

白氏文昌鱼 FADD 的克隆及功能研究

张晶^{1,2} 黄贝^{1,2} 高谦¹ 聂品¹

(1. 中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院,北京 100049)

摘要: Fas死亡结构域相关蛋白 (Fas-associated death domain protein, FADD)是死亡信号转导通路中的连接蛋白,在脊椎动物中其结构和功能都很保守。本文首次克隆了头索动物白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) FADD (bbFADD)的 cDNA 和基因组 DNA 序列。bbFADD cDNA 全长 1239 bp,编码 217 个氨基酸。与脊椎动物的 FADD 一样,bbFADD 含有 N 端的死亡效应结构域 (Death Effector Domain, DED)和 C 端的死亡结构域 (Death Domain, DD)。bbFADD 氨基酸序列的第 33 位氨基酸苯丙氨酸在进化过程中相对保守,此苯丙氨酸在 FADD 自我相互作用中具有重要作用。哺乳类的 FADD 基因编码区含有两个外显子,而 bbFADD 基因含有 3 个外显子。一般认为头索动物处在无脊椎动物进化到脊椎动物的中间过渡阶段,但基于 FADD 氨基酸序列的系统进化树和同源性分析显示,文昌鱼与海胆的亲缘关系更近。bbFADD 在 HeLa 细胞中超表达能够引起 HeLa 细胞的凋亡,暗示 bbFADD 可能能够在人类细胞凋亡通路中起作用,推测凋亡系统在生物进化过程中相当保守。

关键词: FADD;白氏文昌鱼;基因克隆;超表达;细胞凋亡

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)06-1175-10

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的程序性死亡方式,凋亡的发生有利于维持机体内环境稳定,在多细胞生物的分化和发育过程中起重要的作用^[1]。线粒体通路和死亡受体通路是两条主要的细胞凋亡通路,最终都能激活 caspase 效应分子^[2, 3]。线粒体通路主要是由线粒体中细胞色素 c 释放激发^[4]。死亡受体属于肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF)受体超家族成员,其胞内区含有一个死亡结构域 (Death domain, DD),死亡受体的胞外区与配体的结合可激活胞内的死亡结构域^[5-7]。

Fas死亡结构域相关蛋白 (Fas-associated death domain protein, FADD)是 FasL (Fas ligand)和 TNFR1 (TNF receptor 1)介导的细胞凋亡通路中重要的死亡信号衔接蛋白,FADD 在凋亡信号传导过程中承上启下,使得胞外死亡信号能顺利传递到胞内效应分子^[8]。FADD 的 C 端含有一个死亡结构域 DD, N 端含有一个死亡效应结构域 (Death effector domain, DED)。在 FasL 介导的凋亡通路中,FADD 的 DD 结构域首先与活化的 Fas 分子胞内段的 DD 结构域结合,随后 FADD 的 DED 结构域与同样带有

DED 的半胱氨酸蛋白酶酶原 8 (procaspase-8)结合,无活性的单链酶原通过自我催化转化成有活性的双链蛋白酶 caspase-8^[9-12]。Fas、FADD 和 caspase-8 构成死亡诱导信号复合体 (Death-inducing signaling complex, DISC),成熟的 caspase-8 随后剪切并激活下游的效应 caspases,如 caspase-3,并最终导致细胞凋亡^[6, 13]。在 TNFR1 介导的凋亡通路中,活化了的 TNFR1 的 DD 结构域首先与 TRADD (TNF receptor 1-associated death domain)的 DD 域结合,随后 TRADD 又招募胞质中的 FADD 或 RIP (Receptor interacting protein)^[14-16],如招募 FADD,则下游通路与 FasL 介导的相同。

细胞凋亡机制的研究是当前医学和生物学的研究的热点领域之一,然而,大多数研究以哺乳类为对象,有关头索动物细胞凋亡基因方面的研究很少。已有的研究显示,脊椎动物中死亡受体介导细胞凋亡通路的核心成员 Fas、FADD 和 caspase-8 在结构和功能方面相当保守^[17]。从无脊椎到脊椎动物的演化是生物进化史上的重要阶段,白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*)隶属脊索动物门 (Chordata)

收稿日期: 2008-06-01;修订日期: 2009-04-20

基金项目:国家自然科学基金委联合资助基金项目 (U0631010)资助

作者简介:张晶 (1983—),女,汉族,江西省南昌市人;硕士研究生;主要从事鱼类免疫学研究。E-mail: zhuoya1019@163.com

通讯作者:聂品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

头索动物亚门 (Cephalochordata),被认为是现存的与脊椎动物亲缘关系最近的物种^[18]。本研究克隆了白氏文昌鱼 FADD (bbFADD)的 cDNA 和基因组 DNA 序列,并与其他物种的 FADD 进行同源性分析。构建 bbFADD 的真核表达载体,转染 HeLa 细胞并检测其凋亡现象的发生,以期探讨 FADD 功能的保守性,为研究头索动物凋亡系统的组成、功能和进化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用白氏文昌鱼,体长 3—4 cm,活鱼连同海水一起从厦门渔业中心运回实验室,全鱼剪碎后迅速放入液氮中冻存。人子宫颈癌 HeLa 细胞以含 10% FBS (Invitrogen)的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen)培养基在 5% CO₂环境中 37℃培养。

1.2 RNA与基因组 DNA的提取 全鱼总 RNA 和基因组 DNA 分别按照 Trizol试剂盒 (Invitrogen)和 Wizard Genomic DNA 纯化试剂盒 (Promega)的使用说明提取。

1.3 数据库搜索与基因预测 以人 FADD 基因序列 (GenBank 登录号: AAH00334)为种子序列,在佛罗里达文昌鱼 (*B. ranchiostoma floridae*)基因组数据库 (<http://genome.jgi-psf.org/Brafl1/Brafl1.home.html>) 中搜寻,得到包含 FADD 基因结构域的 scaffold,用基因预测软件 GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 预测可能的佛罗里达文昌鱼 FADD 基因。

1.4 SMART RACE PCR 扩增 bbFADD cDNA 全长 按照 SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech)操作手册,以提取的 RNA 为模板合成 cDNA 第一链,根据预测的佛罗里达文昌鱼 FADD 基因用 Primer Premier 5.0 软件在上游外显子上设计两条正向引物 (F1 和 F2),在下游外显子上设计两条反向引物 (R1 和 R2) (表 1),利用巢式 PCR 方法扩增 bbFADD cDNA 中间片段。巢式 PCR 步骤如下: ①以 SMART cDNA 为模板,以 F1 和 R1 为外引物进行第一轮 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。②以第一轮 PCR 产物为模板 (1 μL),以 F2 和 R2 为内引物进行第二轮 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。

表 1 PCR 扩增所用引物的序列和用途		
Tab. 1 Sequence of primers used for PCR amplification		
引物名称 Name	引物序列 (5'—3') Sequence	备注 Remark
F1	AGTTTCTGTGCTCCGACTTCA TC	Nested PCR 外引物
R1	TCTTCGTTCCTGTGCTCCAC	Nested PCR 外引物
F2	GAAAGCGGGACAA GTTGA GGT	Nested PCR 内引物
R2	CGTGAA TA GTCTCTCGGA GA TGC	Nested PCR 内引物
UPM-Long	CTAA TACGACTCACTA TA GGGCA - AGCA GTGGTA TCAACGCA GA GT	RACE-PCR 通用引物
UPM-Short	CTAA TACGACTCACTA TA GGGC	RACE-PCR 通用引物
5R1	GTCTTCTCTCTTCTCCGTCCGA	RACE-PCR 5'反向引物
5R2	TCAAACCTCAACTGTGCCGCTCT	RACE-PCR 5 反向内引物
3R1	AGAACA ACTTGGGCA GGA ACTG- GC	RACE-PCR 3 反向外引物
3R2	TTCTGTGGAGCGACAG- GAACGAAG	RACE-PCR 3 反向内引物
AP1	GTAA TACGACTCACTA TA GGGC	染色体步移通用引物
AP2	ACTA TA GGGCACGCGTGGT	染色体步移通用引物
5W1	GGTCTTCTCTCTTCTCCGTCCGA	染色体步移 5 反向外引物
5W2	ACCTCAACTTGTGCCGCTCTTCCA	染色体步移 5 反向内引物
3W1	AGAACA ACTTGGGCA GGA ACTG- GC	染色体步移 3 反向外引物
3W2	TTCTGTGGAGCGACAGGAACGA- AG	染色体步移 3 反向内引物
ORF-F	GCTAGCA TGGGCGACACGGAA- CAACG	表达载体构建正向引物
ORF-R	GGTACCTTGGTTGTTCAGGA TG- CAATC	表达载体构建反向引物

根据所获得的 bbFADD cDNA 中间片段设计用于 RACE-PCR 的基因特异内、外引物 5R1、5R2、3R1 和 3R2 (表 1),使引物的 T_m > 64℃。bbFADD cDNA 5 端扩增步骤如下: ①以所制备的 SMART cDNA 为模板,以 5R1 和通用引物 UPM 为外引物进行第一轮 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 66℃ 30 s, 72℃ 90 s, 7 个循环; 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 90 s, 28 个循环; 72℃ 10 min。②以第一轮 PCR 产物为模板 (1 μL),以 UPM 和 5R2 为内引物进行第二轮 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 90 s, 7 个循环; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 90 s, 28 个循环; 72℃ 10 min。

bbFADD cDNA 3'端扩增步骤如下: ①以 SMART cDNA 为模板,以 UPM 和 3R1 为外引物进行第一轮 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 64℃ 30s, 72℃ 90s, 7 个循环; 94℃ 30s, 62℃ 30s, 72℃ 90s, 28 个循环; 72℃ 10 min。②以第一轮 PCR 产物为模板 (1 μL),以 UPM 和 3R2 为内引物进行第二轮 PCR 扩增。反应条件为: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 66℃ 30s, 72℃ 90s, 7 个循环; 94℃ 30s, 64℃ 30s, 72℃ 1 min 20s, 28 个循环; 72℃ 10min。

1.5 染色体步移法克隆 *bbFADD* 基因全长 根据得到的 *bbFADD* cDNA 全长序列设计引物 5W1、5W2、3W1 和 3W2 (表 1),按照 Universal Genome Walker™ Kit (Clontech) 使用说明书克隆 *bbFADD* 基因组 DNA 全长。AP1 和 AP2 (表 1)为染色体步移法中的通用引物。

1.6 序列分析及系统进化树的构建 使用 NCBI (National Center for Biotechnology Information)网站上的 BLAST 程序进行同源性搜索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。将 *bbFADD* cDNA 全长序列提交到 ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>) 进行氨基酸序列推导。使用 Pfam 程序 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>)预测蛋白结构域。其他物种的 FADD 氨基酸序列均从 GenBank 数据库获取,物种名及序列登录号 (表 2)。各物种 FADD 多序列比对使用程序 ClustalW 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)。使用 MatGet 2.0 软件 (Matrix Global Alignment Tool)进行氨基酸序列间的同源性分析。使用 MEGA 3.1 软件包中的邻接法 (Neighbor joining, NJ)构建系统进化树。

表 2 同源性和系统发育分析所使用的 FADD 氨基酸序列及其 GenBank 登录号
Tab. 2 GenBank accession numbers of FADD sequences used for phylogenetic tree construction and homology analysis

物种 Species	基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession numbers
人 <i>Homo sapiens</i>	<i>hsFADD</i>	NP_003815
小鼠 <i>Mus musculus</i>	<i>mmFADD</i>	NP_034305
猪 <i>Sus scrofa</i>	<i>ssFADD</i>	NP_001026967
牛 <i>Bos taurus</i>	<i>btFADD</i>	NP_001007817
鸡 <i>Gallus gallus</i>	<i>ggFADD</i>	XP_421073
爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	<i>xlFADD</i>	NP_001089017
斑点叉尾 <i>Ictalurus punctatus</i>	<i>ipFADD</i>	AA584609
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	<i>olFADD</i>	NP_001098257
拟正海胆 <i>Paracentrotus lividus</i>	<i>plFADD</i>	ABQ51094
紫球海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	<i>spFADD</i>	XP_791975

1.7 真核表达质粒的构建及细胞转染 设计引物 ORF-F 和 ORF-R (表 1)扩增得到含有 *bbFADD* 完整开放阅读框的片段,使其 5'端带有 *Nhe*I 酶切位点和起始密码子,3'端带有 *Kpn*I 酶切位点,但不含有终止密码子。将所得片段经限制性内切酶 *Nhe*I 和 *Kpn*I 双酶切后插入到 pEGFP-N3 多克隆位点 MCS 中构成重组质粒 pEGFP-N3-*bbFADD*。

在转染前 20—24h,将约 2×10^5 的 HeLa 细胞培养到六孔板内,待细胞铺满六孔板的 70%—80%后用于转染。根据 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)的使用说明,分别将 pEGFP-N3 空载体和 pEGFP-N3-*bbFADD* 转染 HeLa 细胞。细胞转染后培养 24h,检测凋亡现象,以转染空载体的细胞为阴性对照。

1.8 细胞凋亡检测 形态观察:细胞转染 24h 后,

在倒置荧光显微镜下观察对照组和实验组的形态差异,并拍照。

细胞周期的流式细胞仪分析:分别取出 HeLa 细胞的对照组和实验组全部培养上清置于 10 mL 离心管中,接着向六孔板中加入适量胰酶,待贴壁细胞消化完全后,轻轻吹打,使细胞完全脱落,将细胞悬液移入离心管,500 r/min 离心 10min,弃上清,用 PBS 洗涤细胞两次后,将细胞重悬于预冷的 70%乙醇中固定, -20℃ 24h。500 r/min 离心 15min,收集细胞并重悬于 PBS 中,加入 RNaseA 至终浓度为 100 μg/mL, 37℃ 孵育 30min。然后加入碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 至终浓度为 50 μg/mL,室温孵育 30min。细胞悬液经过 300 目的筛子过滤后用于细胞周期的流式细胞仪分析。

DNA片段化:用胰酶消化转染的 HeLa细胞, 500 r/m in 10m in,弃上清液, PBS离心洗涤细胞后, 重悬于 TES (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0, 1% SDS),加蛋白酶 K至终浓度为 50 μg/mL, 37°C水浴 2—2.5h,至混合物变清亮。然后依次用酚,酚 氯仿 异戊醇 (25 24 1),氯仿 异戊醇 (24 1)抽提,取水相加 2.5 倍体积预冷的无水乙醇, - 20°C过夜沉淀 DNA, 12000 r/m in 10m in, 70%乙醇洗涤沉淀,自然干燥后溶解于去离子水中,加入 RNase A至终浓度为 50μg/mL, 37°C孵育 30m in。 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下检测电

泳结果,并拍照。

2 结 果

2.1 bbFADD cDNA 序列、DNA 序列及推导的氨基酸序列

使用人 FADD 氨基酸序列在佛罗里达文昌鱼基因组数据库中搜索到的同源序列位于 scaffold_430。 所获得的 bbFADD cDNA (GenBank 登录号: EU333170)全长 1239 bp,开放阅读框 654 bp,编码 217个氨基酸,在 3 非编码区发现终止信号 (AATA-AA)。 bbFADD 氨基酸序列的 12—95st和 129—211st

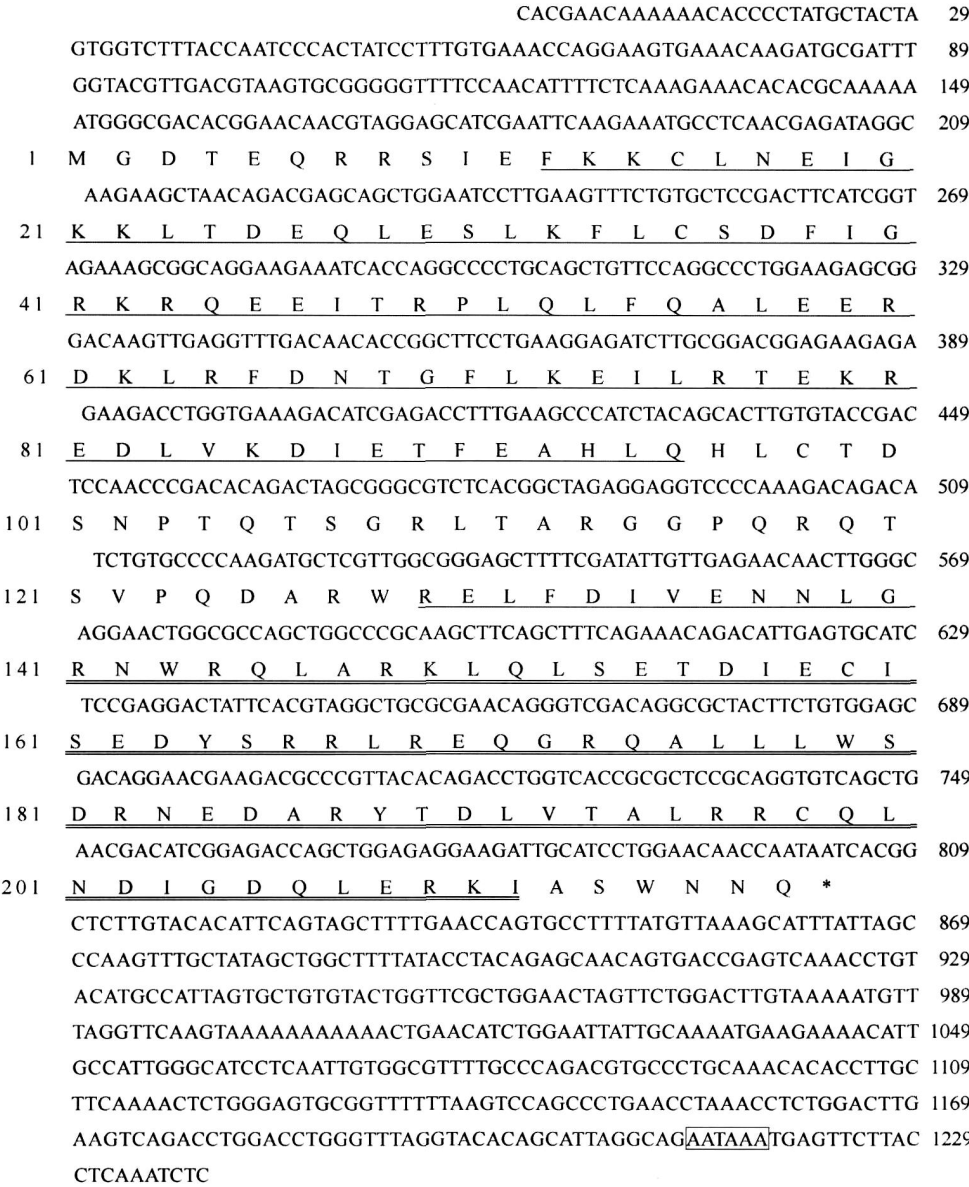


图 1 bbFADD cDNA 全长 (GenBank accession No. EU333170)及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and predicted amino acid sequences of bbFADD cDNA (GenBank accession No. EU333170) are shown
单下划线示 DED 结构域, 双下划线示 DD 结构域; (*)表示终止密码子, 加尾信号用方框标出
The normal and double lines under the amino acid sequence indicate the regions of the DED and DD domains, respectively. (*)
indicate the stop codon. The polyadenylation signal is boxed

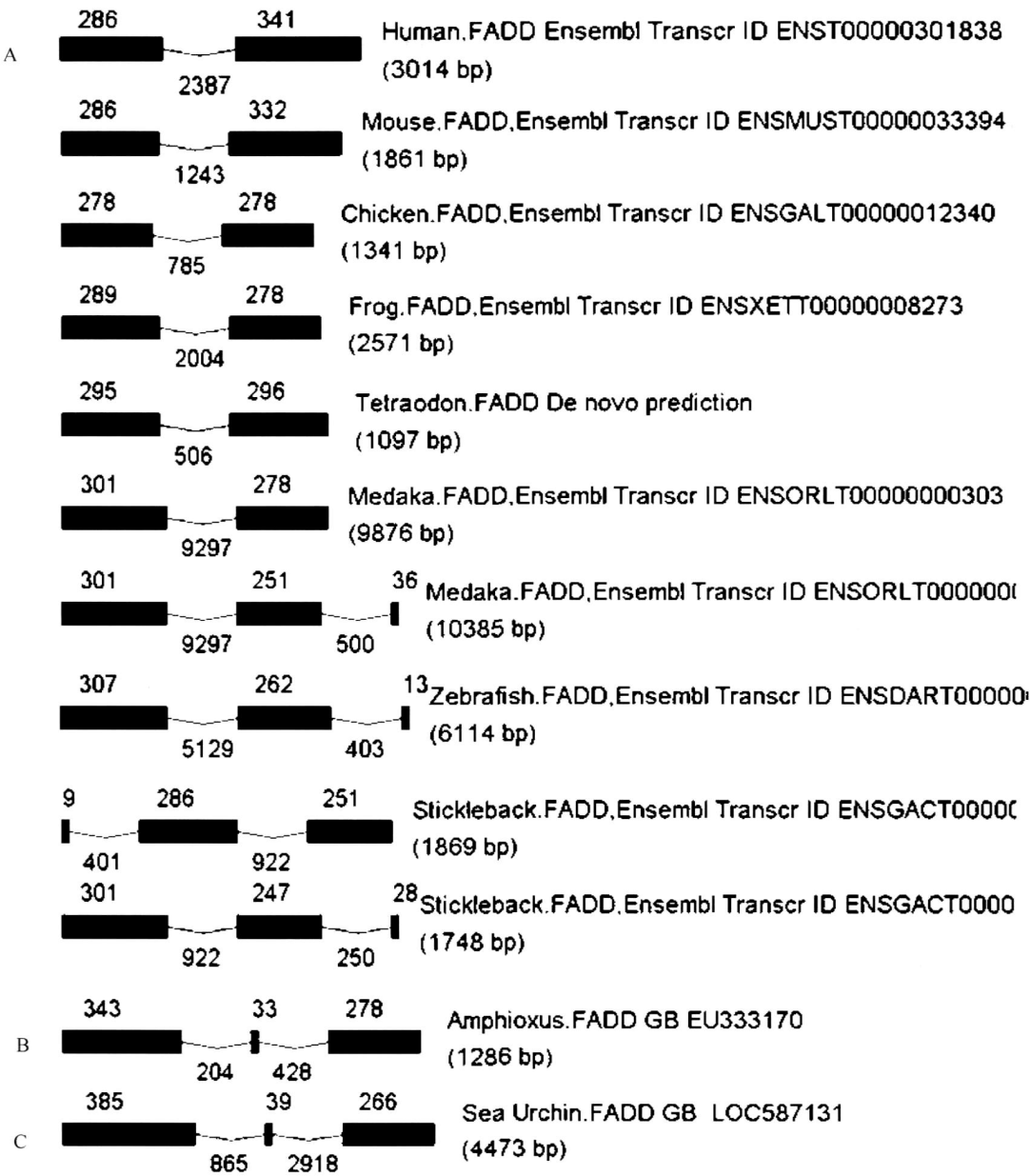


图 2 各物种 FADD 基因编码区结构图

Fig. 2 Structures of the coding regions of FADD genes in vertebrate (A), cephalochordate (B) and invertebrate (C)
A 为脊椎动物, B 为文昌鱼, C 为海胆。外显子长度在外显子上方标出, 内含子长度在内含子下方标出。Ensemble 基因组数据库中
转录本 ID 号在基因名后标出。GB: GenBank, De novo prediction: GENSCAN 预测的新基因

The sizes of exons are exhibited above the exons, and the sizes of introns indicated below the introns. Transcription ID in database
were marked followed the gene name. GB: Gene bank, De novo prediction: new gene predicted by GENSCAN

区域分别对应 DED 和 DD 结构域 (图 1)。bbFADD 基因组 DNA 序列 (GenBank 登录号: EU333171) 长 2840 bp, 含 3 个外显子, 长度依次为 343、33 和 278 bp (图 2)。

2.2 FADD 序列比对、同源性及系统发育分析

bbFADD 氨基酸序列与哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类及海胆的 FADD 进行多序列比对发现, FADD 的 DED 和 DD 区域相对保守 (图 3)。bbFADD 第 33

位氨基酸苯丙氨酸 (F33), 相当于人 FADD 第 25 位苯丙氨酸 (F25), 比对显示该位点的苯丙氨酸相当保守。氨基酸序列同源性分析显示, bbFADD 与脊椎动物 FADD 的同一性 (Identity) 和相似性 (Similarity) 分别为 27.5%—30.0% 和 44.7%—55.3%, 而与海胆的则分别为 35.1%—36.9% 和 51.1%—52.0% (表 3)。在基于 FADD 氨基酸序列的 NJ 树中, 文昌鱼与海胆聚为一支, 支持率达 100% (图 4)。

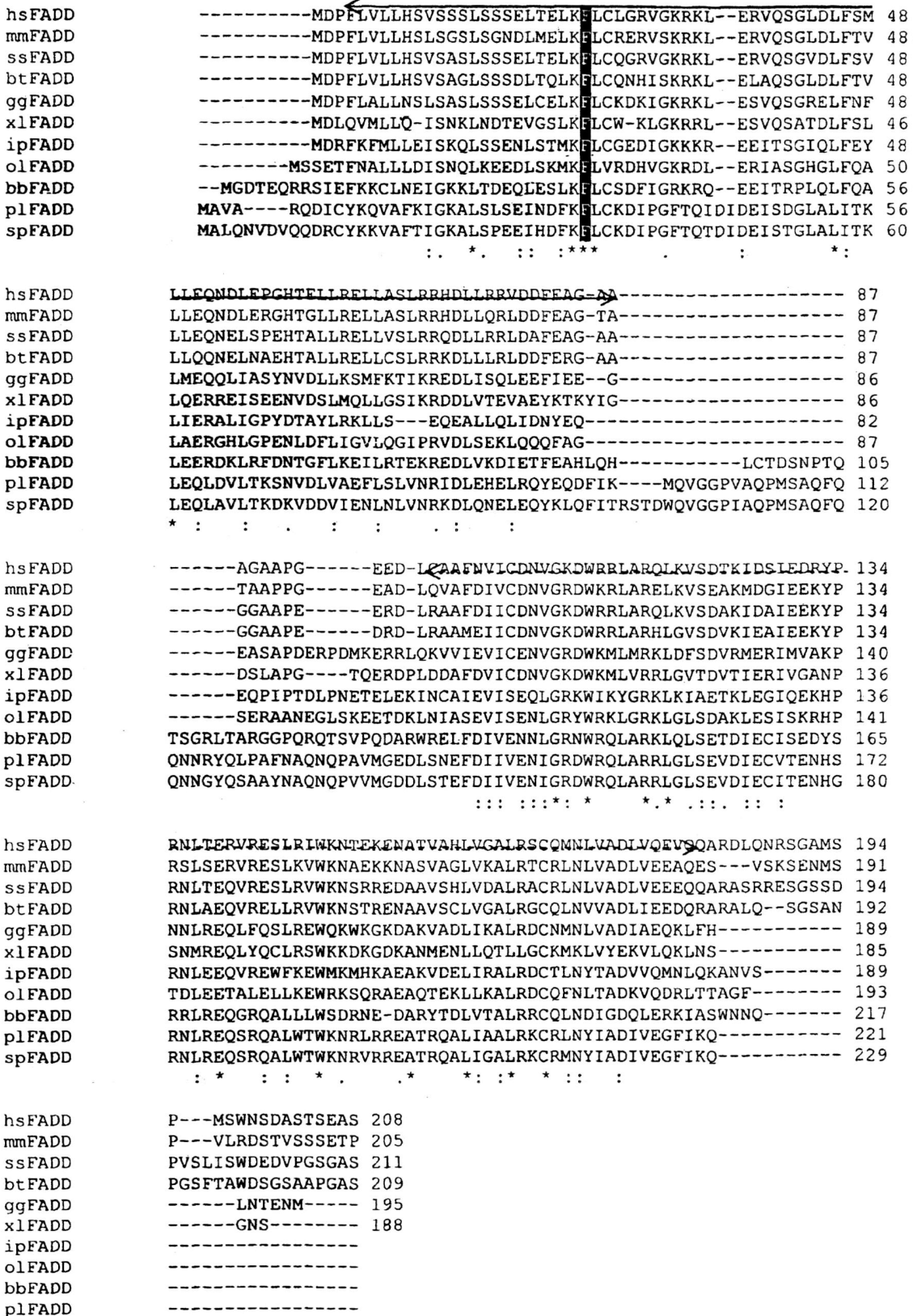


图 3 各物种 FADD 氨基酸序列比对分析此图中氨基酸序列是否未对齐

Fig. 3 Multiple alignment of FADD amino acid sequences from various species were generated by using ClustalW 1.83

实线所示为 DED 区域,虚线所示为 DD 区域,图中黑色阴影区域所示的是保守的苯丙氨酸

The bold and dotted lines indicate the DED and DD domains, respectively. Black shadow indicates the conserved phenylalanine residue

表 3 FADD 氨基酸序列同源性分析
Tab. 3 Identity and similarity of FADD amino acid sequences from various species

		Identity (%)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Similarity (%)	1. hsFADD		67.8	74.4	65.4	39.7	35.8	34.0	34.4	28.0	24.4	24.8
	2. mmFADD	84.1		64.5	59.3	39.8	31.6	33.5	34.0	28.8	25.9	24.3
	3. ssFADD	85.8	79.1		74.4	41.1	37.2	33.5	33.5	29.3	26.9	24.9
	4. btFADD	80.4	75.6	84.4		38.7	34.7	32.9	33.8	28.3	27.1	25.9
	5. ggFADD	60.6	63.4	64.5	62.7		43.1	36.4	36.5	30.0	26.4	26.0
	6. xlFADD	56.7	53.7	56.4	56.0	64.1		27.2	32.1	27.5	22.8	25.0
	7. ipFADD	53.8	53.7	52.6	52.6	54.4	51.3		41.2	30.7	26.2	24.9
	8. olFADD	51.4	53.7	52.6	52.2	54.4	54.9	58.5		27.5	25.4	26.7
	9. bbFADD	52.1	51.6	55.3	50.7	46.1	49.8	51.6	44.7		35.1	36.9
	10. plFADD	47.5	48.9	47.1	45.7	43.9	45.2	43.4	44.8	51.1		79.0
	11. spFADD	47.2	45.9	45.9	45.0	44.5	44.5	41.9	45.0	52.0	85.2	

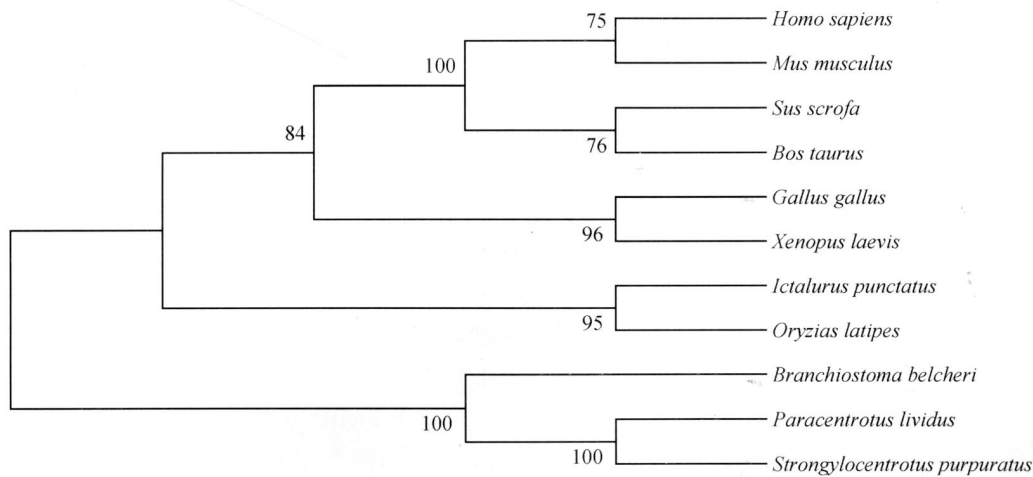


图 4 使用 MEGA 3.1 构建的基于 FADD 氨基酸序列的 NJ 树
Fig. 4 Phylogenetic tree based on FADD amino acid sequences by NJ method using MEGA version 3.1
分支上的数值为自举值 Bootstrap values are shown on the tree branch

2.3 bbFADD 在 HeLa 细胞中的超表达

在倒置荧光显微镜下对转染后的 HeLa 细胞进行观察,可以清楚地看到绿色荧光,说明转染是成功的。实验组 HeLa 细胞的细胞质发生皱缩,并与周围的细胞分离 (图 5 B);而对照组 HeLa 细胞,细胞生长状态良好,细胞核清晰可见 (图 5 A)。用流式细胞仪检测转染后的 HeLa 细胞的细胞周期,发现实验组有 12.6% 的细胞出现了二倍体亚峰 (图 5 D),而在对照组中仅有 0.35% 的细胞出现了二倍体亚峰 (图 5 C)。

DNA 片段化电泳显示,与转染 pEGFP-N3 空载体的 HeLa 细胞相比, pEGFP-N3-bbFADD 转染的

HeLa 细胞中出现了梯状条带 (图 6)。

3 讨 论

FADD 的氨基酸序列在脊椎动物,尤其在哺乳类中相当保守,且 DED 和 DD 结构域是其中高度保守的区域^[17],可见在进化过程中这两个结构域的序列保守性是其功能保守性的基础。与所有已报道的 FADD 一样, bbFADD 含有 DED 和 DD 结构域,暗示 bbFADD 具有与其他物种 FADD 相似的功能。人类 FADD 第 25 位氨基酸苯丙氨酸 (F25) 位于 DED 结构域的疏水区域, F25 对于 FADD 的自我相互作用 (Self-association) 具有重要作用^[21]。而 FADD 的自

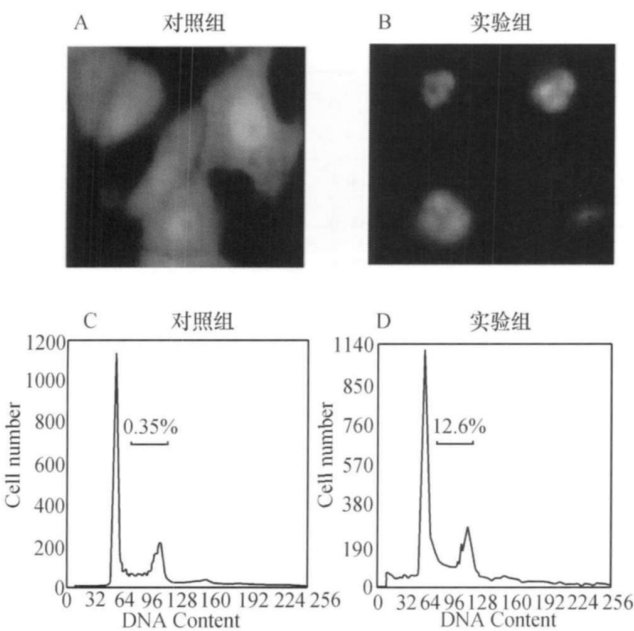


图5 *bbFADD* 在 HeLa 细胞中的超表达

Fig. 5 The effects of over-expression of amphioxus FADD in human HeLa cells

倒置荧光显微镜检测细胞形态(A, B), 流式细胞仪检测细胞周期(C, D)

Cell morphology was examined under inverted fluorescence microscope (A and B). The DNA content of HeLa cells expressing *bbFADD* was assessed by flow cytometry (C and D)

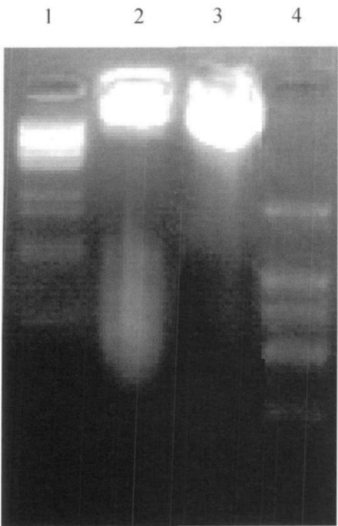


图6 *bbFADD* 引起 HeLa 细胞 DNA 片段化

Fig. 6 DNA fragmentation of HeLa cells induced by *bbFADD*
1: λ DNA/*Eco91* I maker; 2: 转染 pEGFP-N3-*bbFADD* 的 HeLa 细胞基因组 DNA; 3: 转染 pEGFP-N3 的 HeLa 细胞基因组 DNA; 4: DL2000 maker

Lane 1: λ DNA/*Eco91* I maker; Lane 2: DNA extracted from pEGFP-N3-*bbFADD* transfected HeLa cells; Lane 3: DNA extracted from pEGFP-N3 transfected HeLa cells; Lane 4: DL2000 maker

我相互作用是 FADD 与上游的死亡受体及下游的 caspase-8 结合的前提^[21, 22]。可见这一苯丙氨酸位点是 FADD 的一个重要的功能位点, 该位点在 *bbFADD* 中对应的是第 33 位氨基酸苯丙氨酸(F33)。

人 (*Homo sapiens*) 和鼠 (*Mus musculus*) 的 FADD 基因都含有两个外显子^[19, 20], 而 *bbFADD* 基因含有三个外显子。进一步挖掘 GenBank 和 Ensembl 的基因组数据库, 对鸡 (*Gallus gallus*)、爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)、绿色斑点河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 的 FADD 基因序列进行编码区外显子内含子结构预测分析。结果显示, 鸡和爪蟾的 FADD 基因也只有两个外显子; 非脊椎动物的文昌鱼和海胆其 FADD 基因都含有三个外显子, 且第二外显子短小 (图 2)。而作为低等脊椎动物的鱼类其 FADD 基因结构呈现多样性, 河豚有两个外显子, 斑马鱼有三个外显子, 而青鳉和三刺鱼具有两个转录本。青鳉的两个转录本分别为两个外显子和三个外显子, 三刺鱼的两个转录本都是三个外显子, 但外显子的排列方式不同。因此推测, 在从无脊椎动物进化到脊椎动物过程中, FADD 基因发生外显子重排, 这种重排在鱼类中尤为明显, 而在从鱼类到高等脊椎动物的进化过程中, FADD 的基因结构逐步稳定下来, 保持两个外显子。

在基于 FADD 氨基酸序列所构建的系统进化树中, 文昌鱼与海胆聚为一支, 且具有高的支持率。另外, 在脊椎动物 (人、鼠、猪、牛、鸡、爪蟾、斑点叉尾 和青鳉) 中, 除了爪蟾和斑点叉尾 的 FADD 的同源性只有 27.2%, 其他 FADD 间的同源性都大于 32%, 哺乳类 FADD 间的同源性则高达 59.3%—74.4%。 *bbFADD* 与海胆的同源性为 35.1%—36.9%, 而与鱼类的同源性仅为 27.5%—30.7%。结合基因组结构方面的证据, 我们推测: 虽然文昌鱼处于无脊椎动物进化到脊椎动物的中间过渡阶段, 但是与脊椎动物相比, 文昌鱼可能与海胆的亲缘关系更近。

当细胞发生凋亡时, 细胞固缩, 体积变小, 并脱离周围细胞^[23]。凋亡细胞对染色体荧光染料的可染性降低, 用流式细胞仪检测凋亡细胞的细胞周期, 会在 G₁/G₀ 期前出现一个亚二倍体峰^[24]。另外, 在凋亡细胞中, 染色体 DNA 断裂后形成许多长度约

为 $n \times 180-200$ bp ($n=1, 2, 3, 4, \dots$)的 DNA 片段,电泳时呈现阶梯状条带^[25]。我们在表达 bbFADD 的 HeLa 细胞中检测到了上述三个凋亡特征,表明本研究所克隆的 bbFADD 是有生物活性的,它可能能够参与到人类细胞的凋亡系统中引发细胞凋亡。头索动物的 FADD 能在哺乳类细胞系中行使功能,这也说明了在物种进化过程中细胞凋亡系统是相对保守的。

参考文献:

- [1] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Brit J Cancer*, 1972, **26**: 239—257
- [2] MacFarlane M. TRA L-induced signalling and apoptosis [J]. *Toxicol Lett*, 2003, **139**: 89—97
- [3] Bratton S B, MacFarlane M, Cain K, *et al* Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2000, **256**: 27—33
- [4] Liu X, Kim C N, Yang J, *et al* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c [J]. *Cell*, 1996, **86**: 147—157
- [5] Peter M E. The TRA L Discussion: It is FADD and caspase-8 [J]. *Cell Death Differ*, 2000, **7**: 759—760
- [6] Muzio M, Stockwell B R, Stennicke H R, *et al* An induced proximity model for caspase-8 activation [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 2926—2930
- [7] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation [J]. *Science*, 1998, **281**: 1305—1308
- [8] Bang S, Jeong E J, Kim I K, *et al* Fas-and tumor necrosis factor-mediated apoptosis uses the same binding surface of FADD to trigger signal transduction: A typical model for convergent signal transduction [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 36217—36222
- [9] Chinnaiyan A M, Tepper C G, Seldin M F, *et al* FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 4961—4965
- [10] Chinnaiyan A M, O'Rourke K, Tewari M, *et al* FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis [J]. *Cell*, 1995, **81**: 505—512
- [11] Martin D A, Siegel R M, Zheng L, *et al* Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHa-pha 1) death signal [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 4345—4349
- [12] Muzio M, Chinnaiyan A M, Kischkel F C, *et al* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex [J]. *Cell*, 1996, **85**: 817—827
- [13] Strasser A, Newton K. FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth [J]. *Int J Biochem Cell B*, 1999, **31**: 533—537
- [14] Hsu H, Shu H B, Pan M G, *et al* TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways [J]. *Cell*, 1996, **84**: 299—308
- [15] Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation [J]. *Cell*, 1995, **81**: 495—504
- [16] Hsu H, Huang J, Shu H B, *et al* TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex [J]. *Immunity*, 1996, **4**: 387—396
- [17] Sakamaki K, Nozaki M, Komiyama K, *et al* The evolutionary conservation of the core components necessary for the extrinsic apoptotic signaling pathway, in Medaka fish [J]. *BMC Genomics*, 2007, **8**: 141
- [18] Holland L Z, Laudet V, Schubert M. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61**: 2290—2308
- [19] Zhang J, Wino A. A mouse Fas-associated protein with homology to the human MORT1/FADD protein is essential for Fas-induced apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 2756—2763
- [20] Kim P K, Dutra A S, Chandrasekharappa S C, *et al* Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis [J]. *J Immunol*, 1996, **157**: 5461—5466
- [21] Sandu C, Morisawa G, Wegorzewska I, *et al* FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor [J]. *Cell Death Differ*, 2006, **13**: 2052—2061
- [22] Carrington P E, Sandu C, Wei Y, *et al* The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8 [J]. *Mol Cell*, 2006, **22**: 599—610
- [23] Wyllie A H, Kerr J F, Currie A R. Cell death: the significance of apoptosis [J]. *Int Rev Cytol*, 1980, **68**: 251—306
- [24] Lamm G M, Steinlein P, Cotten M, *et al* A rapid, quantitative and inexpensive method for detecting apoptosis by flow cytometry in transiently transfected cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 4855—4857
- [25] Wyllie A H, Morris R G, Smith A L, *et al* Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis [J]. *J Pathol*, 1984, **142**: 67—77

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF FAS-ASSOCIATED DEATH DOMAIN (FADD) FROM BRANCHIOSTOMA BELCHERI

ZHANG Jing^{1,2}, HUANG Bei^{1,2}, GAO Qian¹ and NIE Pin¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: FADD (Fas-associated death domain protein), also termed MORT1, plays a critical role in the apoptotic signaling pathways of both CD95 (Fas/APO-1) and certain members of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily, and is well conserved in vertebrates, especially in mammals. To reveal the features of FADD in lower animals, we have characterized FADD from amphioxus, *Branchiostoma belcheri* (Chordata, Cephalochordata), which is a model animal, and have an insight into the origin and evolution of apoptotic signaling system of the vertebrate. *Branchiostoma belcheri* FADD (bbFADD) cDNA and genomic DNA sequences were obtained by using RACE-PCR and Genomic Walking, respectively. The full-length cDNA of bbFADD consisted of 1239 base pairs (bp) encoding 217 amino acid residues (aa) with a death effector domain (DED) (12—95th; 84 aa) near the N-terminal and a death domain (DD) (129—211st; 83 aa) by the C-terminal. bbFADD genomic sequence, the length of which was 2840 bp, consisted of three exons and two introns in the gene coding region. The structure of bbFADD gene was different from that of its vertebrate counterparts, with two exons. The result of multiple alignments among FADDs from various species supported that DED and DD regions were more conservative than other regions. Furthermore, the 33rd phenylalanine residue (F33) of bbFADD amino acid sequence, which was equivalent to the 25th phenylalanine residue (F25) in human FADD. This site, which was crucial to mediate FADD self-association, was well conserved through sea urchin and human. Homology analysis showed that the percent identity and the percent similarity between bbFADD and vertebrate FADDs were 27.5%—30.0% and 44.7%—55.3%, while 35.1%—36.9% and 51.1%—52.0% between bbFADD and sea urchin FADD, respectively. In NJ phylogenetic tree based on amino acid sequences of FADDs, *B. belcheri* was grouped with sea urchin with the suggestion that comparing with lower vertebrate, fish, amphioxus was closely relative to sea urchin although amphioxus. However, generally amphioxus was regarded as the evolutionary intermediate stage between invertebrate and vertebrate. In order to examine whether bbFADD was functionally conserved, bbFADD was transfected into HeLa cells by using the expression vector pEGFP-N3-bbFADD, which was constructed in the present study. 24 hours post-transfection, over-expression of bbFADD resulted in cell shrinkage and DNA fragmentation. In addition, DNA content of the transfected cells were detected by flow cytometry. 12.6% cells in pEGFP-N3-bbFADD transfected HeLa cells underwent apoptosis while 0.35% in the control. All data suggested that bbFADD might participate in the human apoptotic signaling pathway and induced the apoptosis of human HeLa cells. Therefore, it was speculated that the apoptosis signaling system was conserved during the evolution course through amphioxus to mammal.

Key words: FADD; *Branchiostoma belcheri*; Gene cloning; Over-expression; Apoptosis