

I κ B 激酶的激活及其在 NF- κ B 活化过程中的作用

王 勇* 黄文华

(第三军医大学西南医院烧伤研究所, 重庆 400038)

摘要 在 NF- κ B 二聚体活化过程中, I κ B 激酶 (IKK) 通过对抑制性蛋白 κ B (I κ Bs) 的磷酸化而扮演关键的角色. IKK 复合物在胞浆内有多种存在形式, 其中, IKK- α 、IKK- β 两者氨基酸序列 52% 的同源性, 空间构象相似, 常为催化亚单位, 而 IKK- γ 则为调节亚单位, 它们以不同的方式活化 I κ Bs. 核因子 κ B 诱导激酶 (NIK) 与丝裂原活化蛋白激酶激酶-1 (MEKK1) 均为 IKK 的上游激酶, NIK 可引起 IKK- α Ser176、IKK- β 相应位点的磷酸化, 而 MEKK1 主要引起 IKK- β 的活化. 通过级联反应, 使 I κ Bs 磷酸化而与 NF- κ B 解离, 致使 NF- κ B 被激活并易位入核, 启动免疫及炎症相关的基因转录.

关键词 I κ B 激酶, 核因子 κ B 诱导激酶, 核因子 κ B, 抑制性蛋白 κ B, 丝裂原活化蛋白激酶激酶-1

学科分类号 Q55

核因子- κ B (NF- κ B) 是一类转录因子, 能与多种基因启动子或增强子上的 κ B 位点发生特异性结合并促进基因转录的蛋白质总称. 最初发现在 B 淋巴细胞免疫球蛋白 κ 轻链基因增强子有特异性结合位点 (GGGGACTTTC)^[1], 后来发现在许多基因的启动子或增强子上都有一个或几个 κ B 结合位点. 它参与许多基因, 尤其是炎症与免疫相关的基因如即早基因 (immediate-early genes) 的表达与调控^[1,2]. 该家族每个成员均含有名为 Rel-homology domain (RHD) 的保守的 N 端区, 在该区内, 有 DNA 结合区与核定位信号. 在哺乳动物的细胞中, 已区分出如下几种核因子- κ B 的蛋白质: p65、c-Rel、RelB、V-Rel、p50/p105 与 p52/p100. 其中 p50 与 RelA (p65) 两亚基形成的异二聚体为最常见的形式^[1,2].

当细胞处于静息状态时, NF- κ B 二聚体与抑制性蛋白 κ B (I κ Bs) 结合形成三聚体存在于细胞浆中. 对于 I κ Bs, 目前已发现 7 种蛋白质: I κ B- α 、I κ B- β 、I κ B- γ 、I κ B- ϵ 、Bcl-3、p100 与 p105. 所有 I κ B 蛋白质均包含 30~33 个氨基酸序列的锚蛋白重复序列. 它可与 NF- κ B 亚基的 RHD 偶联以覆盖核定位信号, 阻止 NF- κ B 核易位. 当细胞受到外界因素刺激后, 经一系列激酶激活, 可致 I κ B- α 的丝氨酸残基 Ser 32 与 Ser 36 及 I κ B- β 的 Ser19 Ser23 发生磷酸化, 接着在赖氨酸残基 Lys21 与 Lys22 残基泛素化, 促使 26S 蛋白酶小体快速降解 I κ Bs, 导致 NF- κ B 进入细胞核内, 其亚基形成环状结构与

DNA 接触, 调控相应的基因表达^[1,2]. 在此过程中, I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 为最关键的激酶.

1 IKK 的分类

1995 年 Connelly 与 Marcu^[3] 在酵母菌杂交实验中发现一种丝氨酸-苏氨酸激酶, 该酶可与 NF- κ B 诱导激酶 (NIK) 相互结合作用. 由于功能不详, 暂定名为 CHUK (conserved helix-loop-helix (HLH) ubiquitous kinase). 1997 年, DiDonato^[4] 为了验证 I κ B 激酶是否特导性地使 I κ B- α Ser32/36 残基磷酸化, 作了一系列实验. 他从非刺激的及 TNF- α 刺激过的 HeLa 细胞分离提取物, 以谷胱甘肽-S 转移酶标记的 I κ B- α ——GST-I κ B- α (1~54) 及突变型 GST-I κ B- α (1~54 TT) 为底物, 来验证 IKK 的活性. 该分子质量为 900 ku 的蛋白质混合物可使 GST-I κ B- α (1~54) 发生磷酸化而不能使第 32 位、36 位丝氨酸残基被丙氨酸取代的突变型 GST-I κ B- α (1~54TT) 发生特异性磷酸化. 900 ku 的混合蛋白经 TNF 刺激后活性迅速升高, 其酶活性于 5~10 min 达到峰值. DiDonato 进一步对蛋白质混合物纯化, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染色及 γ -³²P-ATP 亲和层析等方法均可分离出 85 ku 与 87 ku 的两条多肽带. 通过对 85 ku 的多

* 通讯联系人.

Tel: 023-68754135, E-mail: wangyongjhy@163.net

收稿日期: 2000-07-10, 接受日期: 2000-08-23

肽 cDNA 编码产物的分析, 由于该产物与天然纯化的 IKK 对底物有相同的特异性, 表明纯化与克隆是成功的. 85 ku 的多肽命名为 IKK- α . 1997 年 Woronicz^[5] 通过筛选表达的序列标记 (EST) cDNA 文库, 发现类似于 IKK- α 的 756 个氨基酸的蛋白质, 命名为 IKK- β .

IKK- α 与 IKK- β 两种蛋白质有相似的结构与较高的同源性^[5]. IKK- α 分子质量 85 ku, 含 745 个氨基酸, 而 IKK- β 分子质量 87 ku, 含 756 个氨基酸. 二种 IKK 均含蛋白激酶区、亮氨酸拉链结构 (LZ) 与螺旋-环-螺旋区 (HLH). 其中变异分析表明, 亮氨酸拉链结构可介导 IKK- α 结合 IKK- β . 而 HLH 区可发挥高效激酶活性, 对 IKK 亚基间相互作用无关紧要. 经同源分析, IKK- α 与 IKK- β 有 52% 同源的氨基酸序列, 其中含亮氨酸拉链结构和螺旋-环-螺旋区的 C 端有 44% 的同源性, 而 N 端激酶区, 高达 64% 的同源. 令人惊奇的是, IKK- α 、IKK- β 并不定位于同一染色体上, 人的 IKK- α 定位于染色体 10q24, 而 IKK- β 在染色体 8p11.2^[6].

1998 年, Rothwarf 等^[7] 通过免疫亲和层析及基因文库的筛选, 发现 HeLa 及 Jurkat 细胞中的 IKK 复合物, 除了由等量的 IKK- α 、IKK- β 组成外, 还包含了一个新的蛋白质多肽——IKK- γ , 一级结构由富含谷氨酰胺的 419 个氨基酸构成. 二级结构包含两段可伸展的卷曲螺旋特征基序 (coiled-coil motifs) 和一个亮氨酸拉链区. IKK- γ 可分为 IKK- γ_1 与 IKK- γ_2 , 它们可形成同源、异源或者三聚体, 主要与 IKK- α 、IKK- β 异源二聚体的 IKK- β 相互作用, 形成一个复合物. 由于该蛋白质在 TNF- α 刺激后含量并不增加, 且 C 端缺陷的突变体并不影响 IKK 激酶复合物的活性, 故 IKK- γ 为 IKK 复合物的调节亚单位, 而 IKK- α 、IKK- β 则为催化亚单位.

2 IKK 的存在形式与调节

2.1 存在形式

IKK- α 与 IKK- β 可形成同源或异源二聚体, 但以异源二聚体较常见. Woronicz^[5] 实验表明, 将 Flag 与 Myc 表位标记的不同激酶基因的表达载体, 共转染 293 细胞, 再进行免疫沉淀分析. 结果显示, 同源与异源二聚体均可检测到, 但 α/β 异源二聚体与 α/α 同源二聚体较 β/β 同源二聚体更易形成. 当 Flag 标记的 IKK- α 与 Myc 标记的 IKK- α 、

Myc 标记的 IKK- β 共表达时, 抗 Flag 的免疫沉淀物更多地包含 Myc 标记的 IKK- β . 同样, Flag 标记的 IKK- β 更易同 Myc 标记的 IKK- α 结合. 因此, IKK- α 与 IKK- β 常以异源二聚体的形式存在于自然界. Woronicz 指出, 核因子 κ B 诱导激酶 (NF- κ B-inducing kinase, NIK) 常与 IKK- α 、IKK- β 异源二聚体聚合, 组成分子质量 700~900 ku 的激酶复合物. 因此, 作者认为, 细胞内有三种 IKK 复合物存在方式: IKK- α 同源二聚体, IKK- β 同源二聚体, IKK- α 、IKK- β 异源二聚体同 NIK 构成三聚体. 1998 年, Cohen 等^[8] 的实验发现一种新的支架蛋白质 (scaffold protein), 命名为 IKK 复合物相关蛋白 (IKK-complex-associated protein, IKAP), 分子质量 150 ku, 含 1332 个氨基酸. 它与有活性的 IKK-NIK 复合物紧密聚集, 以便后三类激酶的调节.

因此, IKK 复合物有如下几种存在形式: a. IKK- α 与 IKK- β 构成同源或异源二聚体, 以异源二聚体居多. b. IKK- α 、IKK- β 与 NIK 形成三聚体. c. IKK- α 、IKK- β 与 IKK- γ 形成复合物^[9]. d. IKK- α 、IKK- β 、NIK 与 IKAP 形成复合物^[8]. e. IKK- α 、IKK- β 、NIK 与 IKK- γ 、IKAP 形成复合物^[10]. 在不同种属的细胞、静止的细胞及细胞受到不同的刺激时, 核复合物会出现相应的变化, 如在未受刺激的人的单核细胞 THP-1 中, IKK 复合物由 IKK- α/β 异源二聚体、NIK 与 I κ B- α 、I κ B- ϵ 构成, 受到 TNF、IL-1 刺激后, I κ B- α 、I κ B- ϵ 解离, 而 IKK- α 、IKK- β 、NIK 仍紧密连在一起^[10].

2.2 IKK 与 NIK

许多实验已证明^[11], TNF、IL-1 在细胞外刺激后可通过不同信号途径如 TNF 受体相关因子家族 (TNF receptor-associated factor, TRAF) 等共同激活 NIK. NIK 为丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (MAP3K) 家族中的一员, 最早被认定为 TRAF₂ 相互作用型蛋白. 当 NIK 过度表达时可活化 NF- κ B, 而 NIK 的激酶失活突变体则作为显性失活抑制剂减弱由 TNF、IL-1, TNF 受体相关死亡蛋白 (TRADD)、TRAF₂、TRAF₅、TRAF₆ 所介导的 NF- κ B 的活化. 因此, NIK 可作为 IKK 的上游调节激酶. Woronicz^[5] 报道, NIK 不仅可激活 IKK- α , 亦可激活 IKK- β . NIK 与 IKK- α 或 IKK- β 共表达时均能增加 IKK- α 、IKK- β 的活性, 但 NIK 对 IKK- α 的激活作用强于 IKK- β . Nakano^[12] 进一步证实, NIK 对 IKK- α 的活化为 IKK- β 的 4 倍. 因

此, NIK 可能为 IKK- α 、IKK- β 的共同激酶. 1998 年, Ling 等^[13] 实验表明, NIK 可使 IKK- α 的 Ser 176 发生磷酸化. 当 Ser-176, Thr-179, Ser180 位点换成丙氨酸后进行变异分析, 结果提示: 176 位换成丙氨酸的 IKK- α 突变体明显降低了 NIK 对 IKK- α 的磷酸化, 而另两个突变体仍被高效磷酸化. 因此, IKK- α 的 Ser-176 为 NIK 的主要磷酸化点, 且位于激酶 VII、VIII 亚区的活化环域内. 对于 NIK 能否激活 IKK- β , 该文认为 IKK- β 不需 NIK 激活, 而是在 IKK- α 被激活后, IKK- β 可实现自身磷酸化或被 IKK- α 磷酸化, 尚有待进一步证实.

2.3 IKK 与 MEKK₁、MEKK₂、MEKK₃

MEKK₁ 为丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶-1, MAP3K 家族成员之一. 关于它对 IKK 的作用, 有两种不同的报道, 1996 年, Chen 等^[14] 报道 MEKK₁ 可激活 IKK- α 而进一步使 I κ B- α Ser 32/36 磷酸化, 而 1998 年, Nakano 等^[12] 提出相反意见, MEKK₁ 主要激活 IKK- β 而对 IKK- α 作用很弱, 当 MEKK₁、IKK- α 、IKK- β 共表达时, MEKK₁ 明显增强 IKK- β 对 GST 标记的 I κ B- α 的磷酸化, 而 IKK- α 对 I κ B- α 的磷酸化相当弱. IKK- β 的失活突变体可阻断 MEKK₁ 诱导的 NF- κ B 的活化. 虽然 NIK 与 MEKK₁ 属于 MAP3K 家族, 但它们为不同激酶, 可单独与 IKK 结合成复合物, 引起 IKK 磷酸化.

MEKK₂、MEKK₃ 亦为 MAP3K 家族成员之一. Zhao 等^[15] 研究表明, 在体内, MEKK₂、MEKK₃ 可引起 IKK- α 、IKK- β 的活化, 进而导致 I κ B- α 特异丝氨酸位点的磷酸化. 相反, MEKK₄、ASK₁、MLK₃ 却不能参与 NF- κ B 的活化.

3 IKK 的功能

IKK- α 、IKK- β 同为 I κ Bs 的特异性上游激酶, 但对 I κ Bs 的 I κ B- α 、I κ B- β 的作用明显不同^[5]. IKK- α 可导致 I κ B- α 的 Ser 32, Ser36 磷酸化, 亦可使 I κ B- β 的 Ser 23 磷酸化但对 Ser 19 的磷酸化很弱. 因此 IKK- α 主要是 I κ B- α 特异性上游激酶.

IKK- β 能使 I κ B- α 、I κ B- β 特异性位点丝氨酸磷酸化. IKK- β 使 I κ B- α Ser 32/36 发生等效磷酸化, 而且作用强度为 IKK- α 的 20 倍. 同样, IKK- β 亦可使 I κ B- β Ser19/23 产生等效磷酸化.

由于 NF- κ B 在细胞内广泛存在, 对细胞的生长、增殖、发育及凋亡, 对外界刺激的反应起着重

要的调节功能. IKK 的缺乏则会导致相应的发育缺陷. 如用基因敲除制成 IKK- α 缺乏的小鼠, 则会发生许多形态上的改变, 如短肢、骨骼畸形、上皮角化细胞的增殖与分化^[16]. IKK- β 缺乏的小鼠, 由于肝细胞退变及凋亡, 在胚胎期已死亡. 原因可能为胚胎的成纤维细胞内 NF- κ B 对外界刺激反应低下. 以上表明 IKK- β 、IKK- α 两者缺一不可, IKK- β 可能比 IKK- α 更重要^[17].

4 不同的胞外刺激引起 IKK 的活化

引起 NF- κ B 活化的信号有很多, 如 IL-1、TNF- α 、LPS、紫外线、PMA、活性氧等刺激因素. 目前, 在研究 IKK 时, 对 IL-1、TNF- α 、LPS 研究较多. 如在人的单核细胞中, TNF 可引起 IKK 活性迅速而短暂地升高, 峰值出现在受到刺激后 5 min 时, 其中 IKK- α 的活性为 IKK- β 的 4 倍. 相反, LPS 主要活化 IKK β , 峰值在 30 min 时, 升高较缓慢. 第二个峰值出现在 2 h 后, 此时 IKK- α 、IKK- β 均被明显地活化^[10]. TNF 与 IL-1 结合各自的受体, 通过多聚化及募集, 将胞外信号下传, 如 TNF 与 TNF 受体结合后引起受体三聚化, 接着 TRADD、TRAF₂、RIP 向胞膜移动, 发生多聚化, 引起 NIK 或 MEKK₁ 的活化^[13,18], 而 IL-1 通过 MyD₈₈, IRAK、TRAF₆ 的级联反应而活化 MAP3K 成员之一——TAK₁, 再引起 NIK 的磷酸化, 或者 MEKK₁ 直接活化 IKK^[18,19].

因此, 对于 NF- κ B 的活化有以下的描述: 胞外刺激如 TNF、IL-1 经过一系列级联反应如 TRADD、TRAF₂ 或 TRAF₆、TAK₁、RIP 等的参与, 汇聚至 NIK 或 MEKK₁, 其中 NIK 引起 IKK- α Ser176 IKK- β 的磷酸化, 而 MEKK₁ 主要引起 IKK- β 活化. 这样, 活化的 IKK- α 使 I κ B- α Ser 32/36 与 I κ B- β Ser23 磷酸化, 而对 I κ B- β Ser 19 磷酸化很弱. 活化的 IKK- β 也可引起 I κ B- α Ser 32/36 与 Ser 19/23 等效磷酸化. 接着在赖氨酸残基 Lys21、Lys22 发生泛素化, 促使 26S 蛋白酶小体快速降解 I κ B- α 或 I κ B- β , NF κ B/Rel 蛋白二聚体发生核易位, 启动基因转录.

参 考 文 献

- 1 Baeuerle P A, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. Cell, 1996, 87 (1): 13~20
- 2 Beg A A, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α induced cell death. Science, 1996, 274 (5288): 782~784

- 3 Connelly M A, Marcu K B. CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine-threonine kinase catalytic domain. *Cell Mol Biol Res*, 1995, **41** (6): 537~ 549
- 4 DiDonato J A, Hayakawa M, Rothwarf M, *et al.* A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 1997, **388** (6642): 548~ 554
- 5 Woroniec J D, Gao X, Cao Z, *et al.* I κ B kinase β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase α and NIK. *Science*, 1997, **278** (5339): 866~ 869
- 6 Hu M C, Wang Y. IkappaB kinase-alpha and -beta genes are coexpressed in adult and embryonic tissues but localized to different human chromosomes. *Gene*, 1998, **222** (1): 31~ 40
- 7 Rothwarf D M, Zandi E, Natoli G, *et al.* IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, 1998, **395** (6699): 297~ 300
- 8 Cohen L, Henzel W J, Baeuerle P A, *et al.* IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature*, 1998, **395** (6699): 292~ 296
- 9 Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, *et al.* Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK- β subunit phosphorylation. *Science*, 1999, **284** (5412): 309~ 313
- 10 Fischer C, Page S, Weber M, *et al.* Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic I κ B signalsome activation and I κ B proteolysis. *J Biol Chem*, 1999, **274** (35): 24625~ 24632
- 11 Nasuhara Y, Adcock I M, Catley M, *et al.* Differential IkappaB kinase activation and IkappaB alpha degradation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in human U937 monocytic cells: evidence for additional regulatory steps in kappaB-dependent transcription. *J Biol Chem*, 1999, **274** (28): 19965~ 19972
- 12 Nakano H, Shindo M, Sakon S, *et al.* Differential regulation of I κ B Kinase α and β by two upstream kinases: NF- κ B inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (7): 3537~ 3542
- 13 Ling L, Cao Z, Goeddel D V. NF- κ B-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (7): 3792~ 3797
- 14 Chen Z J, Wang Y. Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, 1996, **84** (6): 853~ 862
- 15 Zhao Q, Lee F S. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 2 and 3 activate nuclear factor-kappa through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase beta. *J Biol Chem*, 1999, **274** (13): 8355~ 8358
- 16 Hu Y, Baud V, Delhase M, *et al.* Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*, 1999, **284** (5412): 316~ 320
- 17 Tanaka M, Fuentes M E, Yamayuchi K, *et al.* Embryonic lethality liver degeneration and impaired NF- κ B activation in IKK- β -deficient mice. *Immunity*, 1999, **10** (4): 421~ 429
- 18 Baud V, Lin Z G, Bennett B, *et al.* Signalling by proinflammatory cytokines oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev*, 1999, **13** (10): 1297~ 1308
- 19 Ninomiya Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, *et al.* The kinase TAK1 can activate the NIK-IkappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 1999, **398** (6724): 252~ 256

Activation of I κ B Kinase and Its Effect in the Course of NF- κ B Activation

WANG Yong*, HUANG Wen-Hua

(Institute of Burn Research, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract During the course of NF- κ B dimer activation, I κ B kinase (IKK) play a crucial role by phosphorylation of inhibitory κ B (I κ Bs). There are lots of existing forms in cytoplasm about IKK complex, which activate I κ Bs through different ways. Generally, IKK has two catalytic subunits, IKK- α , IKK- β , which have 52% amino acids identity and similar construction, one regulatory subunit, IKK- γ . Both NF- κ B-inducing kinase (NIK) and mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK1) are upstream kinases of IKK. MEKK1 preferentially activates IKK- β , whereas NIK efficiently phosphorylates both IKK- α Ser176 and IKK- β . Through cascade reaction, I κ Bs are phosphorylated by IKK and dissociated from I κ B- NF- κ B complex, NF- κ B dimer enter the nucleus and activate a series of genes.

Key words I κ B kinase (IKK), NF- κ B-inducing kinase (NIK), mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK1), nuclear factor- κ B (NF- κ B), inhibitory κ B (I κ Bs)

* Corresponding author. Tel: 86-23-68754135, E-mail: wangyongjhy@163.net

Received: July 10, 2000 Accepted: August 23, 2000