

小鼠 Cidea 蛋白 N 端缺失异构体的鉴定和研究 *

张景峰¹⁾ 徐 俐^{1, 2)} 王文珊¹⁾ 李 蓬^{1)**}

(¹⁾ 清华大学生命科学学院, 北京 100084; ²⁾ 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

摘要 Cidea 蛋白调节脂肪代谢, 在机体能量平衡过程中起重要作用, 在转录和翻译后水平受到严格调控, 但在翻译水平的调节还不清楚. 通过对 CIDEA 基因敲除小鼠模型研究, 鉴定了小鼠棕色脂肪组织内源性表达 Cidea 蛋白 N 端缺失异构体 mCidea-22. 定点突变等研究表明其产生机制为选择性起始翻译. 并且, 在异位表达时, N 端缺失异构体和全长异构体的比例呈现细胞系特异性. 此外, 蛋白质稳定性实验表明 mCidea-22 半衰期很短. 亚细胞定位研究显示 mCidea-22 是内质网和脂滴定位蛋白. 为深入理解 Cidea 蛋白的功能和精细调节提供了新的思路 and 方向.

关键词 CIDE, Cidea, 棕色脂肪组织, 选择性翻译, 异构体, 内质网和脂滴定位

学科分类号 Q2, Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00159

CIDE (cell death-inducing DFF45-like effectors) 基因家族最初是由于和 DNA 片段化因子 45(DNA fragmentation factor 45, DFF45)N 端的序列同源性被发现^[1]. 已知在人体中编码 3 种蛋白质: hCidea、hCideb 和 hCide3, 在小鼠中编码 3 种同源蛋白: mCidea、mCideb 和 mFsp27. CIDE 家族蛋白质有高度同源的 N 端 CIDE-N 结构域以及 C 端 CIDE-C 结构域. 最新的研究显示该蛋白质家族在能量平衡的调控中起重要作用^[2].

Cidea 蛋白在小鼠棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)中特异性地高表达^[3], 而在人中则高表达于白色脂肪组织^[4]. CIDEA 基因敲除小鼠具有体瘦的表型, 并能抵抗由高脂食物引发的肥胖症和糖尿病^[5], 而其分子机制可能和基因敲除小鼠 BAT 中 AMP 激活性蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)蛋白含量和酶活性都显著升高有关^[5]. 类似地, 在人体中, Cidea 被报道可以调节脂肪细胞中的脂肪分解^[6], 而 CIDEA 基因 V115F 多态性和肥胖症显示出密切的相关性^[6-7]. 此外, 研究显示, 同 Cideb 和 Fsp27 一样^[8-9], Cidea 定位于内质网和脂滴, 可以促进脂肪细胞中脂滴的增大, 并和胰岛素敏感性密切相关^[10].

Cidea 的表达在多种水平和层次受到严格调控. 在转录水平, CIDEA 基因在小鼠肝脏中受过

氧化物酶体增植物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptors α , PPAR α)和 PPAR γ 的调控, PPAR 的配体可以激活其转录^[11]. 另有文献报道, PPAR γ 辅激活因子 1 α (PPAR gamma coactivator 1 α , PGC-1 α)对 CIDEA 基因的表达起正调控作用, 而这种激活作用同时受到受体相互作用蛋白 140 (receptor interacting protein 140, RIP140)的抑制^[12]. 在人脂肪细胞中, 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)通过激活核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)来下调 CIDEA 基因的表达^[13]. 此外, CIDEA 基因启动子区域 CpG 岛的甲基化被认为对该基因的组织 and 细胞特异性表达有重要作用^[14]. 最新的研究显示, 在乳腺癌、子宫内膜癌等多种癌症组织中 CIDEA 基因启动子的甲基化水平显著升高^[15-16]. 在翻译后水平, Cidea 的蛋白质水平受泛素介导的蛋白酶体降解途径调节, 半衰期很短, 而其主要的泛素化位点位于 N 端^[17]. 然而, 对于 Cidea 蛋白在翻译水平的调控还知之甚少. 有研究曾预测其第 18 位甲硫氨酸为潜在的选择性翻

* 国家自然科学基金资助项目(30925017, 30800555).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62797121, E-mail: li-peng@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2010-03-29, 接受日期: 2010-05-31

译起始位点^[4],但其内源的存在性和具体发生机制还未有任何实验研究证据。

本研究首次鉴定了小鼠棕色脂肪组织中内源组成性地表达 Cidea 蛋白 N 端缺失的异构体,而其产生机制为选择性的起始翻译,并发现不同细胞系异位表达时两种异构体相对表达水平具有差异。同时,本文通过序列比对揭示了选择性翻译位点在哺乳动物中高度的保守性,分析了其进化上潜在的意义。此外,还探究了新异构体的蛋白质稳定性及亚细胞定位。Cidea 蛋白选择性翻译机制的发现和 N 端缺失异构体性质的研究,为探索 Cidea 蛋白在脂滴形成等过程中的作用机制和精细调控提供了新的证据和思路,为解析其在糖尿病、癌症等重大疾病发生发展中所起的作用提供了新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒. 3T3-L1、HEK293T 和 MCF7 细胞系购自美国 ATCC 公司; pEGFP-N1 购自 Clontech 公司; pCMV5 购自 Invitrogen 公司; N 端 HA 标签载体 pCMV5-HA[N]和 C 端 HA 标签载体 pCMV5-HA[C]由清华大学生命科学学院前期构建^[5];质粒测序由 Invitrogen 公司完成。

1.1.2 抗体. 兔抗小鼠 Cidea 抗体为清华大学生命科学学院前期制备^[17](抗原为小鼠 Cidea 蛋白 N 端 172 个氨基酸),鼠抗 HA 抗体、兔抗 GFP 抗体和鼠抗 β -Tubulin 抗体购自 Santa Cruz 公司; Alexa Fluor 568 偶联山羊抗鼠抗体购自 Molecular Probes 公司。

1.1.3 其他试剂及材料. 限制性内切酶购自 NEB 公司; Lipofectamine 2000 和 Hoechst 33342 购自 Invitrogen 公司; Bodipy 493/503 购自 Molecular Probes 公司; 封片剂 Mowiol 4-88 和无脂肪酸的 BSA 购自 Merck 公司; 油酸(oleic acid, OA)和放

线菌酮(cycloheximide, CHX)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物及组织分离. CIDEA 基因敲除小鼠为清华大学生命科学学院制备,其相关饲养、操作以及基因型鉴定方法均同前期报道方法一致^[5],小鼠实验采用的方法和程序均遵循清华大学实验动物委员会相关规定。分离野生型和 CIDEA 敲除的 3 个月雄性小鼠的棕色脂肪组织,匀浆,离心后取上清,获得组织的全蛋白质样品。Bradford 法蛋白质定量,免疫蛋白印迹法检测蛋白质表达。

1.2.2 细胞培养及转染. HEK293T 和 MCF7 细胞培养在含 10% 灭活胎牛血清(四季青公司)的 DMEM 培养基中, 5% CO₂, 湿度 80% 孵育。3T3-L1 细胞培养在含 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)的 DMEM 培养基中, 5% CO₂, 湿度 80% 孵育。HEK293T 细胞用磷酸钙法转染^[18], 3T3-L1 和 MCF7 细胞则采用 lipofectamine 2000 转染试剂,按照产品说明书的方法进行转染。油酸和无脂肪酸的 BSA 以 6:1 的摩尔比混合配制成储液,按需要浓度加入培养基中。

1.2.3 质粒构建. pCMV5-HA-mCidea-24 质粒为清华大学生命科学学院前期构建^[5],是表达 Cidea 全长的质粒。以 pCMV5-HA-mCidea-24 为模板,用 PCR 将小鼠 Cidea-24、Cidea-22 cDNA(第 18 位甲硫氨酸开始的编码序列)分别克隆到 pMD18-T 载体,再酶切连接到真核表达载体 pCMV5 或 pCMV5-HA[C]中,分别获得 pCMV5-mCidea-24、pCMV5-mCidea-22、pCMV5-mCidea-24-HA 和 pCMV5-mCidea-22-HA。突变质粒 pCMV5-mCidea-24 (M¹→L)中点突变直接由 PCR 引物引入, pCMV5-mCidea-24 (M¹⁸→L)用 PCR 扩增突变法分两段经过 PCR 连接后,酶切连入 pCMV5 或 pCMV5-HA[C]载体中。所用 PCR 引物见表 1。

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Product
mCA1F*	GGAATTCACCAATGGAGACCGCCAGG	mCidea-24
mCA2F*	GGAATTCATGGGATTGCAGACTAAG	mCidea-22
mCA2R	GCTCTAGATTACATGAACAGCCTTTGG	mCidea-24、22
mCA-A1TF*	GGAATTCACCATTGGAGACCGC	mCidea-24 (M ¹ →L)
mCA-A52TF	CCTGACATTCTTGGGATTGCAG	mCidea-24 (M ¹⁸ →L)
mCA-A52TR	CTGCAATCCCAAGAATGTCAGG	mCidea-24 (M ¹⁸ →L)
mCA4R	CGGGATCCTTACATGAACAGCCTTTGGTG	mCidea-24 (M ¹ →L、M ¹⁸ →L)

*Four nucleotides before ATG were also included.

1.2.4 免疫印迹分析(Western blot). 组织或细胞蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离后, 湿式电转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗 4℃ 孵育过夜, 经含 0.5% Tween-20 的 PBS(PBST) 洗涤后, 与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 再经 PBST 洗涤后, 用 ECL 化学发光方法检测。

1.2.5 序列比对. 各物种 Cidea 蛋白氨基酸序列及 CIDEA 基因 mRNA 序列提取自 Ensembl 基因组数据库, 其中, 氨基酸序列检索号如下: 人 Human Cidea (ENSP00000320209)、黑猩猩 Chimpanzee Cidea (ENSGALP00000000023)、大猩猩 Orangutan Cidea (ENSPYP00000010087)、猕猴 Macaque Cidea (ENSMUP00000027813)、小鼠 Mouse Cidea (ENSMUSP00000025404)、大鼠 Rat Cidea (ENSRNOP00000024968)、马 Horse Cidea (ENSECAP00000023054)、鸭嘴兽 Platypus Cidea (ENSOANP00000009260)、鸡 Chicken Cidea (ENSGALP00000000023)、斑马鱼 Zebrafish Cidea (ENSXETP00000042627)、爪蟾 *Xenopus* Cidea (ENSXETP00000042627), mRNA 序列检索号如下: 人 Human CIDEA (ENST00000320477)、小鼠 Mouse CIDEA (ENSMUST00000025404)、大鼠 Rat CIDEA (ENSRNOT00000024968), 序列比对分析由 ClustalW2 完成(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)。

1.2.6 蛋白质稳定性检测. pCMV5-mCidea-24 (M¹ → L) 或 pCMV5-mCidea-24 (M¹⁸ → L) 质粒和 pEGFP-N1 质粒共转染进 3T3-L1 细胞中, 24 h 后换新的含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基, 同时添加终浓度为 100 mg/L 的 CHX, 之后在不同的时间点收获细胞, 免疫印迹法检测蛋白质, ImageJ 软件定量分析蛋白质水平。

1.2.7 免疫荧光染色. 转染前一天, 在 6 孔板中种入适量 3T3-L1 细胞, 用 lipofectamine 2000 转染 pCMV5-mCidea-22-HA 和 pEGFP-CB5, 24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞, 4% 多聚甲醛室温固定 1 h, 固定结束后用 PBS 洗涤, 0.4% Triton X-100 通透 30 min, 再用 10% 山羊血清封闭 1 h, 一抗(抗鼠 anti-HA, 1 : 400)室温孵育 2 h, 荧光二抗(Alexa Fluor 568 goat anti-mouse antibody, 1 : 400)室温孵育 1 h, Bodipy 493/503(1 : 100)孵育 30 min, 加入细胞核染料 Hoechst(1 : 10 000) 5 min, 封片。以 Zeiss 200M 倒置显微镜观察, 利用 AxioCam MRm 数码照相机获取图像, 用蔡司公司 Axio Vision 4.5

软件分析处理。

1.2.8 统计分析. 采用 Graphpad Prism 4.0 统计数据并绘图。其中, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 蛋白质稳定性曲线差异显著性计算利用两因素方差分析 (two way ANOVA)。

2 结 果

2.1 小鼠棕色脂肪组织中 Cidea 新异构体的发现

用蛋白质免疫印迹检测野生型和 CIDEA 基因敲除小鼠 BAT 中 Cidea 蛋白表达时意外地发现, 野生型组织中, 除通常观察到的 24 ku 大小 Cidea 蛋白(记为 mCidea-24)表达外^[3], 其下方 22 ku 大小位置还有一个蛋白质表达(记为 mCidea-22)。而在 CIDEA 基因敲除小鼠 BAT 中, 这两种蛋白质均不存在(图 1)。说明其均由 CIDEA 基因编码, 为 Cidea 蛋白不同的异构体。在 293T 细胞中表达含全长 Cidea cDNA 质粒, 会表达同样两种蛋白质, 而表达第二个潜在翻译起始位点(第 18 位甲硫氨酸)开始的 cDNA 质粒时, 则产生一条和上述 mCidea-22 大小一样的蛋白质。说明 Cidea 新异构体 mCidea-22 可能产生于第二个翻译起始位点介导的选择性翻译。

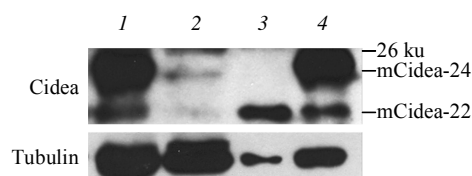


Fig. 1 Mouse brown adipose tissue expressed two isoforms of Cidea

Tissue lysate from brown adipose tissue (BAT) of wild-type or Cidea $-/-$ mouse was probed with rabbit polyclonal antibody against mouse Cidea by Western blot analysis. Plasmid DNAs for pCMV5-mCidea-22 or pCMV5-mCidea-24 were transfected into HEK293T and their expression levels were analyzed. In addition to the major protein band (mCidea-24), a minor protein band (about 22 ku) was detected in wild-type BAT. Both were undetectable in Cidea null mice. The 22 ku Cidea isoform had a similar molecular mass to the protein expressed from pCMV5-mCidea-22, which contained only the second in-frame ATG of Cidea. Tubulin was used as a loading control. Similar experiments were repeated three times. 1: $+/+$ BAT; 2: $-/-$ BAT; 3: pCMV5-mCidea-22; 4: pCMV5-mCidea-24.

2.2 N 端 HA 标签影响 mCidea-22 表达

用蛋白质免疫印迹检测表达 C 端 HA 标签 mCidea-24 cDNA 的 293T 细胞, 同样可以检测到长短两个异构体的表达(图 2), 并且短异构体的大小也同 C 端 HA 标签 mCidea-22 cDNA 所表达蛋白

质一致. 与表达无标签的 mCidea-24 cDNA 相比, HA 标签增加了蛋白质的分子质量. 有趣的是, N 端添加 HA 标签后, 只能检测到 mCidea-24 的表达, mCidea-22 的表达则受到明显抑制.

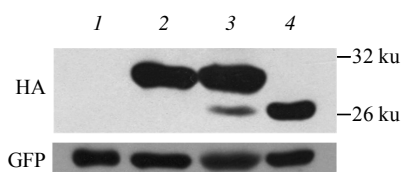


Fig. 2 The influence of the expression of mCidea-22 when HA was tagged at different positions

HA was tagged at either the N (HA-mCidea) or the C-terminus (mCidea-HA) of Cidea and expressed in HEK293T cells. pEGFP-N1 was cotransfected with plasmid DNAs containing HA-mCidea-24, mCidea-24-HA or mCidea-22-HA for a control of transfection efficiency. Expression levels of these constructs were evaluated by Western blot using HA antibody. When HA was tagged in the N-terminal region, no expression of mCidea-22 was detected. On the other hand, when HA was tagged in the C-terminal region of Cidea, mCidea-22 expression was observed. Similar experiments were repeated three times. 1: Vector; 2: HA-mCidea-24; 3: mCidea-24-HA; 4: mCidea-22-HA.

2.3 进化分析

根据进化层次的不同, 选取爪蟾(*Xenopus*)、斑马鱼(zebrafish)、鸡(chicken) 3 种非哺乳类脊椎动物以及鸭嘴兽(platypus)、马(horse)、大鼠(rat)、小鼠(mouse)、猕猴(macaque)、大猩猩(orangutan)、黑猩猩(chimpanzee)和人(human) 8 种哺乳动物, 对各物种 Cidea 蛋白氨基酸序列进行比对, 发现在所选取的 8 种哺乳动物中通常意义的翻译起始位点下游均存在第二个潜在的翻译起始位点(M18), 说明其在哺乳动物中非常保守, 而在 3 种非哺乳类脊椎动物中则不存在对应的下游起始位点(图 3a). 根据 Kozak^[19]的报道, -3 位是嘌呤(A 或 G)同时+4 位是鸟嘌呤(G)时, ATG 起始翻译的能力最强. 将人、小鼠及大鼠中 CIDEA 基因中两个翻译起始位点(ATG₁ 和 ATG₂)的侧翼序列和经典的 Kozak 序列进行比对分析, 发现人源 CIDEA 第一个翻译起始位点为强的翻译起始位点, 而小鼠和大鼠中第一个翻译起始位点为弱的翻译起始位点. 对于第二个翻译起始位点, 3 种生物间保守性很高, 均为弱的翻译起始位点(图 3b).

(a)	Human		MEAARDY.....	AGALIRPLTFMG.	SQTKRVLLFTPLMHPA.	RPF	37	
	Chimpanzee		MEAARDY.....	AGALIRPLTFMG.	SQTKRVLLTPLIHFA.	RPF	37	
	Orangutan		MEAARDY.....	AGALIRPLTFMG.	SQTKRVLLTPLMHPA.	RPF	37	
	Macaque		MEAARDY.....	AGALIRPLTFMG.	SQTKRVLLSPLTHFA.	RPF	37	
	Mouse		METARDY.....	AGALIRPLTFMG.	LQTKKVVLTPLIHFA.	RPF	37	
	Rat		METARDY.....	AGALIRPLTFMG.	LQTKKVVLTPLIHFA.	RPF	37	
	Horse		SEALECPKLT	PQGERGLWAPREWW..	VDLGRASRPLTFMG.	SQTKRVLLTPLMHSS.	RPF	56
	Platypus				LLSVFRPLTFMG.	SQTKKVLFTPLMNPP.	HPF	30
	Chicken					MPAG.	RPF	7
	Zebrafish				TVLDY.....	CGSCYKPKISKSVSSVQTTLAQRMLSP	QRRPY	37
	Xenopus				MQGALDYANALSPKSLIRSV	TNGTSLTRRVLP	PEPPQRF	44
				M1		M18		
				-3	+4			
(b)	Human	(ATG ₁)	CGCGCCATGG	Human	(ATG ₂)	ACATTTATGG		
	Mouse	(ATG ₁)	GCACCAATGG	Mouse	(ATG ₂)	ACATTATGG		
	Rat	(ATG ₁)	ACACCAATGG	Rat	(ATG ₂)	ACATTATGG		
	Kozak		GCCPCCATGG	Kozak		GCCPCCATGG		

Fig. 3 The evolution analysis of potential translation initiation sites in the CIDEA gene

(a) The amino acid sequence alignment of Cidea in the N-terminus in mammalian species including Human (*Homo sapiens*), Chimpanzee (*Pan troglodytes*), Orangutan (*Pongo pygmaeus*), Macaque (*Macaca mulatta*), Mouse (*Mus musculus*), Rat (*Rattus norvegicus*), Horse (*Equus caballus*), Platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) and nonmammalian vertebrates (Chicken (*Gallus gallus*), Zebrafish (*Danio rerio*), *Xenopus tropicalis*). The mammalian Cidea contains an alternative in-frame initiating methionine at position +18 (M18) as indicated in the downstream of the accepted canonical start site, the methionine at position +1(M1), but it was not found in Chicken, Zebrafish and *Xenopus*. (b) Comparison of nucleotide sequences flanking the two initiation codons with conserved Kozak sequences in different mammalian species. Human ATG₁ has uniquely conserved Kozak sequences with purines at -3 position and guanine at +4. The sequences surrounding of the ATG₂ in the mammalian species were highly conserved although they do not match well with the conserved Kozak sequences. Initiation codons are underlined and nucleotides matching the Kozak consensus sequence are shown in bold. Purines (A or G) are denoted by P.

2.4 Cidea 新异构体产生于选择性的起始翻译

利用定点突变，将小鼠 Cidea-24 cDNA 中第一个和第二个 ATG(甲硫氨酸)分别突变成 TTG(亮氨酸)并构建入真核表达载体，产生 mCidea-24 (M¹→L)、mCidea-24(M¹⁸→L)(图 4a)。选择突变成 TTG 是因为有研究显示 TTG 介导翻译起始的能力较低，同时亮氨酸的化学性质与甲硫氨酸比较接近^[20]。测序分析显示了两个突变质粒序列的正确性(图 4b)。在 293T 细胞系中异位表达野生型与不同突变型

mCidea 发现，和野生型 mCidea-24 cDNA 表达相比，在第二个 ATG 的定点突变 mCidea-24(M¹⁸→L)克隆中，mCidea-22 的表达消失；在第一个 ATG 的定点突变 mCidea-24 (M¹→L)克隆因为经典的翻译起始位点被破坏，不再表达 mCidea-24，主要产生 mCidea-22(图 4c)。该定点突变实验充分证明了 mCidea-22 的表达，是由第二个起始翻译密码介导产生的。

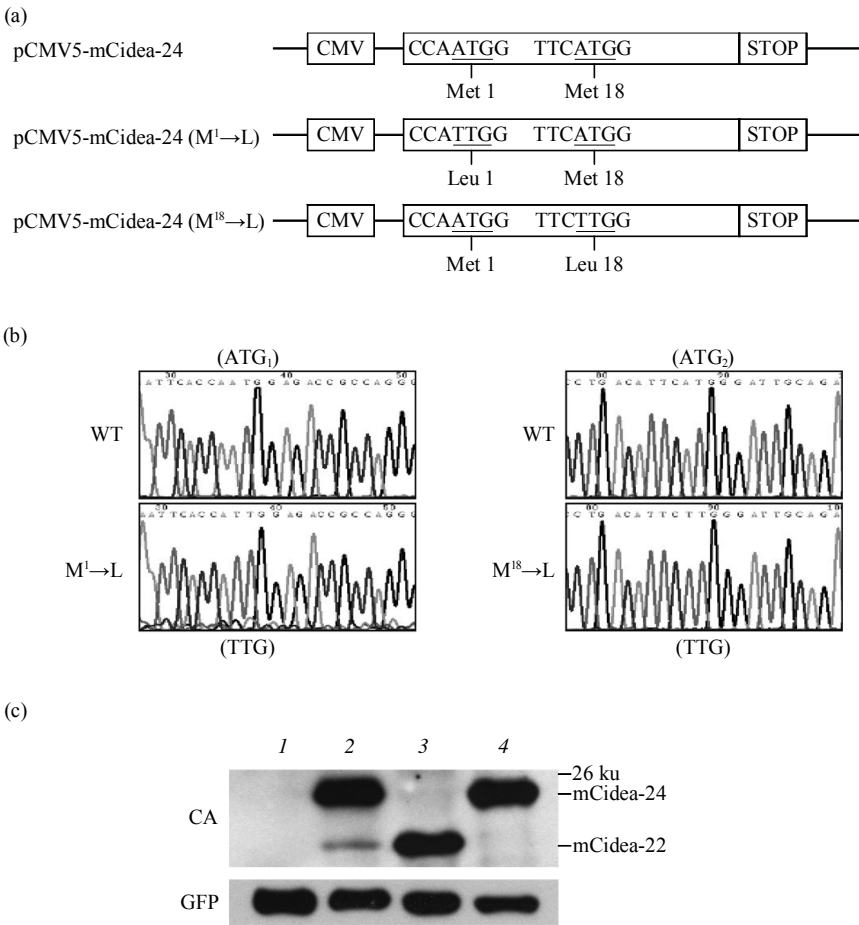


Fig. 4 Mutations at the two ATGs changed the expression pattern of the two isoforms of mCidea

(a) The three expression vectors pCMV5-mCidea-24, pCMV5-mCidea-24 (M¹→L) and pCMV5-mCidea-24 (M¹⁸→L) are schematically presented. The nucleotide sequences surrounding the two in-frame methionine codons of the mouse Cidea cDNA are shown. The first and second ATG are underlined. (b) Nucleotide sequences for the three expression vectors are presented and the nucleotide differences between WT and mutants are highlighted. (c) The expression profile of mCidea when the first and second Methionine were mutated respectively. mCidea-22 production was abolished by the mutation of the 18th Methionine to Leucine (M¹⁸→L). Similarly, the mutation of the first Methionine to Leucine (M¹→L) caused the disappearance of 24 ku protein band and the accumulation of 22 ku protein. Cell lysate expressing empty pCMV5 vector was used as a negative control. 1: Vector; 2: mCidea-24; 3: mCidea-24(M¹→L); 4: mCidea-24(M¹⁸→L).

2.5 Cidea 蛋白不同异构体在不同细胞系中表达比例不同

为了研究 Cidea 蛋白两种异构体功能上的潜

在意义，我们在不同的细胞系中表达无标签 mCidea-24 的 cDNA。免疫印迹结果显示，在人源胚肾细胞系 293T、人源乳腺癌细胞系 MCF7 和鼠

源前脂肪细胞系 3T3-L1 中, 空白对照组均未检测到两种异构体的基础表达, 而实验组均可检测到 24 ku 和 22 ku 两种异构体的表达, 说明了第二个翻译起始位点使用的广泛性. 有趣的是, 在 293T 和 MCF7 细胞系中, mCidea-22 相对 mCidea-24 来说表达水平很低, 而在 3T3-L1 细胞系中, mCidea-22 相对于 mCidea-24 的表达水平有所增加 (图 5).

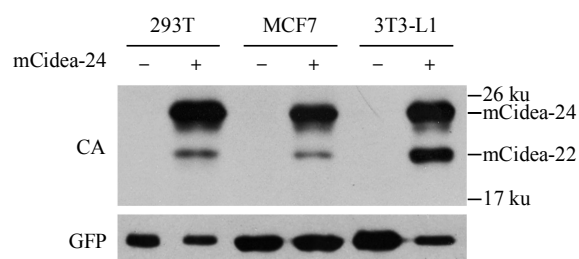


Fig. 5 Relative expression level of Cidea isoforms in different cell lines

293T, MCF7 and 3T3-L1 preadipocyte were co-transfected with pCMV5-mCidea-24 and pEGFP-N1 (as a control for transfection efficiency). The mouse Cidea-24 and Cidea-22 were expressed in all three cell lines, but high expression of mCidea-22 was observed in 3T3-L1 preadipocytes. Cell lysate expressing empty pCMV5 vector was used as a negative control.

2.6 mCidea-22 蛋白稳定性较差

在 3T3-L1 前脂肪细胞中表达 C 端带 HA 标签的 mCidea-24 ($M^{18} \rightarrow L$) 和 mCidea-24 ($M^1 \rightarrow L$), 24 h 后加入放线菌酮抑制蛋白质合成, 不同时间后检测 mCidea 异构体降解情况. 从图 6 可以看出, 两种异构体稳定性均较差, 和 mCidea-24 相比, mCidea-22 的蛋白质稳定性无显著变化.

2.7 mCidea-22 定位于内质网和脂滴

在不加油酸诱导脂滴形成的条件下, 共转 HA 标签的 mCidea-22 和 GFP 标签的 CB5 蛋白到 3T3-L1 细胞中, 免疫荧光染色结果显示, mCidea-22 在细胞质中定位于网状结构, 并和内质网标志蛋白 CB5 有很好的共定位, 说明其具有内质网定位. 而在油酸处理的条件下, 用脂滴特异性染料 Bodipy 493/503 染色可以发现 3T3-L1 细胞中会形成比较大的脂滴, 同时可以观察到 mCidea-22 在脂滴周围形成清晰的环状分布, 说明其具有脂滴定位能力 (图 7). 两种条件下平行实验中空载体的染色结果表明, 免疫荧光特异性显示 mCidea-22 蛋白.

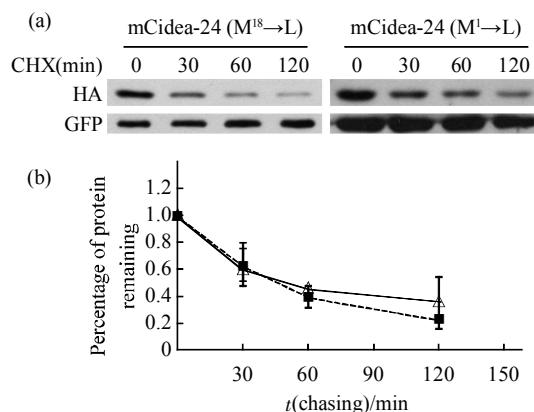


Fig. 6 Protein stability of mCidea isoforms

(a) Protein stability was evaluated by a cycloheximide (CHX, 100 mg/L) chasing experiment. CHX was added to the culture medium of 3T3-L1 cells that had been transfected with pCMV5-mCidea-24 ($M^{18} \rightarrow L$)-HA or pCMV5-mCidea-24 ($M^1 \rightarrow L$)-HA for 24 h. Cells were harvested at 0, 30, 60 or 120 min after the addition of CHX. Cidea protein level was evaluated by Western blot using an antibody against HA. Both isoforms had a short half-life and degraded fast. GFP was used as a transfection control. (b) Quantitative analysis of the Cidea isoform level in (a) using ImageJ software. Results are expressed as the percentage of the signal of HA compared with that of GFP. The ratio was set to 100% at zero time. The results shown are representative of three independent experiments. $\Delta-\Delta$: mCidea-24 ($M^1 \rightarrow L$); $\blacksquare-\blacksquare$: mCidea-24 ($M^{18} \rightarrow L$).

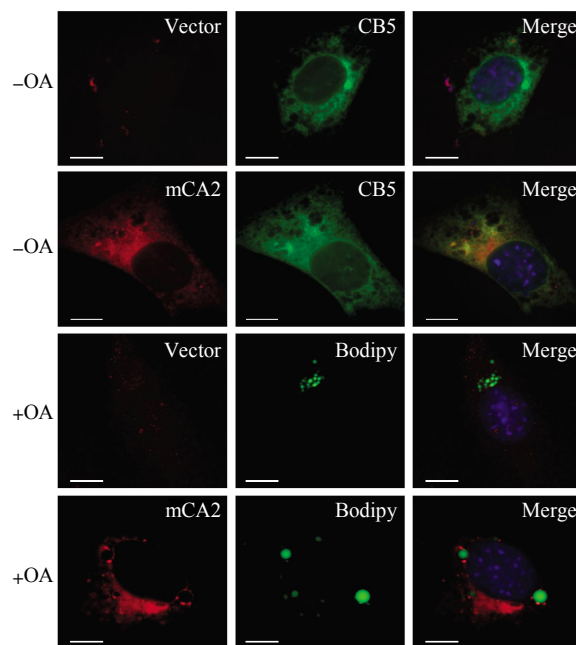


Fig. 7 Sub-cellular localization of mCidea-22 in 3T3-L1 cells

The sub-cellular localization of mCidea-22 in the absence (upper panel) or presence (lower panel) of oleic acids (OA). mCidea-22 had a similar sub-cellular distribution pattern to that of CB5, a ER specific protein in the absence of OA. pCMV5-mCidea-22-HA and GFP-CB5 (cytochrome B5) were cotransfected into 3T3-L1 preadipocytes. In the presence of OA, mCidea-22 (Red) was localized to lipid droplets (LDs, green, stained by Bodipy). Vector was used as a negative control for the specificity of immunostaining. Scale bar: 10 μ m.

3 讨 论

目前研究最广泛的小鼠 Cidea 蛋白异构体是 mCidea-24, 由全长 mRNA 编码. 本研究中我们第一次发现了小鼠棕色脂肪组织除表达 mCidea-24 之外, 还组成性地表达 Cidea 蛋白异构体 mCidea-22 (图 1). 蛋白质异构体的产生有多种可能的机制, 如选择性剪切、选择性翻译、蛋白酶切等. 前期研究在小鼠棕色脂肪组织中仅检测到一条 CIDEA 基因转录本^[1], 且基因序列分析没有发现可编码蛋白的选择性剪切位点(结果未给出). 此外, 放线菌酮处理表达全长 cDNA 细胞时未发现短异构体相对水平随时间的增加而提高, 用不含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液收获细胞也未观察到短异构体的蛋白质水平因蛋白水解而增加, 不支持蛋白酶切机制(结果未给出). 而过表达实验中, HA 标签添加位置对 mCidea-24 表达没有影响, 添加在 N 端则抑制 mCidea-22 的表达(图 2), 暗示 mCidea-22 的产生很有可能源于核糖体遗漏滑动(leaky scanning)产生的选择性翻译起始, N 端 HA 标签所增加的长度大大减小了遗漏滑动至下游翻译起始位点的可能性^[21]. 进一步的翻译起始位点突变实验结果则为选择性翻译机制的采用提供了强有力的证据支持(图 4). 虽然过去通常认为, 真核生物每种 mRNA 只使用一个翻译起始位点, 但越来越多选择性翻译起始的例子被发现, 而且研究发现, 起调节作用的蛋白质经常会采用这一机制来产生具有不同功能的蛋白质^[22]. 作为脂滴形成和脂类代谢过程重要的调节因子, Cidea 蛋白的选择性翻译也很有可能具有同样的目的和意义.

进化分析报道 CIDE 蛋白仅发现于脊椎动物中. 与同家族的其他成员相比, Cidea 蛋白出现得最晚, 且只高表达于棕色脂肪组织等哺乳动物特有组织中, 显示出其进化上功能的特殊性^[23]. 根据本文序列比对结果, 小鼠中第二个翻译起始位点在哺乳动物中高度保守, 而且有趣的是, 其保守程度甚至超过了第一个翻译起始位点(如在最原始哺乳动物之一鸭嘴兽中(图 3)), 暗示其可能在第一个翻译起始位点被采用前即已出现. N 端 17 个氨基酸只出现在高等哺乳动物中的结果, 提示了这一结构域在高等哺乳动物中的特殊作用, 而缺少这一结构域的 mCidea-22 在进化上也得以保留, 说明在哺乳动物进化过程中 Cidea 蛋白自身也可能存在着功能上的分化. 因此, 全长 mCidea-24 和 N 端缺失的

mCidea-22 两种异构体之间比例的变化可能对于相关过程至关重要. 与之相符的是, 在不同细胞系中过表达全长 mCidea cDNA 时, mCidea-22 的相对表达水平呈现细胞系特异性. 而蛋白质稳定性实验表明, mCidea-22 蛋白稳定性较差, 但和 mCidea-24 相比, 无显著差异, 所以可以推测, 不同的细胞环境和功能诉求可能通过调节两种蛋白质的翻译效率来实现其差异表达.

我们发现 mCidea-22 也是一个脂滴定位蛋白. 和 mCidea-24 相比, 缺少 N 端 17 个氨基酸不影响其内质网和脂滴的定位, 说明其定位信号位于两者共有的结构域. 而根据其亚细胞定位, 可以推测其在脂滴形成等过程中可能也扮演着重要角色. 而 mCidea-22 是否和 mCidea-24 同样具有促进脂滴体积增大的功能, 将是需要进一步研究的问题.

mCidea-22 作为我们首次鉴定的 Cidea 的异构体, 比较了其与全长 Cidea 蛋白的特性, 发现它们有相似的定位及蛋白质稳定性. 但是 mCidea-22 独特的生理功能, 包括其在脂肪代谢与脂滴形成中的作用, 需要进一步研究与探索. 另外, 最新的研究显示, CIDEA 基因表达的下调可能和多种癌症的发生密切相关, 但具体的分子机制仍不清楚. mCidea-22 作为新鉴定的异构体, 是否在癌症发生中起作用, 也是值得思考的问题. 总之, 小鼠 Cidea 蛋白具有不同起始翻译位点介导产生的异构体, 该发现为研究 Cidea 蛋白的功能提供了新的方向, 两种异构体的相互平衡及协调也为 Cidea 蛋白功能的精细调节提供了新的层次, 对该蛋白质的研究具有重要的参考意义.

参 考 文 献

- [1] Inohara N, Koseki T, Chen S, *et al.* CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J*, 1998, **17**(9): 2526-2533
- [2] Gong J, Sun Z, Li P. CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol*, 2009, **20**(2): 121-126
- [3] Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, *et al.* Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet*, 2003, **35**(1): 49-56
- [4] Nordstrom E A, Ryden M, Backlund E C, *et al.* A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor- α)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes*, 2005, **54**(6): 1726-1734
- [5] Qi J, Gong J, Zhao T, *et al.* Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J*, 2008, **27**(11): 1537-1548

- [6] Dahlman I, Kaaman M, Jiao H, *et al.* The CIDEA gene V115F polymorphism is associated with obesity in Swedish subjects. *Diabetes*, 2005, **54**(10): 3032–3034
- [7] Zhang L, Miyaki K, Nakayama T, *et al.* Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (CIDEA) gene V115F (G->T) polymorphism is associated with phenotypes of metabolic syndrome in Japanese men. *Metabolism*, 2008, **57**(4): 502–505
- [8] Ye J, Li J Z, Liu Y, *et al.* Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab*, 2009, **9**(2): 177–190
- [9] Puri V, Konda S, Ranjit S, *et al.* Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem*, 2007, **283**(21): 34213–34218
- [10] Puri V, Ranjit S, Konda S, *et al.* Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(22): 7833–7838
- [11] Viswakarma N, Yu S, Naik S, *et al.* Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma. *J Biol Chem*, 2007, **282**(25): 18613–18624
- [12] Hallberg M, Morganstein D L, Kiskinis E, *et al.* A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(22): 6785–6795
- [13] Pettersson A T, Laurencikiene J, Nordstrom E A, *et al.* Characterization of the human CIDEA promoter in fat cells. *Int J Obes (Lond)*, 2008, **32**(9): 1380–1387
- [14] Li D, Da L, Tang H, *et al.* CpG methylation plays a vital role in determining tissue- and cell-specific expression of the human cell-death-inducing DFF45-like effector A gene through the regulation of Sp1/Sp3 binding. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(1): 330–341
- [15] Hill V K, Hesson L B, Dansranjav T, *et al.* Identification of 5 novel genes methylated in breast and other epithelial cancers. *Mol Cancer*, 2010, **9**(1): 51
- [16] Huang Y W, Luo J, Weng Y I, *et al.* Promoter hypermethylation of CIDEA, HAAO and RXFP3 associated with microsatellite instability in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*, 2010, **117**(2): 239–247
- [17] Chan S C, Lin S C, Li P. Regulation of Cidea protein stability by the ubiquitin-mediated proteasomal degradation pathway. *Biochem J*, 2007, **408**(2): 259–266
- [18] Kingston R E, Chen C A, Rose J K. Calcium phosphate transfection//Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Curr Protoc Mol Biol*. Somerset: John Wiley and Sons, 2003: Unit 9.1
- [19] Kozak M. An analysis of 5' -noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15** (20): 8125–8148
- [20] Peabody D S. Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J Biol Chem*, 1989, **264**(9): 5031–5035
- [21] Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 2002, **299**(1–2): 1–34
- [22] Kochetov A V. Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *Bioessays*, 2008, **30**(7): 683–691
- [23] Wu C, Zhang Y, Sun Z, *et al.* Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence. *BMC Evol Biol*, 2008, **8**: 159

Identification and Characterization of a Novel Mouse Cidea N-terminal Truncated Isoform*

ZHANG Jing-Feng¹⁾, XU Li^{1,2)}, WANG Wen-Shan¹⁾, LI Peng^{1)**}

¹⁾ School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ College of Life Science and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

Abstract Metabolic diseases including obesity and diabetes are emerging as major health threats over the world. Cidea, a member of CIDE family proteins, plays an important role in energy homeostasis in brown adipose tissue by regulating lipid storage and AMPK stability. Cidea is tightly regulated at both transcriptional and posttranslational levels, but little is known about its translational regulation. Here, a novel N-terminal truncated isoform of Cidea (mCidea-22) was identified in mouse brown adipose tissue. Using mutational analysis, it was demonstrated that this isoform was generated by alternative translation. Ectopic expression of mCidea cDNA in various cell lines showed that expression of mCidea-22 was cell type specific with its highest expression in preadipocyte 3T3-L1 cells. In addition, it was observed that mCidea-22 had a short half-life and was localized to ER and lipid droplets. Taken together, the data provide strong evidence that translational control played an important role in the regulation of Cidea expression.

Key words cell death-inducing DFF45-like effector (CIDE), Cidea, brown adipose tissue, alternative translation, isoform, endoplasmic reticulum(ER) and lipid droplet localization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00159

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30925017, 30800555).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62797121, E-mail: li-peng@mail.tsinghua.edu.cn

Received: March 29, 2010 Accepted: May 31, 2010