

Změny aktivity transkripčního faktoru NF-kappaB ve vztahu k regulaci cytokinetiky

Mgr. Jiřina Procházková, Ph.D.

jipro@sci.muni.cz

Osnova

- Struktura NF-kappaB
- Charakterizace členů rodiny NF-kappaB
- Klasická vs. alternativní dráha aktivace
- Transaktivace, ubiquitinace
- NF-kappaB a apoptóza
- NF-kappaB a imunitní systém
- NF-kappaB a proliferace
- NF-kappaB a stres
- NF-kappaB a karcinogeneze
- Metody detekce aktivního NF-kappaB

NF-kappaB

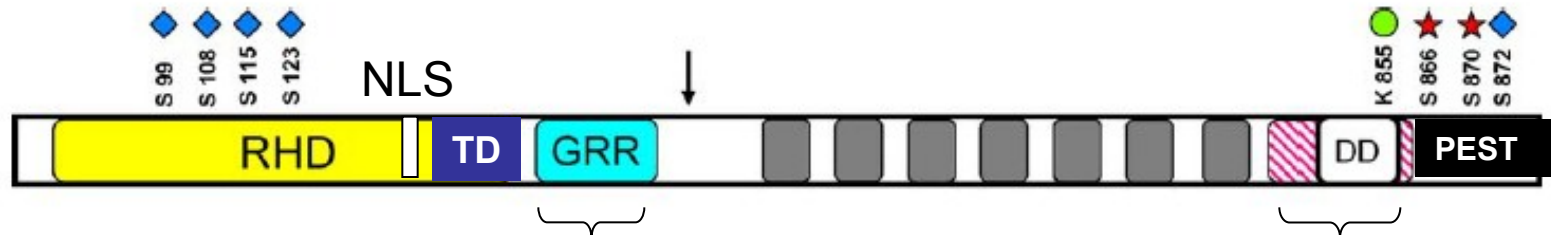
- Nuclear Factor – kappa B (NF-κB)
 - Jaderný faktor B lymfocytů, který se váže na enhancer pro gen kódující lehký κ řetězec imunoglobulinů
- Objeven v roce 1986 (Sen, Baltimore et al.)
- **Pro-přežití, pro-zánětlivý** transkripční faktor
- Aktivován min. 210 podněty a ovlivňuje transkripci min. 150 genů (Pahl 1999)
- Úzká vazba na procesy proliferace, karcinogeneze, aktivace imunitního systému

Struktura NF-kappaB

dimerizace, jaderná lokalizace, vazba na DNA

maskují NLS, interakce protein-protein

obsahuje rozpoznávací sekvenci pro kinázy



chrání protein před degradací v proteasomu, nutná pro správné štěpení proteinu

neubiquitinylovaná chrání před proteasom. degradací



★ NIK phosphorylation site



TD Transactivation Domain

◆ IKK α phosphorylation site



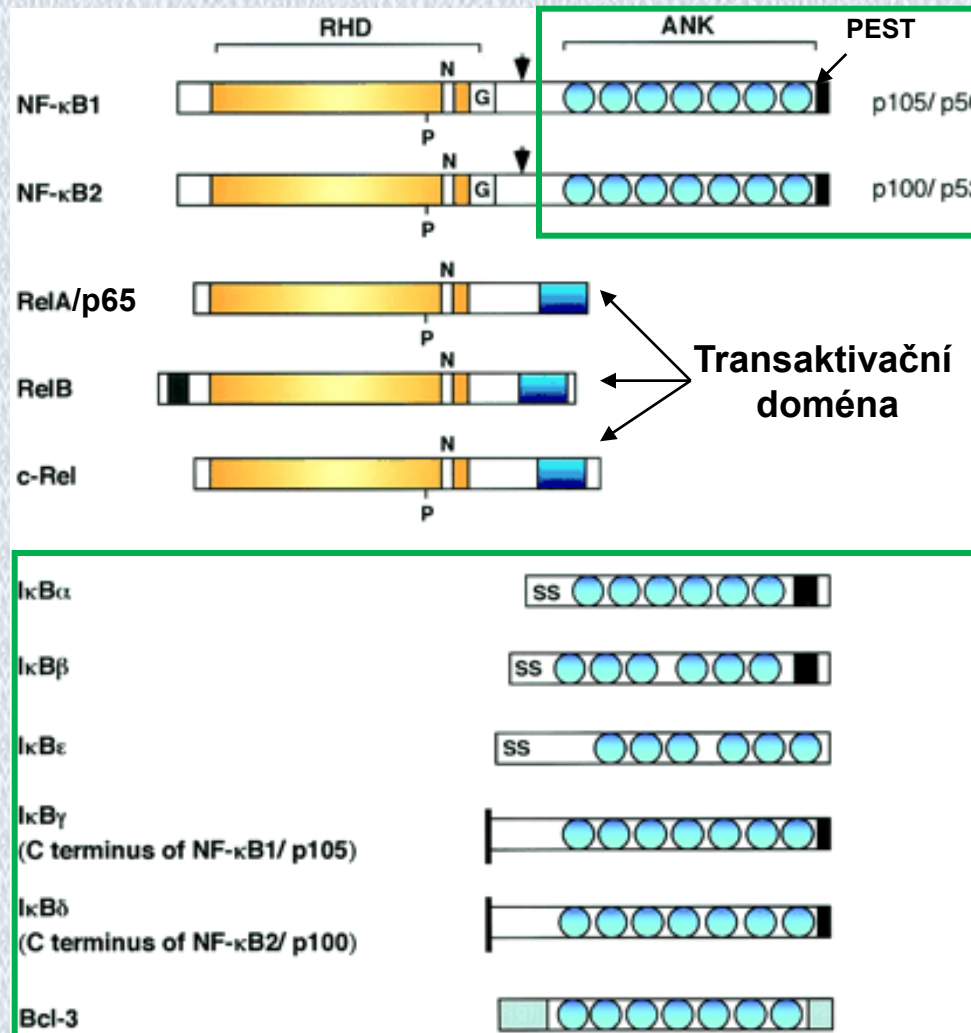
NLS Nuclear Localization Signal

PEST rich in P, E, S, T aminoacids

↓
Cleavage site aa 405

● Polyubiquitination site

Rodina NF-kappaB/IkappaB



Dimerizace členů rodiny NF-kappaB

Table 1. NF-κB family proteins

	TAD ^a domain	Cytoplasmic form	
p65 (RelA)	+	Complex with IκB	Classical NF-κB binding pairs by forming dimers with p50 Regulated by the canonical NF-κB pathway
RelB	+	Complex with p100	Release of RelB-p52 dimers through activation of the non-canonical n pathway
c-Rel	+	Complex with IκB	The cellular homolog of the avian retroviral protein, v-Rel
p50	-	Precursor protein	Derived from processing of p105 Homodimeric form has repressor function Transcriptionally active heterodimers with RelA or c-Rel
p52	-	Precursor protein	Derived from processing of p100 Homodimeric form has repressor function Transcriptionally active heterodimers with RelA or c-Rel

^aAbbreviations: c-Rel, cellular Rel; IκB, inhibitor of κB; NF, nuclear factor; TAD, *trans*-activation domain; v-Rel, viral Rel.

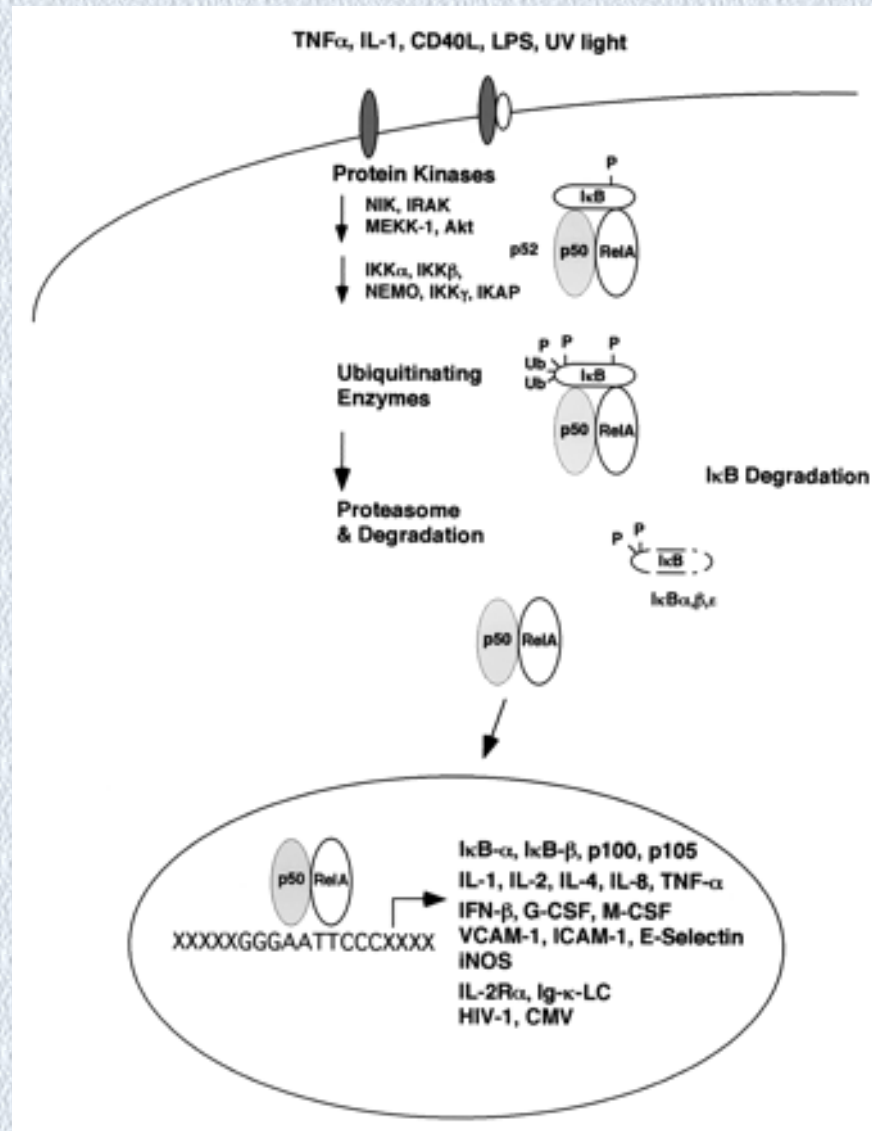
Yamamoto and Gaynor, (2004), TRENDS in Biochemical Sciences, 29 (2)

NF-kappaB knock-outs

Phenotype	Description
NF- κ B1 ^{-/-}	Defects in production of Ab and T-cell proliferative responses. Absence of marginal zone B cells. Defect in Th2 responses. Increased susceptibility to <i>S. pneumoniae</i> and <i>L. monocytogenes</i> . Normal response to <i>E. coli</i> infection and <i>H. influenzae</i> but enhanced resistance to EMCV.
NF- κ B2 ^{-/-}	Disorganized B- and T-cell areas in spleen and lymph nodes associated with absence of marginal zone macrophages and follicular DC. Reduced numbers of B cells and decreased production of antigen-specific Ab. Increased susceptibility to <i>T. gondii</i> , <i>L. monocytogenes</i> , and <i>L. major</i> but normal response to LCMV.
NF- κ B1 ^{-/-} NF- κ B2 ^{-/-}	Increased mortality after birth and developmental defects including osteopetrosis, thymic and lymph node atrophy, and disorganized splenic structure.
RelA ^{-/-}	Embryonic lethality at day 15 to 16 of gestation due to widespread apoptosis of liver parenchymal cells mediated by TNF. Required for formation of secondary lymphoid organs.
RelB ^{-/-}	Development of lethal T-cell-mediated inflammatory disease. Impaired production of antigen-specific Ab associated with defects in germinal center formation. Lack of marginal zone B cells and thymic and CD8 α^+ DC. Susceptible to <i>L. monocytogenes</i> , LCMV, and <i>T. gondii</i> . Reduced capacity to produce IFN- γ and impaired DTH responses.
c-Rel ^{-/-}	Impaired T- and B-cell proliferation and reduced Ab responses. Increased susceptibility to <i>L. major</i> and <i>T. gondii</i> . Memory response to influenza virus is impaired. Decreased production of IL-2, IL-3, IL-12, IFN- γ , and GM-CSF.
I κ B α ^{-/-}	Postnatal lethality 7 to 10 days after birth associated with widespread psoriasis-like dermatitis, increased granulopoiesis, and histological alterations in liver and spleen.
Bcl-3 ^{-/-}	Disorganized B- and T-cell areas in spleen. Impaired formation of germinal centers and production of antigen-specific Ab. Defective antigen-dependent priming of T cells. Increased susceptibility to <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , and <i>T. gondii</i> but normal response to <i>E. coli</i> infection.
IKK mutace	Ectodermal dysplasia and immune deficiency (oportuní infekce)

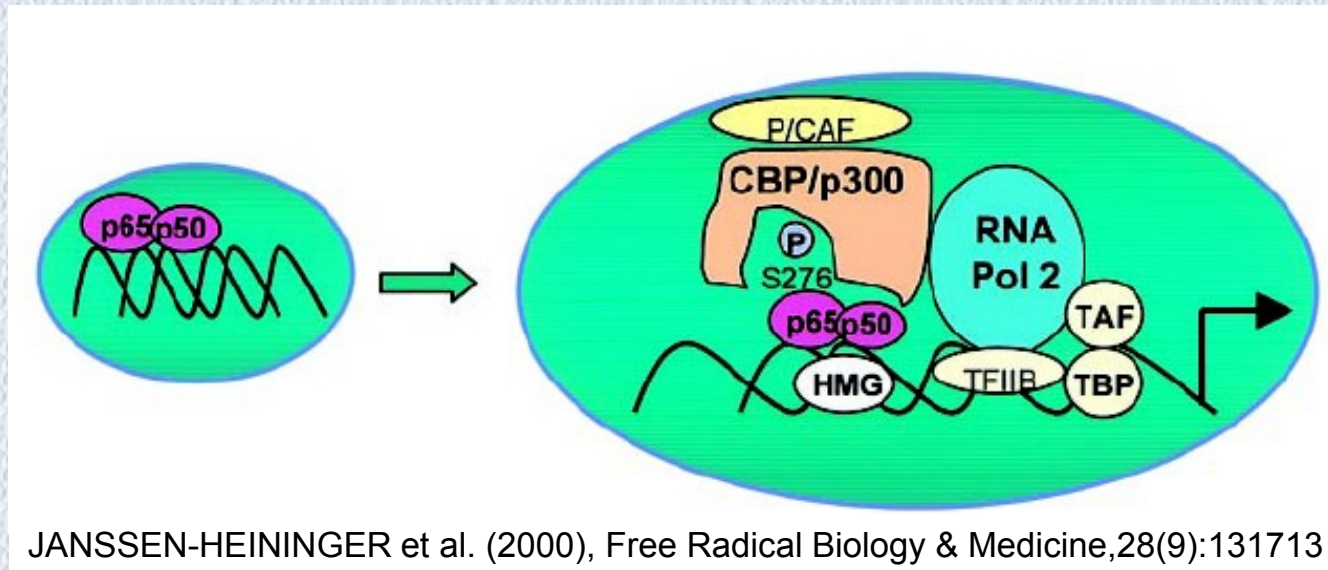
^a Abbreviations: Ab, antibody CTL, cytotoxic T lymphocytes; DTH, delayed-type hypersensitivity; DC, dendritic cells; Th1, T helper cells type 1. Adapted from reference 8 with permission of the publisher.

Signálová dráha NF-kappaB



Transaktivace

κ B vazebné místo: 5'-GGGRNYYYCC-3' (R - purin, Y - pyrimidin, N jakákoli báze)

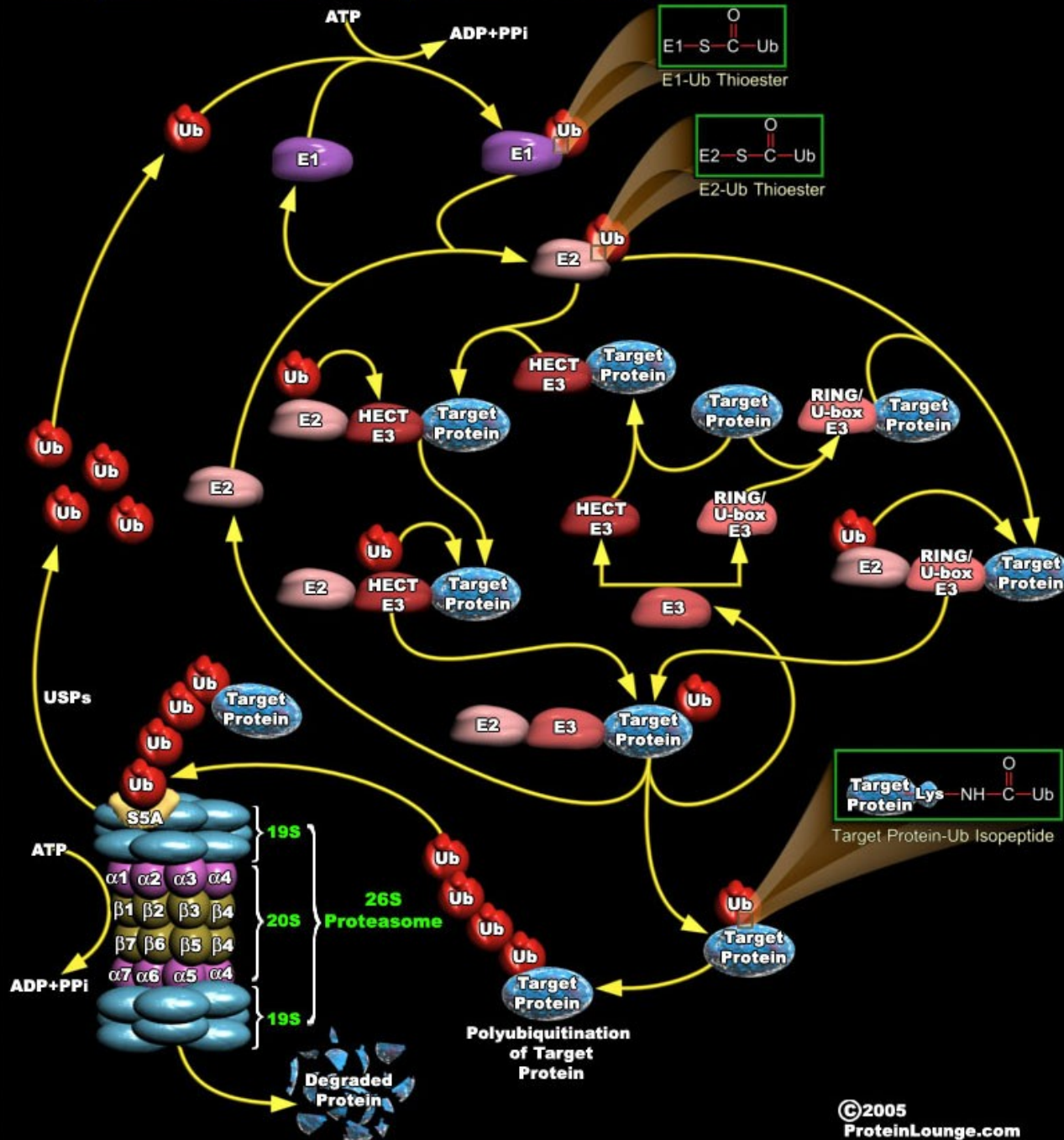


Transkripční koaktivátory:

P/CAF	Histon acetyl transferázová (HAT) aktivita
CBP/p300	cAMP response element (CREB) vázající protein, HAT aktivita
HMG	High mobility group proteins – citlivost DNA k nukleázám
RNA pol 2	RNA polymeráza 2
TFIIB	Nutný pro asociaci RNA pol. s iniciačním komplexem
TBP	TATA-box vázající protein
TAF	TBP asociovaný faktor

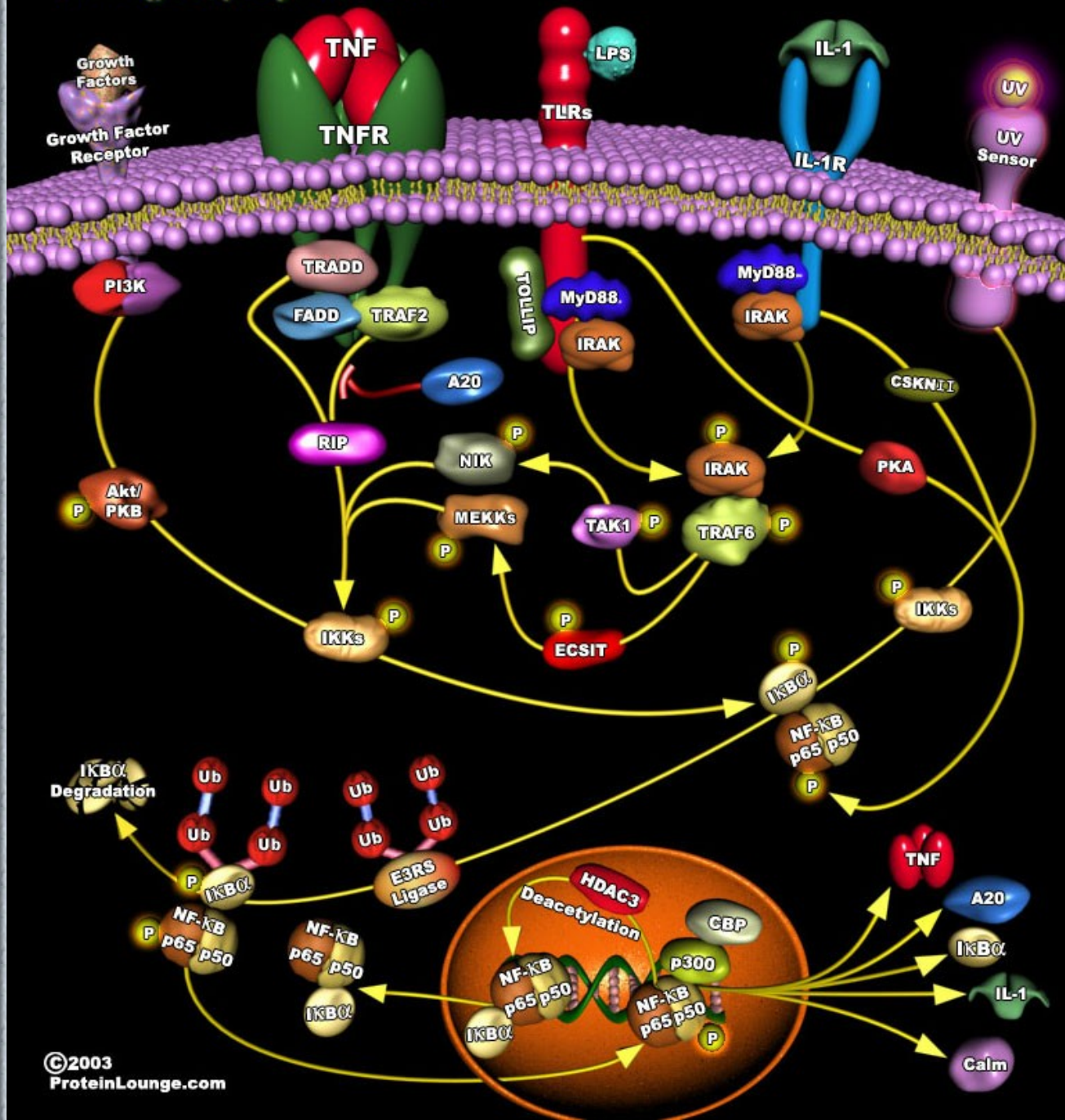
Ubiquitin-Proteasome Dependent Proteolysis

Ubiquitin proteasomový systém



- Ubiquitin – 76 Aky
- E1- Ub. aktivující e.
- E2- Ub. přenášejí e.
- E3- Ub. ligáza

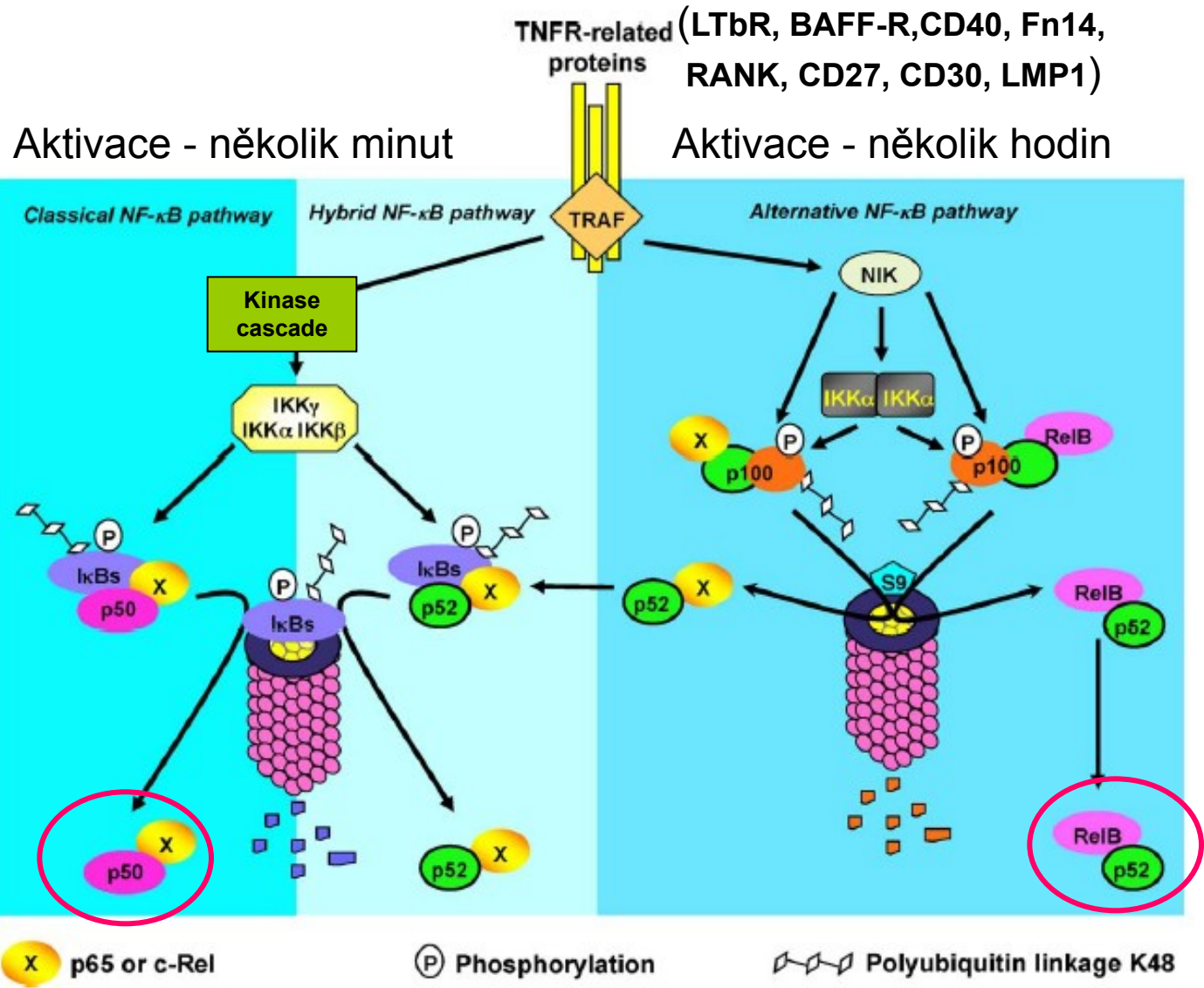
NF- κ B(p50/p65) PATHWAY



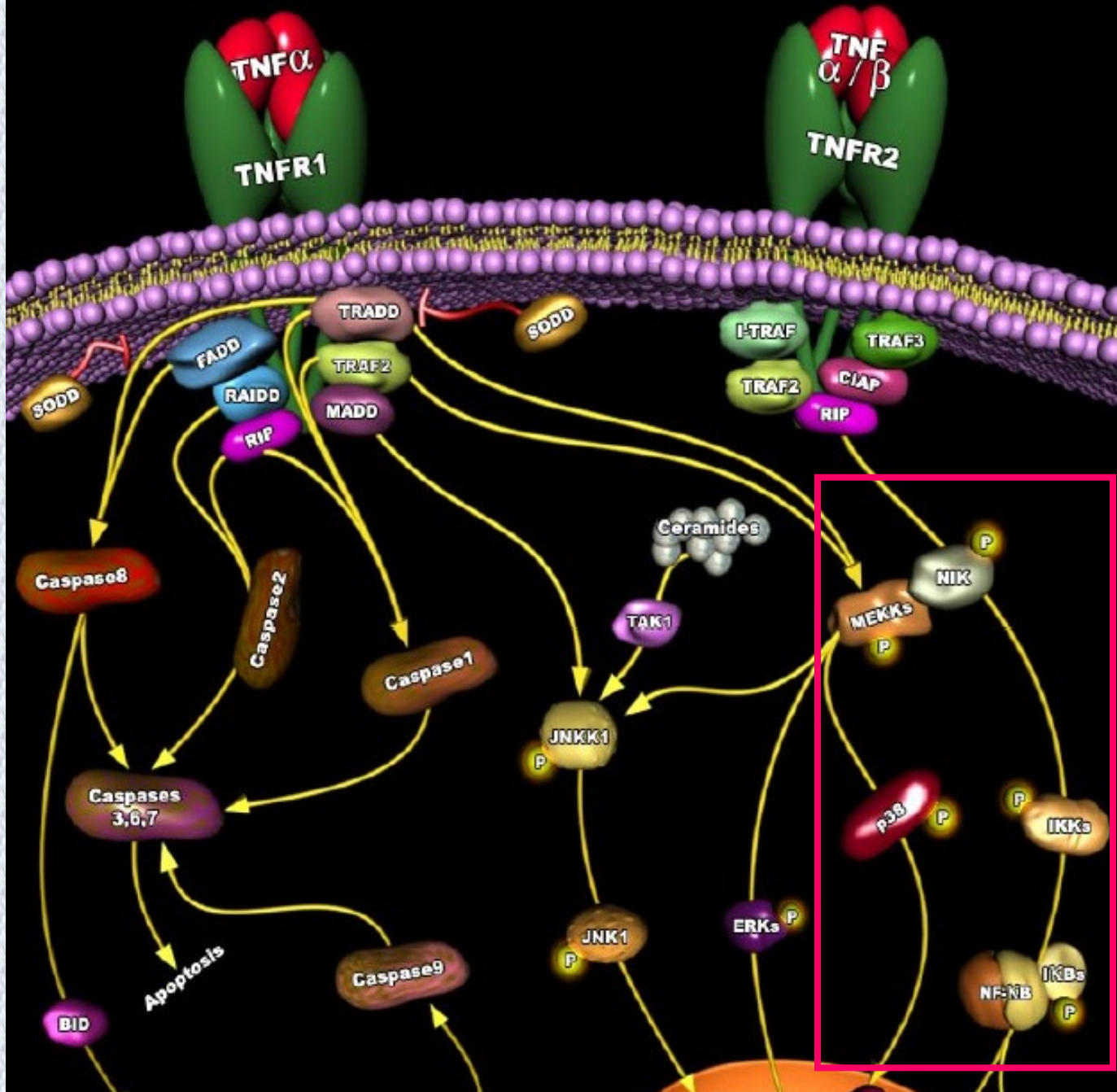
Kanonická dráha aktivace NF-kappaB

Hlavní dimer p65/p50

Alternativní dráha aktivace NF-kappaB



TNF SIGNALING PATHWAY



Dráhy aktivované TNF

TNF α – prozánětlivý, proapoptotický cytokin

Nejsilnější induktor NF-kappaB aktivace

NIK – NF-kappaB indukující kináza

IKK – IkappaB kináza

MEKKs – MAPK/ERK kináza kinázy

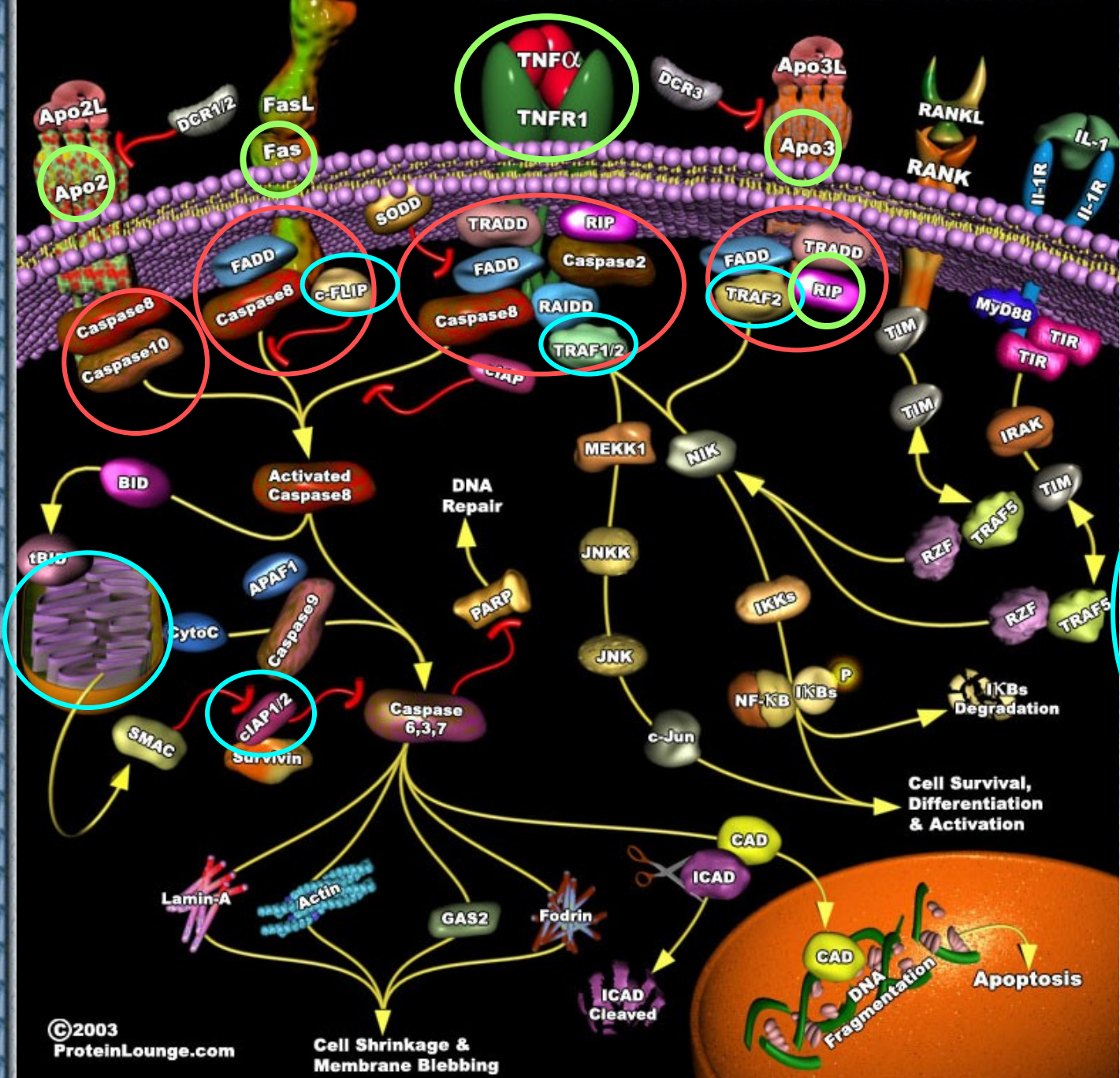
MAPK - Mitogenem aktivovaná protein kináza (JNK, p38, ERK)

ERK - Extracelulárním signálem regulovaná kináza

JNK – cJun N-terminální kináza

p38 – stresem aktivovaná kináza

APOPTOSIS THROUGH DEATH RECEPTORS



NF-κB a apoptóza

DISC -
- death inducing signaling complex

Anti-apoptotické cílové geny NFκB:
c-Flip
c-IAPs
Bcl-XL
A1 (Bcl-2 family)
TRAF1/2

Pro-apoptotické cílové geny NF-kB:
RIP, DR1-6, Fas,
TNF-R

Podpora přirozené imunity

- Produkce pro-zánětlivých působků
 - Interleukiny, chemokiny, TNF; IFN β , RANTES
 - Imunoreceptory (TNF-R, MHCI, imunoglobuliny)
 - Buněčná adheze (ICAM1, ELAM1, VCAM1, selektiny, tenascin C)
 - Proteiny akutní fáze zánětu (faktory komplementu, CRP, LPS R, angiotensinogen)
 - Členové rodiny NF-kappaB
- Anti-apoptotická role je spojena s podporou zánětlivého procesu
 - Apoptotická tělíska pohlcená makrofágy jsou neimunogenní
- Role Bcl-3 v T lymfocytech
 - Vazba na homodimery p50 a p52 v jádře mění tyto represory na aktivátory transkripce
- Podpora dozrávání B lymfocytů
 - IKK α podporuje aktivaci dimerů p52/RelB – produkce proteinů posilujících rezistenci B lymfocytů k apoptóze

x PODPORA CHRONICKÉHO ZÁNĚTU!!!

(revmatoidní artritida, kardiovaskulární nemoci, autoimunitní nemoci)

Podpora proliferace

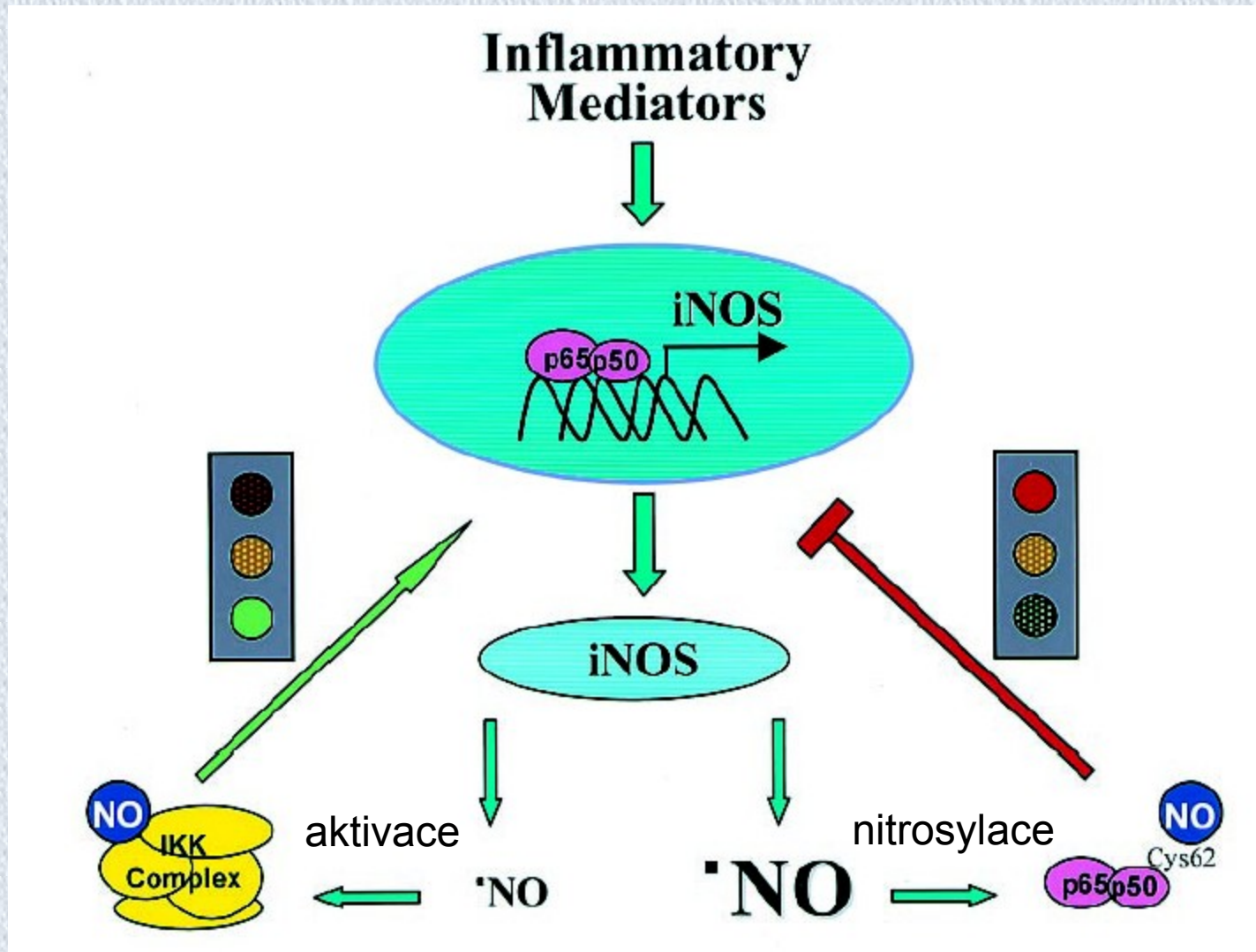
- Cytokiny a jejich receptory produkované působením NF-kappaB působí jako růstové faktory
 - Aktivuje geny pro G-, M-, GM-CSF, VEGF
- Aktivuje expresi cyklinu D1 nutného pro přechod G1/S
- Aktivuje expresi c-Myc – transaktivuje geny pro cykliny a potlačuje expresi p21
- v G1,G2 fázi – hl. role Akt - fosforyluje IKK + Chk1 je inaktivní
- v S fázi je to naopak + role RelA a p100

Regulátor stresové odpovědi

Stresory aktivující NF-kappaB:

- Infekce
- Ischemický/reperfúzní stres
- Hemorhagický šok
- Poškození jater
- Ozáření organismu (UV, γ)
- Oxidační (ROS (?)) a NOS metabolismus)
- Hyperglykemický stres
- Xenobiotický (cigaretový kouř, těžké kovy, PCB, cytostatika)

NO metabolism



Vliv na karcinogenezi

NF-kappaB

Potlačuje rozvoj apoptózy

+

Indukuje proliferaci, angiogenezi

+

Zvyšuje metastatický potenciál

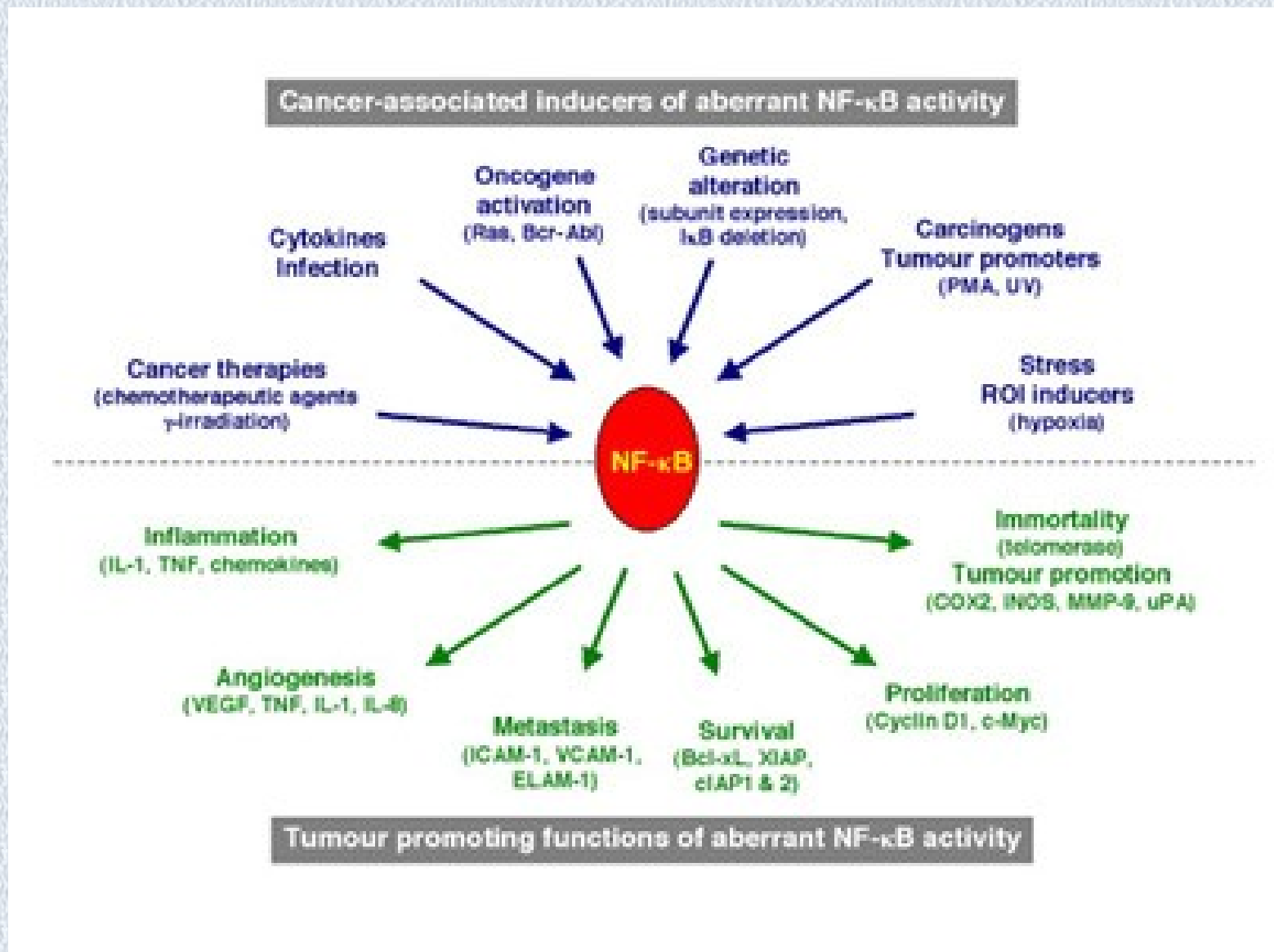
+

Podporuje zánětlivé procesy

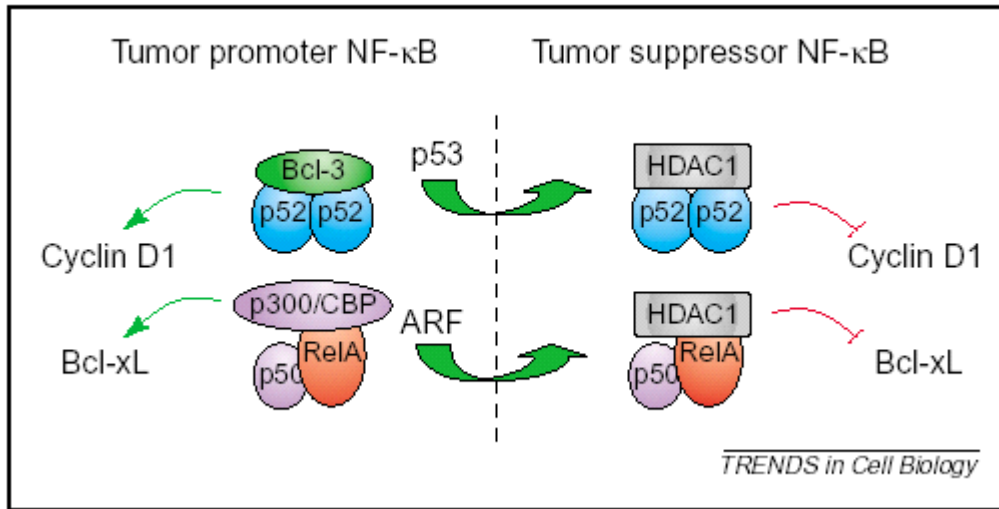
=

Podmínky vhodné pro karcinogenezi

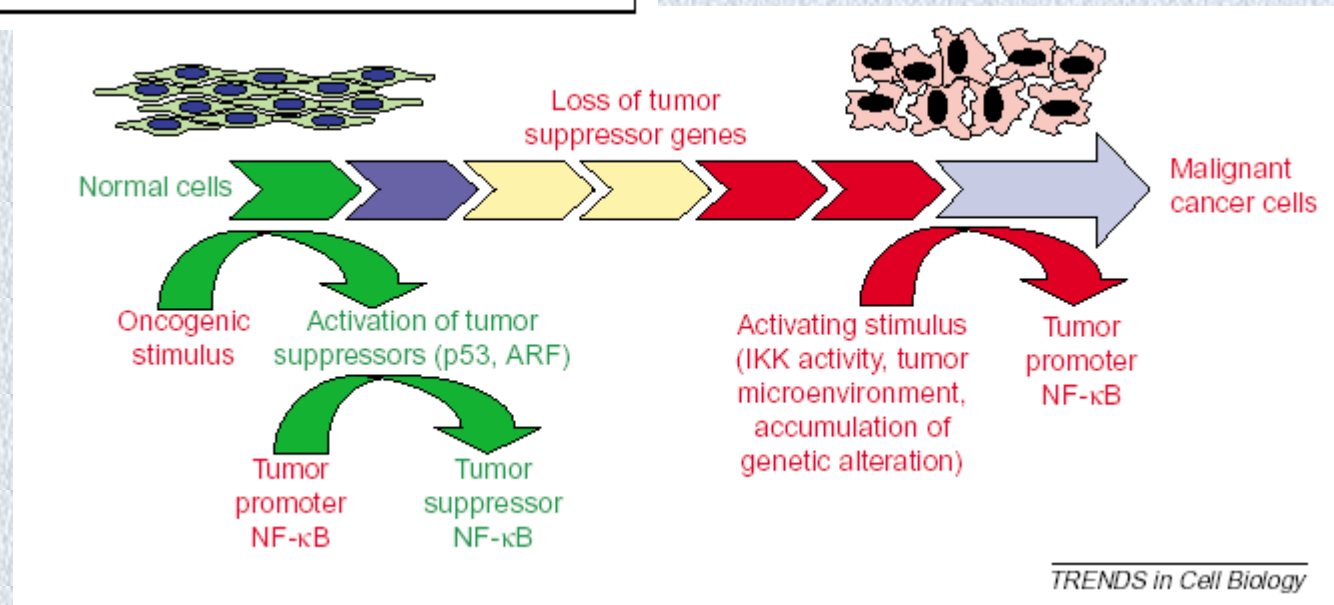
Karcinogenetický potenciál NF-kappaB



Modulace aktivity NF-kappaB



Tumor supresorové proteiny p53 a ARF indukují asociaci aktivního NF-kappaB s HDAC1 => Represe NF-kappaB aktivity



Detekce aktivního NF-kappaB

- **WB**
 - Degradace I κ B
 - Nárůst p50 a p65 v nukleárním extraktu a úbytek v cytoplazmatickém extraktu
- **EMSA** - Electrophoretic Mobility Shift Assay
 - » NF-kappaB v nukleárním extraktu se váže na značené oligonukleotidy obsahující κ B vazné místo
 - » Detekce komplexu nativní PAGE
- **Reportérový plazmid** – Transfekce buněk plazmidem nesoucím κ B vazná místa v promotoru genu pro luciferázu/B-gal/CAT

Shrnutí

- Rodina transkripčních faktorů NF-kappaB
- Klasická vs. alternativní dráha aktivace
- Nejsilnější aktivátor NF-kappaB je TNF- α
- Pro-zánětlivé a přežití podporující účinky
- Aktivován stresem
- Podílí se na rozvoji chronického zánětu a nemocí s ním spojených
- Podporuje rozvoj nádorových onemocnění