

# NF-kappaB

**Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.**

**[jipro@sci.muni.cz](mailto:jipro@sci.muni.cz)**



# Osnova

- Struktura NF-kappaB
- Charakteristika 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  $\kappa$  řetězec imunoglobulinů
- Objeven v roce 1986 (Sen, Baltimore et al.)
- **transkripční faktor podporující přežívání buněk a zánětlivé procesy**
- Aktivován min. 210 podněty a ovlivňuje transkripci min. 150 genů (Pahl 1999)
- Úzká vazba na procesy proliferace, karcinogeneze, aktivace imunitního systému

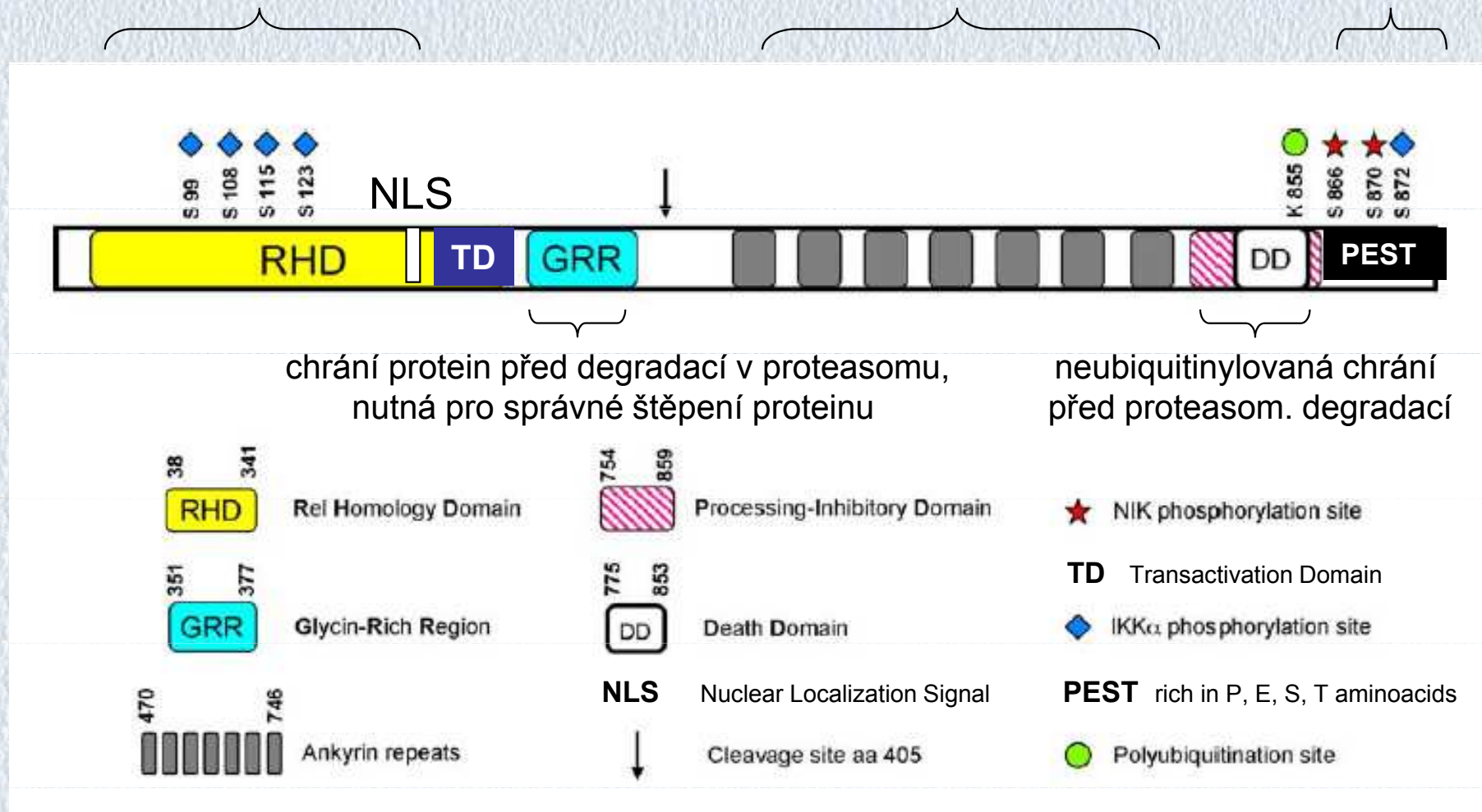


# Struktura NF-kappaB

dimerizace, jaderná lokalizace, vazba na DNA











maskují NLS, interakce protein-protein





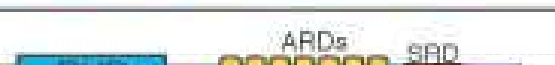
obsahuje rozpoznávací sekvenci pro kinázy





# Rodina NF-kappaB/IkappaB

Gene	Polypeptide	
<i>rela</i>	RelA 	
<i>crel</i>	cRel 	
<i>relb</i>	RelB 	
<i>nfkb1</i>	p50 	
<i>nfkb2</i>	p52 	

Gene	Polypeptide	Stimuli that induce degradation
<i>nfkb1a</i>	IκBα 	TNF, LPS, IL-1, TCR, BCR
<i>nfkb1b</i>	IκBβ 	
<i>nfkb1e</i>	IκBε 	
<i>nfkb1</i>	p105 	LPS (in B cells)
<i>nfkb2</i>	p100 	LTβ, CD40, BAFF, RANKL, OX40



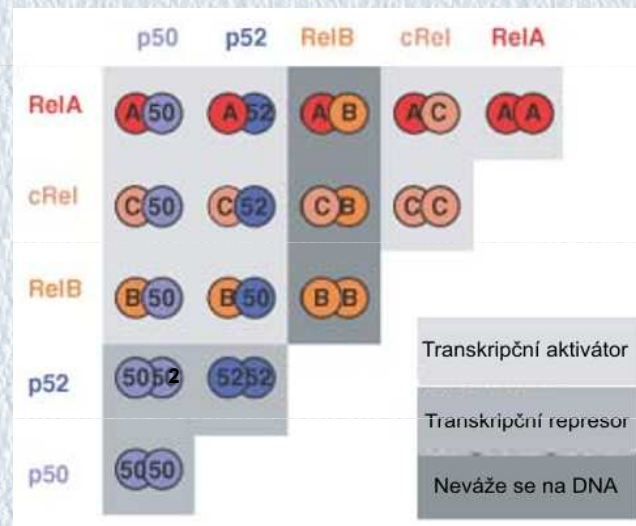
# Dimerizace členů rodiny NF-kappaB

**Table 1. NF-κB family proteins**

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

<sup>a</sup>Abbreviations: 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

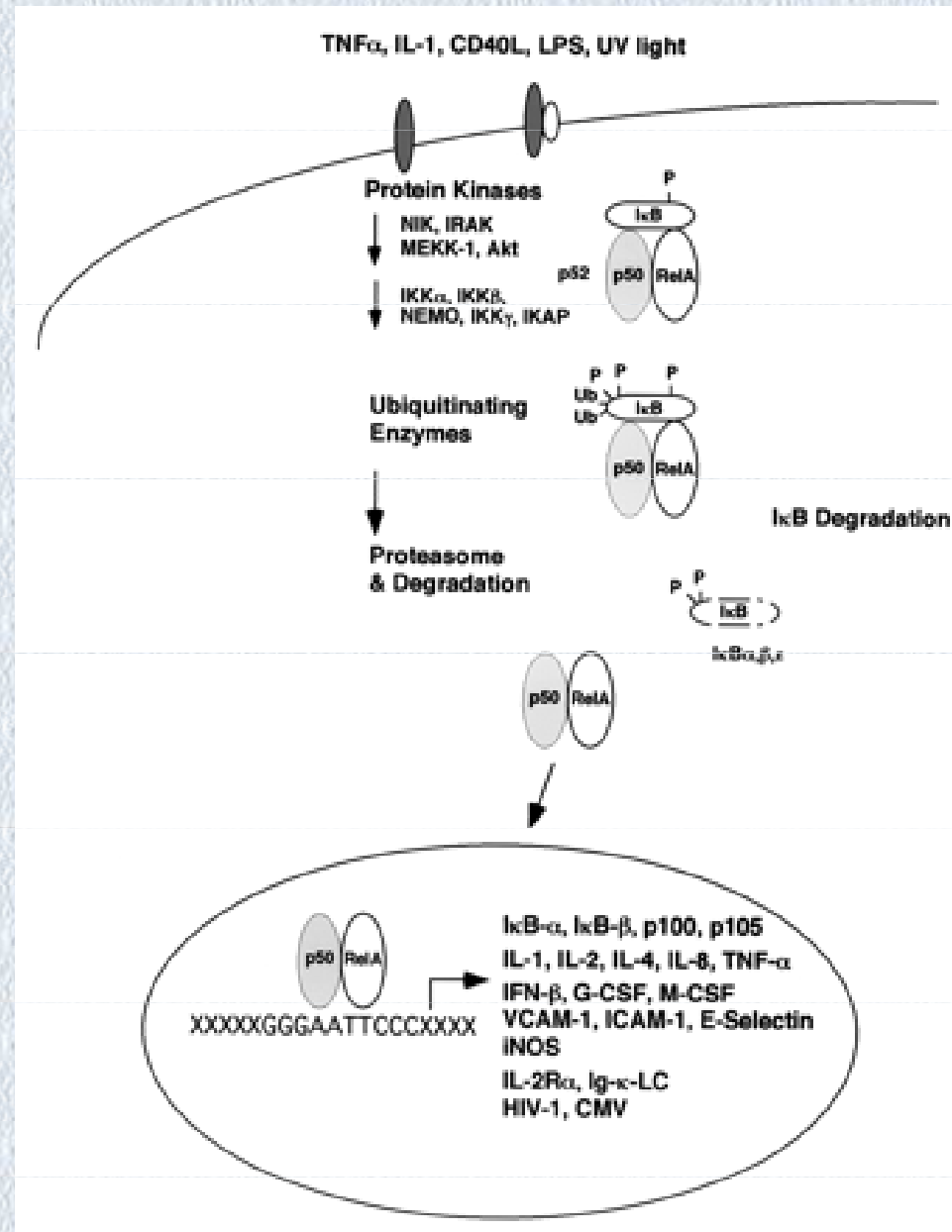
Phenotype	Description
NF- $\kappa$ B1 <sup>-/-</sup>	Defects in production of Ab and T-cell proliferative responses. Absence of marginal zone B cells. Defect in Th2 responses. Increased susceptibility to <i>S. pneumoniae</i> and <i>L. monocytogenes</i> . Normal response to <i>E. coli</i> infection and <i>H. influenzae</i> but enhanced resistance to EMCV.
NF- $\kappa$ B2 <sup>-/-</sup>	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- $\kappa$ B1 <sup>-/-</sup> NF- $\kappa$ B2 <sup>-/-</sup>	Increased mortality after birth and developmental defects including osteopetrosis, thymic and lymph node atrophy, and disorganized splenic structure.
RelA <sup>-/-</sup>	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 <sup>-/-</sup>	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 $\alpha$ <sup>-</sup> DC. Susceptible to <i>L. monocytogenes</i> , LCMV, and <i>T. gondii</i> . Reduced capacity to produce IFN- $\gamma$ and impaired DTH responses.
c-Rel <sup>-/-</sup>	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- $\gamma$ , and GM-CSF.
I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>-/-</sup>	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 <sup>-/-</sup>	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 Ektodermální dysplázie a imunitní deficiencie (oportunní infekce)

<sup>a</sup> 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.

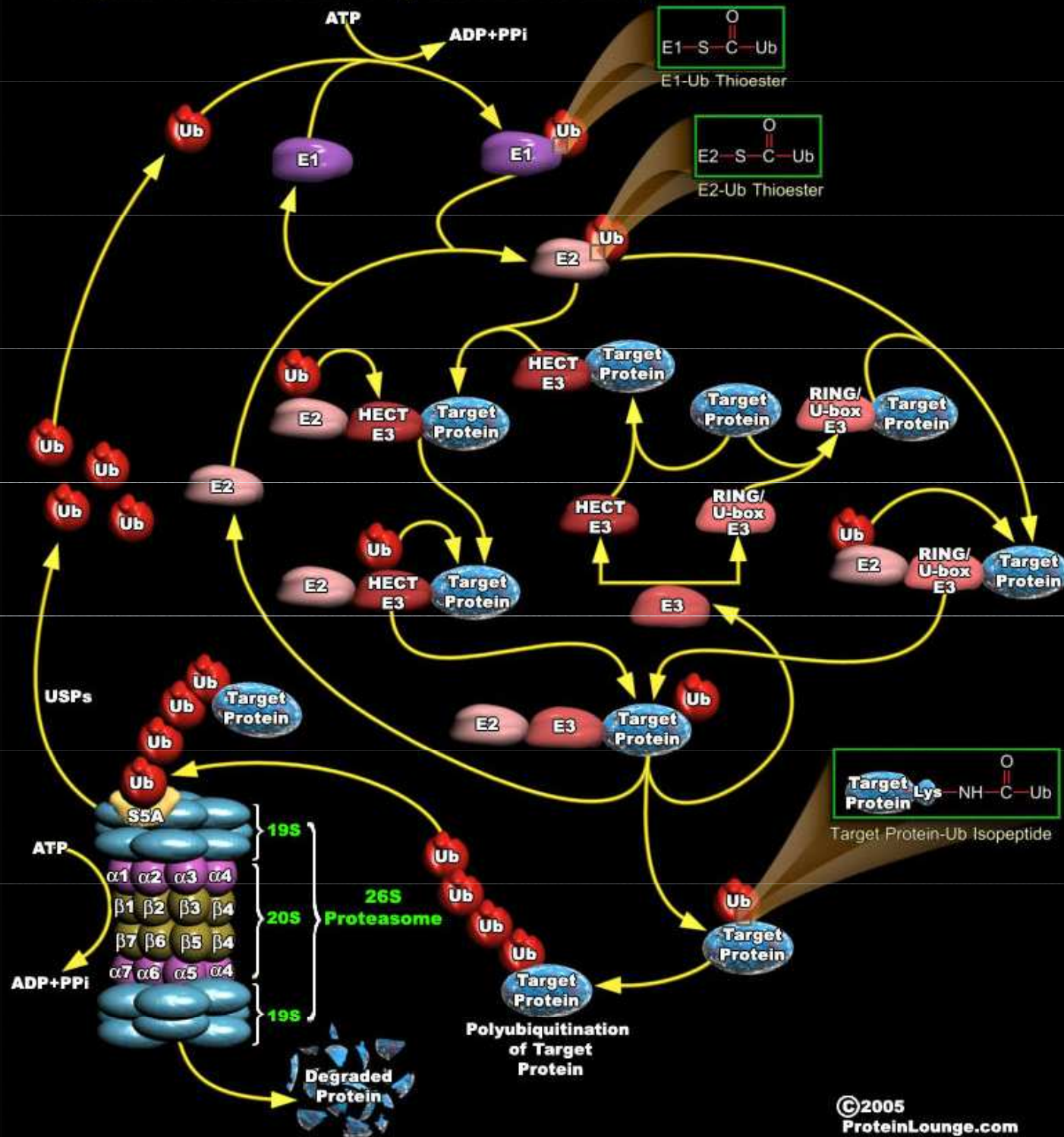


# Signálová dráha NF-kappaB





# Ubiquitin-Proteasome Dependent Proteolysis



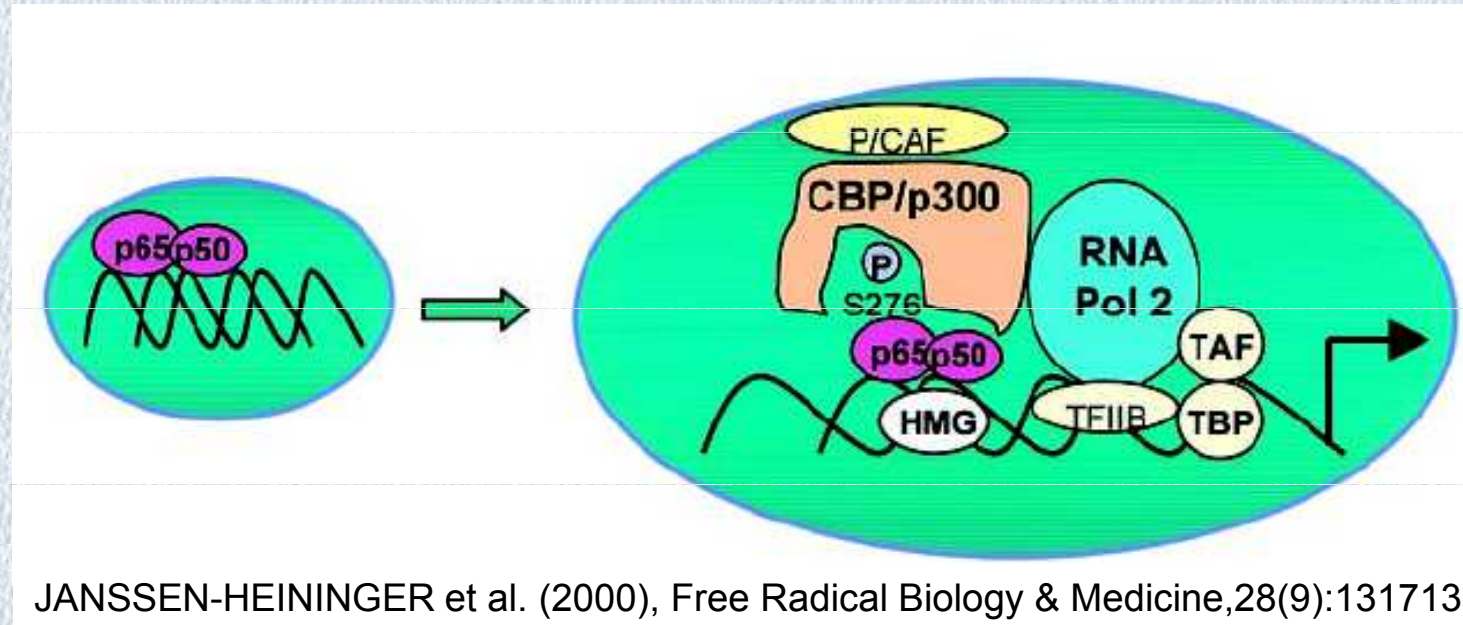
## Ubiquitin proteasomový systém

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



# Transaktivace

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



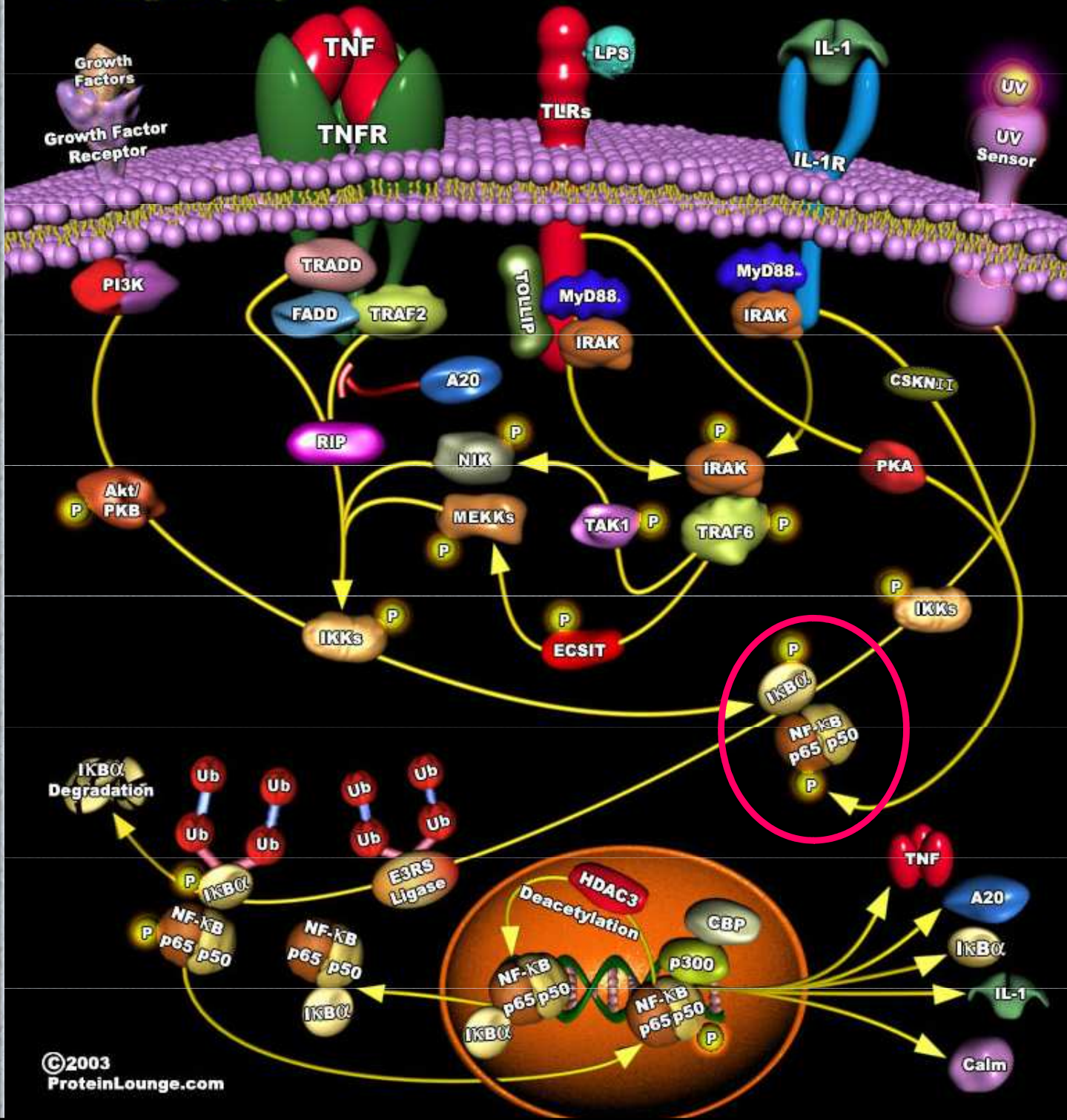
JANSSEN-HEININGER et al. (2000), Free Radical Biology & Medicine,28(9):131713

## 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



# NF- $\kappa$ B(p50/p65) PATHWAY

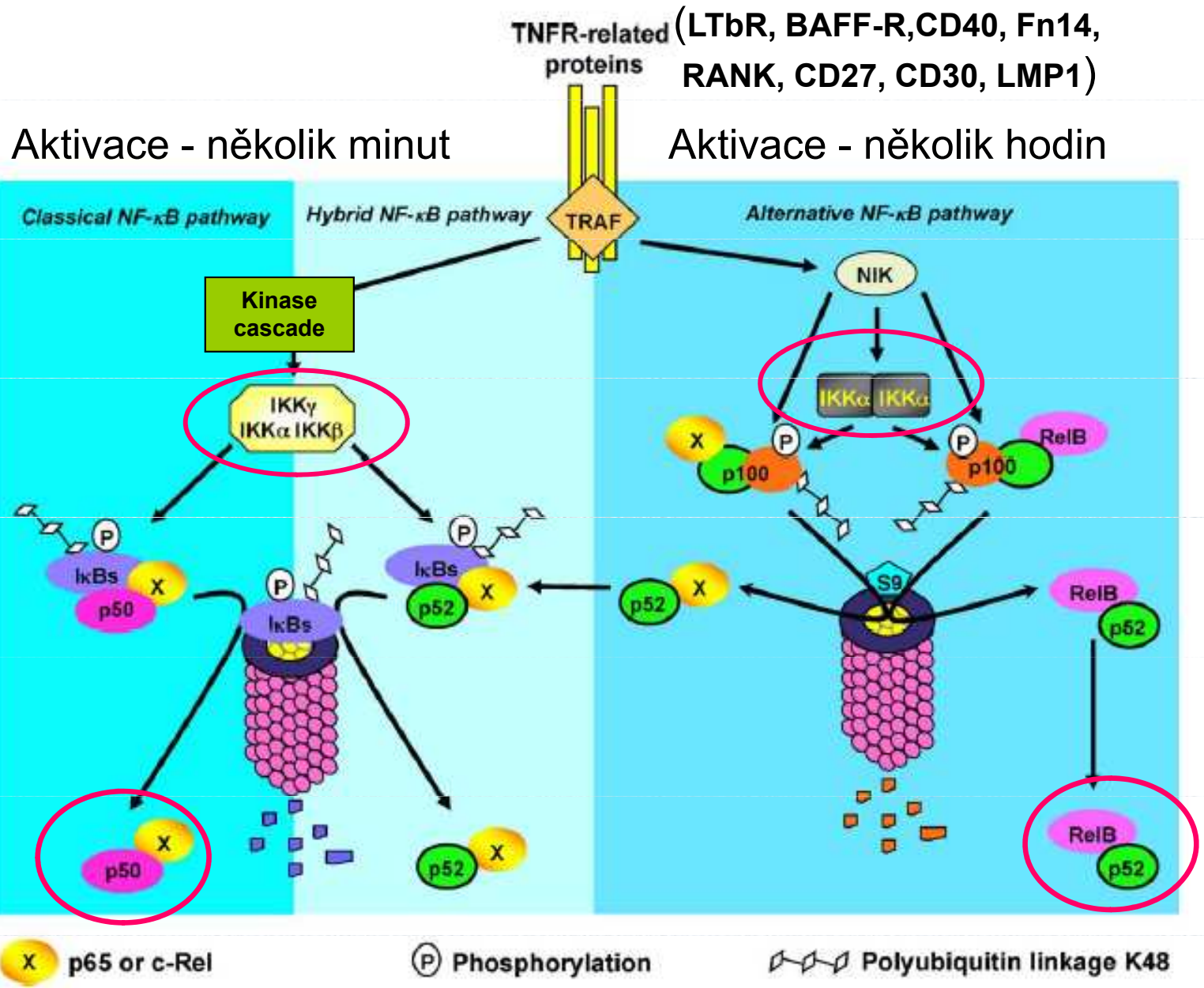


## Kanonická dráha aktivace NF-kappaB

Hlavní dimer p65/p50

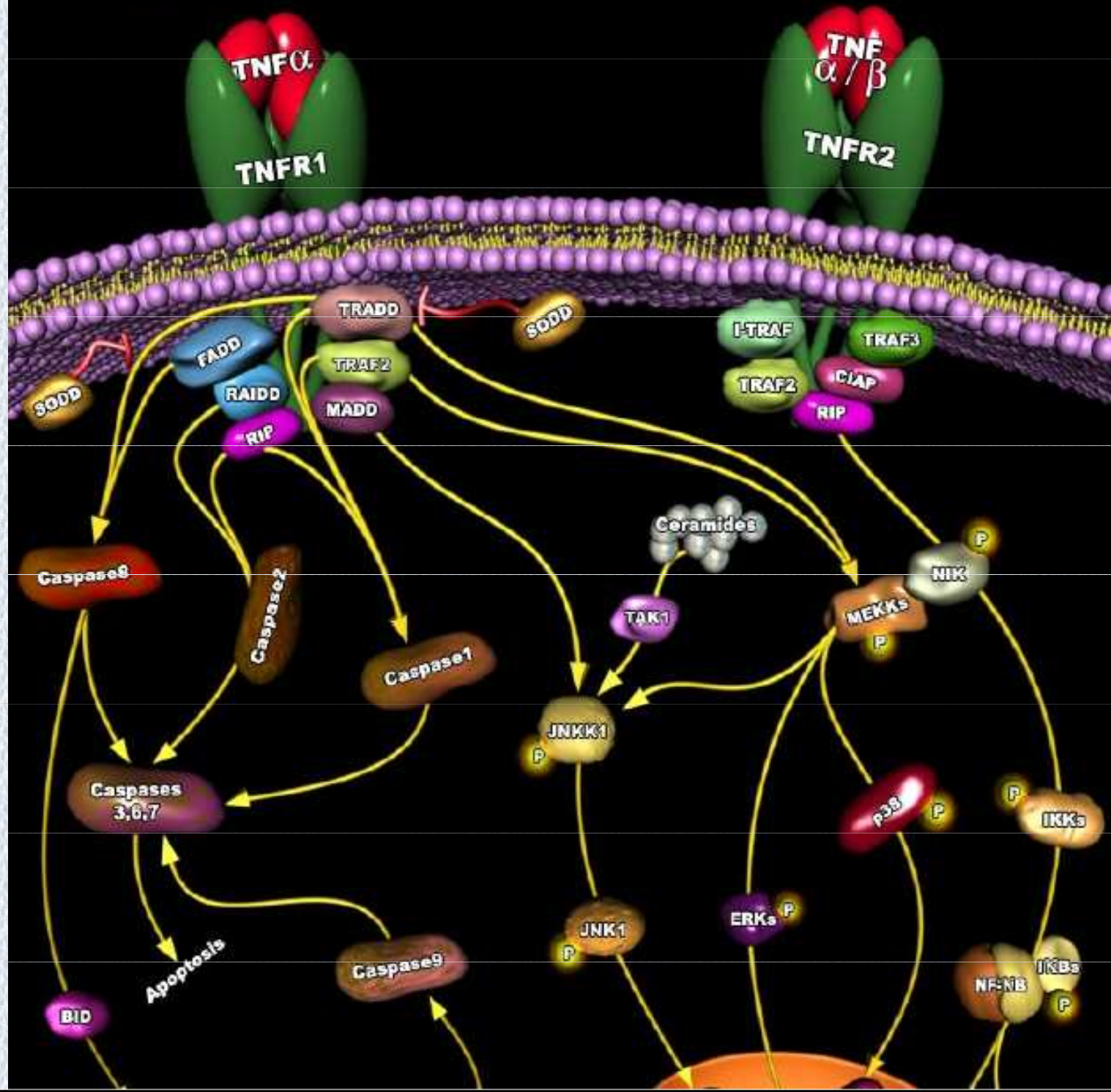


# Alternativní dráha aktivace NF-kappaB





# TNF SIGNALING PATHWAY



## Dráhy aktivované TNF

TNF $\alpha$  – prozánětlivý, proapoptotický cytokin

Nejsilnější induktor NF-kappaB aktivace

NIK – NF-kappaB indukující kináza

IKK – I-kappaB kináza

MEKKs – MAPK/ERK kináza kinázy

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

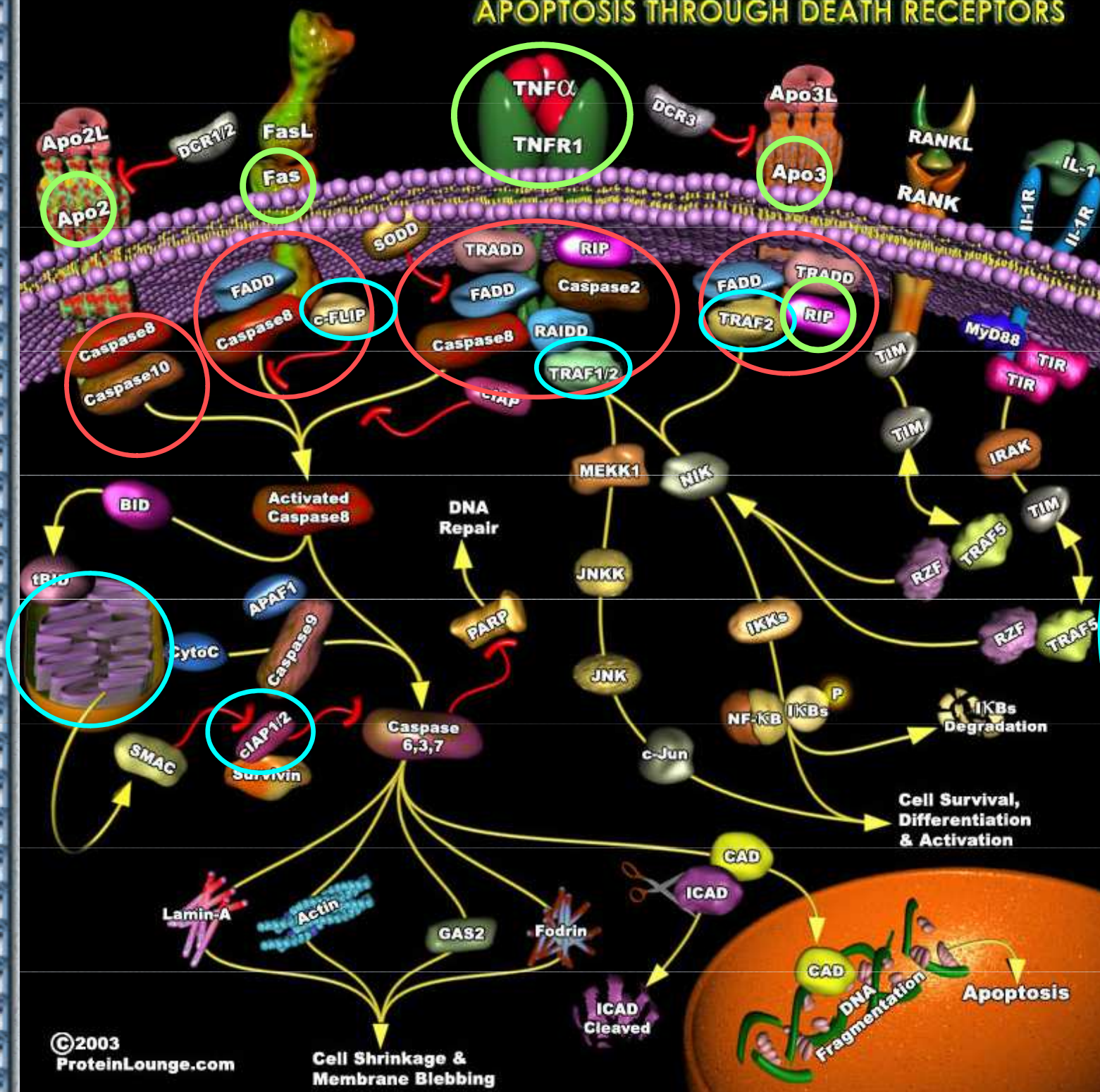
ERK - Extracelulárním signálem regulovaná kináza

JNK – cJun N-terminální kináza

p38 – stresem aktivovaná kináza



# APOPTOSIS THROUGH DEATH RECEPTORS



## NF-κB a apoptóza

DISC -  
– death inducing signaling complex

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

Pro-apoptické cílové geny NF-κB:  
RIP, DR1-6, Fas,  
TNF-R



# Podpora přirozené imunity

- Produkce pro-zánětlivých působků
  - Interleukiny, chemokiny, TNF; IFN $\beta$ , 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 tělíška 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 $\alpha$  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 + potlačuje expresi p21
- Vazba na Cyklin D1, c-Myc a Skp2 promotory se liší v G1,G2 vs S fázi – vliv Akt a Chk1, přesmyk z koaktivátorů na koreprosory (Barré 2007)



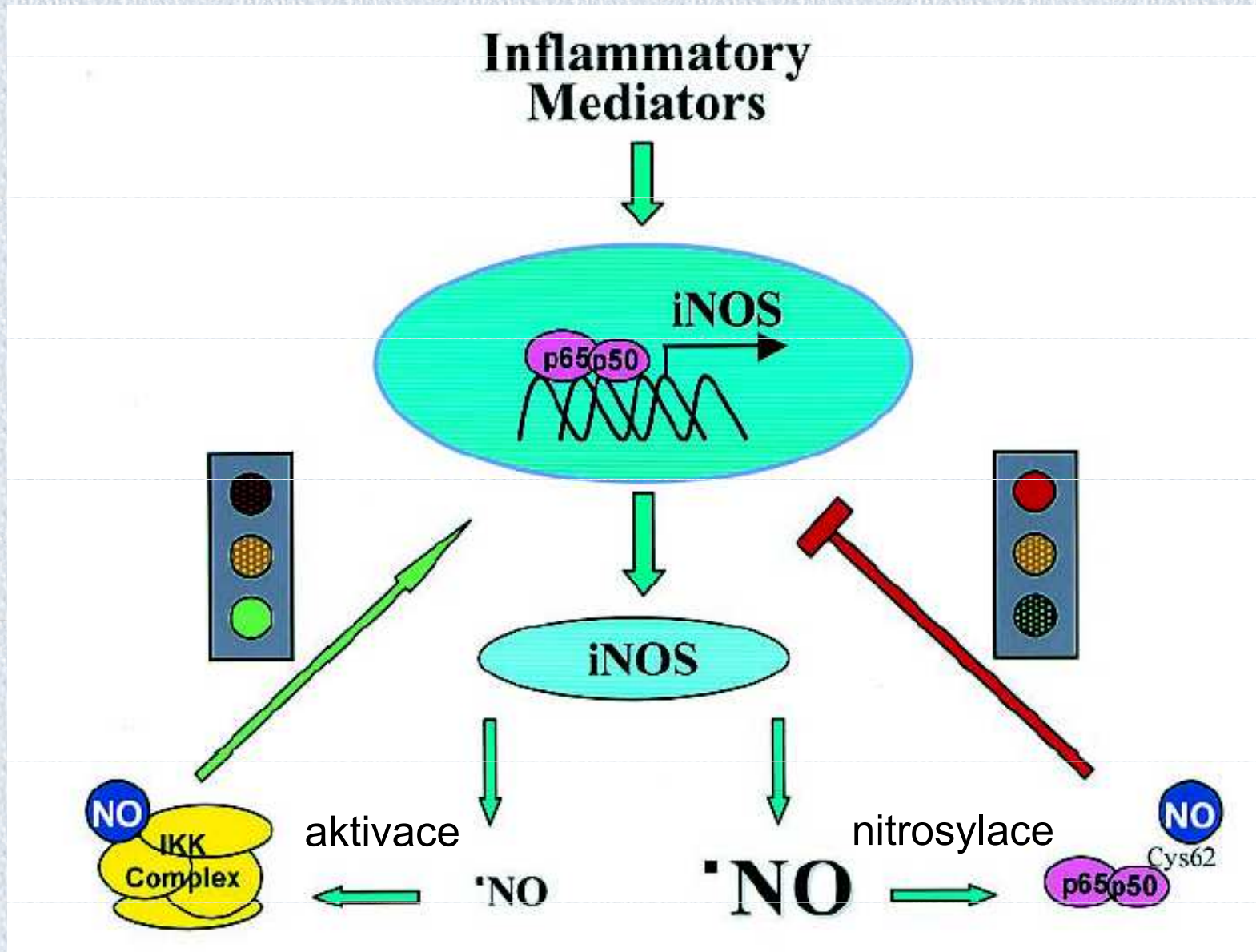
# Regulátor stresové odpovědi

## Stresory aktivující NF-kappaB:

- Infekce
- Ischemický/reperfúzní stres
- Hemorhagický šok
- Poškození jater
- Ozáření organismu (UV,  $\gamma$ )
- 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

+

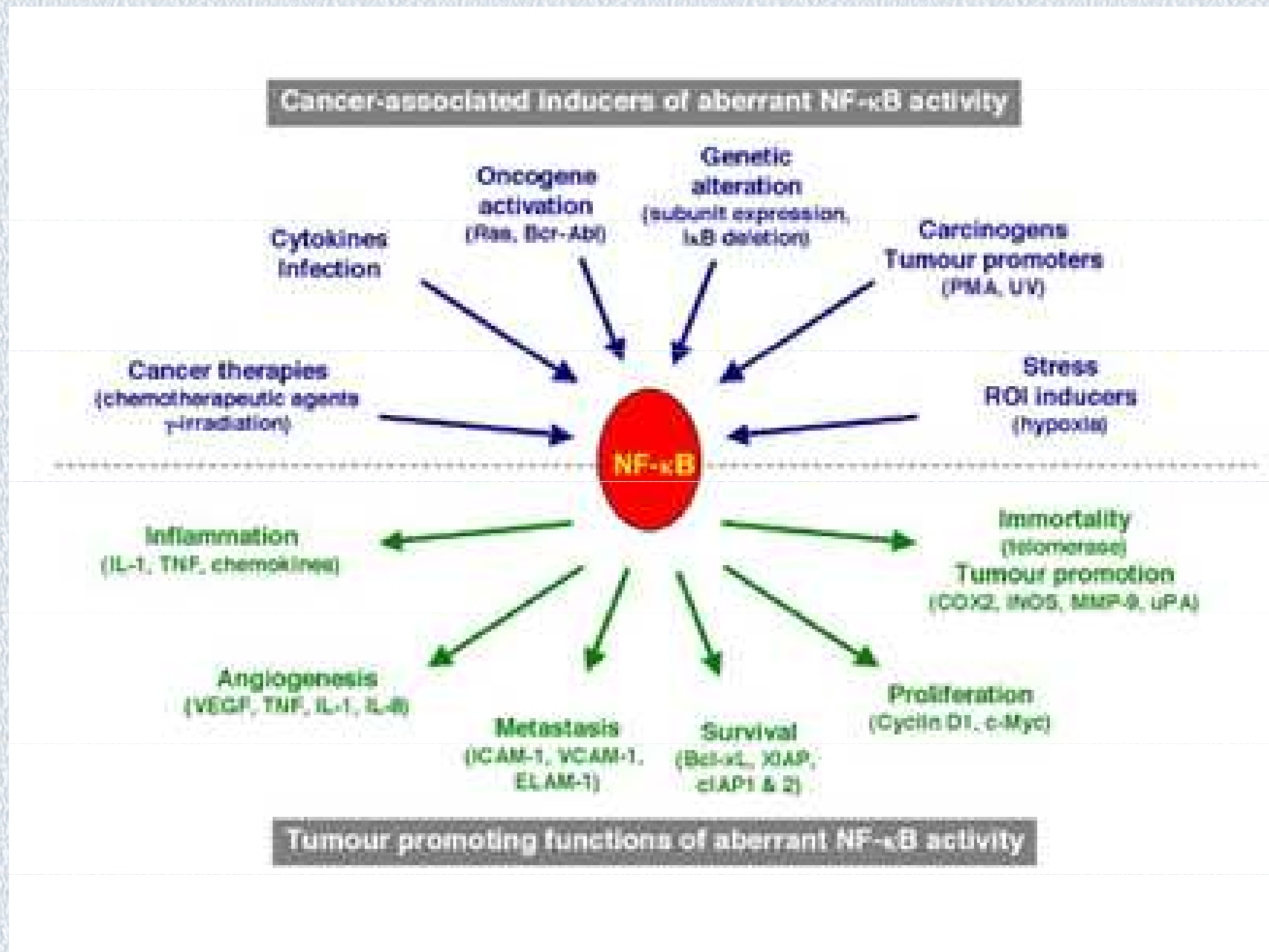
Podporuje zánětlivé procesy

=

**Podmínky vhodné pro karcinogenezi**

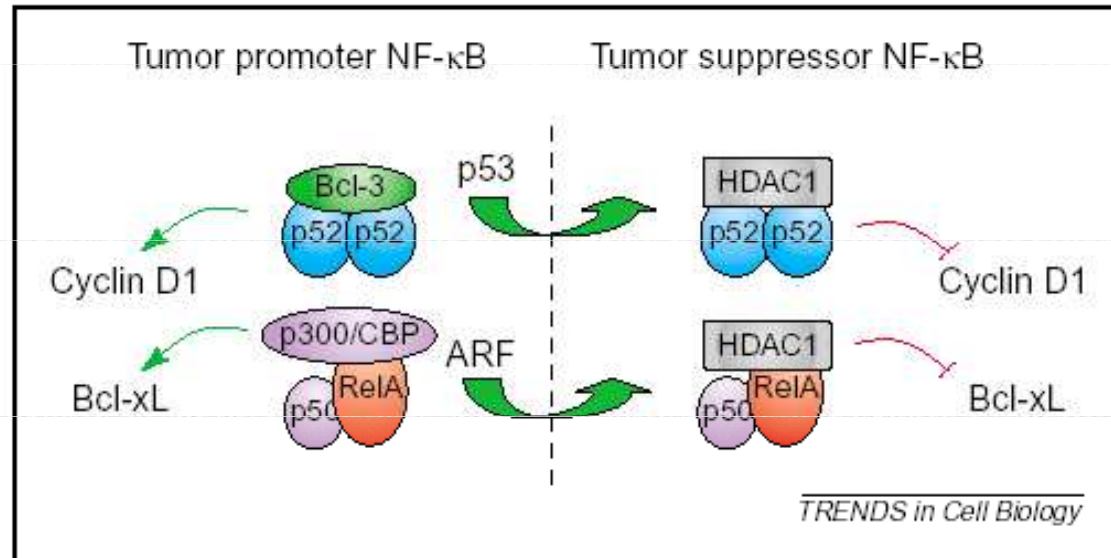


# Karcinogenetický potenciál NF-kappaB

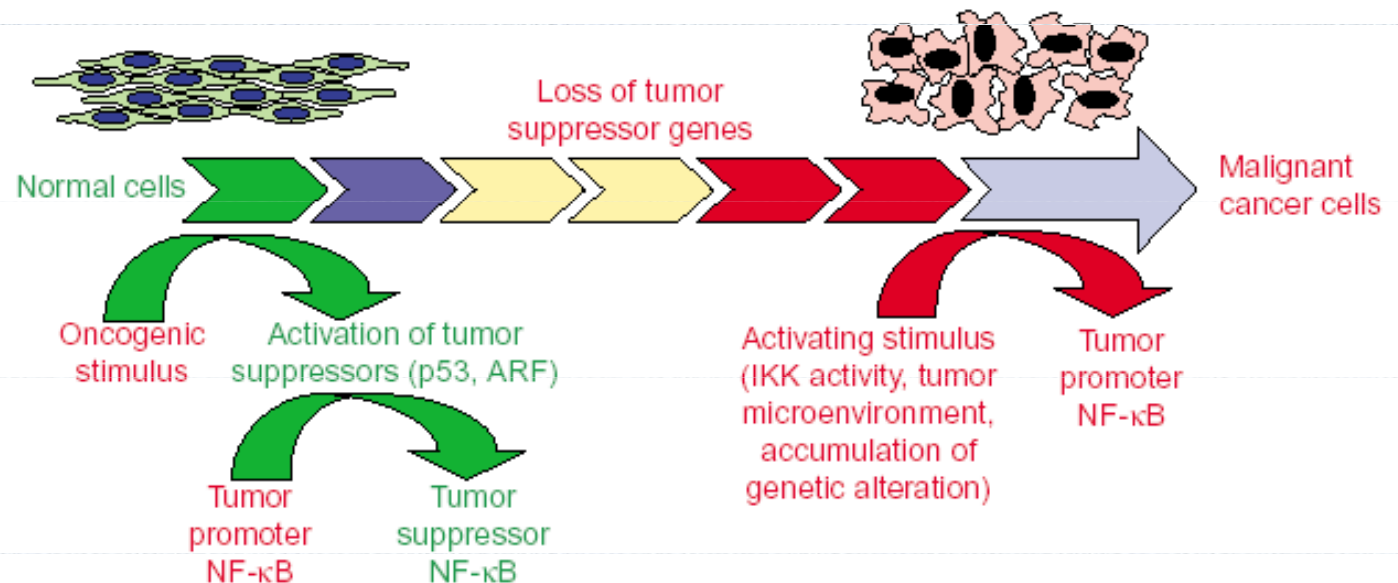




# Modulace aktivity NF-kappaB



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





# Detekce aktivního NF-kappaB

- **WB** - Degradace I kappa 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  $\kappa$ B vazné místo
  - » Detekce komplexu nativní PAGE
- **Reportérový plazmid** – Transfekce buněk plazmidem nesoucím  $\kappa$ 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- $\alpha$
- Pro-zánětlivé a přežití podporující účinky
- Aktivován stresem
- Podílí se na rozvoji chronického zánětu a nemocí s ním spojených
- Podporuje rozvoj nádorových onemocnění