

NF-kappaB

Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

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
- NF-kappaB a paměť
- 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.)
- **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

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

Struktura NF-kappaB

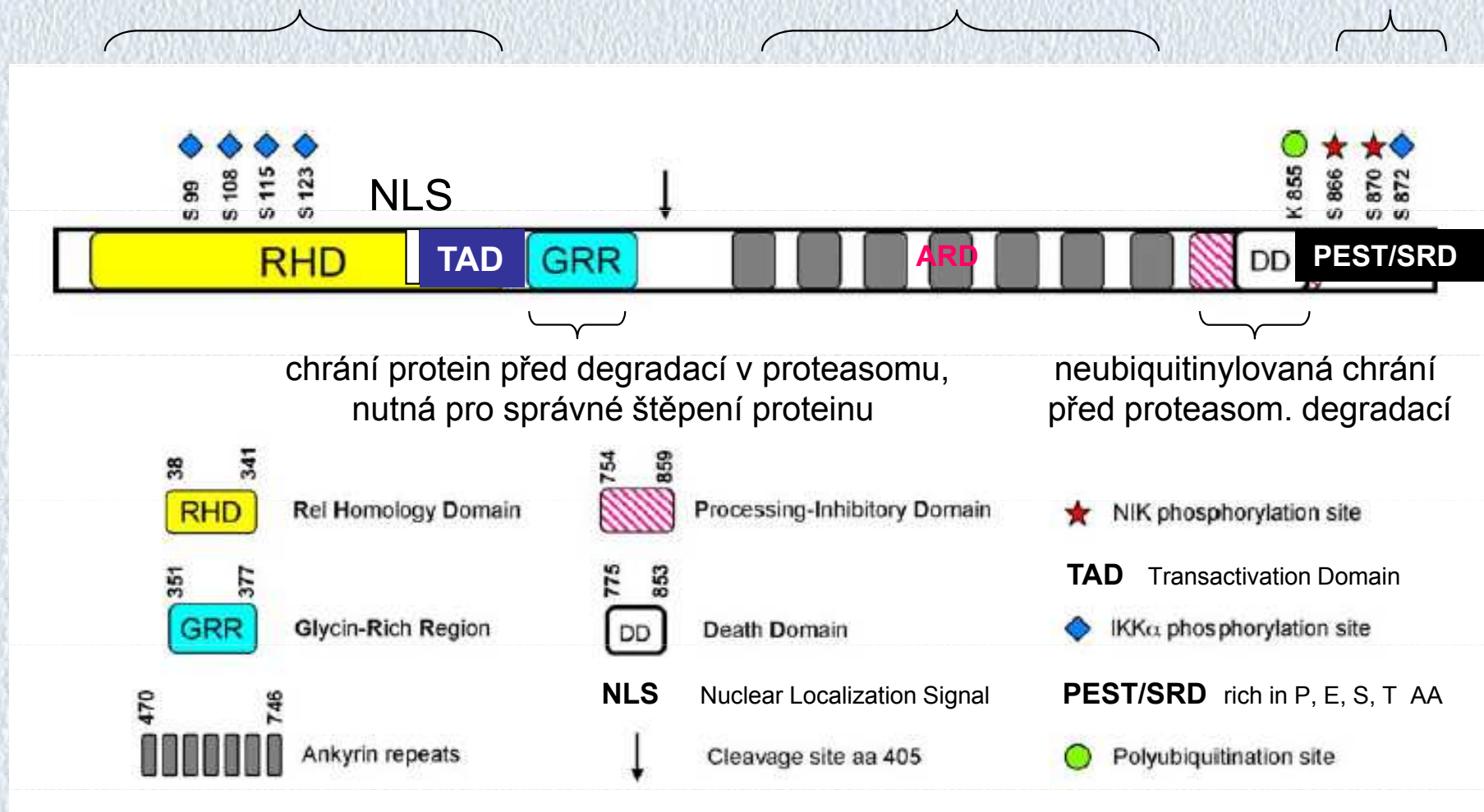
NFkappaB část

dimerizace, jaderná lokalizace, vazba na DNA

IkappaB část

maskují NLS, interakce protein-protein

obsahuje rozpoznávací sekvenci pro kinázy



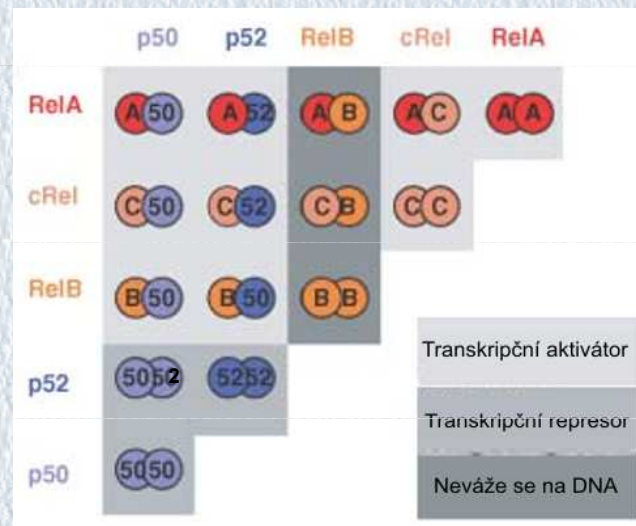
Dimerizace členů rodiny NF-kappaB

Table 1. NF-κB family proteins

	TAD ^a 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

^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)



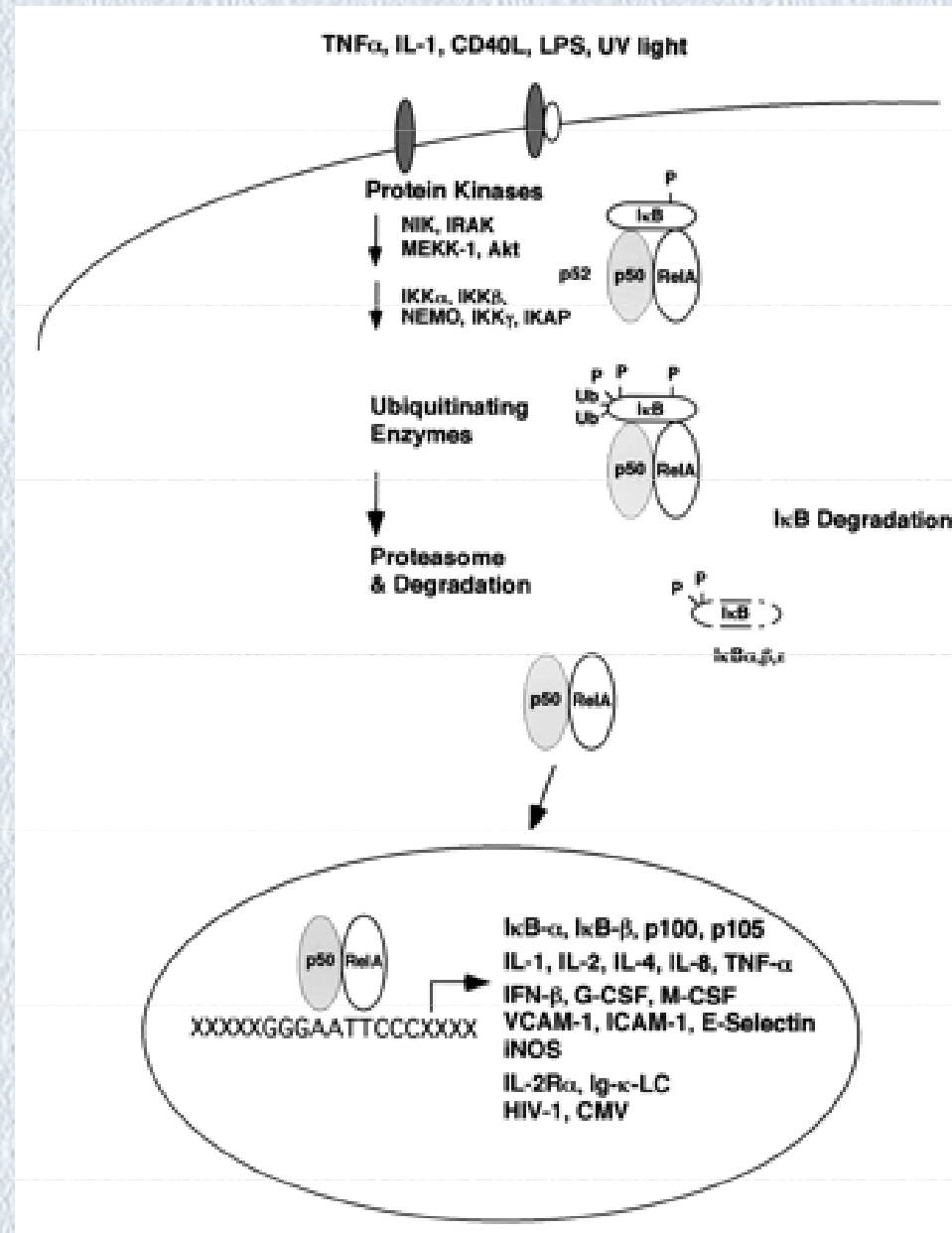
NF-kappaB knock-outs

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.

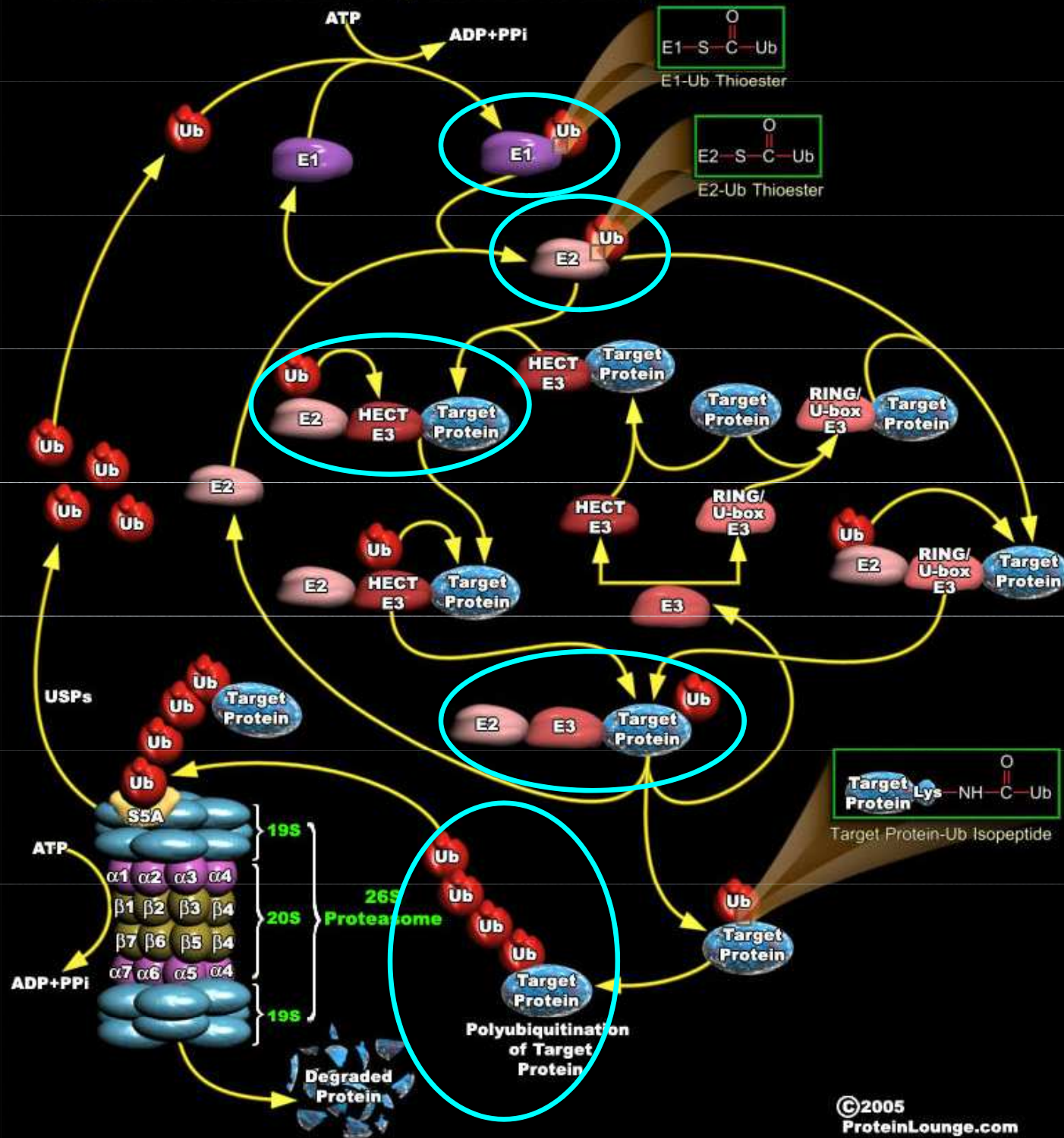
IKK mutace Ektodermální dysplázie a imunitní deficiencie (oportunní infekce)

^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



Ubiquitin-Proteasome Dependent Proteolysis

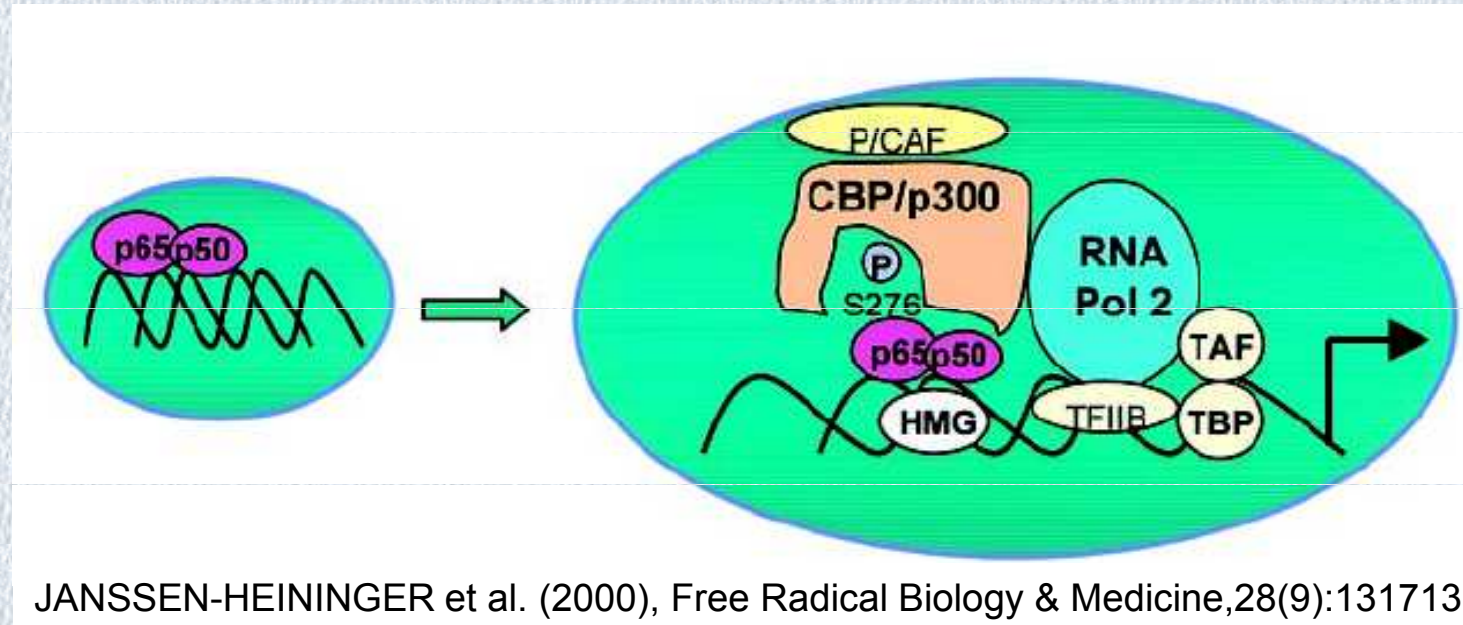


Ubiquitin proteasomový systém

- Ubiquitin – 76 Akys
- 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

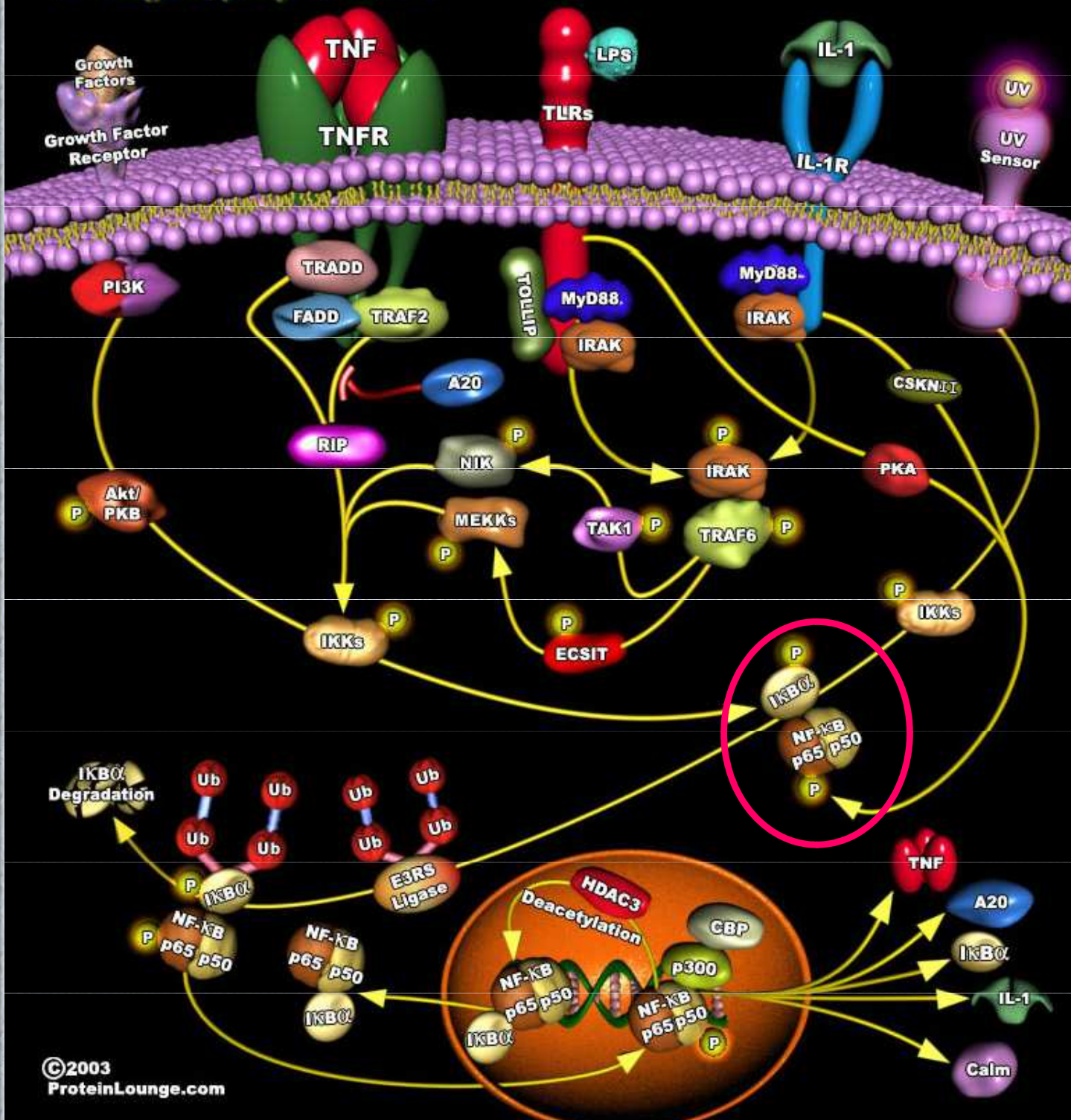
TBP

TATA-box vázající protein

TAF

TBP asociovaný faktor

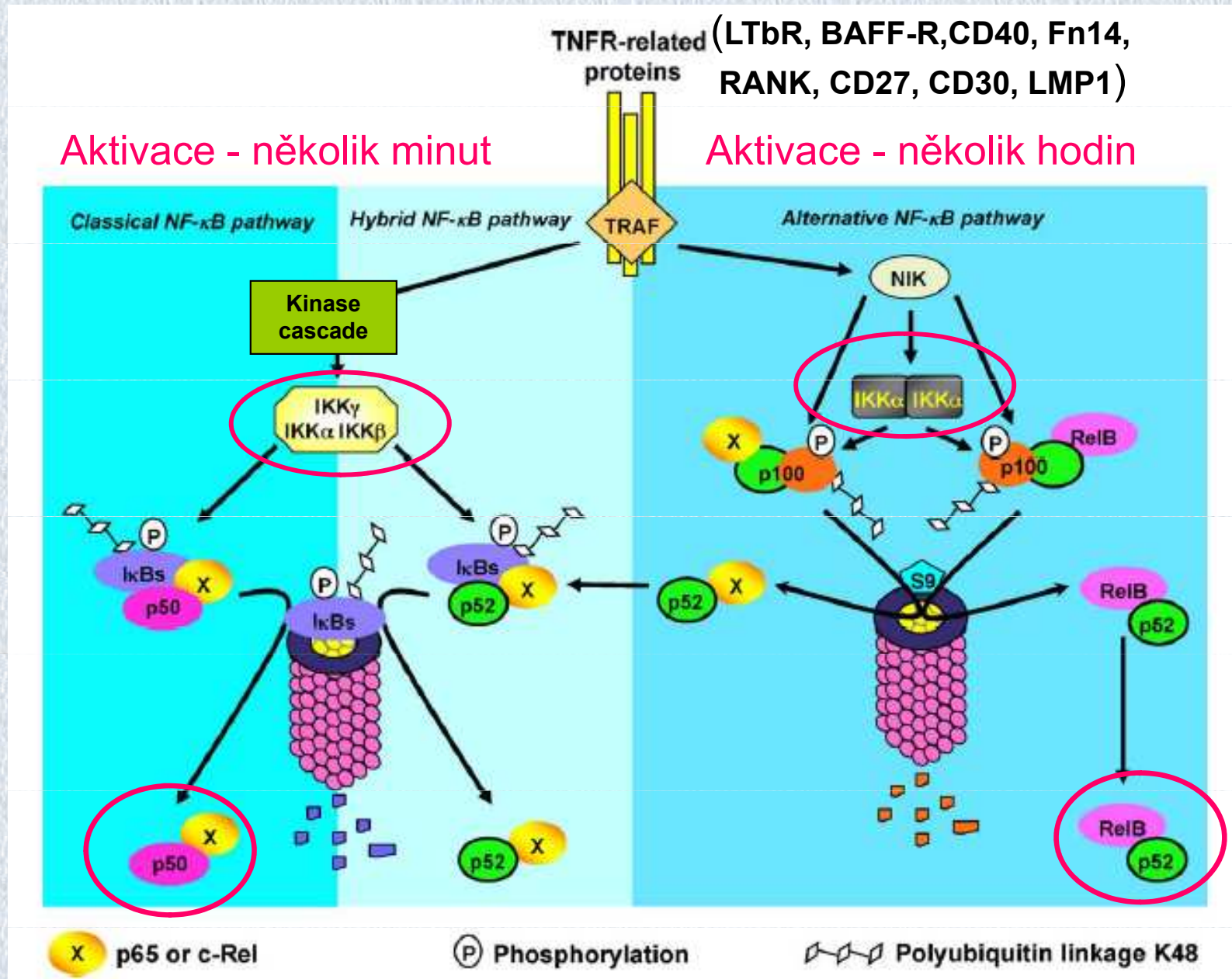
NF- κ B(p50/p65) PATHWAY



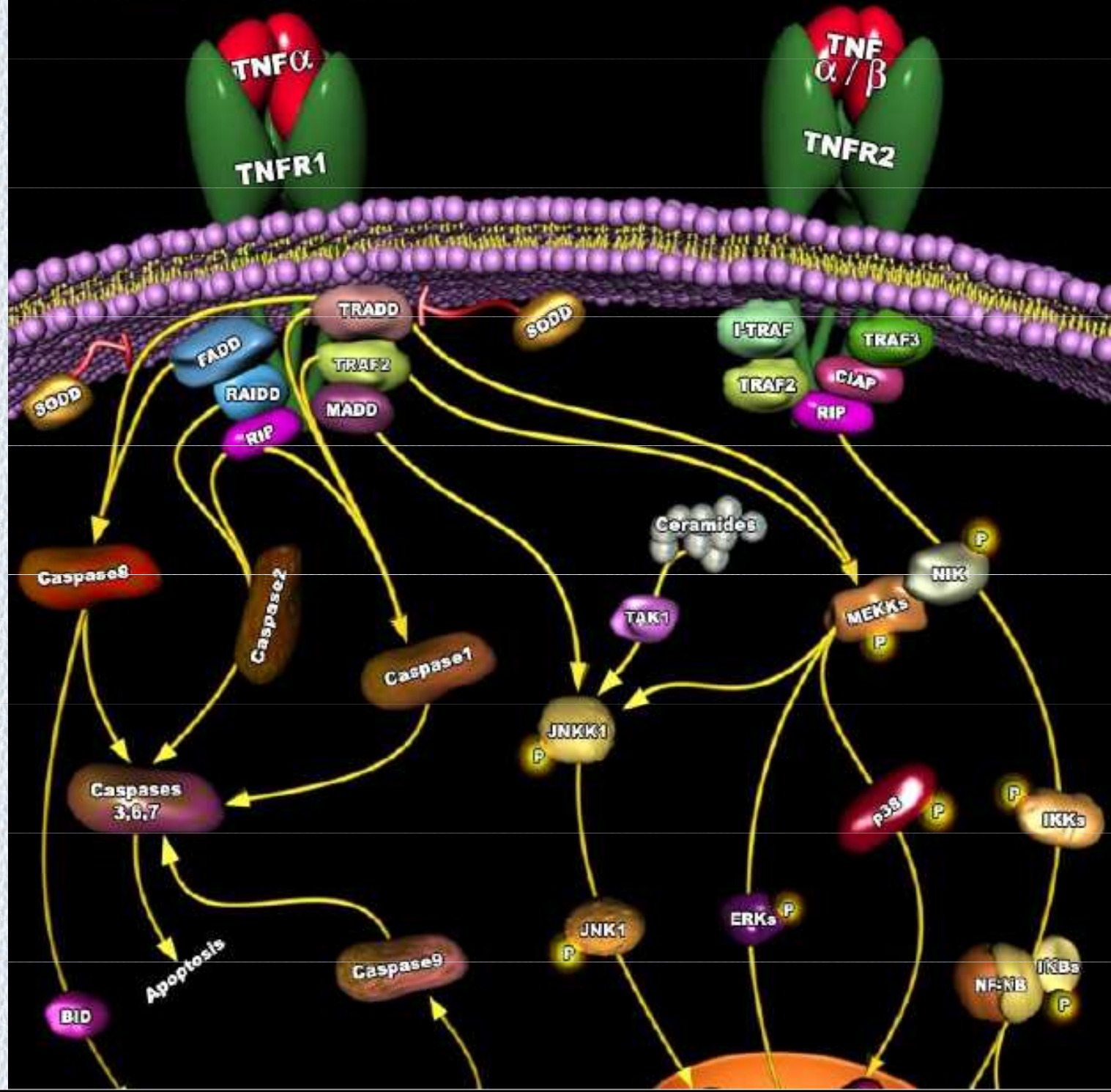
Kanonická dráha aktivace NF-kappaB

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 – I-kappaB kináza

MEKKs – MAPK/ERK kináza kinázy

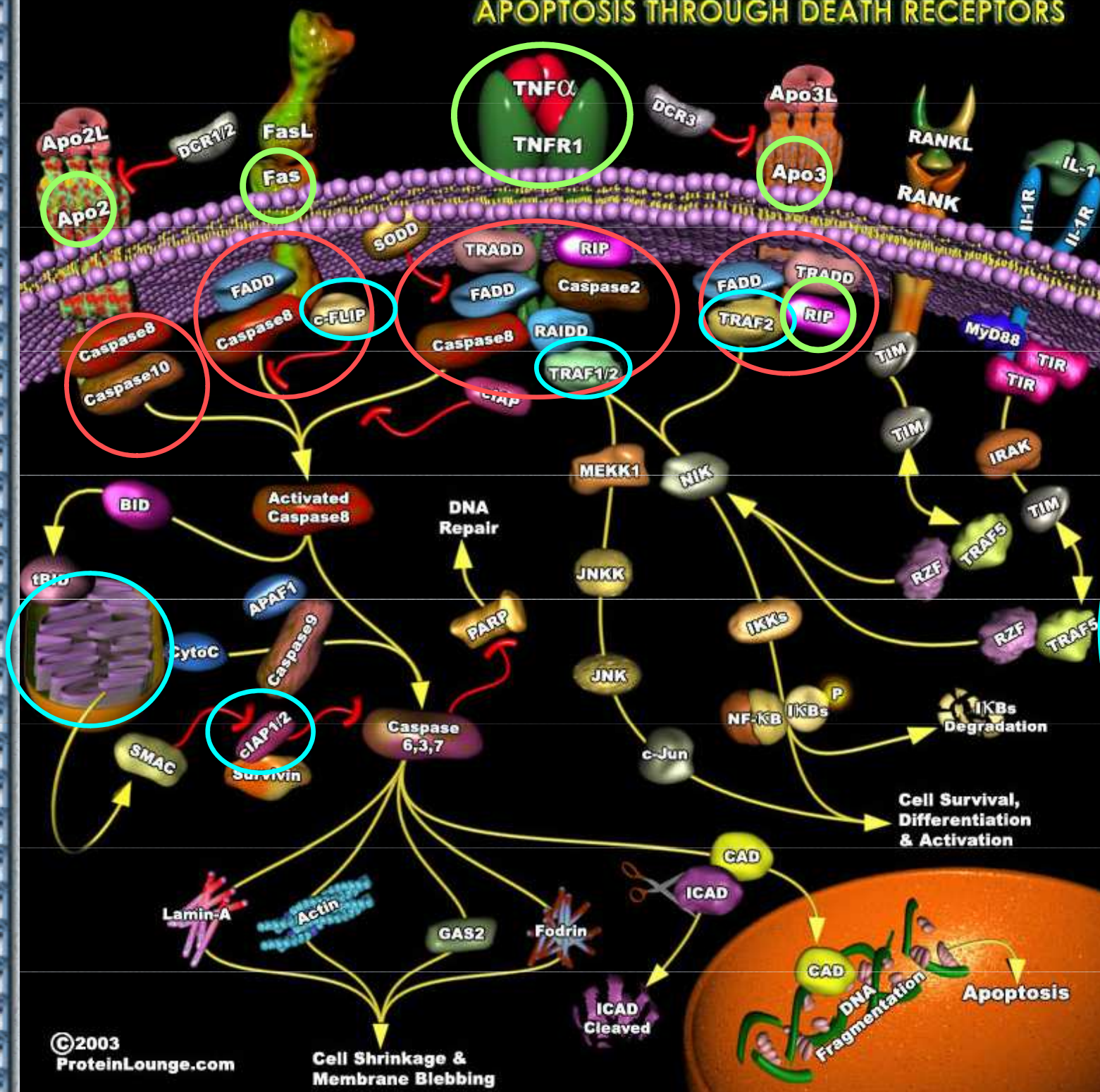
MAPK - Mitogenem aktivovaná protein kináza (JNK, p38, ERK)

ERK - Extracelulárním signálem regulovaná kináza

JNK – cJun N-terminální kináza

p38 – stresem aktivovaná kináza

APOPTOSIS THROUGH DEATH RECEPTORS



NF-κB cílové geny

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 β , RANTES
 - Immunoreceptory (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 tělíčka pohlcená makrofágy jsou neimunogenní
- Role Bcl-3 v T lymfocytech
 - Vazba Bcl-3 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 a jejich maturaci

x PODPORA CHRONICKÉHO ZÁNĚTU!!!

(revmatoidní artritida, kardiovaskulární nemoci, autoimunitní nemoci)

Podpora proliferace

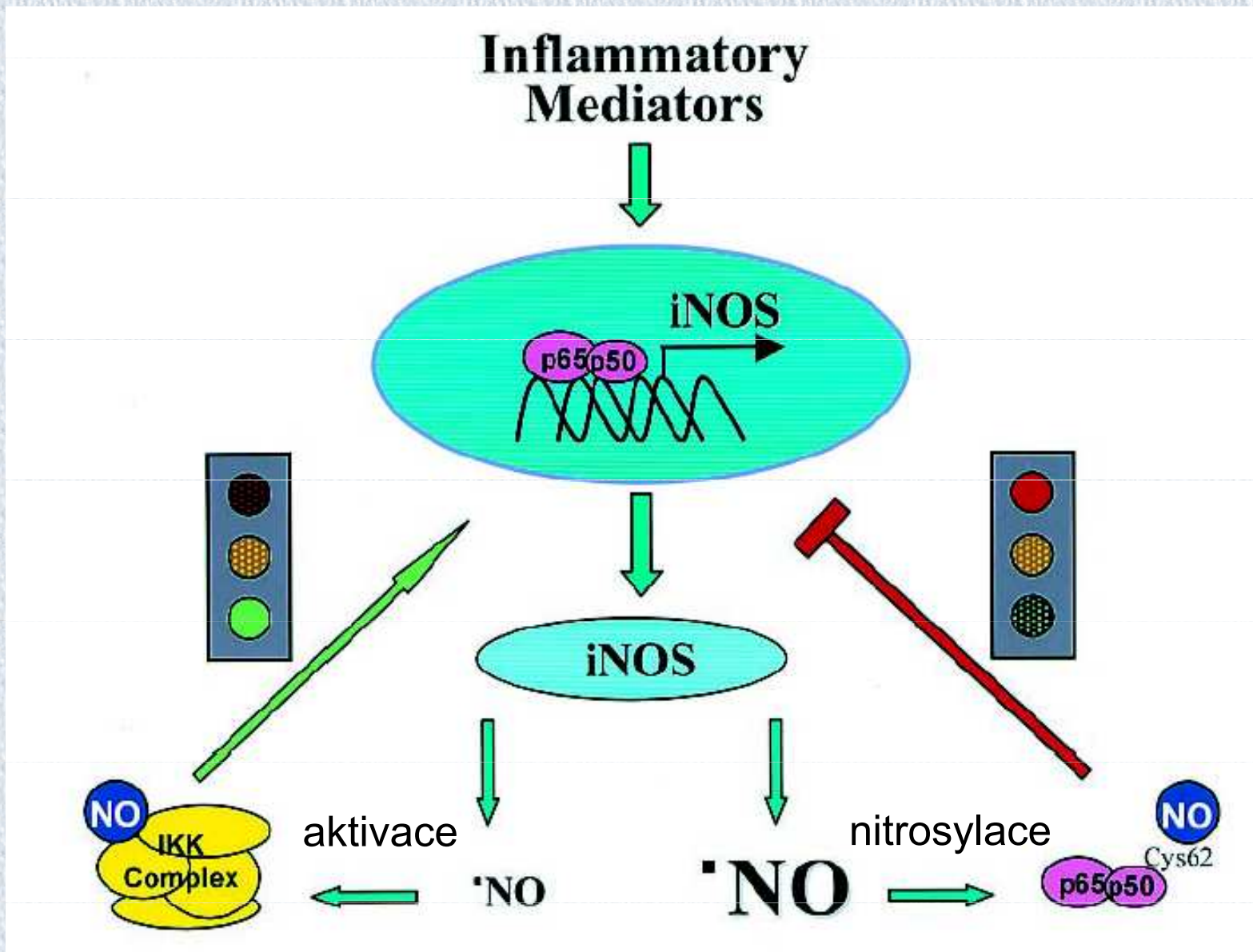
- Cytokiny a jejich receptory produkované působením NF-kappaB působí jako růstové faktory (např. geny pro G-, M-, GM-CSF, VEGF)
- Aktivuje expresi cyklinu D1 nutného pro přechod G1/S
- Aktivuje expresi c-Myc + transaktivuje geny pro cykliny + potlačuje expresi p21
- Vazba na Cyklin D1, c-Myc a Skp2 promotory 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, 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

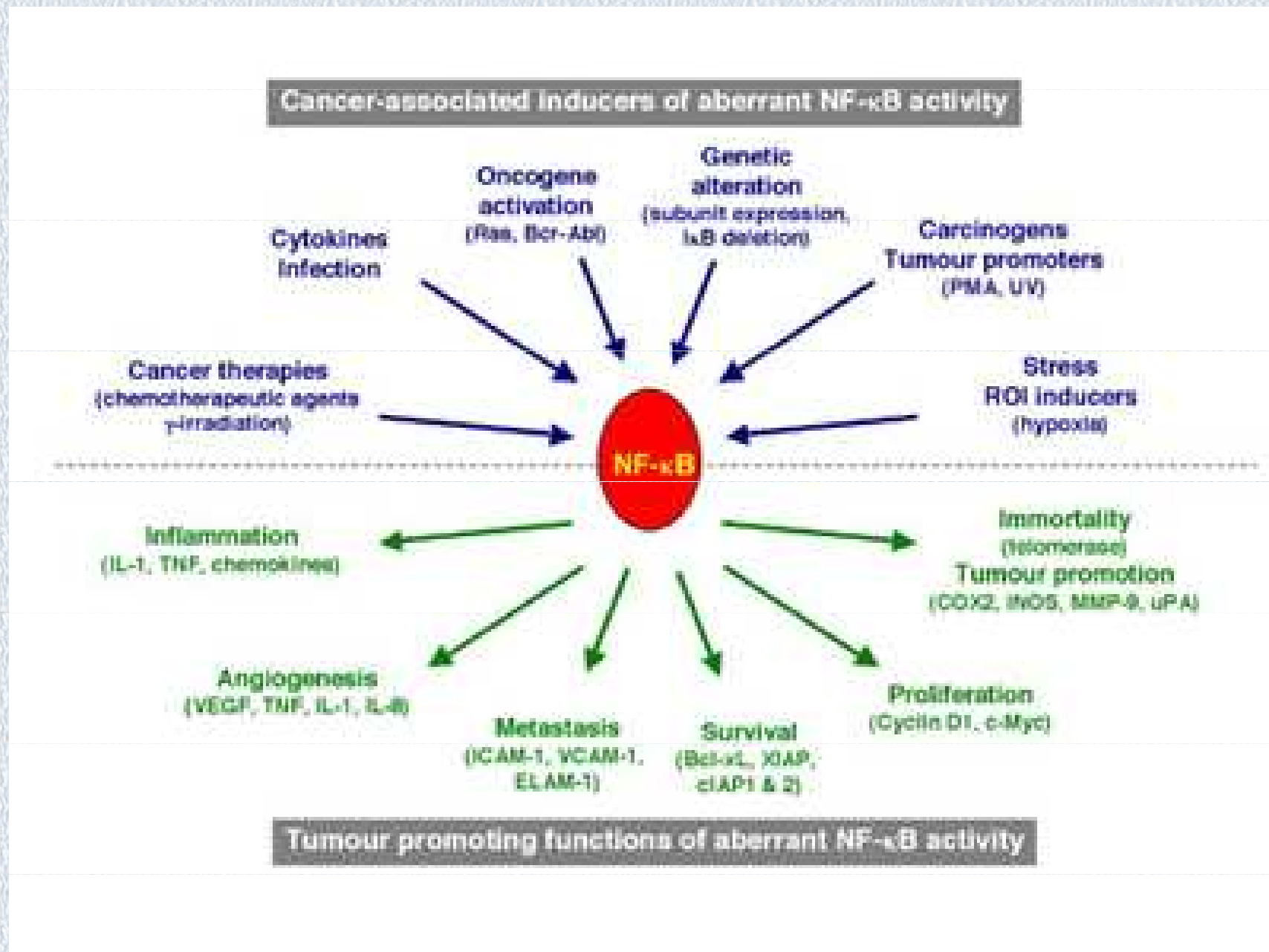
+

Podporuje zánětlivé procesy

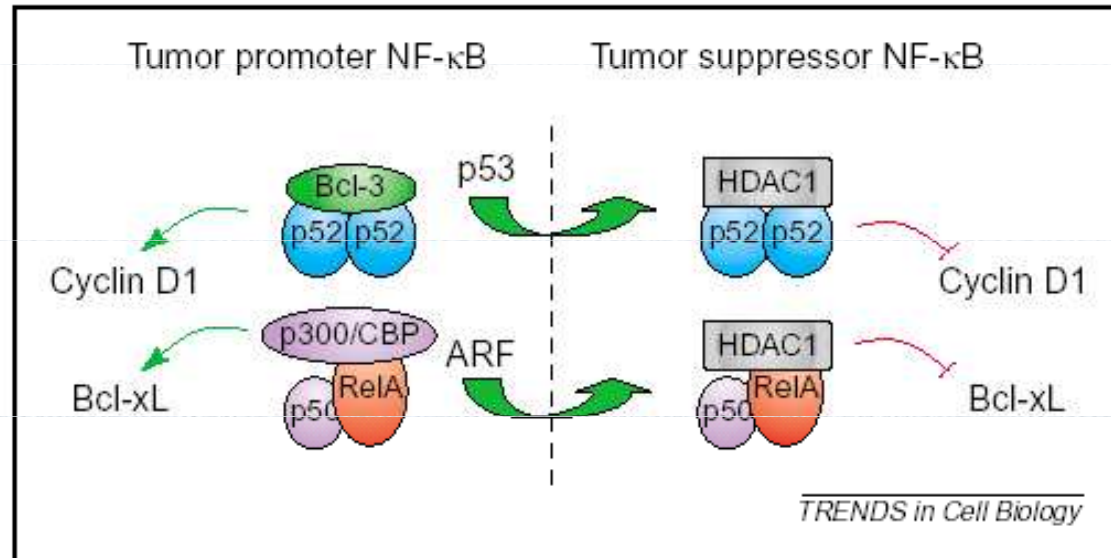
=

Podmínky vhodné pro karcinogenezi

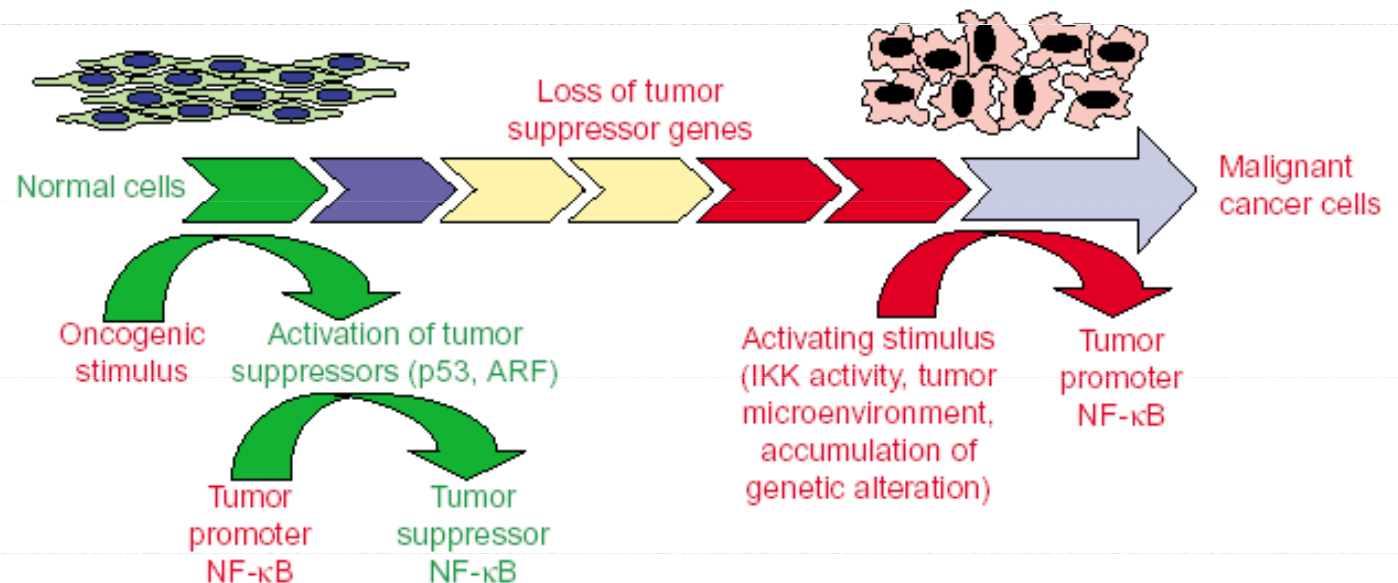
Karcinogenetický potenciál NF-kappaB



Modulace aktivity NF-kappaB

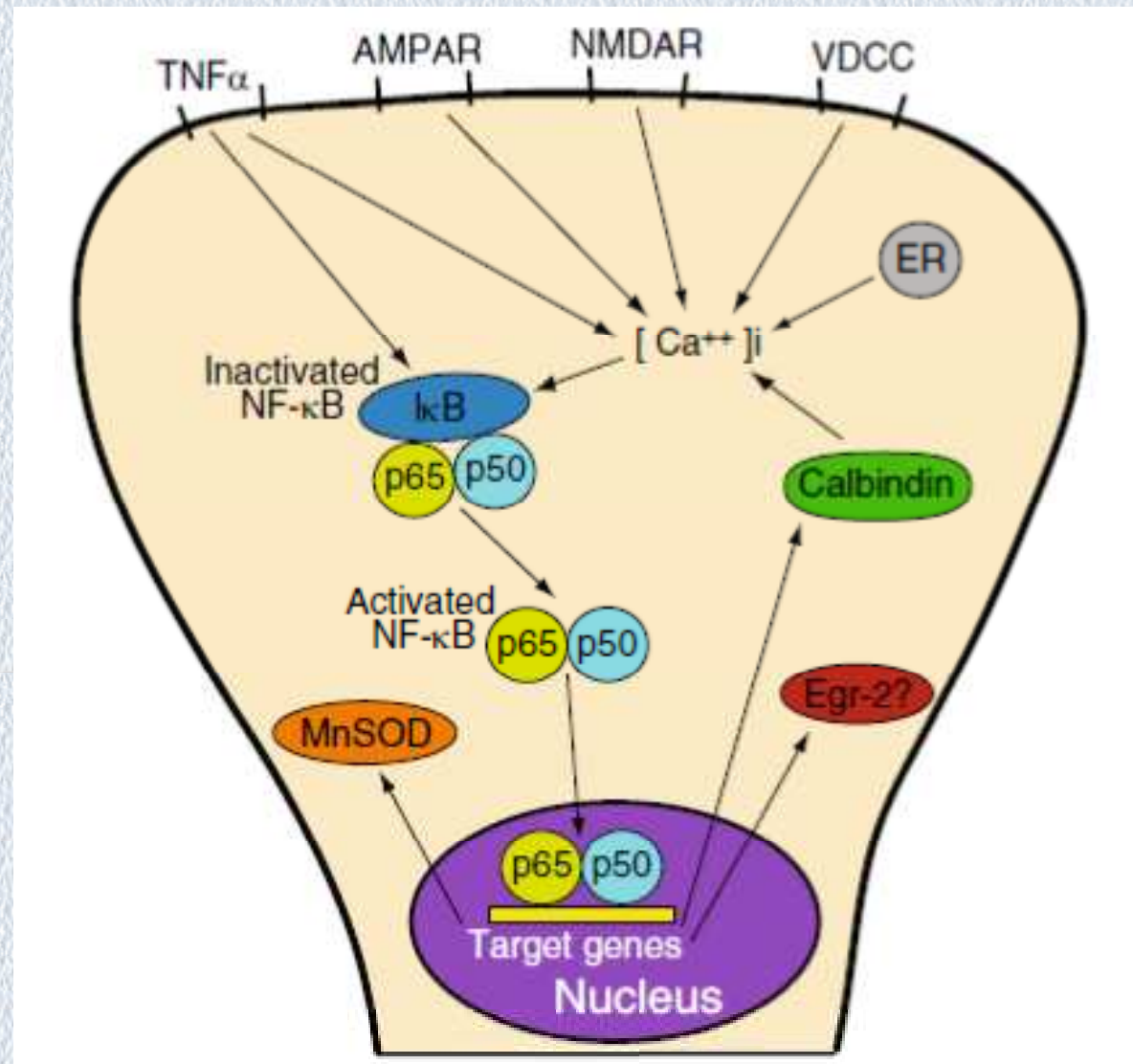


Tumor supresorové proteiny p53 a ARF indukují asociaci aktivního NF-kappaB s HDAC1 => Represe NF-kappaB aktivity



NF-kappaB a paměť'

- **Experimentální blokáce aktivace vedla ke zhoršení paměti**
- Dlouhodobá potenciace (pamatování) a deprese (zapomínání)
- Zesílení synaptické aktivity
- Aktivace povrchových kanálů
- Zvýšení Ca^{2+}
- Fosforylace I kappa B
- Aktivace NFkappaB
- Zvýšená exprese MnSOD, Calbinding, Egr2



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 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