

FADD 形成淀粉样蛋白纤维及其在果蝇免疫信号传递中的作用

王鑫怡, 肖晓艺, 孙畅, 王菲

西南大学 生物学研究中心, 重庆 400716

王鑫怡, 肖晓艺, 孙畅, 等. FADD 形成淀粉样蛋白纤维及其在果蝇免疫信号传递中的作用. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1198-1208.

Wang XY, Xiao XY, Sun C, et al. Formation of FADD amyloid fiber and its role in immune signaling in *Drosophila melanogaster*. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1198-1208.

摘要: 探究果蝇 FADD (Fas-associated death domain-containing protein) 淀粉样蛋白纤维的形成及对 IMD (Immune deficiency) 信号通路中信号传递的影响, 有助于更清楚地了解昆虫先天免疫信号通路中的调节机制, 为其他物种的免疫调控提供参考。通过原核表达纯化 dFADD 蛋白、硫黄素 T 结合和透射电子显微镜观察等鉴定 dFADD 在体外纤维的形成; 通过构建 dFADD 真核表达载体, SDD-AGE 检测、共聚焦显微镜观察等探究 dFADD 在果蝇 S2 细胞内纤维聚合物的形成; 构建 dFADD 结构域突变体, 检测纤维形成的关键结构域及对 IMD 信号传递的影响。结果表明, dFADD 在体外和细胞水平上都能聚合形成淀粉样蛋白纤维聚合物; 纤维的形成是由 dFADD 的 DED (Death-effector domain) 结构域决定的, 当 DED 结构域缺失时, dFADD 以单体形式存在; 双荧光素酶报告系统的检测结果显示, dFADD 只有形成纤维时, 才能诱导下游抗菌肽的表达, 表明纤维形成是 IMD 信号传递的关键。本研究揭示了 dFADD 通过形成淀粉样蛋白纤维参与 IMD 信号通路中介导 IMD 与 Dredd 级联传导的作用, 进一步加深了对淀粉样蛋白纤维不仅在哺乳动物, 也在昆虫的免疫信号通路中传递信号这一保守功能的认识。

关键词: 果蝇, dFADD, 淀粉样蛋白纤维聚合物, DED 结构域, IMD 信号通路

Formation of FADD amyloid fiber and its role in immune signaling in *Drosophila melanogaster*

Xinyi Wang, Xiaoyi Xiao, Chang Sun, and Fei Wang

Biological Science Research Center, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: In this research, we studied the formation of *Drosophila melanogaster* FADD (Fas-associated death domain-containing protein) amyloid fiber and its influence on signal transduction in IMD (Immune deficiency) signaling pathway to better understand the regulation mechanism of *Drosophila* innate immune signaling pathway, which will provide

Received: September 4, 2019; **Accepted:** December 3, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31672495).

Corresponding author: Fei Wang. Tel: +86-23-68251569; Fax: +86-23-68250099; E-mail: fwangswu@gmail.com

国家自然科学基金 (No. 31672495) 资助。

网络出版时间: 2020-03-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200305.1112.002.html>

reference for the immune regulation in other species. First, we purified dFADD protein expressed in *Escherichia coli* and performed Sulfur flavin T binding and transmission electron microscopy to identify the dFADD amyloid fibers formed *in vitro*. Then we investigated the formation of dFADD polymers in S2 cells using SDD-AGE and confocal microscope. We also constructed dFADD mutants to find out which domain is essential to fiber formation and its effect on IMD signal transduction. Our results revealed that dFADD could be polymerized to form amyloid fiber polymers *in vitro* and inside the cells. Formation of fibers relies on DED (Death-effector domain) domain of dFADD, since DED domain-deleted mutant existed as a monomer. Dual luciferase reporter assay showed that intact DED domain was required for the induction of downstream antimicrobial peptides, indicating that fiber formation was the key to IMD signal transduction. Our study revealed the role of dFADD in mediating the cascade between IMD and Dredd in the IMD signaling pathway by forming amyloid fibers, suggesting an evolutionarily conserved regulatory mechanism of innate immune signaling pathway.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, dFADD, amyloid fibril aggregates, DED domain, IMD signaling pathway

无脊椎动物和脊椎动物在长期进化过程中形成了非常保守的先天免疫系统^[1]。两者在先天免疫信号途径中存在诸多同源分子,它们具有相似的结构特征、作用特点和调控方式。而果蝇作为昆虫先天免疫研究的模式生物,阐明其先天免疫信号通路中关键蛋白的分子作用机理,有助于更清楚地了解昆虫先天免疫信号通路中的调节机制,对研究其他物种的免疫调控具有重要参考意义。

病原微生物入侵时,昆虫体内的多层防御机制被激活,主要包括细胞免疫和体液免疫^[2]。细胞免疫由血淋巴细胞介导,依赖吞噬和包裹清除入侵的病原体^[3]。体液免疫主要涉及抗菌肽 AMPs (Antimicrobial peptide) 和黑化因子的产生,昆虫脂肪体产生并分泌 AMPs 到血淋巴中,裂解杀死细菌;黑化因子沉积在入侵者的周围,形成黑色素囊包裹入侵者并将其杀死^[4]。果蝇体液先天免疫应答主要受两条 NF- κ B 信号通路——Toll 和 IMD 信号通路调控^[5]。Toll 通路主要抵御革兰氏阳性菌和真菌,产生 Drosomycin 等抗菌肽^[6];而 IMD 通路主要感知大多数革兰氏阴性菌及少数具有内消旋-二氨基庚二酸型肽聚糖 DAP-type PGN (Diaminopimelic acid-type peptidoglycan) 的革兰氏阳性菌的感染,产生 Attacin、Diptericin 等抗菌肽。在 IMD 信号通路中,跨膜受体 PGRP-LC 或膜内受体 PGRP-LE 识别 DAP-型 PGN,招募膜内衔接蛋白 IMD (Immune deficiency),IMD 进一步招募配体蛋白 FADD (Fas-associated death domain-containing

protein) 与 Dredd (Death-related ced-3/Nedd2-like protein),促使 Dredd 活化,活化的 Dredd 特异性切割 IMD 和 NF- κ B 家族转录因子 Relish,切割后的 IMD 结合 E3 泛素化连接酶 DIAP2 发生泛素化^[7-8],招募 TAK1 和 IKK^[9],磷酸化切割后的 Relish,Relish 具有转录活性的 N 端进入细胞核,激活 AMPs 的表达^[10-11]。

果蝇 FADD (dFADD) 是哺乳动物 FADD 的同源物,其 N 端具有一个 DED 结构域 (Death-effector domain),C 端包含一个 DD 结构域 (Death domain)。在 IMD 信号通路中,dFADD 分别通过其 DD 结构域和 DED 结构域与上游同样包含 DD 结构域的 IMD 和下游同样包含 DED 结构域的 Dredd 相互作用,调控抗菌级联信号的传递^[12-14]。然而,目前关于 dFADD 的研究仅限于功能,其潜在的作用机制仍不清楚。研究报道,在 IMD 信号通路中,果蝇 PGRP-LC、PGRP-LE 和 IMD 能够形成功能性淀粉样蛋白纤维聚合物,且该淀粉样蛋白纤维是 IMD 信号传递所必需的^[15]。最近,本研究团队发现家蚕 Dredd 也能形成功能性蛋白聚合物^[16]。

为进一步深入研究 dFADD 在 IMD 信号通路中的作用机制,本研究拟通过 ThT 染料结合、透射电镜观察等鉴定原核表达纯化的 dFADD 蛋白在体外能否形成淀粉样蛋白纤维;通过共聚焦显微镜观察、ThT 染色以及 SDD-AGE 检测等方法在细胞水平上鉴定 dFADD 是否在细胞内形成淀粉样蛋白纤维聚合物;通过构建结构域突变体,

鉴定纤维形成的关键结构域以及在 IMD 信号传递中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

果蝇 S2 细胞系衍生自胚胎,由本实验室保存,在 27 °C 条件下,培养在添加 10% 胎牛血清 (非热灭活) 和 100 U/mL 青霉素、100 µg/mL 链霉素的 Schneider's *drosophila* medium (Gibco) 中。

Tubulin 抗体、HRP 标记山羊抗鼠抗体、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、NP-40 裂解液、DAPI 染色液、蛋白酶抑制剂 PMSF 等购自上海碧云天生物技术有限公司; HA 标签单克隆抗体购自 Invitrogen; 彩色预染蛋白质分子量标准购自 Thermo Scientific; DAP-型 PGN 购自 Sigma; 细胞转染试剂购自 Roche; BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞、Trans-T1 噬菌体抗性化学感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; 超纯质粒试剂盒购自 Qiagen; 点突变试剂盒购自 TaKaRa; pCold-Sumo 载体购自 Hai gene; ThT 试剂购自 Santa Cruz; Dual-Glo 双荧光素酶活检测试剂购自 Promega。

1.2 质粒构建

原核表达质粒 pCold-Sumo-dFADD 及真核表达质粒 pMT/V5-HisA-HA-dFADD、pMT/V5-HisA-HA-dFADD-mCherry 的构建均根据 NCBI 检索到

的各个基因的 CDS 序列设计引物并扩增出正确片段克隆至相应载体上, dFADD 结构域突变体的构建根据点突变试剂盒使用说明,以上序列均送深圳华大基因股份有限公司测序。本研究所用引物如表 1 所示,所构建载体图谱如图 1 所示。

1.3 细胞转染

将细胞进行血球计数板计数后接种至 12 孔细胞板 (1×10^5 个细胞/孔),待细胞生长至对数生长期, 0.5 µg/孔的质粒与 1 µL/孔的脂质体混合孵育 15 min,转染至细胞中,5 h 后进行 CuSO_4 诱导 (终浓度为 500 µmol/L),24 h 后收集细胞用于 SDD-AGE 检测或制备细胞爬片。以上转染均使用分光光度计对转染的质粒进行定量。

1.4 细胞爬片的制备及 ThT 染色

将细胞旧培养基吸净弃之,添加 500 µL 3% 多聚甲醛 (PFA) 固定细胞 20 min, PBS 轻轻地冲洗一次,添加 500 µL 0.3% Triton-X100,静置 20 min,添加 3 mmol/L ThT 摇晃染色 20 min (避光操作),70% 乙醇清洗 3 次/min, PBS 清洗 3 次,每次 3 min,添加 500 µL DAPI 染色液,静置 5 min, PBS 清洗 3 次,每次 3 min,向载玻片上滴加 3 µL 抗荧光淬灭封片液,夹起细胞爬片置于封片液上,于 4 °C 避光保存。dFADD 点状分布和弥散分布细胞数量的统计执行 3 个孔的重复。每个重复随机选取 5 个视野,计数 (200 ± 5) 个细胞。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
dFADD	F: CGGGGTACCATGACTGCAGGCAGG R: CCGGAATTCTAGTGCACATTAT
HA-dFADD	F: CGGGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTACTGCAGGCAGG R: CCGGAATTCTAGTGCACATTAT
HA-dFADD-mCherry	dFADD-F: CGGGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTACTGCAGGCAGG Linker-R: AGAGCCTCCACCCCGTGCGACATTAT Linker-mCherry-F: GGGGGTGGAGGCTCTATGGTGAGCAAGGGGCGAG mCherry-R: CCGGAATTCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

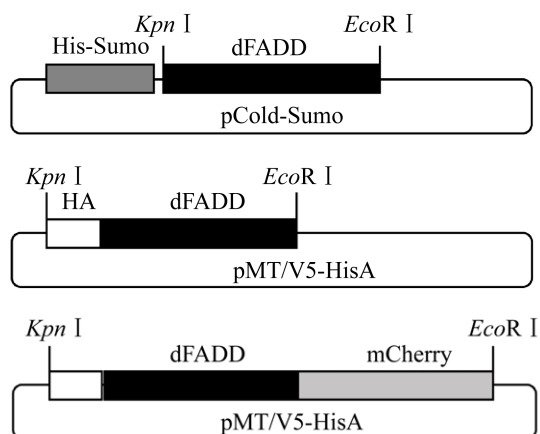


图1 dFADD的原核和真核表达载体图谱

Fig. 1 Prokaryotic and eukaryotic expression vector maps of dFADD. Black line: restriction enzyme cutting site; black box: dFADD ORF; dark grey box: sequence encoding His-Sumo; white box: sequence encoding HA tag; light grey box: sequence encoding mCherry.

1.5 原核表达纯化蛋白及 ThT 结合实验、透射电子显微镜观察

将表达 pCold-Sumo-dFADD 质粒的菌液于 1 L LB 氨苄液体培养基中扩大培养至 OD 值为 0.4–0.6, 添加 0.1 mmol/L 的 IPTG, 15 °C、220 r/min 诱导蛋白表达 24 h。6 000 r/min、4 °C 离心 20 min 收菌, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、300 mmol/L NaCl、1 mmol/L β 巯基乙醇, 5% 甘油, 1 mmol/L PMSF 的缓冲液重悬菌沉淀, 超声破碎 7 min 30 s, 4 °C、16 000 r/min 离心 45 min, 收集蛋白上清, 挂镍柱, 再用不同浓度梯度的咪唑将其洗脱, SDS-PAGE 鉴定蛋白大小及纯度。对目标蛋白浓度最高的洗脱液脱盐处理, Sumo 酶酶切 30 °C、1 h, 反挂镍柱, 收集流穿液, SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度, BCA 测定蛋白浓度。

ThT 结合实验: 用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 将纯化的 dFADD 稀释至反应终浓度为 32 μ mol/L, ThT 反应终浓度为 25 μ mol/L, 再将 dFADD 进行不同程度的梯度稀释, 阳性对照为 A β 蛋白, 阴性对照为 BSA 蛋白, 分别将各蛋白样品

于 37 °C、1 000 r/min 孵育 24 h, 孵育体积不少于 400 μ L。随后将蛋白样品转移至 96 孔黑色酶标板, 添加新鲜配制的 ThT 溶液, 摇晃孵育 15 min, 上机检测: 固定激发光为 440 nm, 检测 470–600 nm 不同发射光的荧光强度。

透射电子显微镜观察: 吸取终浓度为 37 μ mol/L 的蛋白样品滴加于铜网格上, 吸附 1 min, 风干, 用 2% 乙酸铀酰水溶液负染 45 s, 去除多余染液, 风干, 透射电镜观察, 电压 200 kV。

1.6 SDD-AGE

凝胶制备: 1 \times TBE 配制含 0.1% SDS 的 1.5% 琼脂糖凝胶。样品制备: 将细胞裂解物 (细胞裂解液: NP-40 裂解液+1 mmol/L DTT+2 mmol/L PMSF) 与蛋白上样缓冲液 (配制 4 \times 母液: 2 \times TBE, 20% 甘油, 8% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 室温保存, 使用终浓度为 1 \times) 混合, 37 °C 孵育 5 min, 蛋白上样总量为 80 μ g。电泳: 水平凝胶电泳 (电泳缓冲液: 1 \times TBE +0.1% SDS), 恒压 3 V/cm (凝胶宽度), 于 4 °C 冰箱中进行。毛细管转膜: 由下往上依次放置: 5 cm 干滤纸、一层转膜缓冲液 (1 \times TBS) 浸湿滤纸、PVDF 膜、凝胶、一层浸湿滤纸、一层浸湿滤纸桥。室温静置 9 h。转膜完成后, 执行标准的 Western blotting 检测。

1.7 双荧光素酶检测

将旧培养基吸净弃之, 添加 300 μ L PBS 重悬细胞于 1.5 mL 离心管, 10 000 r/min、4 °C 离心 5 min。吸取 120 μ L Dual-Glo 双荧光素酶活检测试剂重悬细胞, 室温摇晃裂解 15 min, 吸取 50 μ L 至 96 孔黑色酶标板, 用 GloMax-Multi 微孔酶标仪读数。取出酶标板, 吸取 50 μ L 终止反应检测试剂加入对应孔中, 摇晃混匀 10 min, 使用酶标仪读数。本实验采用海肾荧光素酶质粒作为内参。每个样品取 3 个孔的重复, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并通过 ANOVA 单因素方差分析后采用邓肯氏 (Duncan) 新复极差测验法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 dFADD 在体外形成淀粉样蛋白纤维聚合物

采用带有 His-Sumo 标签的 pCold-Sumo 载体原核表达纯化 His-Sumo-dFADD, 该蛋白在 200 mmol/L 咪唑浓度下被大量洗脱 (图 2A), 随后使用 Sumo 酶切除 His-Sumo 标签, 得到大小为 27 kDa 的蛋白

dFADD (图 2B)。分别使用灰度计算软件 Image J 及 BCA 蛋白浓度测定法对该蛋白的纯度和浓度进行分析, 结果表明, dFADD 纯度和浓度分别约为 96.2% 和 37 $\mu\text{mol/L}$, 可进行后续实验。硫黄素 T (ThT) 是一种淀粉样蛋白纤维聚集体的特异性荧光染料。ThT 与淀粉样蛋白纤维结合后, 光谱性质发生变化, 激发波长从 335 nm 增加至 445 nm, 发射

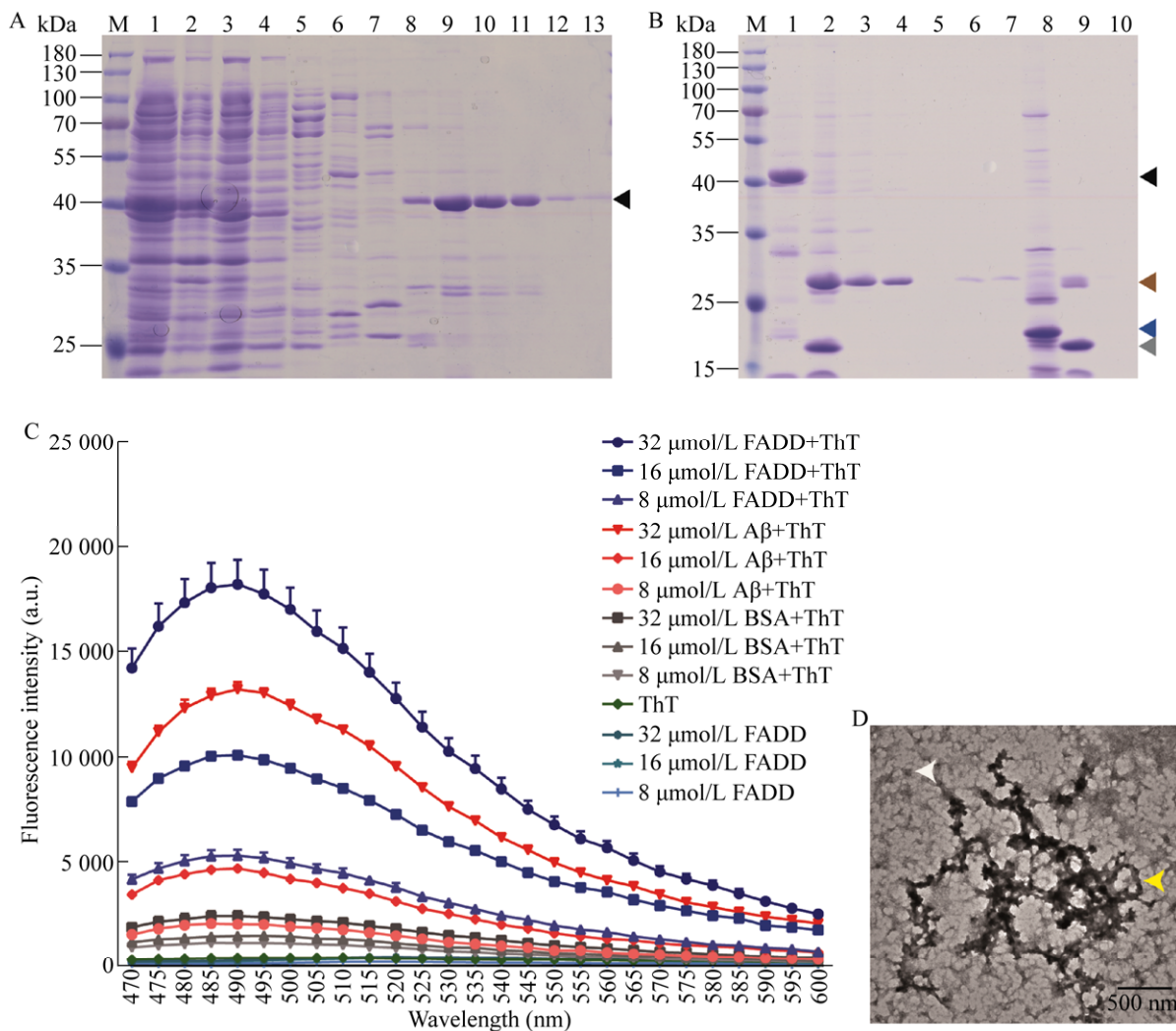


图 2 dFADD 的原核表达纯化、ThT 结合及透射电子显微镜观察

Fig. 2 Prokaryotic expression and purification, ThT binding and transmission electron microscopy of dFADD. (A) Imidazole concentration gradient elution of dFADD. 1: supernatant; 2: sedimentation; 3: flow through; 4: 0 mmol/L; 5: 10 mmol/L; 6: 20 mmol/L; 7: 50 mmol/L; 8: 100 mmol/L; 9: 200 mmol/L; 10: 300 mmol/L; 11: 500 mmol/L; 12: 800 mmol/L; 13: 1 mol/L; M: protein pre-stained marker (kDa); black arrowhead: His-Sumo-dFADD. (B) The imidazole concentration gradient elution of dFADD after digested by Sumo enzyme. 1: uncut; 2: after digestion; 3: flow through; 4: 0 mmol/L; 5: 10 mmol/L; 6: 20 mmol/L; 7: 50 mmol/L; 8: 100 mmol/L; 9: 200 mmol/L; 10: 500 mmol/L; M: protein pre-stained marker (kDa); black arrowhead: His-Sumo-dFADD; brown arrowhead: dFADD; blue arrowhead: Sumo enzyme; gray arrowhead: His-Sumo. (C) ThT binding assay of dFADD. (D) Transmission electron microscopy of dFADD. White arrowhead: amorphous aggregation of dFADD; Yellow arrowhead: amyloid fiber aggregates of dFADD.

波长由 400 nm 增加至 485 nm。ThT 结合实验表明, dFADD 能够与 ThT 染料特异性结合, 改变 ThT 的光谱性能, 使其在 440 nm 的激发光下, 在发射波 490 nm 处产生与阳性对照——典型的 β 淀粉样蛋白 A β 一样的峰值 (图 2C), 且呈现出剂量依赖效应。纯化的 dFADD 蛋白在透射电子显微镜下呈现明显的聚集现象 (图 2D), dFADD 发生明显聚集, 但大多数为无定形聚集 (如白色箭头所示), 只有少数部分能够聚合形成较大的聚集体 (如黄色箭头所示), 且该聚集体整体呈现为纤维状。综上所述, dFADD 在体外可聚集形成淀粉样蛋白纤维聚合物。

2.2 dFADD 在细胞内形成淀粉样蛋白纤维聚合物

为探究 dFADD 在体内是否形成淀粉样蛋白纤维聚合物, 模拟在体外培养果蝇 S2 细胞中过表达

dFADD-mCherry 融合蛋白, 通过共聚焦显微镜观察 dFADD 的细胞定位及分布情况, 发现 dFADD 在果蝇 S2 细胞中呈现两种分布: 一种呈点状 (图 3A), 此种形式数量较少, 但其荧光强度较亮; 另一种则弥散分布于整个细胞质中, 荧光强度较弱一些 (图 3B)。在果蝇 IMD 信号通路中一些能够形成淀粉样蛋白纤维聚合物的蛋白, 如 PGRP-LC 等也呈现这样的点状聚集形式^[15], 因此推测这种点状分布的 dFADD 可能也是蛋白聚集体。为排除蛋白聚集是由于过量表达所造成的, 同时转染了等量的 mCherry 蛋白表达载体 (图 3C), 该蛋白均匀分布于细胞中, 证实过量表达不会造成蛋白的聚集。

对过表达 dFADD-mCherry 蛋白的 S2 细胞进行 ThT 染色, 经荧光显微镜观察发现点状分布的 dFADD 与 ThT 绿色荧光重叠, 表明其能够与 ThT

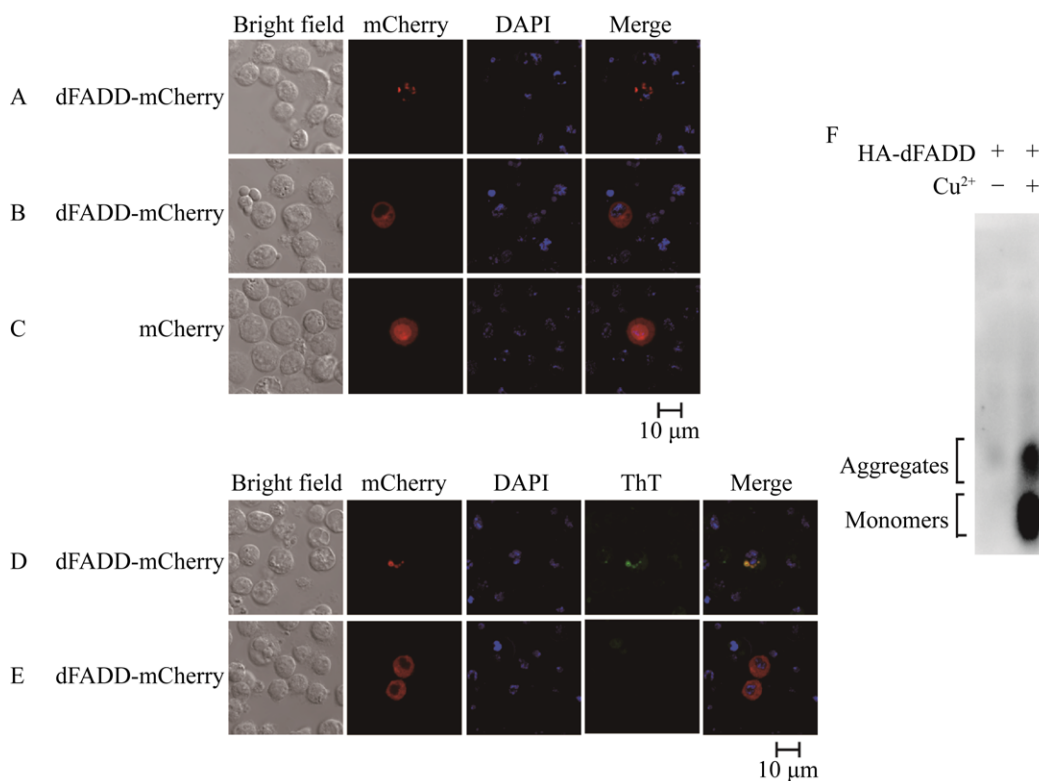


图 3 dFADD 的荧光观察、ThT 染色及 SDD-AGE 检测

Fig. 3 Fluorescence observation, ThT staining and SDD-AGE detection of dFADD. (A) Puncta-like distribution of dFADD-mCherry. (B) Diffuse distribution of dFADD-mCherry. (C) Diffuse distribution of mCherry. (D) Puncta-like distribution of dFADD-mCherry specifically binds to ThT. (E) Diffuse distribution of dFADD-mCherry does not specifically bind to ThT. (F) SDD-AGE detection of HA-dFADD.

特异性结合, 这些点状物即为淀粉样蛋白纤维聚合物 (图 3D)。相反, 弥散分布的 dFADD 则未呈现出 ThT 绿色荧光 (图 3E), 表明其未发生聚合。这些结果表明 dFADD 在细胞内部分形成淀粉样蛋白纤维聚合物, 这与电镜观察的结果一致。SDD-AGE 是一种半变性琼脂糖凝胶电泳技术, 该技术 SDS 用量少, 基本不破坏聚集体, 并借助疏松网状的琼脂糖凝胶进行大分子蛋白的迁移。本研究通过 SDD-AGE 检测过表达 HA-dFADD 的 S2 细胞裂解物, 发现 HA-dFADD 在细胞内以单体与聚合物共存 (图 3F)。

2.3 DED 结构域是 dFADD 纤维形成的关键结构域

为探究 dFADD 淀粉样蛋白纤维的形成与哪一个结构域有关, 构建了删除 dFADD 结构域的真核表达载体 (图 4A), SDS-PAGE 检测各突变体蛋白成功表达 (图 4B)。随后对 dFADD-WT 及其突变体进行 SDD-AGE 检测, 结果显示, dFADD-WT 存在聚合物和单体两种形式, 且单体量较高; dFADD- Δ DED 仅以单体形式存在; dFADD- Δ DD 则表现出单体明显减少、聚合物明显增多的特征 (图 4C)。荧光观察结果显示, dFADD- Δ DD 在细胞内具有聚集和弥散两种分布, 其聚集形式能够被 ThT 染色, 呈现绿色荧光; 而 dFADD- Δ DED 仅有弥散分布一种形式, 不能与 ThT 结合 (图 4D、E)。同时对 dFADD 及其突变体的聚集形式和弥散形式的比例进行了统计 (图 4F), dFADD-WT 的聚集比例为 19.23%, dFADD- Δ DED 的聚集比例为 0, dFADD- Δ DD 的聚集比例为 31.77%。此外, PGN 刺激后, dFADD-WT 和 dFADD- Δ DD 的聚集比例均有所上升, 分别为 24.10% 和 38.22%。以上结果均表明, DED 结构域是 dFADD 纤维形成的关键结构域, 且 PGN 刺激能够诱导更多 dFADD 聚集。

2.4 dFADD 纤维形成是 IMD 信号传递的关键

为进一步探究 dFADD 形成的淀粉样蛋白纤维在 IMD 信号通路中的作用, 在细胞中表达 dFADD

或其突变体, 利用双荧光素酶报告系统对抗菌肽 Attacin 和 Diptericin 的诱导水平进行了检测。结果显示, 在 PGN 刺激下, dFADD- Δ DED 对抗菌肽的表达无促进作用, 或远低于 dFADD-WT 和 dFADD- Δ DD; 而蛋白聚合比例较高的 dFADD- Δ DD, 促进抗菌肽表达的作用则高于 dFADD-WT (图 5A、B)。以上结果表明, dFADD 淀粉样蛋白纤维的形成是 IMD 信号通路传递的关键, 是诱导抗菌肽产生所必需的。

3 讨论

淀粉样蛋白聚集体最早被发现与人类淀粉样蛋白疾病有关。某些蛋白或多肽错误折叠并形成淀粉样蛋白纤维, 在器官和组织的胞外空间中沉积, 从而导致疾病发生, 例如 A β 蛋白导致的阿尔茨海默氏症, 朊病毒蛋白导致的海绵状脑病, α 核蛋白导致的帕金森病等^[17]。然而, 近年来从细菌到昆虫再到人类, 逐渐发现一些功能性淀粉样蛋白纤维, 它们并不导致疾病发生, 而是在体内发挥正常的生理功能, 例如 PMEL 形成淀粉样纤维作为支架沉积和储存哺乳动物黑色素; 荧光假单胞菌的 FapC 组成的原纤维有助于生物膜的形成和稳定; 生殖特异性胱抑素蛋白 Cst8 在体外形成淀粉样蛋白原纤维, 在精子成熟或维持管腔环境中发挥作用^[18-20]。对哺乳动物信号传导的研究发现, RIPK1 和 RIPK3 的 RIP 同型相互作用基序 RHIMs 介导了其异二聚体丝状结构的组装, 二者形成淀粉样蛋白纤维复合物, 在诱导细胞程序性坏死的信号通路中是不可或缺的^[21-23]。与此相似的是, 在昆虫的 IMD 免疫信号通路中, PGRP-LC、PGRP-LE、IMD 三种蛋白形成功能性淀粉样蛋白纤维聚合物, PGRP-LC 或 PGRP-LE 首先聚合形成淀粉样蛋白原纤维, 成为下游 IMD 纤维聚合的核心, 促进 IMD 的聚合, 纤维形成是 IMD 通路的信号传递所必需的^[15]。这暗示着对于哺乳动物和昆虫, 信号分子的组织形式和信号传递方式具有进化上的保守性。dFADD 纤维参与 IMD 级联调控的分子作用尚需要后续深入研究。

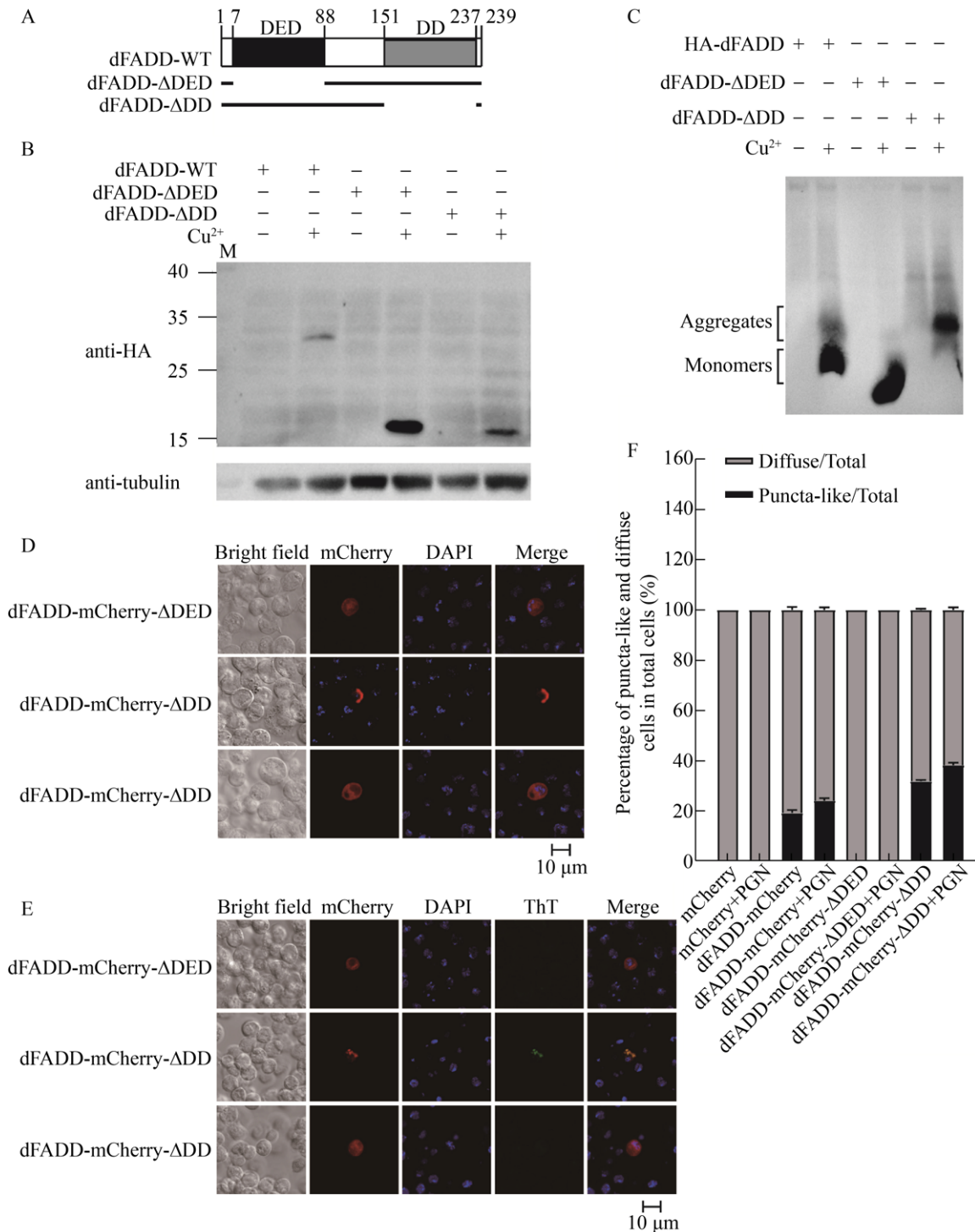


图 4 dFADD-WT 及其突变体真核表达载体的构建、SDD-AGE 检测及荧光观察

Fig. 4 Eukaryotic expression vector construction, SDD-AGE detection and fluorescence observation of domain-deleted mutants of dFADD. (A) Schematic diagram of dFADD-WT and its domain-deleted mutants. (B) SDS-PAGE detection of dFADD-WT and its mutants. M: protein pre-stained marker (kDa). (C) SDD-AGE detection of dFADD-WT and its mutants. (D) Fluorescence observation of dFADD's mutants. (E) Fluorescence observation of dFADD's mutants after ThT staining. (F) The ratio of puncta-like vs. diffuse distribution of dFADD and its mutants in the absence or presence of PGN.

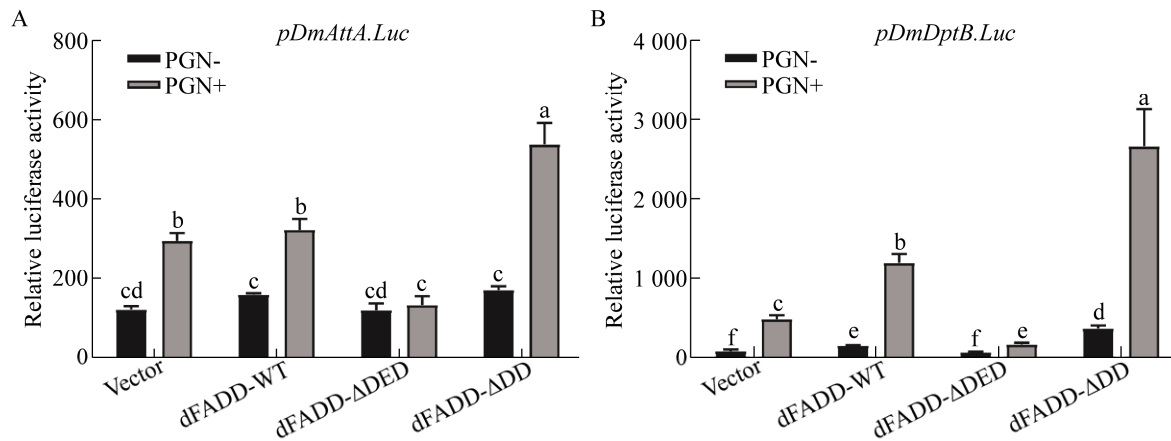


图5 dFADD-WT及其突变体对抗菌肽表达的影响

Fig. 5 Effect of dFADD-WT and its mutants on the expression of antimicrobial peptides. (A) Effect of dFADD-WT and its mutants on the expression of the antibacterial peptide Attacin. (B) Effect of dFADD-WT and its mutants on the expression of the antibacterial peptide Diptericin. PGN: DAP-type PGN (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). a-f: differences are assigned by letters, overlapping letters mean no significance.

本研究发现 dFADD 也能够自组装聚合成类似的功能性淀粉样蛋白纤维,其能够与淀粉样蛋白纤维特异性染料结合,在透射电子显微镜下呈现明显的高分子聚合特征,形似纤维。然而,该分子在体外或在模拟体外培养果蝇 S2 细胞中的聚合能力是较弱的,少数形成纤维,大部分仍是以无定形的较小聚合物形式存在,或者不发生聚合以单体形式存在。在 PGN 刺激下, dFADD 形成聚集体的能力有所增强,说明其聚集响应免疫诱导。而 dFADD- ΔDED 突变体不能形成淀粉样蛋白纤维聚合物并且无法诱导抗菌肽 Attacin 和 Diptericin 的表达,进一步说明了淀粉样蛋白纤维在免疫信号通路中的作用。这些结果提示 dFADD 纤维分子可能作为原纤维核心在 IMD 信号通路中协同参与了上游 IMD 的淀粉样蛋白纤维的形成,改变 IMD 纤维特征,促进与下游分子 Dredd 等分子的相互作用,调控抗菌级联信号的传递。

有意思的是, dFADD- ΔDD 突变体对抗菌肽 Attacin 和 Diptericin 表达的促进能力明显增强,可能暗示 dFADD 的 DD 结构域对 dFADD 淀粉样蛋

白纤维的形成有一定程度的干扰。类似现象也存在于哺乳动物 FADD 介导的细胞凋亡信号通路中, FADD 的 DED 结构域能够形成死亡效应纤丝,该纤丝的形成是细胞凋亡信号传递所必需的。当只表达 DED 结构域时,细胞凋亡率要高于同时包含 DED 结构域和 DD 结构域的全长型 FADD^[24-27],说明在无 DD 结构域存在的情况下, DED 结构域的功能可能有所增强。统计 dFADD-mCherry 及其突变体在细胞中呈现聚合形式的比例,发现 dFADD- ΔDD 呈现聚合的比例高于 dFADD-mCherry-WT,这也与二者促进抗菌肽产生的能力相对应,当 dFADD 聚合物增多时,其促进抗菌肽产生的能力进一步增强。

dFADD 通过其 DED 结构域与 Dredd (Caspase8 同源物) 相互结合,促进下游抗菌肽的产生或诱导细胞凋亡。Dredd 的 N 端也包含两个 DED 结构域^[28]。笔者研究团队在研究家蚕 Dredd 时,发现 BmDredd 能够聚合形成淀粉样蛋白纤维,且 BmDredd 与 BmFADD 的细胞共定位表明,二者能够共同聚合形成淀粉样蛋白纤维聚合物^[16],这

提示了果蝇 Dredd 也可能形成淀粉样蛋白纤维聚合物。由此 IMD 信号通路中, 已鉴定或预测到 PGRP-LC、PGRP-LE、IMD、dFADD 与 Dredd 均能够形成淀粉样蛋白纤维聚合物, 暗示它们能够组装形成类似于在哺乳动物细胞中鉴定到的超分子复合物, 对迅速高效的免疫信号传递和抗菌肽的诱导至关重要, 值得深入研究。

REFERENCES

- [1] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 697–743.
- [2] Imler JL. Overview of *Drosophila* immunity: a historical perspective. *Dev Comp Immunol*, 2014, 42(1): 3–15.
- [3] Vlisidou I, Wood W. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *Febs J*, 2015, 282(8): 1368–1382.
- [4] Igboin CO, Griffen AL, Leys EJ. The *Drosophila melanogaster* host model. *J Oral Microbiol*, 2012, 4(1): 10368.
- [5] Khush RS, Leulier F, Lemaitre B. *Drosophila* immunity: two paths to NF- κ B. *Trends Immunol*, 2001, 22(5): 260–264.
- [6] Valanne S, Wang JH, Rämetsä M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J Immunol*, 2011, 186(2): 649–656.
- [7] Paquette N, Broemer M, Aggarwal K, et al. Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for *Drosophila* NF- κ B signaling. *Mol Cell*, 2010, 37(2): 172–182.
- [8] Meinander A, Runchel C, Tenev T, et al. Ubiquitylation of the initiator caspase DREDD is required for innate immune signalling. *Embo J*, 2012, 31(12): 2770–2783.
- [9] Vidal S, Khush RS, Leulier F, et al. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKs in the control of rel/NF- κ B-dependent innate immune responses. *Gene Dev*, 2001, 15: 1900–1912.
- [10] Kleino A, Silverman N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Dev Comp Immunol*, 2014, 42(1): 25–35.
- [11] Stöven S, Silverman N, Junell A, et al. Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5991–5996.
- [12] Hu SM, Yang XL. dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J Biol Chem*, 2000, 275(40): 30761–30764.
- [13] Naitza S, Rossé C, Kappler C, et al. The *Drosophila* immune defense against Gram-negative infection requires the death protein dFADD. *Immunity*, 2002, 17(5): 575–581.
- [14] Leulier F, Vidal S, Saigo K, et al. Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Curr Biol*, 2002, 12(12): 996–1000.
- [15] Kleino A, Ramia NF, Bozkurt G, et al. Peptidoglycan-sensing receptors trigger the formation of functional amyloids of the adaptor protein Imd to initiate *Drosophila* NF- κ B signaling. *Immunity*, 2017, 47(4): 635–647.
- [16] Hu J, Wang XY, Xiao XY, et al. A tandem death effector domain-containing protein inhibits the IMD signaling pathway via forming amyloid-like aggregates with the caspase-8 homolog DREDD. *Insect Biochem Molec Biol*, 2019, 114: 103225, doi: 10.1016/j.ibmb.2019.103225.
- [17] Knowles TP. J, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(6): 384–396.
- [18] Jackson MP, Hewitt EW. Why are functional amyloids non-toxic in humans? *Biomolecules*, 2017, 7(4): 71.
- [19] Otzen D. Functional amyloid turning swords into plowshares. *Prion*, 2010, 4(4): 256–264.
- [20] Pham CLL, Kwan AH, Sunde M. Functional amyloid:

- widespread in nature, diverse in purpose. *Essays Biochem*, 2014, 56: 207–219.
- [21] Chen SF, Lv X, Hu BW, et al. RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis contributes to compression-induced rat nucleus pulposus cells death. *Apoptosis*, 2017, 22(5): 626–638.
- [22] Li JX, Mcquade T, Siemer AB, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*, 2012, 150(2): 339–350.
- [23] Wu XN, Yang ZH, Wang XK, et al. Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death Differ*, 2014, 21(11): 1709–1720.
- [24] Siegel RM, Martin DA, Zheng LX, et al. Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*, 1998, 141(5): 1243–1253.
- [25] Riley JS, Malik A, Holohan C, et al. DED or alive: assembly and regulation of the death effector domain complexes. *Cell Death Dis*, 2015, 6(8): e1866.
- [26] Schleich K, Buchbinder JH, Pietkiewicz S, et al. Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain. *Cell Death Differ*, 2016, 23(4): 681–694.
- [27] Fu TM, Li Y, Lu A, et al. Cryo-EM structure of caspase-8 tandem DED filament reveals assembly and regulation mechanisms of the death-inducing signaling complex. *Mol Cell*, 2016, 64(2): 236–250.
- [28] Leulier F, Rodriguez A, Khush RS, et al. The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep*, 2000, 1(4): 353–358.

(本文责编 郝丽芳)