

## 细胞水平筛选鉴定激活核因子 $\kappa$ B 通路的新基因 TMEM9B\*

刘宇明<sup>1,3)\*\*</sup> 彭智<sup>1)\*\*</sup> 邓唯唯<sup>1)</sup> 石太平<sup>1,2)\*\*\*</sup> 马大龙<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>国家人类基因组北方研究中心, 北京 100176; <sup>2)</sup>北京大学医学部基础医学院医学免疫学实验室, 北京 100191;

<sup>3)</sup>内蒙古工业大学化工学院, 呼和浩特 010051)

**摘要** 核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是细胞内重要的转录因子, 其介导的细胞信号转导通路在细胞凋亡中的作用是国内外研究的热点. 为了筛选 NF- $\kappa$ B 通路相关新基因, 建立了基于细胞水平的报告基因高通量筛选模型. 利用双荧光素酶报告系统检测报告基因荧光素酶活性, 通过对构建的 439 个人类未知功能基因的筛选, 获得了一批激活 NF- $\kappa$ B 信号通路的功能基因, 其中基因 TMEM9B 可以明显激活 NF- $\kappa$ B 通路. 进一步实验显示 TMEM9B 激活 NF- $\kappa$ B 通路呈明显剂量依赖性, Western blot 及 EMSA 实验证实, TMEM9B 能够促进胞质内 NF- $\kappa$ B 的抑制分子 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解, 并促使 NF- $\kappa$ B 由胞质向胞核转移, 同时流式细胞术实验发现 TMEM9B 可引起 293T 和 HeLa 细胞的凋亡. 总之, 所建立的基于细胞水平的 NF- $\kappa$ B 通路筛选模型稳定高效, 筛选并验证 TMEM9B 可明显激活 NF- $\kappa$ B 信号转导通路, 并从而引起细胞凋亡.

**关键词** 细胞水平筛选, TMEM9B, 核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), 细胞凋亡

**学科分类号** R3, R392

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00256

随着人类基因组测序工作的完成, 大量未知功能的基因被发现, 基于细胞水平的功能基因高通量筛选技术迅速形成和发展<sup>[1]</sup>, 已广泛应用于人类功能基因组研究, 可以高效获得大量基因的功能线索, 发现一批具有重要生理意义的新基因, 为各种生理病理机制的深入研究提供了条件, 也为疾病治疗靶标的发现和基因药物的开发打下了基础.

NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白是细胞内最重要的转录因子之一. 静息状态下, 核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)在胞质内与抑制性分子 I $\kappa$ B(inhibitor  $\kappa$ B)结合在一起, 因 RHR 结构域中的核定位信号被封闭而滞留于胞质中, 处于无活性的状态. 在某些刺激信号作用下, I $\kappa$ B 激酶 (IKK)复合物中的 IKK $\beta$ <sup>[2]</sup>活化, 并将 I $\kappa$ B 分子磷酸化, 磷酸化的 I $\kappa$ B 被进一步泛素化并由蛋白酶体降解<sup>[3]</sup>, 这样, NF- $\kappa$ B 分子被释放出来, 暴露其核定位信号, NF- $\kappa$ B 从胞质转入胞核内, 通过 RHR 结构域结合到靶基因的应答元件上, 激活下游基因的转录. NF- $\kappa$ B 分子参与很多重要的生理与病理过程, 几乎影响着免疫系统发育、应答以及炎症反应的每一个环节<sup>[4]</sup>. 近年的研究表明, NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡的关系密切, 其参与多种凋亡相关基因如

IAPs, Bcl-2, Bcl-xL, c-myc 的转录调控, 具有抑制细胞凋亡的作用<sup>[5]</sup>. 而随着 NF- $\kappa$ B 抑制细胞凋亡机制研究的不断深入, 人们发现, NF- $\kappa$ B 在不同的刺激因素及特定的细胞类型中还有促进细胞凋亡的作用, 促凋亡的机制是 NF- $\kappa$ B 通过促进凋亡相关基因如 Fas, FasL 的表达而使细胞发生凋亡<sup>[6~9]</sup>.

NF- $\kappa$ B 的异常活化与很多疾病的发生有关, 如自身免疫病、炎症反应、肿瘤等<sup>[10~12]</sup>. 这也就使得对 NF- $\kappa$ B 信号通路的研究一直是免疫学的热点.

报告基因是研究基因调控的有力工具, 尤其是荧光素酶报告基因技术, 以其简单、快速、定量等特点受到科研工作者的青睐. 本研究利用双荧光素酶报告基因技术建立了针对 NF- $\kappa$ B 信号转导通路的高通量细胞筛选体系. 筛选出了激活 NF- $\kappa$ B 通路的阳性基因 TMEM9B, 并对 TMEM9B 激活 NF- $\kappa$ B 通路的分子机制及其功能进行了初步的研究.

\* 国家高技术研究发展计划(863)“十一五”重大专项资助项目 (2006AA02A305).

\*\* 共同第一作者. \*\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-67883332-868, E-mail: tpshi@126.com

收稿日期: 2009-04-28, 接受日期: 2009-07-08

## 1 材料和方法

### 1.1 cDNA 文库

从人类 RefSeq 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/RefSeq/>)中, 选出“假定”、“预测”、“推定”或“未知”和功能研究文献少于 3 篇的序列作为候选序列. 使用 EST 数据库对候选序列进行校正和延伸, 得到全长序列, 预测开放读码框. 根据对 Unigene 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>)的分析, 选用包含 20 种人类组织的 cDNA 文库(Clontech, USA), 在这 20 种组织中能检测到绝大多数候选基因的表达. 为了提高 PCR 效率, 使用两步 PCR 法: 首先将候选基因根据编码序列长度与表达谱相似性分组, 用各组共同的 cDNA 模板和混合引物进行第一轮 PCR. 然后将第一轮 PCR 产物进行纯化, 作为第二轮 PCR 的模板, 加入基因特异的引物扩增靶基因. 纯化的 PCR 产物连入 pGEM-T Easy 载体 (Promega 公司, USA), 通过使用 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 测序验证. 正确地插入片段进行酶切 (*EcoR* I), 并连接到哺乳动物表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B (Invitrogen 公司, USA). 共构建了 439 个人类功能基因的真核表达质粒.

### 1.2 细胞培养, 瞬时转染, 双荧光素酶报告分析

HEK293T 细胞(ATCC: CCL-2)用含有 10% 胎牛血清(Biochrome 公司, 德国)的 DMEM 培养液(Hyclone 公司, 美国), 于 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内 37°C 常规培养. 取处于对数生长期的细胞进行所有实验. 细胞转染采用阳离子转染试剂 VigoFect(威格拉斯公司, 中国), 按照产品说明书进行操作. 待筛选基因真核表达质粒 100 ng, pNF- $\kappa$ B-luc 报告质粒(Stratagene 公司, 美国) 20 ng, pRL-TK 内对照质粒(Promega 公司, 美国) 5 ng, 总质粒量 125 ng 稀释于 5  $\mu$ l PBS 中; 使用相同总量的 pEGFP-N1 质粒(Clontech 公司, 美国)表达绿色荧光蛋白以检测转染效率. 转染后 30 h, 收获并加入预先配制的 1 $\times$ Passive Lysis Buffer(PLB)细胞裂解液(40  $\mu$ l/孔)裂解细胞, 将 96 孔板盖好置于 -80°C 冰箱冷冻过夜. 取出 96 孔板室温融化, 每孔取 30  $\mu$ l 移入 96 孔荧光板. 按双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega 公司, 美国)说明书处理样品, 使用 Genios Pro 多功能酶标仪(Tecan)检测荧光素酶活性. 使用 Excel 软件进行数据处理. 将每个孔测得的数值经“萤火虫荧光素酶荧光强度 / 海肾荧光素酶荧光强度”计

算, 所得数值代表该孔的 NF- $\kappa$ B 活性. 阴性对照为 pcDNA3.1/myc-His(-)B 空载体(pcDB), 阳性对照为 MEKK3.

### 1.3 TMEM9B 的生物信息学分析

通过 NCBI 的 Refseq 数据库得到基因的全长 cDNA. 从基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)得到染色体定位. TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)<sup>[13]</sup>用于跨膜区分析. Signal P(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)<sup>[14]</sup>用于信号肽分析. GNF SymAtlas v 1.0.4(<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>)<sup>[15]</sup>用于表达谱分析.

### 1.4 TMEM9B 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路的剂量依赖实验

将 HEK293T 细胞接种到 96 孔培养板, 接种细胞密度为  $1.2 \times 10^4$  个 / 孔, DMEM 培养基体积为 100  $\mu$ l/孔. 37°C 培养 24 h, 将目的基因真核表达载体转染细胞, 每个基因设 3 个复孔. 其中真核表达质粒 TMEM9B 的剂量依次为 0 ng, 20 ng, 40 ng, 60 ng, 80 ng, 最终用 pcDB 补足为 100 ng/孔, 每孔加 pNF- $\kappa$ B-luc 报告质粒 20 ng, pRL-TK 内对照质粒 5 ng, 总质粒量 125 ng 稀释于 5  $\mu$ l PBS 中. 使用相同总量的 pEGFP-N1 质粒表达绿色荧光蛋白以检测转染效率.

转染后 30 h, 收获并裂解细胞, 经冻融后检测荧光素酶活性.

### 1.5 Western blot 检测 TMEM9B 对 I $\kappa$ B $\alpha$ 降解的影响

将处于对数生长期的 6 孔板 HEK293T 细胞转染 pcDB 和 TMEM9B 真核表达质粒, 按每孔 3  $\mu$ g 质粒转染, 转染 30 h 后提取细胞总蛋白, 用等量的细胞蛋白进行 12% SDS-PAGE, 再电转(100 V, 120 min)至硝酸纤维素膜上. 用 TBST(TBS + 0.1% Tween-20)配制的 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 I $\kappa$ B $\alpha$  一抗(CA, 美国), 4°C 反应过夜, 用 TBST 充分洗膜 3~5 次, 每次 10 min, 然后加入 HRP 标记的二抗(1:5 000)(CA, 美国), 室温避光反应 1 h, 用 TBST 充分洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后进行化学发光检测.  $\beta$ -actin 作为内参对照, 以保证实验的稳定性.

### 1.6 EMSA 检测 TMEM9B 对 NF- $\kappa$ B 入核的影响

将处于对数生长期的 6 孔板 HEK293T 细胞转染 pcDB、MEKK3 和 TMEM9B 真核表达质粒, 按每孔 3  $\mu$ g 质粒转染, 转染 30 h 后, 使用 Active Motif 的核蛋白提取试剂盒, 参照厂家说明进行细

胞核蛋白质的提取。

3'端标记生物素, 带有 NF- $\kappa$ B 转录因子结合位点的探针 (5' AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC 3')(上海生工公司, 中国)经 PAGE 纯化. 合成的互补双链 DNA 按 1:1 的摩尔比溶解于 TNE 溶液(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH8.0, 50 mmol/L NaCl, 终浓度为 1  $\mu$ mol/L). 水中煮沸 5 min, 停止加热, 室温缓慢冷却过夜退火.  $-20^{\circ}\text{C}$  避光保存, 即为贮存液. 使用前 1:100 稀释至 10 nmol/L, 即为工作液.

按 EMSA 试剂盒(Pierce, 美国)说明书进行操作. 用 0.5 $\times$ TBE 配制 5%非还原性 PAGE, 溴酚蓝泳动至胶下缘约 3/4 处停止. 经电转至阳离子尼龙膜, 并紫外线照射 3 min 交联. 室温封闭 15 min 后, 加入链霉素-辣根过氧化物酶偶联物, 继续室温孵育 15 min. 洗涤 5 次后加入底物平衡缓冲液, 室温放置 5 min. 取 1 ml 稳定过氧化物液与 1 ml 鲁米诺增强液混匀, 室温反应 5 min. 取出尼龙膜, 暗盒中曝光 2~5 min, 显影, 定影.

### 1.7 FACS 法检测 TMEM9B 对 293T、HeLa 细胞活性的影响

采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(宝赛生物技术有限公司, 中国)检测细胞凋亡. 目的基因转染 24 h 后, 分别取  $5 \times 10^5$  个 HEK293T 和 HeLa 细胞, 胰酶消化并用 PBS 洗 2 遍. 细胞用 200  $\mu$ l 结合缓冲液重悬, 加入 Annexin V-FITC 标记外翻的磷脂酰丝氨酸(终浓度为 0.5 mg/L), PI 标记细胞核(终浓度为 1 mg/L), 室温下避光孵育 20 min 后加入 400  $\mu$ l 结合缓冲液, 立即使用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD, 美国)检测. 用 FL1 通道(激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm)检测 Annexin V-FITC 荧光信号, 用 FL2 通道( $> 600$  nm 滤镜)检测 PI 荧光信号. AnnexinV-FITC 和 PI 双染能将样品中的坏死和晚期凋亡细胞(Annexin V+, PI+)与早期凋亡细胞(AnnexinV+, PI-)区分开来.

## 2 结 果

### 2.1 针对 NF- $\kappa$ B 通路的细胞水平筛选

经过检索、扩增、克隆及测序, 再将目的基因序列与 RefSeq 数据库(Release 11, on May 13, 2005)进行比对, 共得到 439 条功能未知的新基因序列 (<http://211.101.49.211/gene>). 其中少部分基因有 3 篇以下功能报道的文献, 绝大部分为完全未知或者功能信息极少的新基因. 国家人类基因组北方研究中心功能基因组学实验室仍在进行新基因的克隆工作, 目的基因 cDNA 文库不断扩大. 使用上述 NF- $\kappa$ B 实验系统, 通过对 439 个克隆进行两轮细胞筛选, 其中筛到 TMEM9B 是激活 NF- $\kappa$ B 通路效果最明显的基因(图 1). 接下来对 TMEM9B 进行了进一步的功能研究.

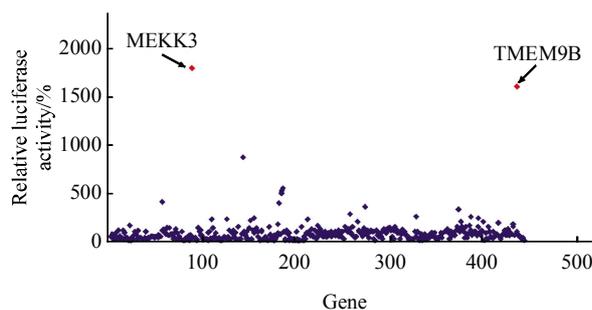


Fig. 1 TMEM9B obviously activates NF- $\kappa$ B in the screen of genes involved in NF- $\kappa$ B pathway

### 2.2 NF- $\kappa$ B 通路激活基因 TMEM9B 生物信息分析结果

通过对 TMEM9B 进行生物信息学分析, 发现其有两个跨膜区, 在第 33 位氨基酸处有信号肽切割位点, 在免疫细胞、胎盘及全血中高表达, 染色体定位和等电点预测结果见表 1.

Table 1 Bioinformatics analysis of TMEM9B

Genename	RefSeqID	Map	Theoretical pI/M	Expression profile	Signal IP	TMHMM
TMEM9B	NM020644.1	11p15.3	8.35 / 22 531.31	Immunocyte, placenta	33aa	2

### 2.3 TMEM9B 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路呈剂量依赖性

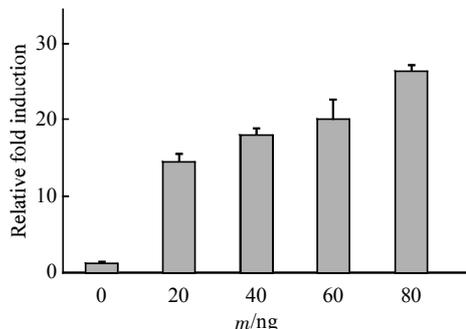
将不同浓度的 TMEM9B 真核表达质粒转染 HEK293T 细胞, 30 h 后检测荧光强度, 发现, TMEM9B 激活 NF- $\kappa$ B 通路具有明显的剂量依赖性, 表明 TMEM9B 对 NF- $\kappa$ B 通路的激活能力与其

表达量正相关(图 2).

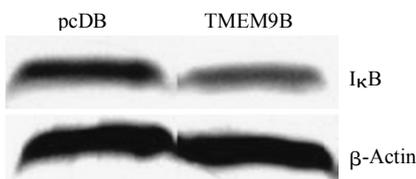
### 2.4 Western blot 分析 I $\kappa$ B 蛋白降解

为了进一步探讨 TMEM9B 引起 NF- $\kappa$ B 活化的分子机制, 用 Western blot 分析胞质内 I $\kappa$ B 蛋白的表达量变化. 与对照组(pcDB)相比, TMEM9B 明

显降低了细胞内 I $\kappa$ B 蛋白的含量, 表明 TMEM9B 可能通过引起细胞内 I $\kappa$ B 蛋白的降解, 进而促使 NF- $\kappa$ B 的活化(图 3).



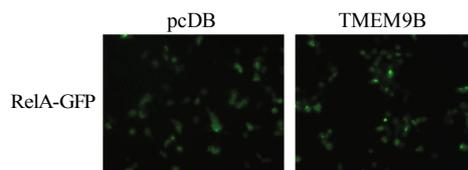
**Fig. 2** TMEM9B activated NF- $\kappa$ B signaling pathway in dose-dependent manner



**Fig. 3** TMEM9B-induced NF- $\kappa$ B signaling pathway activation is accompanied by I $\kappa$ B degradation

**2.5 TMEM9B 能够促进 RelA-GFP 入核**

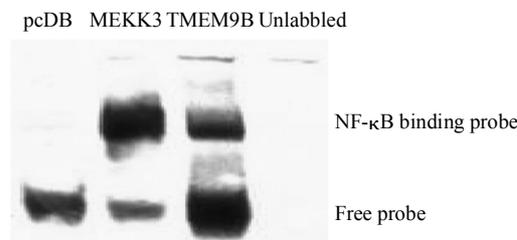
NF- $\kappa$ B 入核对于其激活是重要的一步. 我们通过共转染 TMEM9B 和 RelA-GFP, 观察 TMEM9B 对于 RelA 的入核作用. 结果如图 4 所示, 相比于对照组 pcDB, TMEM9B 能够明显促进 RelA 的入核.



**Fig. 4** TMEM9B could induce the translocation of RelA-GFP from cytoplasm to nuclear(100 $\times$ )

**2.6 EMSA 检测 TMEM9B 对 NF- $\kappa$ B 入核的影响**

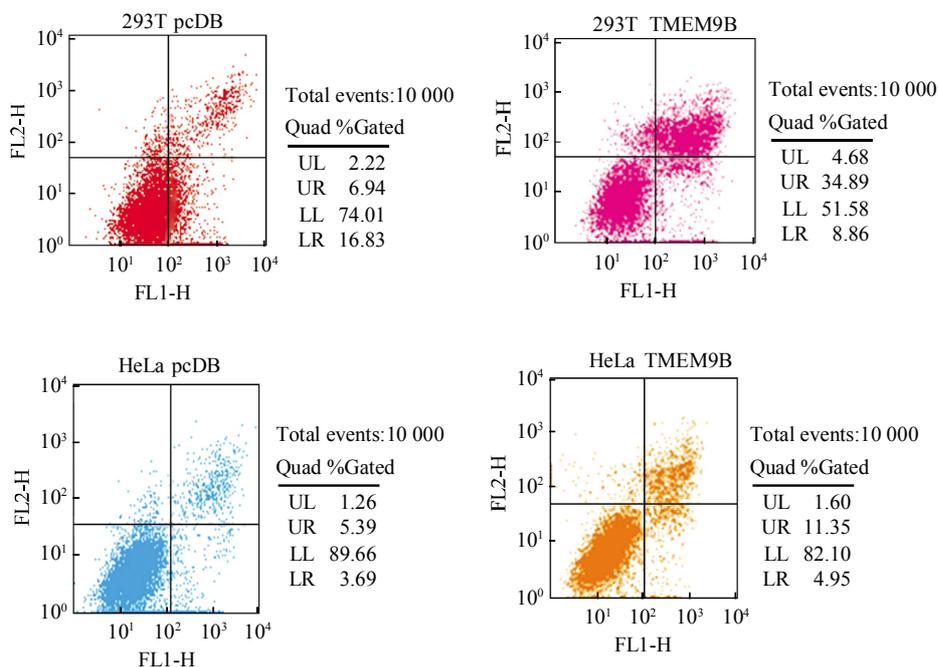
为了进一步研究 TMEM9B 对 NF- $\kappa$ B 通路的作用机理, 通过 EMSA 实验检测 TMEM9B 对 NF- $\kappa$ B 入核的影响. 结果显示, TMEM9B 能够明显促进 NF- $\kappa$ B 入核以及与特异性 DNA 探针的结合能力(图 5).



**Fig. 5** TMEM9B could induce the translocation of NF- $\kappa$ B from cytoplasm to nuclear and bind to specific NF- $\kappa$ B probe

**2.7 FACS 法检测 TMEM9B 能引起 293T、HeLa 细胞凋亡**

将 TMEM9B、pcDB 分别同时转染 HEK293T



**Fig. 6** Overexpression of TMEM9B could induce apoptosis in HEK293T and HeLa cell lines

及 HeLa 细胞, 24 h 后收集细胞经 Annexin-V, PI 双染后流式细胞术检测. 结果显示, 与转染了空载体 pcDB 的细胞相比, 转染 TMEM9B 真核表达质粒的细胞凋亡百分比明显增加(图 6), 说明超表达 TMEM9B 可以引起细胞凋亡.

### 3 讨 论

本项研究选用“反向生物学研究”策略, 即首先进行 DNA 克隆, 建立人类功能未知基因的 ORF 文库(所谓 ORF 文库, 即获得人类全部或部分基因转录本 ORF 的独立克隆, 并构建到各种表达质粒中), 并以这个 ORF 文库为基础进行高通量细胞筛选以及系统性功能研究. 本课题组选择人类功能未知基因作为目标, 并最终克隆到真核表达载体中, 构建了包含 439 个克隆的 ORF 文库.

在高通量 NF- $\kappa$ B 信号通路筛选实验中, TMEM9B 激活 NF- $\kappa$ B 的倍数最高, 从而被挑选出来进行系统性功能研究. 重复实验显示, TMEM9B 对于 pNF- $\kappa$ B-Luc 报告质粒具有激活作用, 并呈现明显的剂量依赖性.

目前已有文献报道, TMEM9B 是定位于溶酶体膜上的糖基化蛋白, 它在 TNF、IL-1 诱导的促炎性细胞因子产生过程中发挥重要作用, 是 TNF 激活 MAPK 通路过程中的重要分子<sup>[16]</sup>, 从另一方面验证了 TMEM9B 过表达引起 NF- $\kappa$ B 活化的结果. 在此实验基础上通过 Western blot 分析 TMEM9B 是否能够促进胞质内 I $\kappa$ B 的降解, 实验结果表明 TMEM9B 明显促进 I $\kappa$ B 蛋白的降解. 这就说明 TMEM9B 是在胞质中发挥作用, 即通过促进 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 I $\kappa$ B 的降解来促进 NF- $\kappa$ B 信号转导通路活化. 那么 TMEM9B 是否影响 NF- $\kappa$ B (p65)蛋白核转位以及与 DNA 结合, 就是接下来要解决的问题. 凝胶迁移或电泳迁移率实验(EMSA)是一种研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的技术, 可用于定性和定量分析. EMSA 实验结果表明, TMEM9B 能够明显促进 NF- $\kappa$ B 入核, 这也进一步验证了 Western blot 的实验结果, 说明 TMEM9B 是通过促进胞质中的 I $\kappa$ B 蛋白的降解, 进而促使 NF- $\kappa$ B 转位入核与下游靶基因结合的. 有研究报道 NF- $\kappa$ B 的激活是把双刃剑, 既能抑制细胞凋亡, 又能促进细胞凋亡. 在前期实验中发现, 转染 TMEM9B 后的 293T 细胞在显微镜下观察呈凋亡形态(数据未显示), 流式细胞术实验验证过表达 TMEM9B 确实可以诱导细胞发

生凋亡. 推测可能是因为 TMEM9B 引起 NF- $\kappa$ B 的活化, NF- $\kappa$ B 活化入核后激活凋亡相关基因的转录, 进而引起细胞凋亡.

NF- $\kappa$ B 家族及其介导的细胞信号转导通路在细胞凋亡中的作用是国内外研究的热点. 通常认为, 通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号转导途径的激活可以促进细胞凋亡, 而近些年的研究证明 NF- $\kappa$ B 尚具有促细胞凋亡的作用, 并发现 NF- $\kappa$ B 亚单位的种类及数量在细胞凋亡中起着决定性的作用, 为疾病的治疗提供了新的策略. 对 NF- $\kappa$ B 及相关信号转导通路具体机制的研究, 将有助于加深对不同疾病发生的分子机制的认识, 也可用于治疗这些疾病开拓新的途径<sup>[17~19]</sup>. TMEM9B 就是活化 NF- $\kappa$ B 信号转导通路同时引起细胞凋亡的基因, 而 TMEM9B 引起细胞凋亡的机制尚不明确, 需要进一步的研究探讨.

### 参 考 文 献

- Giese K, Kaufmann J, Pronk G J, *et al.* Unravelling novel intracellular pathways in cell-based assays. *Drug Discovery Today*, 2002, **7**(3): 179~186
- Karin M, Yamamoto Y, Wang Q M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3** (1): 17~26
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*, 2000, **18**: 621~663
- Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 2002, **3**(3): 221~227
- Dutta J, Fan Y, Gupta N, *et al.* Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*, 2006, **25** (51): 6800~6816
- Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, *et al.* NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**(52): 48921~48929
- Hettmann T, DiDonato J, Karin M, *et al.* An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med*, 1999, **189**(1): 145~158
- Campbell K J, Rocha S, Perkins N D. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell*, 2004, **13**(6): 853~865
- Bessho R, Matsubara K, Kubota M, *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol*, 1994, **48**(10): 1883~1889
- Zingarelli B, Sheehan M, Hector R. *et al.* Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*, 2003, **31** (1 Suppl): S105~S111
- Richmond A. NF-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(9): 664~674

- 12 Karin M, Cao Y, Greten F R, *et al.* NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(4): 301~310
- 13 Sonnhammer E L, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1998, **6**: 175~182
- 14 Lukashin A V, Borodovsky M. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(4): 1107~1115
- 15 Su A I, Wiltshire T, Batalov S, *et al.* A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(16): 6062~6067
- 16 Dodeller F, Gottar M, Huesken D, *et al.* the lysosomal transmembrane protein 9B regulates the activity of inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem*, 2008, **283**(31): 21487~21494
- 17 Calzado M A, Bacher S, Schmitz M L. NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr Med Chem*, 2007, **14**(3): 367~376
- 18 Camandola S, Mattson M P. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, **11**(2): 123~132
- 19 O'Sullivan B, Thompson A, Thomas R. NF-kappa B as a therapeutic target in autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, **11**(2): 111~122

## Cell-based Screening and Validation of Human Novel Gene TMEM9B Activated Nuclear Factor $\kappa$ B Signaling Pathway\*

LIU Yu-Ming<sup>1,3)\*\*</sup>, PENG Zhi<sup>1)\*\*</sup>, DENG Wei-Wei<sup>1)</sup>, SHI Tai-Ping<sup>1,2)\*\*\*</sup>, MA Da-Long<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> Chinese National Human Genome Center, Beijing 100176, China;

<sup>2)</sup> Laboratory of Medical Immunology, School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;

<sup>3)</sup> Chemical Engineering College of Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010051, China)

**Abstract** Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is an important cellular transcription factor. The important role of NF- $\kappa$ B-mediated cell signal transduction pathway in apoptosis is a hot topic at home and abroad. In order to discover new regulators in NF- $\kappa$ B signaling pathway, a high-throughput cell-based screening model based on dual luciferase reporters system was established, a number of genes that can activate NF- $\kappa$ B signal pathway were obtained by screening of 439 novel function genes. Among them, TMEM9B can obviously activate NF- $\kappa$ B signaling pathway. Further experiments showed that TMEM9B activated NF- $\kappa$ B signaling pathway in a dose-dependent pattern. Western blotting and EMSA experiments confirmed that TMEM9B can promote the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  (a cytoplasm inhibitor of NF- $\kappa$ B), and cause NF- $\kappa$ B shift from the cytoplasm to nucleus. At the same time, flow cytometry result demonstrated TMEM9B can induce apoptosis in HEK293T and HeLa cells. In short, a stable and effective screening system for NF- $\kappa$ B has been established, through which TMEM9B was identified to be able to significantly activate NF- $\kappa$ B signal transduction pathway and thus cause cells apoptosis.

**Key words** cell-based screening, TMEM9B, NF- $\kappa$ B, cell apoptosis

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00256

\*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A305).

\*\*These authors contributed equally to this work.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-67883332-868, E-mail: tpshi@126.com

Received: April 28, 2009 Accepted: July 8, 2009