DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.020
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2112 2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)23-2112-03

hFIST/HIPK2在Fas/FasL和TNF/TNFR1介导的凋亡信号转导途径中的作用

李 欣,刘 宏,赵育新,何俊彦,张新华,杜光祖 (广州军区武汉总医院肿瘤血液科,武汉 430070)

提 要:目的 探讨hFIST/HIPK2在Fas/FasL介导的凋亡信号转导途经中的作用。方法 应用瞬时转染技术,将全长序列hFIST/HIPK2、Fas(CD95/Apo-1)、TNFR1、FADD、TRADD、caspase-8 cDNAs转染入293T细胞中,应用免疫沉淀技术、Western Blotting技术检测hFIST/HIPK2与以上凋亡相关蛋白的相互作用。结果 hFIST/HIPK2与Fas、TNFR1、FADD、caspase-8无相互作用,与TRADD有相互作用,且Fas、TNFR1竞争性抑制这种相互作用。在有FasL存在及无FasL存在时,Fas均可与FADD相互作用;Fas与TRADD有相互作用。结论 hFIST/HIPK2与TRADD有相互作用,Fas与TRADD有相互作用,hFIST/HIPK2可能间接参与了Fas/FasL、TNF/TNFR1信号转导途径。

关键词:hFIST/HIPK2;TRADD;Fas(CD95/APO-1);TNFR1;凋亡
中图法分类号:R392.11;R394.2;R730.23 文献标识码:A

Role of serine/threonine protein kinase hFIST/HIPK2 in signal transduction pathway in Fas/FasL- and TNF/TNFR1-mediated apoptosis

LI Xin, LIU Hong, ZHAO Yu-xin, HE Jun-yan, ZHANG Xin-hua, DU Guang-zu (Department of Oncology & Hematology, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanisms in the regulation of Fas/FasL signal transduction pathway and to find more new Fas-associated proteins by means of investigating the roles of hFIST/HIPK2 (human Fas-interacting signal transducer/homeodomain-interacting protein kinase) in this pathway. Methods Full length hFIST/HIPK2, Fas (CD95/Apo-1), TNFR1, FADD, TRADD, and Caspase-8 cDNAs were transfected into human kidney embryonic cell line 293T cells by transient transfection. The interaction of Fas with these apoptosis-associated proteins was analyzed by immunoprecipitation and Western blotting. Results hFIST/HIPK2 interacted with TRADD, but not with TNFR1, FADD nor Caspase-8. Apo-1 and TNFR1 competitively inhibited the interaction of hFIST/HIPK2 with TRADD. Fas interacted with FADD both in the presence of and in the absence of FasL. Fas could interact with TRADD. Conclusion hFIST/HIPK2 may interact with TRADD and Fas with TRADD, suggesting that hFIST/HIPK2 may play an indirect role in the signal transduction pathway in Fas/FasL- and TNF/TNFR1-mediated apoptosis.

Key words: hFIST/HIPK2; TRADD; Fas(CD95/Apo-1); TNFR1; apoptosis

多种免疫细胞和肿瘤细胞表达Fas及Fas配基(FasL),而Fas/FasL信号转导途径是调控这些细胞凋亡的最重要途径之一[1]。新近发现的Daxx蛋白(Fas death domain associated protein)、FLASH(FLICE-associated huge protein)、hFIST/HIPK3以各自的方式作用于Fas/FasL信号转导途径,继而诱发凋亡[2~4]。为深入探讨Fas/FasL信号转导途径的调控机制及发现新的Fas相关蛋白,我们观察了hFIST/HIPK2蛋白与其它凋亡相关蛋白的相互作用,认为hFIST/HIPK2间接参与了Fas/FasL、TNF/TNFR1介导的凋亡信号转导途径。

1 材料与方法

1.1 细胞系和细胞培养

人肾胚胎细胞系293T细胞培养于DMEM完全培养基中,2~3 d传代1次。

1.2 细胞裂解液

20 mmol/L HEPEs(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 10% 甘油, 20 μl/ml Protease inhibitor cocktail (Sigma)。

作者简介:李 欣(1963-),男,河南省内黄县人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤、白血病化疗的基础研究和临床应用以及Fas/FasL介导的凋亡信号转导途径调控的分子生物学机制方面的研究,发表论文20余篇。电话:(027)87879797-78461

收稿日期:2003-03-16;修回日期:2003-06-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　质粒

全长序列 FLAG-hFIST/HIPK2 cDNA（登录号: AF 208291）、全长序列 Fas、FLAG-TNFR1、c-myc-TRADD、FADD、caspase-8 cDNAs 由 Dr. Hug Hubert (Children's hospital, Ulm University, Germany) 提供。

1.4　抗 hFIST/HIPK2 多肽多克隆抗体的制备

将 hFIST/HIPK2 多肽 H_2N-SSPQRSKRVKENTPPRC-$CONH_2$（氨基酸位点为－819～－835）免疫家兔, 制备多克隆抗体, 制备方法见文献[5]。

1.5　抗体及试剂

用于免疫沉淀(IP)的抗体及试剂为: 鼠抗人 Fas 单抗(AMS Biotechnology Ltd)、羊抗人 caspase-8 多克隆抗体 p20 (T-16)（Santa Cruz)、鼠抗人 TRADD 单抗(Biovision)、兔抗 hFIST/HIPK2-SS 多克隆抗体、Protein A sepharose (琼糖脂)(Pharmacia Biotech)、Protein G plus-agarose (琼糖脂)、Protein A/G plus-agarose (Santa Cruz); 用于 Western Blotting (WB、IB) 的抗体: 兔抗人 Fas 多克隆抗体(c-20)(Santa Cruz)、鼠抗人 FADD 单抗(Pharmingen)、鼠抗人 TRADD 单抗(Biovision)、鼠抗人 FLAG-M2 单抗(Stratagene)、鼠抗 c-myc 单抗、兔抗 hFIST/HIPK2-SS 多克隆抗体。用于检测特异性蛋白带的化学发光剂 ECL 试剂盒(Amersham-Pharmacia Biotech)。

1.6　转染、免疫沉淀和 Western blotting

用磷酸钙沉淀法将全长序列 hFIST/HIPK2 cDNA、全长序列 Fas (CD95/Apo^{-1})、TNFR1、TRADD、FADD、caspase-8 cDNAs 单转染或共转染入 293T 细胞中, 培养 16～20 h 后加入 FasL, 37 ℃培养 2 h 后收集细胞、加入 0.5 ml 细胞裂解液, 取 50 μl 行直接 Western blotting, 继之补充 0.5 ml 细胞裂解液, 加入 4 μg 用于免疫沉淀 (IP) 的抗体, 免疫沉淀后行 SDS-PAGE 电泳, 再行 Western blotting。一抗为用于 Western Blotting (WB、IB) 的抗体(1.5), 二抗为偶联 HRP 的鼠抗 IgG McAb、兔抗 IgG McAb(Santa Cruz), ECL 试剂盒检测特异蛋白带。

2　结果

2.1　hFIST/HIPK2 与 Fas 无相互作用; 在无 FasL 作用时, FADD 与 Fas 有相互作用

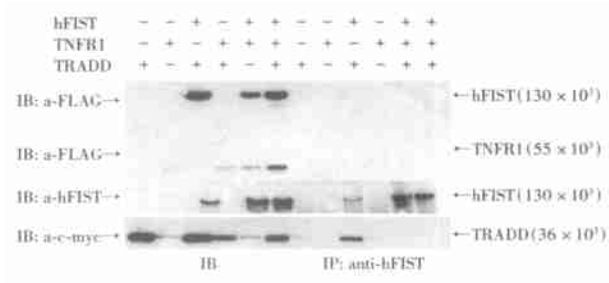
不论在有 FasL 及无 FasL 作用时, 均不能检测到 hFIST/HIPK2 与 Fas 的相互作用; 但在同样的条件下, 均能检测到 FADD 与 Fas 的相互作用。

2.2　hFIST/HIPK2 与 TRADD 有相互作用

在无 FasL 作用时, 我们检测到 hFIST/HIPK2 可与 TRADD 相互作用, 但与 Fas 或 TNFR1 均无相互作用; 同样的条件下, Fas 或 TNFR1 的存在抑制了 hFIST/HIPK2 与 TRADD 的结合, 即在以上 2 个受体蛋白中的一个存在时, TRADD 不能与 hFIST/HIPK2 结合, 见图 1("＋" 示转染了某 cDNA, "－" 示未转染某 cDNA, 下同)。

2.3　Fas 与 TRADD 有相互作用, hFIST/HIPK2 与 FADD、caspase-8 均无相互作用

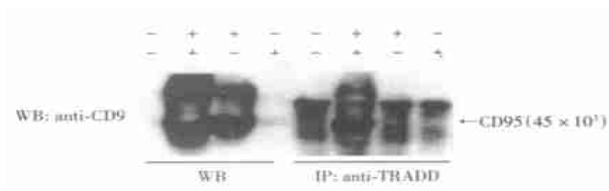
应用共转染技术, 将 TRADD、Fas cDNAs 同时转染 293T 细胞, 用抗 TRADD 抗体作 IP, 用抗 Fas 抗体作 Western blotting, 与既往报道不同的是, 我们检测到分子量为 45×10^3 的 Fas 蛋白, 提示 Fas 可与 TRADD 相互作用, 见图 2。应用共转染技术, 我们发现 hFIST/HIPK2 与 FADD、caspase-8 均无相互作用。



IP: Rabbit polyclonal anti-hFIST/HIPK2-SS antibody. IB: Rabbit polyclonal anti-hFIST/HIPK2-SS antibody (1∶10), rabbit polyclonal anti-Fas antibody (C-20) (1∶1 000) (Santa Cruz), mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (1∶1 000) (Stratagene), mouse monoclonal anti-c-myc antibody (1∶5 000) (Invitrogen)

图 1　**hFIST/HIPK2 可与 TRADD 相互作用, 但与 Fas 或 TNFR1 均无相互作用; 同样的条件下, Fas 或 TNFR1 的存在抑制了 hFIST/HIPK2 与 TRADD 的结合**

Fig 1　hFIST/HIPK2 interacted with TRADD but neither with Fas (CD95/Apo-1) nor with TFR1; Fas (CD95/Apo-1) and TNFR1 interfered with the interaction



IP: Mouse monoclonal anti-human TRADD antibody (1∶200) (Biovision)

图 2　**Fas 可与 TRADD 相互作用**

Fig 2　Fas (CD95/Apo-1) interacted with TRADD

3　讨论

Fas/FasL 信号转导途径是调控凋亡的最重要途径之一。位于 Daxx 蛋白 C-端的一段长 112 个氨基酸残基的片段与位于 Fas 蛋白 C-端的 DD 相互作用, 并激活 ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1, MAPKKK), 继之激活 JNK、p38 MAPK 信号转导途径, JNK 诱发凋亡[2,6,7]。在无 FasL 存在时, FLASH (FLICE-associated huge protein) 蛋白通过其 DED 招募域 (Death-effector-domain recruitment domain, DRD) 与 procaspase-8 结合, 再与 FADD 一起被招募至 Fas 上, 形成一种新型的 DISC, 在其上, 在 FADD 的帮作下, FLASH 蛋白激活 procaspase-8, 从而诱发凋亡[3]。hFIST/HIPK3 可分别与 Fas

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

或FADD 相互作用;但在无 Fas 存在时,hFIST/HIPK3 与FADD 的相互作用较弱;提示在有 Fas 存在时,Fas 可稳定hFIST/HIPK3 与 FADD 的相互作用[4]。

与我们预期结果不同的是[8],hFIST/HIPK2 与死亡因子受体 Fas 或 TNFR1 无相互作用,尽管将 hFIST/HIPK2 通过瞬时转染技术转染至 HeLa 细胞可致细胞死亡。在无 Fas 或 TNFR1 存在时,过度表达的 hFIST/HIPK2 在 293T 细胞中与 TRADD 相互作用,但不与 FADD、caspase-8 相互作用。目前,我们尚无法解释为什么 TRADD 只有在死亡因子受体 Fas 或 TNFR1 不存在时方可与 hFIST/HIPK2 相互作用,可能的原因是由于 Fas 或 TNFR1 与 TRADD 的结合力高于 hFIST/HIPK2 与 TRADD 的结合力,Fas 或 TNFR1 竞争性抑制了 hFIST/HIPK2 与 TRADD 的结合。TNFR1 与 TRADD 的结合是 TNF/TNFR1 介导的凋亡信号转导途径中公认的重要步骤之一[9,10],因此 TRADD 可能在 TNFR1 信号转导途径中发挥作用。

在有 FasL 及无 FasL 作用时,未检测到 FADD 与 Fas 结合的差异性,即 Fas 在无 FasL 作用时也能与 FADD 相互作用;这种无差异性可能是由于 Fas 受体不依赖 FasL 的前装配作用(Pre-assembly)[11,12]。由于过度表达的 TRADD 与过度表达的 Fas 相互作用,TRADD 可能在 Fas/FasL 信号转导途径中发挥作用,提示 TRADD 不仅参与了 TNF/TNFR1 介导的凋亡信号转导途径,也可能参与了 Fas/FasL 介导的凋亡信号转导途径。相应地,hFIST/HIPK2 也可能间接参与了以上 2 个信号转导途径,但其具体作用机制尚有待深入探讨。

最近的研究显示:人 HIPK2 可与 RanBPM(Ran binding protein)相互作用[13];还可与 HMGI(High mobolity group I)蛋白相互作用,该作用是直接通过 HIPK2 的 PEST 域的[14]。HIPK2 还可与 p53 家族中的 p53、p73 相互作用[15~17]:提高了 p53 的转录活性、增加了 P53 蛋白的表达、稳定性,该作用与促进 p53 的 Ser 46 磷酸化及 Lys 382 乙酰化有关。仓鼠 HIPK2 的 PEST 域(氨基酸序列 812~907,相当于人 HIPK2 氨基酸序列 846~941)可与 p73α 的氨基酸序列 345~380、p53 的氨基酸序列 319~360 相互作用[18]。HIPK2 通过以上作用影响细胞周期、细胞生长、增殖与凋亡。

参考文献:

[1] Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm[J]. Science, 2002, 296(5573): 1635-1636.

[2] Yang X, Khosravi-Far R, Chang H Y, *et al*. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis[J]. Cell, 1997, 89(7): 1067-1076.

[3] Imai Y, Kimura T, Murakami A, *et al*. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis [J]. Nature, 1999, 398(6730): 777-785.

[4] Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, *et al*. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation[J]. J Exp Med, 2000, 192(8): 1165-1174.

[5] Li X, Wang Y, Debatin K M, *et al*. The serine/threonine kinase HIPK2 interacts with TRADD, but not with CD95 or TNF-R1 in 293T cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(2): 513-517.

[6] Chang H Y, Nishitoh H, Yang X, *et al*. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx[J]. Science, 1998, 281(5384): 1860-1863.

[7] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, *et al*. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis[J]. Science, 1995, 270(5240): 1326-1331.

[8] 李 欣, 刘 宏, 赵育新, 等. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 hFIST/HIPK2 的表达纯化磷酸化[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(14): 1262-1265.

[9] 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(4): 387-396.

[10] 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(2): 299-308.

[11] Golstein P. FasL binds preassembled Fas[J]. Science, 2000, 288(5475): 2328-2329.

[12] 李 欣, 刘 宏, 赵育新, 等. Fas 蛋白:一种独特的、免疫球蛋白样凋亡相关蛋白[J]. 中国免疫学杂志, 2001, 17(专刊): 28-31.

[13] Wang Y, Marion Schneider E, Li X, *et al*. HIPK2 associates with RanBPM[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 297(1): 148-153.

[14] Pierantoni G M, Fedele M, Pentimalli F, *et al*. High mobility group I (Y) proteins bind HIPK2, a serine-threonine kinase protein which inhibits cell growth[J]. Oncogene, 2001, 20(43): 6132-6141.

[15] Wang Y, Debatin K M, Hug H. HIPK2 overexpression leads to stabilization of p53 protein and increased p53 transcriptional activity by decreasing Mdm2 protein levels[J]. BMC Mol Biol, 2001, 2(1): 8.

[16] Hofmann T G, Moller A, Sirma H, *et al*. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(1): 1-10.

[17] D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, *et al*. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(1): 11-19.

[18] Kim E J, Park J S, Um S J. Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53 family *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2002, 277(35): 32020-32028.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net