

活体细胞内 p53 与 I κ B α 的相互作用及其核穿梭过程*

李 贤¹⁾ 邢 达^{1)**} 陈小佳²⁾ 唐永红¹⁾
孙奋勇²⁾ 汪 炬²⁾ 洪 岸²⁾ 吴云霞¹⁾

(¹⁾华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631; ²⁾暨南大学生物工程研究所, 广州 510632)

摘要 通过构建 6 种荧光融合蛋白质粒载体 pECFP-I κ B α 、pECFP-I κ B α M、pECFP-I κ B α 243N、pECFP-I κ B α 244C、pp53-DsRed 和 pp53/47C-DsRed, 应用激光共聚焦显微镜, 观测静止细胞内 p53 与 I κ B α 及其各种突变体的定位特点及相互作用关系, 直观地说明了活体细胞内的 p53 可与 I κ B α 的 C 端的 PEST 区发生相互作用, p53 的 N 端也参与了 p53·I κ B α 复合体的形成. 同时, 实时观测外界刺激下细胞内 DsRed/CFP 两荧光比值的变化, 探讨 p53·I κ B α 复合体形成与解离的动态平衡, 细霉素 B(leptomycin B, LMB) 作用下细胞内 p53 与 I κ B α 的动力学分布、及核穿梭动态过程的意义. I κ B α 蛋白可能已经成为 p53 和 NF- κ B 信号通路的一个交叉点, 从而扩展了对于这两条重要信号通路调控的认识.

关键词 p53, I κ B α , 核转录因子 - κ B, 荧光共振能量转移

学科分类号 Q2, Q6, R3

I κ B α (inhibitor of NF- κ B alpha) 是核转录因子 - κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的抑制因子, 普遍存在于各种类型细胞中, I κ B α 蛋白可以在胞浆中通过其锚蛋白重复序列区 (ankyrin repeat domain, ARD) 与 NF- κ B 的 Rel 同源区 RHD (Rel homology domain, RHD) 结合形成复合物, 抑制 NF- κ B 进入细胞核发挥转录激活作用, 使其以一种无活性的状态存在于胞浆中^[1~3]. I κ B α 调控 NF- κ B 的具体过程十分复杂. 目前研究比较清楚的是细胞因子 TNF- α 和 IL-1^[4~6] 借助受体将信号传递到 NF- κ B 诱导激酶 (NF- κ B inducing kinase, NIK), 之后通过激活 I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 使 I κ B α 第 32 和 36 位丝氨酸发生磷酸化, 随后 I κ B α 被泛素化而降解. I κ B α 的降解使得 NF- κ B·I κ B α 复合体解离, 从而允许游离的 NF- κ B 二聚体迁移到细胞核内, 诱导相关基因的表达^[7~10].

p53 蛋白也是以一个转录因子的身份来发挥其众多的重要作用, 其与多种细胞功能有关, 包括基因转录、DNA 修复、周期调控、基因组稳定以及程序性细胞死亡等等. 最近的研究表明, I κ B α 在胞浆内不仅可与 NF- κ B 相结合, 也可与 p53 蛋白发

生相互作用^[11]. 但 I κ B α 与 p53 的相互作用关系与调控机制还不清楚. 本实验通过构建青色荧光蛋白 (CFP) 与 I κ B α (全长 I κ B α , 为 1~317 个氨基酸) 及其突变体 I κ B α M(S32A, S36A, 第 32 和 36 位丝氨酸突变为丙氨酸, 不能发生磷酸化也不能被降解^[12])、I κ B α 243N(含有锚蛋白重复序列, 但缺乏 C 端的 PEST 区, 1~243 个氨基酸) 和 I κ B α 244C(含有 C 端的 PEST 区, 244~317 个氨基酸) 的融合蛋白载体, 并利用红色荧光蛋白 DsRed 与 p53 的融合蛋白载体 pp53-DsRed, 应用激光共聚焦显微镜, 观测活体细胞内 p53 与 I κ B α 及其各种突变体的定位及相互作用关系, 并实时地观测其在 UV 和细霉素 B(leptomycin B, LMB) 作用下细胞内定位的变化, 及其核穿梭过程, 进一步探讨 p53·I κ B α 复合体的动力学分布及其意义.

*国家自然科学基金面上项目 (60378043, 30470494) 和广东省自然科学基金资助项目 (015012, 04010394).

** 通讯联系人. Tel: 020-85210089, Fax: 020-85216052

E-mail: xingda@scnu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-05, 接受日期: 2006-04-20

1 材料与方法

1.1 实验材料

宿主菌(DH5α)购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 质粒 pDsRed-Mit 由 Tsuruta^[13]教授惠赠. p53 cDNA 由叶开河博士 (暨南大学药学院) 惠赠. 人的全长 IκBα cDNA 是由基因数据库 GenBank 中获得,基因序列号为 AY033600, 并由广州复能基因公司提供 (载体: pRB01-IκBα). pECFP-C1 载体源于 Clontech 公司. 所用引物均由北京三博远志公司合成. 相应的质粒提取试剂盒 (Qiagen 公司)、切胶回收试剂盒(上海博亚公司) 按操作指南进行使用. 所有限制性内切酶及 T4 连接酶来自 TaKaRa 公司,

Plus Taq 酶购于上海生工生物工程有限公司. 转染试剂 Lipofectin Reagent 来自 Invitrogen 公司. LMB 源于 Calbiochem 公司.

1.2 质粒构建

质粒 pECFP- IκBα (1~317)、pECFP- IκBαM (1~317, Ser32A, Ser36A 丙氨酸)、pECFP- IκBα 243N(1~243)和 pECFP- IκBα244C(244~317)的构建载体为 pECFP-C1, 酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam*H I . 同时构建了带有红色荧光蛋白的质粒载体 pp53-DsRed(1~393 个氨基酸)和 pp53/47C-DsRed (47~393 个氨基酸), 以 p53cDNA 或 p53/47C 取代 pDsRed-Mit 中的 Mit, 酶切位点为 *Nhe* I 和 *Bam*H I . 构建质粒所需引物见表 1. 所有重组子经酶切、PCR 及测序 (上海博亚生物技术有限公司) 鉴定.

Table 1 Primers and primer sequences

Primer		Sequence	Amino acids
pECFP- IκBα	FW	5' c cgg aat tca ttc cag gcg gcc gag cgc ccc cag gag tgg gcc atg gag ggc c 3'	1~317
	RV	5' cgc gga tcc tca taa cgt cag acg ctg gcc tcc aaa cac aca gtc 3'	
pECFP-IκBαM	FW1	5' gag cgg cta ctg gac gac cgc cac gac gcc ggc ctg gac gcc atg aaa gac gag gag ta 3'	1~317,Ser32A,Ser36A
	FW2	5' g gag tgg gcc atg gag ggc ccc cgc gac ggg ctg aag aag gag cgg cta ctg gac gac c 3'	
	FW3	5' c cgg aat tca ttc cag gcg gcc gag cgc ccc cag gag tgg gcc atg gag ggc c 3'	
	RV	5' cgc gga tcc tca taa cgt cag acg ctg gcc tcc aaa cac aca gtc 3'	
pECFP-IκBα243N	FW	5' c cgg aat tca ttc cag gcg gcc gag cgc ccc cag gag tgg gcc atg gag ggc c 3'	1~243
	RV	5' cg gga tcc tta tca atg gtg atg gtg atg gtg gac atc agc ccc aca ctt 3'	
pECFP-IκBα244C	FW	5' gg aat tct aac aga gtt acc tac cag ggc ta 3'	244~317
	RV	5' cgc gga tcc tca taa cgt cag acg ctg gcc tcc aaa cac aca gtc 3'	
pp53-DsRed	FW	5' c tag cta gcg gaa gct tcc acc atg gag gag ccg cag tca gat 3'	1~393
	RV	5' c ggg atc ccg gtc tga gtc agg ccc ttc tgt 3'	
pp53/47C-DsRed	FW	5' c tag cta gcg gaa gct tcc acc atg ccg gac gat att gaa caa t 3'	47~393
	RV	5' c ggg atc ccg gtc tga gtc agg ccc ttc tgt 3'	

FW: Forward primer; RV: Reverse primer.

1.3 细胞转染

肺腺癌细胞 ASTC-α-1 (暨南大学医学院病理教研室)培养于 DMEM 培养液中, 其组成为: DMEM (GIBCO)、15%新生牛血清(杭州四季清生物工程材料研究所)、2 mmol/L 谷氨酰胺、25 mmol/L HEPES、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素, 37℃ 5% CO₂ 细胞培养箱进行培养. 将 80% 左右汇聚的细胞与 Lipofectin Reagent (Invitrogen 公司) 和一种或两种 0.5 μg 的质粒载体悬浮液共同培养 10 h 后, 更换新鲜培养液. 转染 24~36 h 后, 进行观察, 以空质粒 pECFP-C1 代替 pECFP-IκBα 做为对照.

1.4 激光共聚焦显微镜观测

待检测细胞置于激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司 ConfoCor 2) 的恒温培养台上进行观察 (37℃, 5% CO₂). 单独的 DsRed 由 543 nm 激光激发 (HFT488/543、 NFT545、 LP560 nm) 观察 p53-DsRed 和 p53/47C-DsRed 的表达; 单独的 CFP 由氩离子激光器(发射波长为 458, 488, 514 nm) 458 nm 激发(HFT458 nm、 NFT545 nm、 BP470~500 nm), 观测 CFP-IκBα 及其突变体 CFP-IκBαM、 CFP-IκBα243N 和 CFP- IκBα244C 在细胞的定位; CFP 和 DsRed 的 FRET, 由 458 nm 激发, 同时观测 CFP (HFT458、 NFT515、 BP470~500 nm) 和

DsRed (HFT458、NFT515、LP560 nm) 两个通道 (荧光共振能量转移通道, FRET 通道), 以及 ratio 图像 (通过 Zeiss Rel3.2 图像处理软件计算受体图像除以供体图像所得). UV 照射 (150 mJ/cm²) 后实时观察细胞 DsRed/CFP 的比值变化. LMB (10 μg/L) 作用下观测细胞内各荧光蛋白的分布及其核穿梭过程.

1.5 受体漂白实验

应用 543 nm 的强激光对细胞浆内一定区域的 DsRed 进行漂白, 漂白参数 interaction (100), 之后观测漂白区内外 CFP 和 DsRed 两个通道荧光强度变化, 检测 DsRed 漂白程度, 以及 CFP 通道的荧光强度与漂白前相比是否增强.

2 结 果

2.1 p53 在细胞中的表达情况

转染了 p53-DsRed 及其突变体 p53/47C-DsRed 的细胞在转染 36 h 后, 用激光共聚焦显微镜观测. 结果表明, p53 主要分布于胞核中, p53/47C 为缺乏 N 端 46 个氨基酸的 p53 突变体, 其分布与 p53 相似 (图 1).

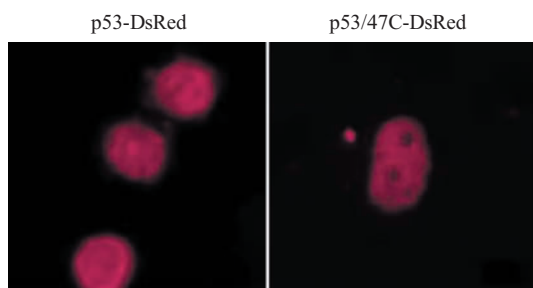


Fig. 1 Microscopy of p53 and p53/47C in living cells

ASTC-α-1 cells transfected with p53-DsRed or p53/47C-DsRed revealed a predominant nuclear localization.

2.2 IκBα 及突变体 IκBαM、IκBα243N 和 IκBα244C 在细胞内的表达情况

用激光共聚焦显微镜观测转染了 pECFP-IκBα (IκBαM、IκBα243N、IκBα244C) 质粒的细胞, 结果显示, 无论是 CFP-IκBα (全长 IκBα)、CFP-IκBαM (第 32 和 36 位丝氨酸突变为丙氨酸)、还是 CFP-IκBα243N (含有锚蛋白重复序列, 但缺乏 C 端的 PEST 区), 在活体细胞的胞浆及胞核内均有定位, 但主要分布于胞浆中, 而 CFP-IκBα244C (含有 C 端的 PEST 区) 在胞核的荧光强度则高于胞浆 (图 2).

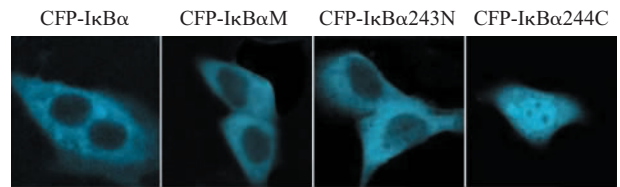


Fig. 2 Localization patterns of IκBα and its mutants in living cells

Cells were transfected with CFP-IκBα, CFP-IκBαM, CFP-IκBα243N, and CFP-IκBα244C respectively (from left to right panel). CFP-IκBα, CFP-IκBαM, and CFP-IκBα243N mainly existed in cytoplasm, while cells transfected with CFP-IκBα244C revealed a predominant nuclear localization.

2.3 应用 FRET 观察 p53 与 IκBα 的相互作用

共转染等量的 p53-DsRed 和 CFP-IκBα 或其突变体时, 出现不同的表达分布 (图 3). 共转染 p53-DsRed/CFP-IκBα 或 p53-DsRed/CFP-IκBαM 的细胞内, 荧光蛋白均主要分布于胞浆中, 胞核内维持着低水平的表达, ratio 图像 (即通过 Zeiss Rel3.2 图像处理软件计算出的受体图像与供体图像的比值) 为阳性. 共转染 p53-DsRed 和 CFP-IκBα243N 的细胞, CFP-IκBα243N 主要分布在胞浆中, 而此时的 DsRed 通道 (FRET 通道) 胞浆及胞核内均有荧光信号, ratio 图像为阴性. 之后我们用 458 nm 和 543 nm 激光分别激发共转染 p53-DsRed 和 CFP-IκBα243N 的细胞, 结果如图 4, 两通道出现了不同的荧光分布, p53-DsRed 主要存在于核内, 而 CFP-IκBα243N 主要分布于胞浆中,

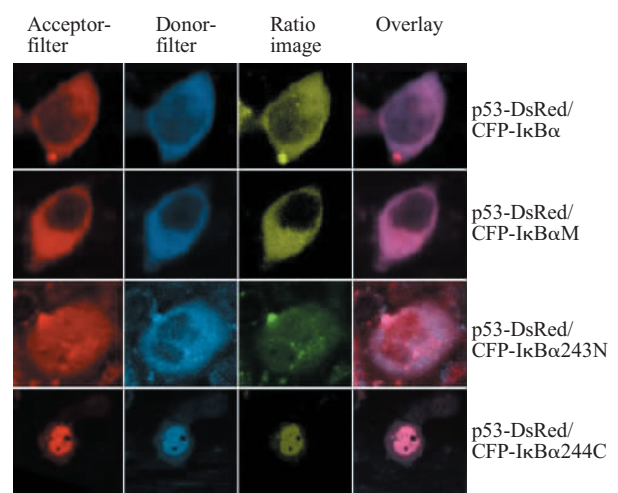


Fig. 3 Interaction of p53 and IκBα in static cells

The characters on the right showed different co-transfected cells. From the left to right panel were the images of DsRed-channel, CFP-channel, ratio, and the overlay of the former two. The ratio images represent the division of the acceptor filter images by the donor filter images.

I κ B α 243N 并不能影响 p53 的定位, 那么图 3 共转染 p53-DsRed/CFP-I κ B α 243N 的细胞中, 其 FRET 通道内的荧光信号有可能是由于 CFP 的荧光漏到 DsRed 通道和 DsRed 通路中 DsRed 直接被激发的荧光. 共转染 p53-DsRed/CFP-I κ B α 244C 的细胞, 其 2 种荧光融合蛋白的分布特点与前面 3 种又有所不同, 胞浆及胞核内均有 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α 244C 的表达, 且主要分布于胞核中, 胞浆中仅有微量的表达, ratio 图像为阳性. 4 种不同的 I κ B α 在与 p53 进行共转染时, 荧光分布出现了不同的结果. 其中 I κ B α 243N 并不能改变 p53 在细胞内的定位. 另外, 在共转染的 p53/47C-DsRed 和 CFP-I κ B α 的细胞内, p53/47C-DsRed 主要存在于胞核中, CFP-I κ B α 则主要分布于胞浆中 (图 5).

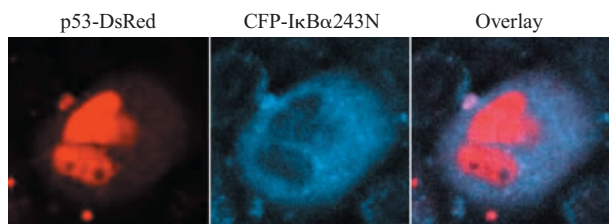


Fig. 4 Localizations of p53-DsRed and CFP-I κ B α 243N in living cells

Cells were transfected with p53-DsRed and CFP-I κ B α 243N. The cell was excited by 458 nm and 543 nm lasers respectively. From the left to right panel were the images of p53-DsRed, CFP-I κ B α 243N and the overlay.

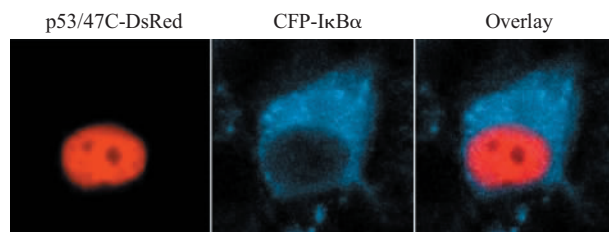


Fig. 5 Location of p53/47C-DsRed and CFP-I κ B α in living cells

Cells were co-transfected with p53/47C-DsRed and CFP-I κ B α . The cell was excited by 458 nm and 543 nm lasers respectively. From the left to right panel were the images of p53/47C-DsRed, CFP-I κ B α and the overlay.

2.4 受体光漂白技术研究 p53 与 I κ B α 的相互作用

以上实验结果说明 I κ B α 和 I κ B α M 改变或影响了 p53 的定位, 这可能是由于它们与 p53 直接发生了相互作用, 将 p53 定位在胞浆中, 但是也有可能是它们作用于 p53 信号通路中的某一蛋白质, 间接

接改变了 p53 的定位. 为了确定其作用方式, 我们接着应用受体光漂白技术进一步验证并实时观测漂白区内 p53 与 I κ B α 的相互作用, 结果如图 6a. 漂白区内 p53-DsRed 的荧光强度大幅度下降, 已部分被漂白, 漂白区外的 p53-DsRed 的荧光强度也随之降低, 但与漂白区内相比, 其下降幅度较小, 说明在漂白的过程中, 已有 p53-DsRed 分子在漂白区内外自由扩散. 而 CFP-I κ B α 在 p53-DsRed 被漂白后, 由于 CFP 的能量不再向已被漂白的 DsRed 转移, 其漂白区内的荧光强度有所增强, 随后 CFP-I κ B α 的荧光强度又有所降低, 表明漂白区内的 CFP-I κ B α 在向外扩散, 同时随着漂白区周围的 p53-DsRed 逐渐进入漂白区, 与之结合的 CFP-I κ B α 也扩散进来, 这部分 p53-I κ B α 复合体中, 能量是可以从 CFP 向 DsRed 转移的, 漂白区

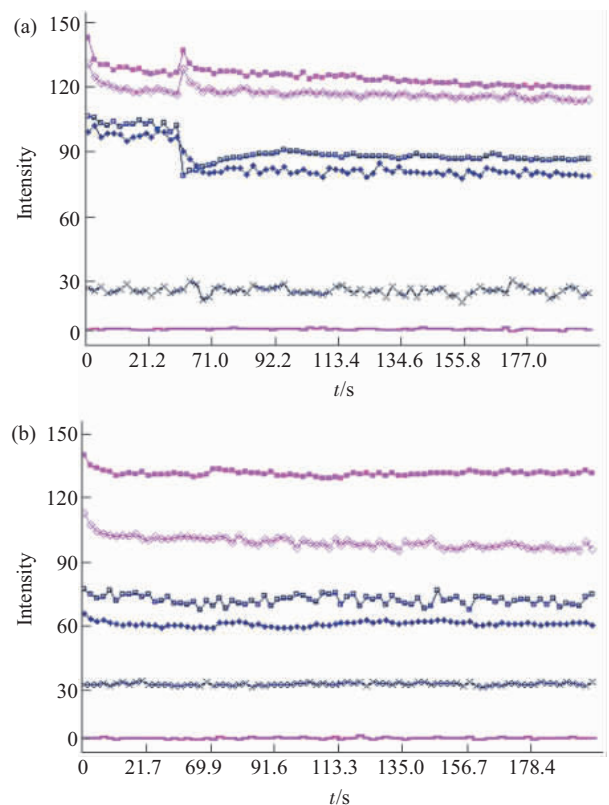


Fig. 6 Interaction of p53 and I κ B α studied by acceptor photobleaching

Cells co-transfected with p53-DsRed/CFP-I κ B α (a) or p53-DsRed/CFP-I κ B α 243N (b) were bleached with 543 nm high intensity laser. Photobleaching time was 29.7~60.4s and 29.7~58.4s respectively. The changing of the intensity of DsRed and CFP was studied. —□—: DsRed in the bleaching area; —■—: CFP in the bleaching area; —●—: DsRed out of the bleaching area; —○—: CFP out of the bleaching area; —×—: DsRed of background; —+—: CFP of background.

外 CFP-I κ B α 的荧光强度也有升高, 也提示我们在漂白过程中, 有 p53-I κ B α 复合体在漂白区内外自由扩散. 随着时间的推移, 最终所有分子均达到一定的平衡, 进一步验证了原来的 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α 间是有相互作用的发生. 共转染 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α M 也得到相似结果. 而共转染 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α 243N 的细胞, 在应用 543 nm 激光进行漂白后, 其荧光强度未发生明显变化(图 6b). 从而在活体细胞内很直观地证明了 I κ B α 与 p53 的直接相互作用关系.

2.5 UV 刺激后 p53 与 I κ B α 相互作用的变化

在本实验中, 还应用 UV 刺激共转染荧光融合蛋白的细胞, 实时观测受体与供体的比值变化^[4], 即 DsRed/CFP 值的变化. 无论 DsRed/CFP 的起始值为多少, 如果有 FRET 的发生, 则在外界刺激下, 势必会引起两蛋白质的分离, CFP 的荧光不再向 DsRed 转移, DsRed 通路内的荧光强度会下降, CFP 通路内的荧光强度将上升, DsRed/CFP 比值必然会降低. 由于 I κ B α 可以被降解, 所以我们应用第 32 和 36 位丝氨酸发生突变的 I κ B α M. 在 UV 刺激后计算细胞内 DsRed/CFP 比值变化, 结果如图 7 所示, DsRed/CFP 比值是逐渐降低的, 未出现突然下降的现象, 这也许是由于两蛋白质的分离过程

并非是单向的, 而是双向可逆的过程. 未进行 UV 照射的细胞该值基本没有发生变化.

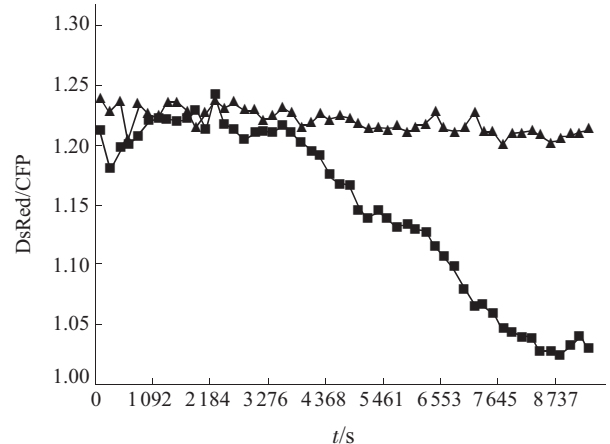


Fig. 7 The changing of DsRed/CFP under UV stimulation

Cells co-transfected with equal amount of p53-DsRed and CFP-I κ B α M, were or were not exposed to UV (150 mJ/cm²) and then cells were observed using the appropriate filter sets. After FRET experiments, the ratio of the DsRed/CFP emission was calculated. ■—■: UV; ▲—▲: without UV.

2.6 p53 与 I κ B α 的核浆穿梭过程

静止细胞中 I κ B α 主分布于胞浆中, 但在降低扫描层的厚度, 去除胞核上下胞浆对胞核的影响后, 结果显示, 其实在胞核中也维持有低水平的

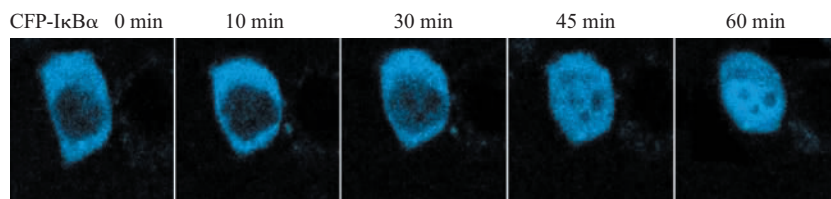


Fig. 8 Translocation of CFP-I κ B α from the cytoplasm to nucleus following treatment with LMB

Cells were transfected with CFP-I κ B α and images show successive sections of CFP-I κ B α transfected cells taken 0, 10, 30, 45 or 60 min after addition of LMB (10 μ g/L).

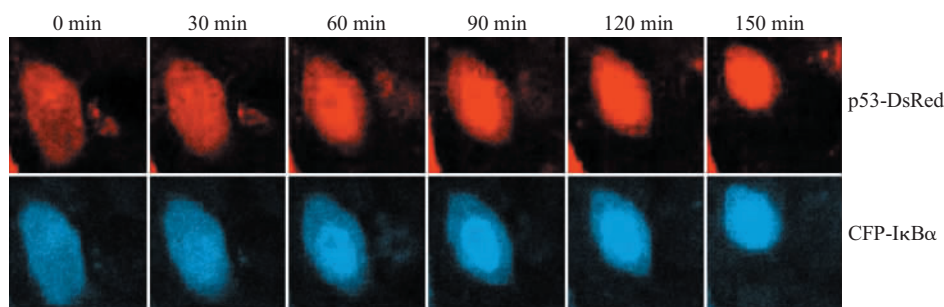


Fig. 9 Shuttling of p53-DsRed and CFP-I κ B α between cytoplasm and nuclear

Cells were co-transfected with p53-DsRed and CFP-I κ B α constructs. Images show consecutive sections of p53-DsRed and CFP-I κ B α transfected cells taken 0, 30, 60, 90, 120, or 150 min after addition of LMB (10 μ g/L).

I κ B α 的表达. 于是应用可抑制 CRM-1 调控核输出过程的特殊抑制剂 LMB, 得到如图 8 所示的结果, 即 LMB 可引起 CFP-I κ B α 向胞核内的积聚 (图 8), 加入 LMB 1 h 后, I κ B α 主要分布于核中. 在共转染了 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α 的细胞在 LMB 处理后, 也出现了 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α 的核穿梭过程 (图 9).

3 讨 论

荧光共振能量转移理论 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的基本原理是: 在两个不同的荧光基团中, 如果一个荧光基团 (供体 donor) 的发射光谱和另一个基团 (受体 acceptor) 的激发光谱有一定的重叠 (overlap), 当这两个荧光基团间的距离合适时 (一般小于 100 nm), 就可观察到荧光能量由供体向受体转移的现象, 即用前一种基团的激发波长激发时, 可观察到后一种基团发射的荧光. FRET 已被广泛应用于蛋白质-蛋白质间相互作用的研究领域中, 相对于传统的研究方法, 如: 酵母双杂交、免疫共沉淀等等, 其优势主要在于可以在活细胞生理条件下实时、定量、定位、无损伤地对蛋白质-蛋白质间相互作用进行动态研究^[14-16]. 本实验应用了 CFP 和 DsRed 荧光融合蛋白, 因为两者的激发光谱与发射光谱合适, 所以是一对极好的检测蛋白质-蛋白质间相互作用的报告分子.

I κ B α 是 NF- κ B 的抑制蛋白, 和其他 I κ B 蛋白家族成员在功能上均可以抑制 NF- κ B 的活性, 通过与 NF- κ B 的结合而将其滞留于胞浆中^[17]. 结构上, I κ B α 包含 N 端的锚蛋白重复序列区 (ARD 区) 和 C 端的 PEST 区. ARD 区与 NF- κ B·I κ B α 复合体的形成有关, I κ B α 的第一个锚蛋白抑制 NF- κ B 活性的作用最强^[18]. 核内的 I κ B α 参与抑制 NF- κ B 与靶 DNA 结合, 提高 NF- κ B 从核内向胞浆的输出量.

实验结果显示, CFP-I κ B α 244C 的分布特点很明显与 CFP-I κ B α 、CFP-I κ B α M 和 CFP-I κ B α 243N 不同, 也许是因为其缺乏锚蛋白重复区 (ARD) 及 N 端的核输出序列^[19]区有关, 因而不能够与内源性的 NF- κ B 结合, 核内的分子也不能被输出至胞浆. 由于融合蛋白的分子质量明显较大, CFP-I κ B α 244C 的定位说明其有活跃的核输入过程 (图 2). 不同的 I κ B α 突变体与 p53 的作用也不相同, I κ B α 和 I κ B α M 可以影响 p53 的定位, 但 I κ B α 243N 并不能改变 p53 在胞核内的分布特征,

I κ B α 244C 和 p53 则均主要分布于胞核中. 另外, 与共转染 p53 和 I κ B α 的结果相比, I κ B α 并不能影响也不能改变 p53/47C-DsRed 的分布. 从而直观地说明了 I κ B α 通过其 C 端的 PEST 区可与 p53 在活体细胞内发生相互作用, I κ B α 的 C 端和 p53 的 N 端在 I κ B α ·p53 复合体形成的作用中是非常重要的^[11], 缺少了 I κ B α 的 C 端或 p53 的 N 端会改变两者的分布特征.

胞浆中的 p53·I κ B α 复合体在外界刺激下, I κ B α 可以迅速降解, p53·I κ B α 复合体发生解离, 而 p53 则进入至细胞核中发挥作用, 说明在静止细胞内, I κ B α 对 p53 有着严格的调控过程. 静止细胞胞浆和胞核中 p53 的量是非常低的. 有一种假设的模型是, 在静止细胞内存在一部分胞浆中的 p53 和 I κ B α 复合体, 其不断地解离, 而允许 p53 的核输入, 从而保持一定水平的细胞功能. 细胞核内的 p53 接着与 Mdm2 结合, 被输出至胞浆中, 被泛素化和降解. 新合成的 p53 又与 I κ B α 形成复合体, 作为新的胞浆储备.

静止细胞中 I κ B α 主要分布于胞浆中, 胞核中也维持有低水平 I κ B α 的表达, 本实验中应用了可抑制 CRM-1 调控核输出过程的特殊抑制剂 LMB (leptomycin B), 引起 I κ B α 向胞核内的积聚 (图 8). I κ B α 的核输入是独立于 NF- κ B 蛋白的^[20], I κ B α 的第二个锚蛋白重复序列与其核定位有关^[21]. I κ B α 的核浆穿梭过程, 使 I κ B α 能够与核内过多的 NF- κ B 结合, 将其带至胞浆中^[22], 以防止 NF- κ B 分子过量激活, 维持其处于低活性状态, 以诱导一些重要的与基础过程有关的基因转录, 如细胞周期蛋白 CYCLIND1 等^[8, 23, 24]. 上游的信号激酶 NIK 和 IKK, 其他与 I κ B α 降解有关的结构, 如泛素小体、蛋白酶, 也存在于胞核内^[25, 26], 也解释了 I κ B α 核穿梭的意义. 共转染 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α 的细胞在 LMB 处理后, 也出现了 p53-DsRed 和 CFP-I κ B α 的核穿梭过程. 那么 I κ B α 核穿梭的意义并不仅仅在于调控 NF- κ B 的活性, 也必然与 p53 的作用相关. 这些激酶在核内表现出某种基础的酶活性, 必然也会调节核内 I κ B α 与 p53 的相互作用. 另外, p53 和 I κ B α 核浆穿梭的原因是否与 I κ B α 和 NF- κ B 一样, 是由于复合体的解离引起^[26], 还是 p53·I κ B α 复合体直接的核输入或 I κ B α 的降解与再合成所致, 仍需要进一步的探索, 但 p53·I κ B α 复合体的核穿梭速度与单独 I κ B α 的核穿梭速度相差不多, 提示我们, p53·I κ B α 复合体的解离可能不

是该复合体核穿梭的限速过程。

I κ B α 可以通过 ARD 区与 NF- κ B 形成 NF- κ B·I κ B α 复合体,也可通过 C 端的 PEST 区与 p53 形成 p53·I κ B α 复合体,由于 I κ B α 与 p53 和 NF- κ B 相互作用的位点并不冲突,那么,是否有 NF- κ B·I κ B α ·p53 复合体的存在呢? p53、NF- κ B 和 I κ B α 之间到底是如何调控的呢?有文献报道,NF- κ B 是 p53 调控的程序性细胞死亡过程中的一个联合因子^[27],是否是因为外界的刺激使得 I κ B α 降解,而同时将 NF- κ B 和 p53 释放出来?也有文献报道,p53 和 I κ B α 可以协同作用提高细胞的死亡^[11],是否与 I κ B α 和 p53 结合,增加了 p53 的稳定性,抑制了 Mdm2 调控的 p53 降解作用有关呢?而 WOX1 也可与 p53 相互作用^[28],WOX1 和 I κ B α 间是否存在竞争性抑制作用?NF- κ B、I κ B α 、p53、Mdm2 和 WOX1 相互之间的关系是非常复杂的,也是需要进一步研究以确定的。综上所述,本实验应用 FRET 技术在活体细胞内实时研究 p53 和 I κ B α 间的相互作用,并实时观察细胞内 p53 与 I κ B α 核穿梭的动态过程,探讨 p53·I κ B α 复合体及核穿梭的意义,I κ B α 蛋白可能已经成为 p53 和 NF- κ B 两条信号通路的一个串话分子,关于这一热点问题在今后的细胞生物学研究中将会继续受到重视,并会有更多的发现。

参 考 文 献

- Huguet C, Crepieux P, Laudet V. Rel/NF- κ B transcription factors and I κ B inhibitors: evolution from a unique common ancestor. *Oncogene*, 1997, **15** (24): 2965~2974
- Whiteside S T, Israel A. I κ B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol*, 1997, **8** (2): 75~82
- May M J, Ghosh S. Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol*, 1997, **8** (2): 63~73
- Han Y, Weinman S, Boldogh I, *et al.* Tumor necrosis factor- α -inducible I κ B α proteolysis by cathepsin B is mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem*, 1999, **274** (2): 787~794
- Nasuhara Y, Adcock I M, Catley M, *et al.* Differential I κ B kinase activation and I κ B α degradation by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in human U937 monocytic cells. *J Biol Chem*, 1999, **274** (28): 19965~19972
- 萨其拉, 刘孟珉, 贺福初. TNF 受体家族介导的细胞凋亡信号转导. *生物化学与生物物理进展*, 1999, **26** (4): 327~330
Satschra, Liu M M, He F C. *Prog Biochem Biophys*, 1999, **26**(4): 327~330
- Yang L, Chen H B, Qwarnstrom E. Degradation of I κ B α is limited by a postphosphorylation/ubiquitination event. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **285**: 603~608
- Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 1999, **18**: 6853~6866
- Yamamoto Y, Gaynor R B. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem Sci*, 2004, **29** (2): 72~79
- 张劲松, 王兴宇, 单佑安等. 转录因子 NF- κ B 的研究进展. *科学通报*, 2002, **47** (5): 323~329
Zhang J S, Wang X Y, Shan Y A, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47** (5): 323~329
- Chang N S. The non-ankyrin C terminus of I κ B α physically interacts with p53 *in vivo* and dissociates in response to apoptotic stresses, hypoxia, DNA damage, and transforming growth factor- β 1-mediated growth suppression. *J Biol Chem*, 2002, **277** (12): 10323~10331
- Fujioka S, McIlab G M, Schmidt C, *et al.* Inhibition of constitutive NF- κ B activity by I κ B α M suppresses tumorigenesis. *Oncogene*, 2003, **22**: 1365~1370
- Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem*, 2002, **277**, **16** (19): 14040~14047
- 王进军, 陈小川, 邢达. FRET 技术及其在蛋白质-蛋白质分子相互作用研究中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 980~984
Wang J J, Chen X C, Xing D. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 980~984
- Kenworthy A K. Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*, 2001, **24**: 289~296
- Sekar R B, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*, 2003, **160** (5): 629~633
- Jacobs M D, Harrison S C. Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell*, 1998, **95** (6): 749~758
- Simeonidis S, Stauber D, Chen G Y, *et al.* Mechanisms by which I κ B proteins control NF- κ B activity. *Biochemistry*, 1999, **38** (1): 49~54
- Johnson C, Van Antwerp D, Hope T J. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *EMBO J*, 1999, **18** (23): 6682~6693
- Carlotti F, Dower S K, Qwarnstrom E E. Dynamic shuttling of nuclear factor- κ B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem*, 2000, **275** (52): 41028~41034
- Sachdev S, Hoffmann A, Hannink M. Loss of I κ B α -mediated control over nuclear import and DNA binding enables oncogenic activation of c-Rel. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (9): 2524~2534
- 沈利群, 徐祥, 吕凤林, 等. 核因子- κ B 的跨核膜转运及其调控机制. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (3): 368~371
Shen L Q, Xu X, Lu F L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (3): 368~371
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, *et al.* NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and

- G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(4): 2690 ~ 2698
- 24 Joyce D, Albanese C, Steer J, *et al.* NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth F R*, 2001, **12**: 73 ~ 90
- 25 Birbach A, Gold P, Binder B R, *et al.* Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem*, 2002, **277** (13): 10842 ~ 10851
- 26 Reits E A, Benham A M, Plougastel B, *et al.* Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J*, 1997, **16**(20): 6087 ~ 6094
- 27 Ryan K M, Ernst M K, Rice N R, *et al.* Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 2002, **404** (20): 892 ~ 897
- 28 Chang N S. A potential role of p53 and WOX1 in mitochondrial apoptosis (Review). *Int J Mol Med*, 2002, **9**: 19 ~ 24

Interaction of p53 and Inhibitor of NF- κ B alpha and Their Shuttling Between Cytoplasm and Nucleus Observed in Living Cells*

LI Xian¹⁾, XING Da^{1)**}, CHEN Xiao-Jia²⁾, TANG Yong-Hong¹⁾,
SUN Fen-Yong²⁾, WANG Ju²⁾, HONG An²⁾, WU Yun-Xia¹⁾

(¹⁾*Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;*

(²⁾*Institute of Biology Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)*

Abstract Six fluorescent fusion protein plasmids were constructed, and the location and interaction of p53 and I κ B α (I κ B α M, I κ B α 243N and I κ B α 244C) in living cells were investigated with cyan (CFP) and red fluorescent protein (DsRed) fusion proteins by fluorescence resonance energy transfer. p53 interacts with the non-ankyrin C terminus PEST domain of I κ B α , and the N terminus in p53 plays an important role in the formation of p53 • I κ B α complex. The change of DsRed/CFP in response to UV-mediated DNA damage was observed in real time and the balance between p53 • I κ B α complex formation and dissociation was discussed. In addition, the shuttling of p53 and I κ B α between cytoplasm and nucleus under LMB stimulation suggested that the relationship among NF- κ B, p53, I κ B α , Mdm2, and WOX1 is complicated and remains to be determined. I κ B α has been an important cross-talk protein between p53 and NF- κ B, and this might expand the understanding of these two signaling pathways considerably.

Key words: p53, inhibitor of NF- κ B alpha (I κ B α), nuclear factor- κ B (NF- κ B), fluorescence resonance energy transfer

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (60378043, 30470494), The Natural Science Foundation of Guangdong Province (015012, 04010394).

**Corresponding author. Tel: 86-20-85210089, Fax: 86-20-85216052, E-mail: xingda@scnu.edu.cn

Received: April 5, 2006 Accepted: April 20, 2006