到高表达的活化的 NF- κ B^[2]。此外在急性淋巴瘤白血病(acute lymphoblastic leukaemia, ALL)、前列腺癌(prostatic cancer, PC)以及卵巢癌(ovarian cancer)中都发现了 NF- κ B 的组成性激活^[3,4]。

NF- κ B/Rel 家族有五个成员: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1)和 p52/p100 (NF- κ B2)^[3]。所有 NF- κ B/Rel 家族成员的 N 端都含有一个高度保守的由 300 个氨基酸组成的 Rel 同源区(Rel homology domain, RHD)。RHD 结构域负责形成二聚体,结合 DNA 以及与 I κ Bs 的结合,同时它还含有核定位序列(nuclear localization signal, NLS),介导活化的 NF- κ B 进入核内行使功能。p65 (RelA)、RelB、c-Rel 的 C 端含有转录激活结构域(transactivation domain, TAD)。这些 TADs 可以和多种基本转录因子(basal transcription apparatus)相互作用,其中包括 TATA 序列结合蛋白(TATA-binding protein, TBP)、转录因子 IIB (transcription factor IIB, TFIIB)和 p300/CBP 转录共刺激因子。只有 p65 (RelA)、RelB、C-Rel 参与形成的 NF- κ B 二

聚体能够激活转录,而 p50 和 p52 缺少转录激活区,它们形成的二聚体能够抑制靶基因的转录。

关于 NF- κ B 家族蛋白如何被激活从胞质进入核内,一般认为有两条途径。经典途径中, p65/p50 组成的异源二聚体由于结合了 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)而不能入核,当刺激发生后,信号传递到 I κ B 激酶复合物(I κ B kinase complex), IKK α / β / γ 的 IKK β 亚基,使之磷酸化 I κ B α 32 和 36 位的丝氨酸,磷酸化的 I κ B α 被泛素化(ubiquitination)进而被 26S 蛋白酶体降解,使得 NF- κ B 复合物的 NLS 暴露出来,能够入核并在核内发挥转录功能^[5]。多种刺激如细菌,病毒以及多种细胞因子可以激活这条经典通路。另一条非经典通路只与特定的 NF- κ B 激活相关。能够激活这条通路的包括 TNF 超家族(TNF superfamily)的 B 细胞活化因子(B cell activating factor, BAFF)和 CD40L, 以及淋巴毒素 β (lymphotoxin-beta, LT β)和病毒蛋白 Tax 等。它们通过激活 NF- κ B 诱导激酶(NF- κ B inducing kinase, NIK)和 IKK α , 使之磷酸化 p100, 从而导致 p100 被泛素化并降解成 p52。与经典通路不同的是,这条通路主要通过 RelB/p52 复合物来行使转录功能^[6]。

当细胞处于静息状态时, NF- κ B 处于胞质中;一旦细胞被相关刺激激活, NF- κ B 就会转移到细胞核内行使功能,作为开关调控各种下游基因的转录水

* 通讯作者。 Tel: 021-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn

平。近些年来, NF- κ B 家族蛋白在细胞核内的行为成了新一轮的研究热点。下文总结近年来的一些研究进展, 大致描述了 NF- κ B 在核内与 DNA 结合的动力学过程以及在此过程中受到的种种调控机制(图 1)。

1 NF- κ B 与 DNA 的动态结合

体外实验证实, NF- κ B 二聚体和 κ B 位点之间存在着很强的亲和力, 结合常数为 10^{-13} 到 10^{-10} mol/L, 高于其他大多数转录因子(结合常数为 10^{-9} mol/L)。NF- κ B 二聚体和 κ B 位点在体外组成的复合物的半衰期为 45 min, 并且这种复合物的稳定性可以被其他转录因子及结构蛋白加固, 例如干扰素 β 增强子复合物

(IFN β enhanceosome)在体外可以稳定存在达 10 h。

但体内的情况是否与之类似呢。Bosisio 等^[7]通过光脱色荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)的方法发现, 核质中的 NF- κ B 分子的运动性强于结合与目的基因启动子上的 NF- κ B 分子, 这说明体内 NF- κ B 分子和启动子存在着高亲和力的结合, 这种结合机会可以招募其他转录因子和基本转录复合物, 使得转录开始进行。但是这种结合并不是持久的, 用光脱色荧光损失(fluorescence loss in photobleaching, FLIP)的方法测量出 NF- κ B 和目标 DNA 序列结合的时间最多只能持续 30 s。并且, 结合于 DNA 上的 NF- κ B 和核质中的 NF- κ B 之间存在着动态的平衡。突变实验证实, 如果核质 NF- κ B 的降

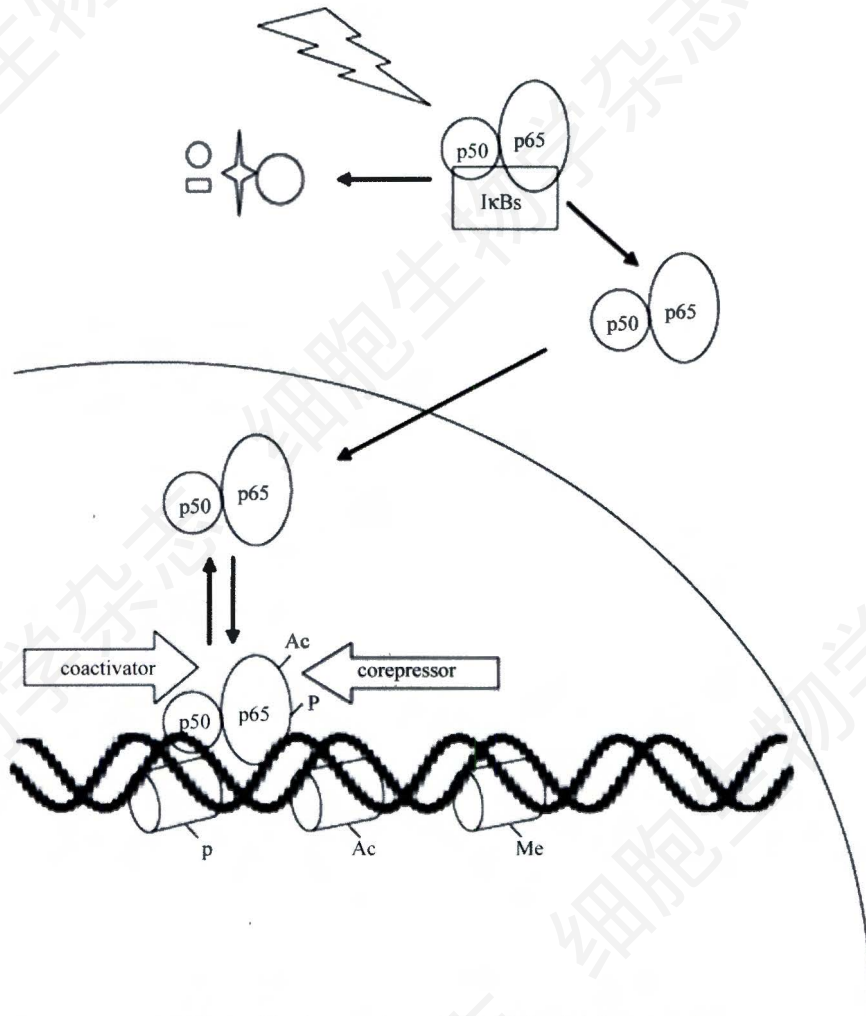


Fig.1 Nuclear action of NF- κ B is tightly controlled

Upon stimulus, the I- κ Bs inhibitor proteins are quickly degraded by the proteasome and NF- κ B dimers translocate from the cytoplasm into the nucleus. Then NF- κ B dimers interact with the promoters of downstream genes and lead to their transcription. In the process, the activity of NF- κ B dimers is regulated by several ways such as post-translational modification by other enzymes. Also, certain proteins called coactivators and corepressors will be recruited into the transcriptional complex and change the activity of NF- κ B dimers. Besides, the modification status of the histones nearby can influence the transactivation efficiency of NF- κ B dimers. In addition, NF- κ B dimers can be degraded via the ubiquitination pathway in the nucleus.

解过程被阻止,那么由此引起的核质中NF- κ B浓度的增加会使得NF- κ B和DNA的结合力加强^[7]。因此,在体内,增强子也许并不是通常所料想的一个稳定的蛋白复合物,而是一个多蛋白参与的高度动态并且受到核质精密调控的复合物。

有报道在病毒感染细胞的时候,NF- κ B被激活入核之后并不马上结合到IFN β 增强子复合物上,而是结合到两个(或许更多)分别位于9号和21号染色体上的快速易达的位点,然后,通过染色体之间的相互作用,这两个位点上的NF- κ B被传递到另一条染色体上的IFN β 增强子复合物上^[8]。这种情况发生的几率约为20%,这就解释了病毒感染初期在整个群体中表达IFN β 的细胞只占一部分的现象。

2 启动子对NF- κ B二聚体的选择

NF- κ B转录因子家族有5个成员,RelA,RelB,C-Rel,p100/p52和p105/p50。它们可以两两组成同源或者异源二聚体来发挥作用。那么,这数十种二聚体在体内的作用是否是相同的,还是各有分工呢。通过构建这五个成员分别或者共同缺失的细胞株,发现它们在体内是可以互相补充的。例如,在p105缺失的细胞株中,p52可以代替p50,和p65形成二聚体来发挥作用;而在RelA缺失的细胞株中,C-Rel可以代替RelA,形成C-Rel:p50复合物来代替p65:p50;而RelA和p50双缺失的细胞株就完全失去了功能。同时,各种不同的下游基因对于转录二聚体的选择的严格程度也是不一样的。例如MCP-1基因的启动子上可以接受p50:p65、p52:p65、p50:C-Rel和p65:p65这些二聚体的调控,而LIF基因只能接受p50:p65的调控^[9]。

对于启动子对于二聚体选择的严格程度和启动子序列之间的关系,目前的研究还没有明确解答。但是,有证据表明二聚体选择和启动子序列存在着相关性。当NF- κ B二聚体入核后,会结合到众多下游基因的启动子的 κ B序列上。这些众多的NF- κ B结合位点之间表现出高度的序列相似性,但都有或多或少的差异。而对于同一个基因来说, κ B序列是高度保守的。Leung等^[10]在研究中交换了不同基因的 κ B序列,发现特异的序列决定了对NF- κ B二聚体以及共转录因子的选择。

3 组蛋白修饰对NF- κ B活性的调节

NF- κ B入核之后,能够调节成百种下游基因的

表达,包括炎症因子、趋化因子、抗感染因子等等。这些基因在表达的时间序列上是有区别的。如I κ B α 、MnSOD、MIP-2等会被快速诱导出来,而Rantes、MCP-1、IL-6等的诱导需要一定的时间。Saccani等^[11]的研究为这种时序性调节提供了解释。他们发现,I κ B α 等早期基因的启动子早在外来刺激之前就已经被充分乙酰化,因此当NF- κ B二聚体入核之后便很容易结合道这些启动子上。而Rantes等的启动子需要在外界刺激的影响下,组蛋白逐渐被乙酰化,从而改变构型,使得NF- κ B二聚体结合上去。

在进一步的研究中,Saccani等^[12]研究了组蛋白甲基化和炎症基因转录之间的关系。他们发现,在炎症基因的启动子区域,组蛋白H3的Lys9的甲基化水平和RNA聚合酶2的招募和解离是相关的。在NF- κ B转录活跃期,组蛋白H3的Lys9的甲基化水平很低,而组蛋白甲基化水平的重新升高和组蛋白去乙酰化一起能够有效地调节NF- κ B转录的终止。

除了甲基化,组蛋白的磷酸化对于一部分NF- κ B调节的炎症基因的表达也是必须的。LPS等炎症刺激能够引起组蛋白H3的Ser10磷酸化并同时伴随着Lys14的乙酰化,并且用染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)的方法在MCP-1、IL-6、IL-8、IL-12p40的启动子区域观察到了组蛋白的磷酸化现象。这种磷酸化很有可能是由p38介导的,因为用p38的抑制剂处理细胞之后,H3 Ser10的磷酸化就会消失,MCP-1等基因的表达也受到抑制。而TNF α 、MIP1 α 等基因的表达不会受到p38介导的组蛋白磷酸化的影响^[13]。

4 NF- κ B的翻译后修饰——磷酸化和乙酰化

在上游信号如TNF α 、IL-1 β 、LPS等的刺激下,I κ B α 、I κ B β 被降解,释放出p65的入核序列。这使得原本驻留在细胞质中的p65入核,结合到目的基因的启动子上。但这个过程远远没有模型所显示的简单。在这个过程中,随着上游刺激种类,细胞系等的差异,p65本身会受到一系列翻译后的修饰,主要表现为磷酸化和乙酰化。其中,有的修饰对于p65发挥转录因子的功能是必不可少的,有的修饰能够使得p65选择性地调节某一类特异的基因。

在p65中已经有四个磷酸化位点被识别出来。包括RHD区域的276位和311位丝氨酸,和TAD区

域的 529 位和 536 位丝氨酸。其中, 276 位丝氨酸可以由 LPS 激活 PKAc 来修饰^[14], 也可以由 TNF α 激活 MSK1 来修饰; PKAc 的修饰发生在细胞质中, MSK1 的修饰发生在细胞核中。311 位丝氨酸可以由 TNF α 和 IL-1 β 激活 PKC ζ 来修饰。529 位丝氨酸由 TNF α 和 IL-1 β 激活的 CKII 来修饰。536 位丝氨酸由 TNF α 、LPS、TAX 激活的 IKKs 或者由 IL-1、p53 激活的 RSK1 来修饰^[15]。这些在不同刺激下由不同的激酶介导的磷酸化可以增加 p65 和 DNA 结合的能力, 促进它的二聚化, 提高它的转录激活能力。这些磷酸化位点的作用也许是冗余的, 也有可能在一起发挥协同作用, 通过磷酸化程度不同来调节 p65 不同的转录活性。

磷酸化可以改变 p65 的构型, 促使它与 p300/CBP 或者基本转录复合物等的结合^[16]。p300/CBP 是 NF- κ B 的主要乙酰化酶。p300 对 p65 的乙酰化是多位点的^[17]。310 位赖氨酸的乙酰化可以提高转录活性, 221 位赖氨酸的乙酰化可以提高 RelA 与 κ B 位点的结合能力以及减弱和 I κ B α 的结合, 从而有助于稳定 p65 在 DNA 上进行转录。最近有研究表明 p65 的 314 和 315 位也能够被 p300/CBP 乙酰化, 它们能够特异调节一部分下游基因的表达水平^[18]。

5 共激活因子对于 NF- κ B 活性的调节

NF- κ B 在启动转录时, 还需要和其它转录因子协同作用。如 IFN β 的转录启动需要 NF- κ B、ATF-2、IRF、C-Jun 和 HGM-I (Y) 的协同作用。在 Ccl-2 基因的表达中, NF- κ B 和 Sp1 协同作用。这些共转录因子和 NF- κ B 相互作用, 对于其转录活性进行了多方面的调控和优化。

其中, p300/CBP 是一类重要的转录共激活因子^[19]。p65 可以通过它的 C 端 TAD 结构域结合 p300/CBP。过表达 p300/CBP 可以提高 NF- κ B 的转录激活能力, 而其机制可能是多方面的。p300/CBP 在起始转录复合物中起到了整合器的作用, 它们可以作为桥梁, 将 p65/p50 与基本转录因子联系起来, 它们还可以作为支架蛋白, 来招募和转录有关的多种调控因子, 从而加快转录的进行。p300 和 CBP 都有组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT) 活性。它们可以乙酰化组蛋白的 N 末端, 使得启动子区域的 DNA 结构松散, 促进下游基因的表达。乙酰化的组蛋白和染色质的转录活化区域结合, 而去乙酰化的组蛋白则积累在染色质的转录抑制区域。除了修饰组蛋白,

p300/CBP 还能直接乙酰化 p65 来调节其转录活性。另外, p160 家族蛋白和 p/CAF 也能够发挥类似的共激活作用^[20]。

通过在果蝇 S2 细胞中进行 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)文库筛选, 鉴定出一个对于 Imd 通路下游基因 attacin 有显著负调控作用的基因 akirins。除了在果蝇中, 它在小鼠及人类中都高度保守, 并且在脊椎动物中有两个成员, akirin1 和 akirin2。akirins 是一个严格定位于细胞核的蛋白。除了在果蝇中负调控 Imd 通路之外, 在小鼠中, akirin2 缺失的小鼠成纤维细胞(MEF)中, IL6、Bcl3、Cxcl10、Ccl15 等 NF- κ B 基因的表达都降低, 而 akirin1 的作用还不明确。Akirin1 对于 I κ B α 的降解以及 NF- κ B 结合 DNA 的过程没有显著影响。akirin 作用的具体机制仍有待进一步研究^[21]。

我们实验室也报道了一个名为 UXT 的蛋白, 它是 NF- κ B 转录复合物中一个必要的组成因子。Sun 等^[22]用酵母双杂交的方法, 找到了一个广泛分布于各种细胞的蛋白 UXT。它能够和 p65 的 RHD 结构域产生相互作用, 它和 p50、C-Rel 之间也有相互作用。过表达 UXT 对于 p65 激活下游基因没有什么影响, 但是用 RNAi 的方法降低 UXT 的表达量却可以显著抑制 NF- κ B 下游基因的表达。ChIP 实验证明 UXT 是 NF- κ B 转录复合物中必要的一员。同时, UXT 的表达量和前列腺癌的发生发展具有正相关性。

MAPK 激酶之一 p38 对于炎症过程具有巧妙的调节作用。它入核之后, 一方面通过磷酸化 MSK1, 而磷酸化的后者磷酸化 p65 的 276 位丝氨酸, 促进 IL-12p40、IL-6 等基因的转录, 另一方面通过磷酸化组蛋白 H3 的 10 位丝氨酸, 从而促进 p65 和染色体的结合^[23]。入核的 p38 还能磷酸化 MK2, 后者通过磷酸化 HSP27 来和 p38 形成 MSK2-HSP27-p38 复合物, 帮助 p38 出核^[24], 而出核的复合物还能够促进 TNF 等炎症因子的翻译。

研究发现, 精氨酸甲基转移酶家族成员之一 CARM1 能够和 p65, p300 形成复合物, 作为共激活因子来促进 IP10、MIP-2、MCP-1 等基因的转录^[25]。在 CARM-1 缺失的细胞中, 这些基因经 TNF α 刺激之后诱导的 mRNA 水平较野生型大幅下调; 并且用 ChIP 的方法发现 p65 和这些基因启动子的结合减少, 启动子区域组蛋白 H3 的 17 位精氨酸甲基化水平降低。报告基因实验表明, CARM1 很有可能是通过稳定 p65 和共激活因子乙酰转移酶家族成员 p300、

p160 组成的复合物来发挥作用的。通过点突变证实, 精氨酸甲基转移酶活性对于 CARM1 发挥共激活因子的作用也是必须的。

当 TNF α 刺激人气管平滑肌细胞时, 二型 PKC β 被激活, 并且转移到细胞核中。在细胞核中, 它能够结合并且磷酸化共激活因子 p/CAF, 促进其结合到 CCL11 基因的启动子上, 导致了组蛋白 H4 的乙酰化, 从而引发了 p65 介导的 CCL11 的转录^[26]。

6 NF- κ B 活性的负调控因子

在果蝇的胚胎发育过程中, dorsal 转录因子(NF- κ B 在果蝇中的同源物)会诱导 twist 蛋白。twist 属于 bHLH 转录因子家族, 它在果蝇中胚层形成过程中起重要作用。研究表明, twist 在哺乳动物中存在着高度保守的同源物 Twist1 和 Twist2。这两个蛋白被证明是 p65 的下游基因, 并且当它们被诱导出来之后, 可以负反馈调控 NF- κ B 信号通路。Twist 基因敲除小鼠的皮肤, 骨骼肌等组织和血液中, 炎症因子 TNF α 和 IL-1 β 较野生型显著升高, 并且会因为体质不良导致的出生后死亡率增加。进一步研究表明, Twist 通过和 p65 相互作用, 并且结合到炎症因子基因的启动子上, 来抑制这些基因的转录^[27]。

在癌症发生过程中, NF- κ B 是持续性激活的, 它能够诱导许多促癌基因的表达。ING4 是一个抑癌基因, 它在不少癌症中是缺失或者突变的。研究表明, 在人脑神经胶质瘤(glioma)中, NF- κ B 被持续激活, NF- κ B 调控的基因如 COX-2、MMP-9 等表达上调, 而 ING4 几乎不表达; 并且, 四环素诱导(Tet-on)实验证明过表达 ING4 能够抑制 COX-2、MMP-9 等基因的表达。ING4 和 NF- κ B 之间存在着相互作用, 它们能够同时结合到下游基因的启动子上, ING4 的存在减弱了 p65 和 RNA 聚合酶 2 的磷酸化水平, 引起 p300、pTef-b、p50 的解离, 并且能够促使组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase, HDAC-1)和这些启动子结合, 降低组蛋白乙酰化和组蛋白 H3 的 4 位赖氨酸三甲基化(转录活跃区域的标志)的水平^[28]。

BCA3 是一个乳腺癌相关蛋白, 它可以被类泛素 NEDD8 修饰(neddylation, Nd), 也可以被 SENP8 水解去 Nd。Nd 的 BCA3 可以和 p65 相互作用, 并且招募 3 型组蛋白去乙酰化酶 SIRT1, 从而抑制 cyclin D1、Bcl-2、survivin 等 NF- κ B 下游基因的表达^[29]。

研究发现有一类小类泛素修饰因子连接酶 E3

(small ubiquitin-like modifier E3, SUMO E3)家族可以在 NF- κ B 被激活的早期, 通过阻止 p65 和 DNA 的结合来减弱其活性。这个家族的两个成员 PIAS1 和 PIASy 目前被研究地比较深入。PIAS1 一开始被认为是 STAT 的负调控因子。后来, 由于 PIAS1 缺失小鼠表现出干扰素下游基因的上调和内毒素休克(LPS shock)的易感性^[30,31], 人们猜想也许它也能调控 NF- κ B 通路。通过 ChIP 等实验, 证明它的确能减弱 p65 和 DNA 的结合。并且, 它影响的主要是 I κ B α 、IL-1 β 等早期基因, 而对于晚期基因的表达影响不大^[31]。PIASy 对于 STAT 的影响不大, 人们也是从缺失小鼠对内毒素休克的易感性增强发现了它对 NF- κ B 的负调控作用^[32]。它调控的基因群和 PIAS1 不同, 为 CXCL1 等。

7 核内 NF- κ B 转录活性的终止

对于 NF- κ B 活性的终止, 以前认为是由重新合成的 I κ B α 蛋白结合到核内的 NF- κ B 上, 把它们带出核外。但在 I κ B α 缺失的细胞株中发现, p65 的转录活性还是能在后期被降低, 并且这种降低能够被蛋白酶体抑制剂抑制^[33]。近来的研究发现了几个重要的能终止 NF- κ B 活性的分子, 使得人们对于这条通路终结的方式有了更加深入的了解。

首先, 通过共转录因子交换的方式, 即由 HDAC 来取代 HAT, 减弱了 NF- κ B 二聚体和 DNA 结合的能力, 同时使 I κ B 更容易结合到二聚体上^[34]。

接下来人们发现, 在激活的后期, p65 二聚体可以通过泛素化途径被降解。现在已经发现了 ECS 复合物和 PDLIM2 能够介导 p65 的降解。SOCS1 可以负调控 LPS 对巨嗜细胞的激活^[35]。进一步研究发现过表达 SOCS1 能够影响 p65 的稳定性。COMMD1 可以负调控 p65 的活性, 并且可以限制 HIV 的复制。研究表明, SOCS1、COMMD1 可以和 ElonginBC 组成复合物来泛素化 p65^[36,37]。同时, PIN1 可以通过和 SOCS1 竞争结合 p65 来阻止 ECS 复合物的泛素化过程^[38]。但是, 在 COMMD1 缺失的细胞中, 在激活后期, p65 的量仍旧减少, 这说明除了 ECS 复合物, 还有别的分子来介导 p65 的降解。研究发现, PDLIM2 分子具有核内泛素连接酶活性, 并且缺失 PDLIM2 的小鼠表现出显著的发炎症状。进一步研究发现, PDLIM2 可以泛素化 p65, 同时还可以把 p65 转运到 PML 核内小体中, 终止它的活性^[39]。

Regulation of NF- κ B Activity in Nucleus

Xi-Wen Lou^{1,2}, Shao-Gang Sun^{1,2}, Chen Wang^{1*}

(¹Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China)

Abstract NF- κ B is a family of transcription factors which play important roles in immunology, inflammation, development and cancer development. So their activity in nucleus is tightly regulated. We review recent research progress, picturing the dynamic interaction of NF- κ B with DNA, suggesting the promoter sequence may decide which NF- κ B dimer to bind. We summarize different kinds of histone modifications and post-translational modifications of NF- κ B themselves, and enumerate the reported cofactors of NF- κ B. Finally, we describe the degradation process of NF- κ B in nucleus.

Key words NF- κ B; regulation in nucleus; histone modification; post-translational modification; cofactor

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921185, E-mail: cwang01@sibs.ac.cn