

BTF2/TFIIH 的多功能与 Pol II 转录

倪菊华 贾弘禔 张迺衡

(北京医科大学生物化学及分子生物学系, 北京 100083)

摘要 BTF2, 又称 TFIIH, 为一多亚基蛋白质复合物, 具有解链酶、依赖 DNA 的 ATP 酶及磷酸激酶活性, 参与 mRNA 转录起始以及与转录偶联的核苷酸切除修复过程。在转录起始复合物形成过程中, BTF2/TFIIH 在有 TFIIIE 存在时, 可使 RNA 聚合酶 II 的羧端区域(CTD)、TBP 及有关转录因子磷酸化。磷酸化反应可影响转录起始复合物中的蛋白质-蛋白质相互作用, 调节转录起始。因此, BTF2/TFIIH 是一种重要的基本转录因子。

关键词 BTF2/TFIIH, Pol II CTD 磷酸化, 转录调节

真核 mRNA 转录起始除 RNA 聚合酶 II 外, 还需要许多转录因子参与^[1]。转录因子可分为两类^[2,3]: 一类是基本转录因子, 另一类为特异转录因子。基本转录因子 BTF2 (basic transcription factor 2), 亦称 TFIIH, 为一多亚基蛋白质复合物^[4]。BTF2/TFIIH 具有解链酶活性, 可使 DNA 双链解旋; 还可催化 RNA 聚合酶 II 羧端区域(CTD)磷酸化, 在 mRNA 转录起始过程具有独特的功能。此外, BTF2/TFIIH 还参与转录偶联的核苷酸切除修复过程, 对转录延长的准确进行具有重要意义。

1 BTF2/TFIIH 的分子组成

BTF2/TFIIH 由多亚基组成, 目前其确切亚基数目不详。Gerard 等^[5]从 HeLa 细胞提取纯化 BTF2/TFIIH 后, 进一步将其分离为 5 个多肽, 分子量分别为 90 000、60 000、43 000、41 000 和 35 000。Ohkuma 等^[6]提取纯化的 BTF2/TFIIH 含有 7 个多肽, 分子量分别为 94 000、75 000、62 000、46 000、43 000、38 000 和 35 000。来自另一实验室的资料表明, HeLa 细胞的 BTF2/TFIIH 含 89 000、80 000、62 000、43 000、41 000 和 35 000 等数个多肽。各实验室所得结果不尽相同, 可能与所采用的纯化、分析方法不同有关。在这几种亚基中,

89 000 (p89) 和 62 000 (P62) 多肽似乎更为重要。P89 为 ERCC-3 基因产物^[1], 由 782 个氨基酸残基组成, 分子量为 89 200。P89 具有 DNA 解链酶活性, 参与转录偶联的 DNA 切除修复过程^[4,7,8]。

P62 也是 BTF2/TFIIH 的重要组成部分。Fischer 等^[9]在腺病毒主要晚期启动子 (AdzMLP) 启动的特异转录体系加入抗 P62 特异单克隆抗体, 测试转录产物水平。结果发现, 当单抗剂量增至一定浓度时, 特异性转录即被抑制。这是由于单抗与 P62 发生了免疫沉淀反应, 从而抑制了 BTF2/TFIIH 的转录活性。将有 BTF2/TFIIH 活性的提取物经特异性抗体亲和柱洗脱, 所得流洗液在缺乏 BTF2/TFIIH 的体外转录体系中再也检测不出转录活性, 进一步证明 P62 是 BTF2/TFIIH 转录活性所必不可少的。

P89 和 P62 虽然是 BTF2/TFIIH 的重要亚基, 但分别独立存在时均不表现转录活性。在缺乏 BTF2/TFIIH 的体外转录体系中, 加入重组的 P89 或重组的 P89 和 P62, 也检测不到转录活性^[9], 提示除 P89 和 P62, BTF2/TFIIH 的其他亚基对于 BTF2/TFIIH 的转录活性也是必不可少的。

2 BTF2/TFIIH 的功能

BTF2/TFIIH 具有解链酶活性^[1,4]. Schaeffer 等^[1]将部分纯化的 BTF2/TFIIH 通过抗 BTF2/TFIIH 特异性抗体亲和柱后, 测试其流洗液活性, 结果既未检测到流洗液有解链活性, 也未检出转录活性. BTF2/TFIIH 的解链酶活性与转录活性同样需要 Mg^{2+} 的存在, 并可被 200 mmol/L 的 NaCl 或 KCl 所抑制. DNA 解链过程需要消耗能量. BTF2/TFIIH 具有依赖 DNA 的 ATP 酶活性^[7], 可水解 ATP 或 dATP 获取能量. 此外, BTF2/TFIIH 还具有另一个重要性质——激酶活性, 可催化哺乳类 RNA 聚合酶 II 大亚基 C 端区域 (CTD) 六肽重复单位 (YSPTSPS) 磷酸化. CTD 磷酸化所需磷酸基可能也是由 BTF2/TFIIH 水解 ATP 所提供.

为证明 BTF2/TFIIH 为转录起始所必需, Gerard 等^[5]测试了转录起始抑制剂肝素和 BTF2/TFIID 加入顺序对 AdzMLP 体外转录体系的影响. 结果发现, 在肝素之前加入 BTF2/TFIIH, 转录体系依然有特异的 run-off 转录产物出现; 但与肝素同时或在肝素后加入 BTF2/TFIIH 则无特异的转录产物发生. 结果表明, BTF2/TFIIH 对于基本转录是必需的. Schaeffer 等^[1]采用类似的体外转录体系也证实了这一结论. 若将抗 ERCC-3 基因产物抗体加入重建转录体系, 可导致转录的抑制; 当加入过量的 BTF2/TFIIH 时, 特异性抗体的转录抑制作用则可被解除; 相反, 加入过量的 TFIIIB 或 TFIIIE 却不能解除这种抑制作用^[4], 进一步证明, BTF2/TFIIH 对于基本转录是必不可少的.

BTF2/TFIIH 还参与核苷酸切除修复过程. Drapkin 等^[4]发现, 除 P62 外, BTF2/TFIIH 还包含参与 DNA 切除修复的两种多肽: ERCC-2 和 ERCC-3. 前已述及, ERCC-3 实际上就是 P89; ERCC-2 分子量约为 80 000, 这两种多肽与解链酶活性相关^[7]. 它们的缺失可导致类似于人的着色性干皮病和 Cockayne 综合征. 有人发现, 酵母转录因子 b 也参与核苷酸

切除修复过程^[10]. 转录因子 b 含两个亚基, 分别为 rad3 和 ssl2 基因产物. rad3 和 ssl2 突变可引起酵母细胞明显的核苷酸切除修复缺陷; rad3 和 ssl2 突变细胞经 rad3 基因和 ssl2 基因转化后, 切除修复恢复正常, 提示 RAD3 和 SSL2 蛋白直接参与核苷酸切除修复. 值得注意的是, TFIIH/BTF2 与酵母转录因子 b 同源^[10], 由此结论 BTF2/TFIIH 参与核苷酸的切除修复过程.

3 BTF2/TFIIH 与 TFIIIE 的功能联系

BTF2/TFIIH 与其他基本转录因子及 RNA 聚合酶 II 构成转录起始复合物, 参与转录过程. 在该过程中, BTF2/TFIIH 与复合物各元件之间存在着复杂的相互作用, 尤其值得一提的是 BTF2/TFIIH 与 TFIIIE 之间的功能关系.

TFIIIE 也是一种重要的基本转录因子, 并具有如下特性: a. TFIIIE 通过其 P56 亚基与 BTF2/TFIIH 的 ERCC-3 相互作用, 可特异地抑制 BTF2/TFIIH 的解链酶活性^[4]. b. TFIIIE 可刺激、增强 BTF2/TFIIH 的 ATP 酶和激酶活性^[6]. TFIIIE 对 BTF2/TFIIH 激酶活性的刺激作用与 DNA 模板存在与否有关. 在无 DNA 模板时, BTF2/TFIIH 在 TFIIIE 协助下催化 RNA 聚合酶 II 的 CTD 磷酸化. 经 BTF2/TFIIH 磷酸化的 RNA 聚合酶 II 不能有效地进入前起始复合物形成途径^[11]. 当有 DNA 模板而无 TFIIIE 时, BTF2/TFIIH 与 DNA 及 TFIID (TBP) 紧密联系, 不能作用于 RNA 聚合酶 II 的 CTD; 加入 TFIIIE 后, TFIIIE 与 BTF2/TFIIH 相互作用, 或者前起始复合物发生构象变化, 使 BTF2/TFIIH 进入前起始复合物^[12], 这时 BTF2/TFIIH 催化 RNA 聚合酶 II 的 CTD 磷酸化, 引起前起始复合物构象进一步变化; 同时由 ATP 水解供能, 使转录起始点周围 DNA 双链解旋, 导致活性起始复合物的形成. RNA 聚合酶 II CTD 磷酸化需要所有基本转录因子的参与, 而且只有在前起始复合物形成的晚期才会发生磷酸化反应. 可能 CTD 磷酸化还与早期的延长有关. TFIIIE 与 BTF2/TFIIH 在起始

复合物形成中的作用如图 1 所示。

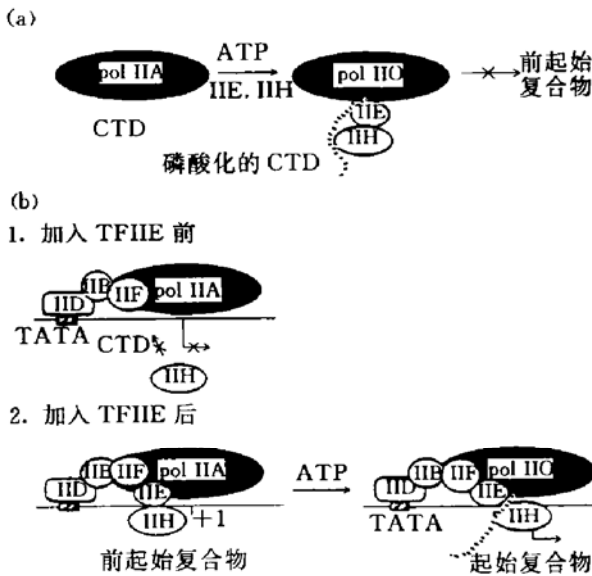


图 1 TFIIH 与 TFIIH 在起始复合物的形成

(a) 无 DNA 模板; (b) 有 DNA 模板。

4 BTF2/TFIIH 与磷酸化

早期研究认为, BTF2/TFIIH 的激酶底物只有 RNA 聚合酶 II 的 CTD。其实, 其他一些基本转录因子也可能是它的底物^[6]。例如, BTF2/TFIIH 可使 TFIIE- α 磷酸化, 该作用可被 TFIIE- β 增强。BTF2/TFIIH 还可使人的 TBP (TFIID) 磷酸化, TFIIE- α 激活这一反应。人的 TBP 磷酸化发生于 TBP 的 N 端区 (1~154 aa), 而 C 端核心区 (155~335 aa) 和酵母的 TBP 不发生磷酸化。人的 TBP N 端具有类似 CTD 的 SPT 序列 (富含 Ser、Pro 和 Thr), 在高等真核生物这一序列高度保守, 是磷酸化反应的位点。BTF2/TFIIH 还可催化 TFIIIF- α (RAP74) 磷酸化, 这个反应不需 TFIIIF- β (RAP30) 或 TFIIE 的参与。TFIIB 和 TFIIIF- β 不能被 BTF2/TFIIH 激酶磷酸化。经分析表明, RNA 聚合酶 II CTD 磷酸化反应可发生在丝氨酸 (93%) 和苏氨酸残基 (7%); TFIIE 的磷酸化只发生在丝氨酸; 人 TBP 磷酸化发生于丝氨酸 (34%), 苏氨酸 (66%)。尽管基本转录因子磷酸化的意义尚不十分清楚, 但它能影响起始复合物中的蛋白质-蛋白质相互作用, 最

终影响转录起始。

5 BTF2/TFIIH 在 PolII 转录中的作用

BTF2/TFIIH 作为一种基本转录因子, 与其他基本转录因子及 RNA 聚合酶 II 等组成转录起始复合物, 催化转录起始。转录起始复合物组装过程先由 Greenblaff 提出^[13], 最近又被 Schaeffer 等^[1]补充: 首先, TFIID 识别并结合 TATA 盒子, TFIID/TBP 可引起 TATA 盒结构上的变化, 导致 DNA 模板的弯曲^[14]。TFIIA 可能起着稳定或活化 TFIID 的作用, 然后 TFIIB 结合于 TFIID^[15], 这时 RNA 聚合酶 II 在 TFIIIF 的介导下加入到 DAB 复合体^[16,17], 接着 BTF2/TFIIH 加入复合体^[18]。BTF2/TFIIH 解链酶活性解开 DNA 模板, 随之转录被启动 (图 2)。

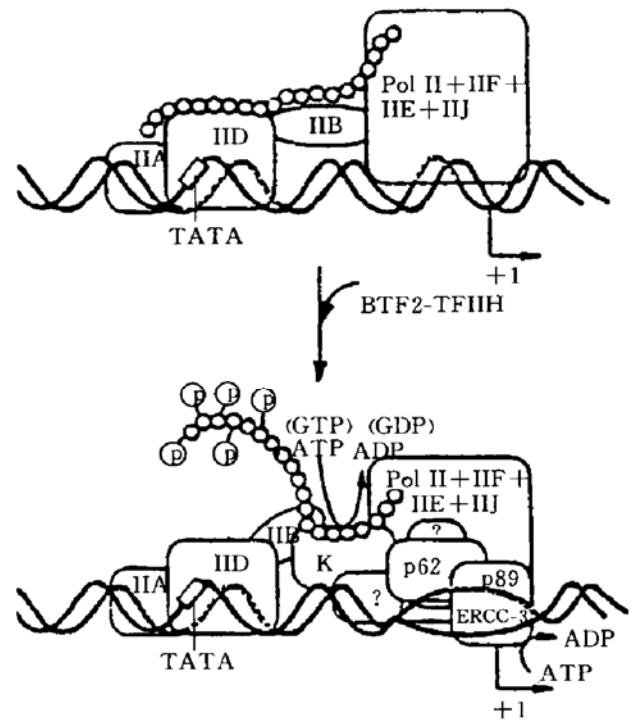


图 2 BTF2/TFIIH 参与 PolII 转录起始示意图

尽管 BTF2/TFIIH 参与转录和核苷酸切除修复的双重功能详尽机制目前尚不清楚, 但其生物学意义是可以推测的。可能 BTF2/TFIIH 的 ERCC-3 蛋白在转录起始点前后进行 DNA 解链, 以利于转录起始复合物的形成及

RNA 聚合酶沿 DNA 向前移动; 同时进行核苷酸的切除修复, 以确保转录延长准确进行^[7].

参 考 文 献

- 1 Schaeffer L, Roy R, Humbert S *et al.* Science, 1993; **260**: 58
- 2 Michell P J, Tjian R. Science, 1989; **245**: 371
- 3 贾弘提. 生理科学进展, 1993; **24**: 298
- 4 Drapkin R, Reardon J T, Ansari A *et al.* Nature, 1994; **368**: 769
- 5 Gerard M, Fischer L, Moncollin V *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 20940
- 6 Ohkuma Y, Robert G R. Nature, 1994; **368**: 160
- 7 Weeda G, van Ham R C A, Vermeulen W *et al.* Cell, 1990; **62**: 777
- 8 Wang Z, Svejstrup J Q, Feauer W J *et al.* Nature, 1994; **368**: 74
- 9 Fisher L, Gerard M, Chalut C *et al.* Science, 1992; **257**: 1392
- 10 Feaver W J, Gileadi O, Kornberg R D. Cell, 1991; **67**: 1223
- 11 Chesnut J D, Stephans J H, Dahmus M E. J Biol Chem, 1992; **267**: 10500
- 12 Flores O, Lu H, Reinkerg D. J Biol Chem, 1992; **267**: 2786
- 13 Greenblaff J. Cell, 1991; **66**: 1067
- 14 Lee D K, Horikoshi M, Roeder R G. Cell, 1991; **67**: 1241
- 15 Buratowski S, Hahn S, Guarente L *et al.* Cell, 1989; **56**: 549
- 16 Buratowski S, Sopta M, Greenblaff J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 7509

17 Flores O, Lu H, Killeen M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 9999

18 Lu H, Zawel L, Fisher L *et al.* Nature, 1992; **358**: 641

The Mutiple Functions of BTF2/TFIIH in PolII Transcription. Ni Juhua, Jia Hongti, Zhang Naiheng (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract BTF2, also named TFIIH, with multiple subunit complex is believed to have helicase, DNA-dependent ATPase and phosphate kinase activities participated in transcription initiation and transcription-coupled nucleotide-excision repair. During the formation of transcription initiation complex, polymerase II C-terminal domain (CTD), TBP and associated transcription factors are phosphorylated by BTF2/TFIIH in the presence of TFIIIE. These phosphorylation modifications can be expected to have effects on the regulation of transcription initiation through affecting protein-protein interactions. So BTF2/TFIIH is an important transcription factor in eukaryotic cells.

Key words BTF2/TFIIH, PolII CTD phosphorylation, transcription regulation

真核生物蛋白质翻译的内部起始机制

李 彤 王思多

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 蛋白质翻译过程中, 翻译的起始步骤是非常重要的. 真核生物的翻译起始主要是通过依赖帽子结构的扫描机制进行的. 近几年在翻译的研究工作中发现, 在一些动物病毒中, 蛋白质合成通过一种不同于扫描机制的内部起始机制起始翻译. 用内部起始机制翻译的 mRNA 的 5' 端非翻译区有一个相对保