维普资讯 http://www.cqvip.com

综 述 文章编号:0253-3626(2007)05-0552-02

A20 的泛素修饰抑制 NF-κB 活性

左云龙[1],匡凤梧[1],吴丽娟[2]

(1.重庆医科大学儿童医院重症监护室,重庆 400014;2.第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042)

【中国图书分类法分类号】Q753 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-07

转录因子 NF-κB 的失控能介导肿瘤和多种炎症性疾病,包括锌指蛋白 A20 在内的几种蛋白质紧密的控制着它的活化。近来 A20 针对前炎症反应细胞因子肿瘤坏死因子(TNF)、多种 Toll 样受体(TLR)介导的 NF-κB 的活化的下调机制的研究取得进展[1,2]。在 TNF-α 途径:A20 发挥两个相对的活性,相继的 TNF 受体相互作用蛋白(RIP)的去泛素化和泛素化,从而靶向蛋白酶体导致 RIP 降解,抑制了抑制性 κB 激酶(IKK)的活化,从而终止了 TNF 诱导的 NF-κB 的活化;在 TLR 途径:A20 通过其 N 末端卵巢肿瘤(OTU)域从肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)去除泛素链,从而终止了 TLR 诱导的 NF-κB 的活化。

1 A20 抑制 TNF 诱导的 NF-κB 活化机制

目前研究最深入的 NF-κB 活化途径是 TNF 所诱导的信号途径。TNF 通过结合到两个不同的受体:TNF- 受体 1 和 TNF- 受体 2(分别称为 TNF-R1 和 TNF-R2)而发挥效应。由于 TNF 的作用主要是通过 TNF-R1 介导,我们集中分析由这个受体启动的 NF-κB 信号途径:许多相同的或者类似的蛋白参与了 TNFR1 介导的信号,TNFR1 与衔接蛋白 -TNF- 受体相关死亡域(TRADD)联结,后者募集 RIP1 和 TRAF2(也可能是 TRAF5)。TNFR1 诱导的 NF-κB 需要 RIP1、TRAF2 和 TRAF5 的参与。依赖 TRAF2 和 TRAF5,TNF 的刺激诱导 RIP1 的泛素化,这提示:TRAF2 和 TRAF5 可能催化 RIP1 的 K63- 多泛素化[3](图 1)。此外,TNF 刺激后被泛素化的 RIP1 募集 TAB2 和 TAK1 复合物[3,4]。在培养的细胞株中 TNF 介导的 NF-κB 激活要求 TAK1 参与[4]。在这两种情况 K63- 泛素化在下游区 MAPKKK 激活可能是必要的。Dixit 和及其研究小组的研究指出:A20 是紧密和 RIP1 的去泛素化和再泛素化相关联。已有研究指出 A20 的 N 端 OUT 域有去泛素化(DUB)活性,但是这个信号并不跟 NF-κB 信号的抑制相关。Dixit 和及其研究小组现在证明了 A20 能消除被多泛素化的 RIP1,指出这个活性是参与 TNF 介导的 NF-κB 活化的抑制。而且 A20 也能催化多泛素化的形成,A20 的 E3 连接酶活性是依赖其 C 端的 7 个锌指基序之一。在体外和体内这个连接酶促进 K48 的多泛素链形成。此外,在转染实验中野生型 A20(但不是 E3 连接酶缺陷性 A20)促进 RIP1 失去稳定性。TNF 诱导的 NF-κB 活化的抑制要求 A20 的 E3 连接酶活性。在最后一组实验中,他们进一步指出:在 A20 锌指基序介导 K48 泛素化之前 A20 也介导 RIP1 的 K63 去泛素化。

作者介绍:左云龙(1976-),男,博士生,
主要研究方向:脓毒症的分子机制及临床研究。

2 A20 抑制 LPS 诱导的 NF-κB 活化机制

对 A20 缺陷性小鼠的最初的描述提示了 A20 特别抑制了 TNFR1 介导的 NF-κB 途径的一个成份。Ma 及其研究组证实:除了对 TNF 信号的影响,A20 也下调 TLR4 介导 LPS 信号。和仅 A20 缺陷性小鼠相似,A20+TNFR1 或 A20+TNF 双缺陷性小鼠都产生了自发的炎症。这显示了 A20 调控了非 TNF 依赖的促炎症反应。另外由 A20 缺陷性的造血细胞再生的小鼠对 LPS 诱导的休克高度敏感,在 LPS 注射的 2 小时内即死亡。在体外实验中,A20 缺陷性巨噬细胞也显示了适应于 TLR2,TLR3 和 TLR9 配体的增高的 NF-κB 活性,提示 A20 负调控多种 TLR 途径[2]。

TLR4 胞浆区和 4 个 Toll- 白介素 1 受体(IL-1R)域(TIR 域)——包括衔接蛋白:MyD88,MAL(也叫 TIRAP),Trif(也叫 TICAM-1)和 TRAM(图 1)。这个受体复合物通过两个机制激活 NF-κB。衔接物 MyD88 和 MAL 是参与 LPS 处理后的 NF-κB 初始快速激活,而 Trif 和 TRAM 用一个相对缓慢的动力学激活一个次级旁路途径。Trif-TRAM 也参与 IRF3 的激活,IRF3 是一个诱导 I 型干扰素表达的关键成份。虽然这两个途径都导致 TRAF6 的激活,但是 MyD88-MAL 是通过 IRAK 激酶激活 TRAF6,而 Trif-TRAM 很可能通过 RIP1,一个现非常明确参与 TNFR1 信号的成份[5]。

TRAF6 包含一个 RING 指域,它是许多泛素 E3 连接酶共有部分。TRAF6 与 Ubc13 和 Uev1A 组成的二聚体 E2(也称为泛素结合酶)。免疫刺激后,E2-E3 复合物多泛素化靶向各种蛋白,包括 TRAF6 本身。然而,这个泛素化并不导致靶向蛋白的降解。而 TRAF6-Ubc13-Uev1A 复合物催化生成赖氨酸 63(K63)- 多泛素链。K63 链多泛素化的 TRAF6 介导这个途径中下一个成份的激活,这个成份可能是 MAPKKK,比如 TAK1[6]。与此一致,TAK1 相关蛋白 TAB2 和 TAB3 都包含一个与 K63- 泛素链特异相互作用域。这个 TLR 信号模式可能就是:TAK1-TAB 复合物和 K63 泛素化的 TRAF6 相关联以激活 TAK1 激酶,然后 TAK1 不仅激活了 JNK 激酶,而且

维普资讯 http://www.cqvip.com

也激活了 IKK 复合物。同样地,Ma 及其研究组扩展 TLR4 介导 NF-κB 活化的结果[7]。他们证明:一个 DUB 缺陷性的 A20 不再和野生型 A20 一样抑制 LPS 介导的 NF-κB 活化。然而,在这个系统中,突变体 A20 保留了一些残余活性,指出:LPS 介导的 NF-κB 活化抑制的微弱的剂量依赖性。或许对于 TLR4 信号途径,A20 的 DUB 活性和 E3 连接酶活性能相互独立的产生作用。尽管在调控 TLR 信号中 A20 的 E3 连接酶活性的潜在功能没有得到评价,但是这些研究者的确指出 A20 能去泛素化 TRAF6,在 TLR 和 IL-1R 信号途径中后者是 K63- 泛素化的靶点。尽管 Ma 及其研究组指出 A20 能减弱 TLR 信号,但是他们以前的研究显示 A20 缺陷性不会影响到 IL-1β 介导的 NF-κB 活化。这是意想不到的,因为在胞浆区(即 TIR 域)IL-1R 与 TLR 是同源的,跟 TLRs 一样,IL-1R 通过包含衔接物 MyD88 的 TIR 域激活 NF-κB。那么 IL-1 信号是怎样逃逸 A20 介导的信号沉默呢? 答案或许存在于介导 IL-1 信号的 MyD88 的独特作用,与此不同的是 TLR 信号要求额外的衔接物。另一种对这个差异的可能解释或许是用于研究的细胞型 - 巨噬细胞及胚胎成纤维细胞或者检测方法,一个是 IκBα 降解,一个是 IL-6 生产。与 A20 抑制 TLR 和 IL-1R 信号相一致的发现是通过瞬时转染 A20,其过表达能抑制 IL-1β 和 TLR 诱导的 NF-κB 活化[9]。更细致的分析 A20 及其他 A20 样的蛋白对弄清楚它们对 IL-1R,TLR 和 TNFR 信号的不同影响是很必要的。

自然而然 A20 抑制 TLR4 和 TNFR1 信号的能力让我们注意到 RIP1,它在 TLR3 介导的 Trif 依赖的 NF-κB 活化起关键作用,TLR4 诱导的 NF-κB 活化也需要 Trif,特别在随后的时间点,或许也需要 RIP1。Dixit 和及其小组已确定 RIP1 在 TNFR 途径作为 A20 的去泛素化和再泛素化的靶点。同样地,RIP1 也能在 TLR4 途径被 K63 方式泛素化,然后被 A20 修饰以抑制信号。这将能解释 A20 怎样影响 TLR4,TLR3 和 TNFR,而不是 IL-1R 信号。然而它不能解释 A20 怎样抑制 TLR2 和 TLR9 信号,因为它们都不需要 TRIF 或 RIP1 参与。Ea,C.K.等[8]进一步指出 IKK 活化过程中要求信号诱导性位点专一的 RIP1 泛素化。

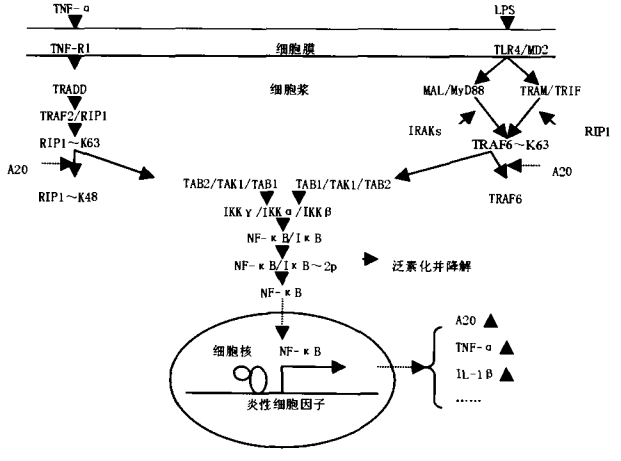


图 1 A20 在 TNF-R1 和 TLR4 信号途径的作用

3 结语及展望

在控制 NF-κB 活化时泛素化和去泛素化有多重功能。K48 多泛素化是个必要的“下游区”,在 IKK 介导的磷酸化后,IκBs 就在这个下游区被 β-TrCP-SCF 复合物泛素化。相反,K63 多泛素链是重要的“上游区”,在这个区域 TRAF 介导的 K63 泛素化对 IKK 复合物的活化是很关键的。在这个途径中两个 DUB 酶下调了这一步。肿瘤抑制物 CYLD 有 DUB 酶的作用并去除 TRAF 诱导的 K63 多泛素链,从而抑制了 NF-κB 活化[10]。同样的 Ma 和 Dixit 研究组均证实 A20 不仅 K48- 多泛素化 RIP1 而且从 TRAF6 和 RIP1 去除 K63- 多泛素链,因此下调了 TNFR 和 TLR 途径的 NF-κB 活化。这些发现强调了在 NF-κB 活化的调控中泛素化的重要性。A20 泛素化和去泛素化活性的发现让我们对 TNFR1 和 TLRs 诱导 NF-κB 活化的负反馈调控的分子机制有了进一步的了解。然而几个基本问题仍没有得到解决,主要的问题是 A20 这两个明显相互对立的活性是如何调控的。A20 的表达水平,定位,二聚作用,或次级修饰支持它这两个活性之一吗? RIP1 不可能是 A20 的泛素修饰功能的唯一靶点,鉴于 A20 还有抗凋亡,抗坏死的活性,涉及这些途径中的蛋白质或许也是 A20 的靶点。而且另外我们也可以猜想是否 A20 相互作用蛋白,比如 ABIN-1 (A20 binding inhibitor of NF-κB)和 ABIN-2,也是 A20 的底物或者在它的去泛素化或泛素连接酶活性的调控中起重要作用。最近 Mauro,C 等[10]研究指出:IKKγ 也是 A20 的靶点—在 ABIN-1 的协助下,A20 结合 NEMO/IKKγ,导致了 NEMO/IKKγ 的去泛素化,从而抑制了 NF-κB 活性。Wu,C.J.,Conze,D.B 等[11]指出 IKKγ 是 K63 多泛素化的感受器,特定结合到 K63 泛素化 RIP,使得 IKK 募集到 TNFR1,从而保护 RIP 被 TNF-α 诱导降解,活化了 NF-κB。

除了上面所提及的情况外,A20 作为双泛素修饰酶功能的鉴定或许有助于总体上泛素化重要性的阐明。泛素途径的变更能促进几种疾病,如肿瘤和神经变性性疾病的发生、发展。进一步的研究应能揭开是否导致 A20 功能缺陷的突变或许参与疾病的发病过程。

参 考 文 献

[1] Wertz IE,O'Rourke KM,Zhou H,et al.De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kB signaling[J]. Nature,2004;430(7000):694-699.

[2] Boone DL,Turer EE,Lee EG,et al.The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termi-nation of Toll-like receptor responses[J].Nat.Immunol,2004;5(10):1010-1012.

[3] Lee TH,Shank J,Cusson N,et al.The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2[J].J Biol Chem,2004;279(32):33185-33191.

(下转第 557 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

lenges for imaging physics[J].Phys Med Biol,2004;49(1):13-48.

[2] 文 明,李少林.磁共振成像用于分子影像学研究[J].中国医学影像技术,2007;23(1):147-150.

[3] Avitian TB.In vivo antisense imaging[J].Q J Nucl Med,2000;44(1):236-255.

[4] 孟 博,朱大海.反义 RNA 技术的应用与进展[J].国外医学遗传学分册,2001;24(6):289-292.

[5] 吴永忠,任庆兰,李少林.脂质体 -c-erbB2 反义寡核苷酸对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤的治疗作用[J].实用癌症杂志,2003;18(1):6-8.

[6] 谢 娟,李少林,张玉诺,等.99mTc 标记 c-erbB2 反义寡脱氧核苷酸对乳腺癌显像的实验研究 [J]. 中华医学杂志,2005;85(41):2940-2942.

[7] Allawi HT,Fang D,Ip SH,et al.Mapping of RNA accessible sites by extension of random oligonuctide libraries with reverse transcriptase[J].RNA,2001;7(2):314-327.

[8] Zhang HY,Mao JP,Zhou DX,et al.mRNA accessible sites tagging (MAST):a novel high throughput method for selecting effective antisense oligonucleotides[J]. Nucleic acides Res,2003;31(1):72-80.

[9] Tamm I,Dobrken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology:new hope for an old idea[J].Lancet,2001;358(9280):489-497.

[10] Wang RF,Qiu F,Zhang CL.Labeling of antisense oligonucleotides with ^{125}I and the experimental research of identification of the lymphoma cell by using ^{125}I-FR-ASON[J].J Nucl Med,2003;44(5):369.

[11] Asaoka K,Tadam, Sawamura Y,et al.Dependence of efficient adenviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the coxsackievirus and adenovirus recepter[J].J Neursurg,2000;92(8):1002-1008.

[12] 郑素军,任 红,王升启.反义寡核苷酸研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2004;25(6):506-509.

[13] Braasch DA,Corey DR.Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression[J].Biochemistry,2002;41(14):4503-4510.

[14] Morita K,Hasegawa C,Kaneko M,et al.2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA):highly nuclease-resistant and thermodynamically stable oligonucleoides for antisense drug[J].Bioorg Med Chem Lett,2002;12 (1):73-76.

[15] Kurreck J,Wyszko E,Gillen C,et al.Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleicacids[J].Nucleic Acids Res,2002;30(9):1911-1918.

[16] Lubrich B,Calker D,Peschka SR. Inhibition of inositol uptake in astrocytes by antisense oligonucleotides delivered by pH-sensitive liposomes[J]. Eur J Biochem,2000;267(8):2432-2438.

[17] Zhang YM,Wang Y,Liu N,et al.In vitro investigations of tumor targeting with 99mTc -labeled antisense DNA[J].J Nucl Med, ^{99m}Tc 2001;42(11):1660-1669.

[18] Zhang YM,Liu N,Zhu ZH,et al.Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA)on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisense DNA[J].Eur J Nucl Med,2000;27(11):1700-1707.

[19] 黄家君,谢 娟,李少林,等.^{99m}Tc-MAG3-ASON 药代动力学研究[J].重庆医科大学学报,2006;31(3):366-368.

[20] Wang Y,Chang F,Zhang Y,et al.Pretargeting with amplification using polymeric peptide nucleic acid[J]. Bioconjugate Chem,2001;12(5):807-816.

[21] Hnatowich D.Antisense imaging:Where are we now Cancer Biother[J].Radiopharm,2000;15:447-457.

[22] Myers KJ,Dean NM.Sensible use of antisense:how to use oligonucleotides as research tools[J].Trends Phimacol Sci,2000;21(1):19-23.

[23] 秦光明.肿瘤核素反义显像技术的研究现状与展望[J].国外医学放射医学核医学分册,2001;25(5):213-216.

[24] Van de Vijver MJ.Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2)[J].Eur J Cancer,2001;37(supp 11):11-17.

[25] Sutsui T,Ohno S,Murakami S,et al.Prognostic value of c-erbB2 expression in breast cancer[J].J Surgical Oncology,2002;79:216-223.

(上接第 553 页)

[4] Kanayama A,Seth RB,Sun L,et al.TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains[J].Mol Cell,2004;15(4):535-548.

[5] Meylan E,Burns K,Hofmann K,et al.RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor3- induced NF-kappa B activation[J].Nat Immunol,2004;5(5):503-507.

[6] Sun L,Chen ZJ.The novel functions of ubiquitination in signaling[J].Curr Opin Cell Biol, 2004;16(2):119-126.

[7] Evans PC,Ovaa H,Hamon M,et al.Zinc-finger protein A20,a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity[J].Biochem J,2004;378(Pt3):727-734.

[8] Ea CK,Deng L,Xia ZP,et al.Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO[J].Mol Cell,2006;22(2):245-257.

[9] Lakhani SR. Putting the brakes on cylindromatosis [J].N Engl J Med,2004;350(2):87-188.

[10] Mauro C,Pacifico F,Lavorqna A,et al.ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB[J]. J Biol Chem,2006;281(27):18482-18488.

[11] Wu CJ,Conze DB,Li T,et al.Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [J].Nat Cell Biol,2006;8(4):398-406.