

利用条件基因沉默系统研究 CHIP 对 TGF- β 信号通路的调控*

商 瑜 徐夏莲 辛 宏 常智杰**

(清华大学医学院, 清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 根据条件基因敲除技术和基因沉默的理论, 构建了可被 CRE 操控的条件基因沉默系统, 并应用其研究分子伴侣相互作用蛋白 CHIP(C-terminus of Hsc70-interacting protein)对 TGF- β 信号通路的调控. RT-PCR 和免疫印迹结果显示, pLoxP/CHIPi 与 CRE 相互作用后, 可以有效地降低内源 CHIP 的 mRNA 水平, 减少外源和内源 CHIP 的蛋白质量. 荧光素酶报告系统分析表明, 条件基因沉默能解除 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制性调控, 增强 TGF- β 信号通路的转录活性. 结果表明, CRE 依赖的条件基因沉默系统具有高效性、特异性, 并通过它反向验证了 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制性调控, 为进一步研究与 CHIP 相关的 TGF- β 信号通路所致疾病的发生机理提供了有效工具.

关键词 条件基因沉默, CHIP, TGF- β , 抑制性调控

学科分类号 R31, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00779

条件基因敲除(condition knockout)技术是近年来发展迅速的研究基因功能的有力方法. 它基于胚胎干细胞的基因打靶技术和同源重组技术, 结合 CRE-LoxP 或 FLP-*frt* 的系统^[1,2]来获得靶基因在某一组织器官或发育时期上缺失的基因敲除小鼠, 完成了从时间和空间上对靶基因表达的准确控制. CRE 酶是一种分子质量为 38 ku 的重组酶, 可以识别 LoxP 位点, 通过重组可删除 2 个同向 LoxP 位点之间的靶基因, 反转 2 个反向 LoxP 位点之间的靶基因, 或使各带 1 个 LoxP 的环状 DNA 整合为一个环状 DNA. 该作用不需要其他酶或者蛋白质的参与, 其对底物的构象要求不严格.

RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA(dsRNA)引起的转录后基因沉默机制^[3~5]. 这种具有干涉基因表达的双链 RNA 被称为 siRNA. RNAi 作为一门新的基因沉默技术, 具有序列特异性和高效性等许多优点. 目前, 可以表达 siRNA 的真核载体系统已被广泛应用^[6~8], 这种真核载体系统可以持续稳定地产生 siRNA, 从而引发 RNA 干涉效应, 引起靶基因的沉默.

CHIP (C-terminal hsc70 interacting protein) 是 1999 年 Cam Patterson 研究小组发现的能够和 Hsc70

相互作用的蛋白质^[9]. 随后研究表明, CHIP 可以作为 E3 泛素连接酶通过泛素化途径降解很多与分子伴侣有关的底物, 诸如 CFTR^[10]、ErbB2^[11,12]、Parkin^[13]等. 我们的前期工作首次揭示了 CHIP 可以通过泛素化过程来降解 Smad 蛋白^[14,15], 从而特异性地抑制 TGF- β 信号通路的活化^[16,17]. 最近, 我们还发现 CHIP 能够和 Runx2 相结合, 从而调控成骨细胞的分化^[18].

为了进一步研究 CHIP 的体内功能, 我们希望建立可调控的抑制 CHIP 表达的系统. 本文将条件基因敲除技术引入到基因沉默领域, 成功构建了可以通过 CRE 操控的 CHIP 基因沉默系统. 我们将所构建的系统应用于 TGF- β 信号通路的活性抑制研究中, 发现该系统能够良好地特异地抑制 TGF- β 信号通路.

* 清华大学裕元基金项目(20240005-06)和国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB910102, 2002CB513007).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62785076, Fax: 010-62773624, E-mail: zhijie@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2008-11-13, 接受日期: 2009-01-09

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞. pBS/U6/CHIPi 为本实验室构建; pBSsk/LoxP-neo-LoxP, pBS/Cre, pRK1M/Myc-CHIP 为本实验室保存; pBS/U6 为哈佛大学医学院施扬博士惠赠; (CAGA)₁₂-Lux 为美国 Duke 大学王小凡教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 α , 293T(人胚肾上皮细胞), P19(小鼠畸胎瘤细胞)及已整合响应 TGF- β 荧光素酶报告基因 (CAGA)₁₂-Lux 的 Mv1Lu(貂肺上皮细胞) 稳定细胞系皆为本实验室保存. 细胞于 10%胎牛血清(FBS, Gibco)的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 温箱中培养. Mv1Lu/(CAGA)₁₂-Lux 需培养在含有 0.5 g/L G418 的上述培养液中.

1.1.2 试剂. 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Klenow Fragment、CIP 购自 NEB 公司; 胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; Vigorous 转染试剂购自 VigoFect 公司; 电转移系统为 BioRad 产品; c-Myc、EGFP 抗体为 StanCruze 产品; 免疫印迹所用二抗及 ECF 增强发光系统均为 Amersham Pharmacia Biotech 产品; 一步法 RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司; Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System 购自 Promega 公司; TGF- β 1 为 R&D 公司产品; 其他试剂均为进口或国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 pLoxP/CHIPi 的构建. 将 pBS/U6/CHIPi 用限制性内切酶 *Hind* III 进行消化, 利用 Klenow Fragment 的 5'~3' DNA 聚合酶活性, 沿 5'~3' 方向合成与模板互补的 DNA(25 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 75 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后终止反应), 从而使末端平端化. 然后将产物用 CIP 处理, 去磷酸化. 同时, 用限制性内切酶 *Bgl* II 消化 pBSsk/LoxP-neo-LoxP, 得到 *Bgl* II -LoxP-neo-LoxP-*Bgl* II 片段, 同样用 Klenow Fragment 处理, 得到其末端平端化的产物. 将二者在 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 转化连接产物. 根据插入外源片段上的特异酶切位点(*Eco*R I, *Xba* I)进行正确克隆的筛选鉴定, 得到 pLoxP/CHIPi.

1.2.2 细胞 RNA 的提取和 RT-PCR. P19 细胞按设计方案转染 48 h 后, 用 TRIzol RNA 提取试剂 (GIBCO)提取总 RNA. 具体方法参照说明书. 检测 RNA A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.85~2.0 之间以用于下一步 RT-PCR. 采用一步法 RT-PCR 试剂盒, 以基因

特异性引物进行 PCR, 以 β -actin 为内参照. 反应所需引物如下: CHIP 正义, 5' TGATAAGAGCCC-GAGTGC 3'; CHIP 反义, 5' CAAGTGGGTTCC-GAGTGAT 3'. β -actin 正义, 5' CAAGAGATGGC-CACGGCTGCT 3'; β -actin 反义, 5' TCCTT-CTGCTCC GTCGGCA 3'. 反应条件如下: 50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 为一个循环, 重复 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 扩增反应在 PE 公司 9600 型 PCR 仪上进行. 产物以含溴化乙锭的 3%琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 免疫印迹(Western blot). 利用 Vigorous 转染试剂将总量为 4 μ g 的 DNA(Myc-CHIP 或 EGFP 和 pBS/U6/CHIPi 或者 pLoxP/CHIPi 和 pBS/Cre)共转染至 6 孔板培养的 293T 或 P19 细胞中, 具体操作按说明书进行. 其中 EGFP 80 ng, CHIP 与 pBS/U6/CHIPi 质粒比例为 1:10~1:40, 同时以空载体平衡质粒总量. 48 h 后收获细胞, 全细胞裂解液 (400 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10% 甘油, 1 mmol/L PMSF, 0.5% NP-40, proteasome inhibitors)裂解. 定量样本加入 2 $\times$ 样品缓冲液经 SDS-PAGE 分离, 蛋白质电转移至 PVDF 膜, 8%脱脂奶粉封闭, anti-Myc 或 anti-CHIP 温育. 程序按 Amersham Pharmacia Biotech 提供条件进行. ECF 增强发光显色, 蛋白质印迹经 Molecular Dynamics Storm Model 860 (Pharmacia)扫描记录.

1.2.4 荧光素酶报告分析(luciferase assay). 根据实验设计组别, 以 Vigorous 转染培养于 12 孔板中的 (CAGA)₁₂-Lux-Mv1Lu 细胞, 24 h 后, 加入 TGF- β 1(7.5 μ g/L), 继续培养 18 h, 收获细胞每孔加入 150 μ l 细胞裂解液, 室温轻微振荡 15 min. 在荧光素酶报告分析仪(TopCount)专用检测板的每个孔中加入 30 μ l 荧光素酶催化底物, 再加入 10 μ l 上述细胞裂解物, 混匀, 测定荧光素酶活性. 每次试验重复 3 次, 所有数据都经过双报告系统的内参 (pTK-RL)校正后进行统计学分析.

2 结 果

2.1 pLoxP/CHIPi 的构建

以 pBS/U6/CHIPi 为模板, 将左右带有同向 LoxP 的 neomycin 序列 LoxP-neo-LoxP 成功插入到正义和反义位点之间, 得到质粒 pLoxP/CHIPi, 克隆流程示意图如图 1 所示. 根据 neo 基因上带有

EcoR I 酶切位点, 而质粒 pBS/U6/CHIPi 上面缺失 *EcoR* I 位点, 当大小约为 1.7 kb 的 LoxP-neo-LoxP 片段成功连入到 3.2 kb 的 pBS/U6/CHIPi 载体时, 该质粒可以被 *EcoR* I 线性化, 并且大小约为 4.9 kb (图 2a 泳道 2). 同时, 因为 neo 基因和质粒 pBS/U6/CHIPi 上分别带有 *Xba* I 酶切位点, 当 LoxP-neo-LoxP 片段正向插入到 pBS/U6/CHIPi

时, 该质粒被 *Xba* I 酶切后, 出现 2.0 kb 和 2.9 kb 两个片段(图 2a 泳道 3), 未成功连接时, 只能被线性化, 相应出现单一片段. 上述结果证明, 我们成功构建了质粒 pLoxP/CHIPi, 并且 LoxP-neo-LoxP 片段是正向插入的.

2.2 pLoxP/CHIPi 与 CRE 重组酶相互作用后可以特异性地抑制外源 CHIP 蛋白的表达

为了验证所构建的 pLoxP/CHIPi 质粒在 CRE 存在下能够产生特异基因沉默, 我们将其与带 Myc 标签的真核细胞表达质粒 Myc-CHIP 和 pBS/Cre 质粒共转染 293T 细胞. 免疫印迹分析结果表明, 单独转染 Myc-CHIP 可引起胞内 Myc-CHIP 的高表达(图 3 第 1 排第 1 行), 转染我们以前构建的 pBS/U6/CHIPi 质粒可使细胞内 Myc-CHIP 蛋白表达显著降低(图 3 第 1 排第 2 行). 转染 pLoxP/CHIPi 或 pBS/Cre 后, 细胞内 Myc-CHIP 蛋白表达均未受影响(图 3 第 1 排第 3 行, 第 5 行), 而当同时转染 pLoxP/CHIPi 和 pBS/Cre 后, 则细胞内 Myc-CHIP 蛋白表达显著降低(图 3 第 1 排第 4 行), 其水平比一般 siRNA 质粒(pBS/U6/CHIPi)所引起的降低程度还明显. 以上结果说明 CRE 能够调控 pLoxP/CHIPi 从而引起 Myc-CHIP 表达水平降低.

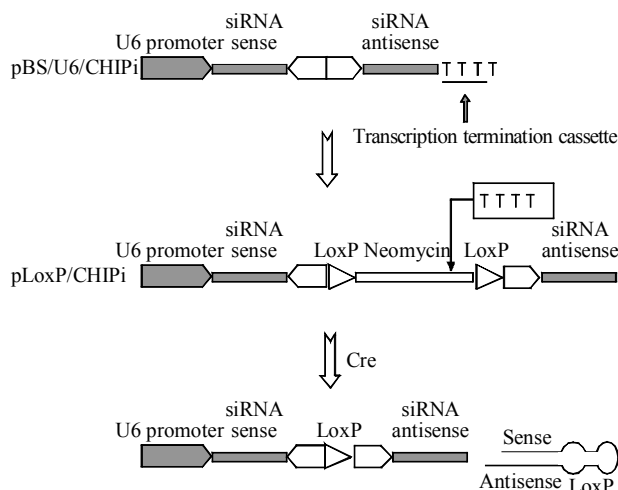


Fig. 1 Construction strategy of pLoxP/CHIPi

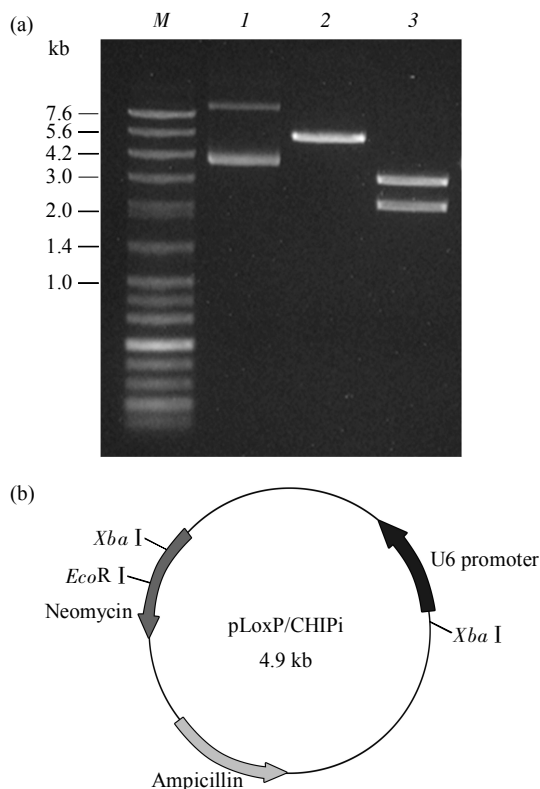


Fig. 2 Identification of pLoxP/CHIPi by restriction enzyme

(a) 1: DNA marker; 2: Plasmid of pLoxP/CHIPi; 3: Digested products of pLoxP/CHIPi with *EcoR* I; 4: Digested products of pLoxP/CHIPi with *Xba* I. (b) The map of plasmid pLoxP/CHIPi.

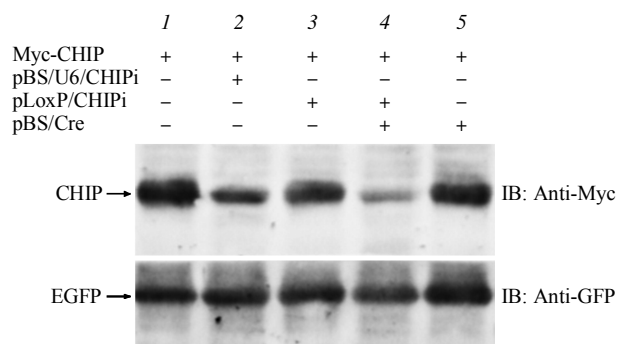


Fig. 3 pLoxP/CHIPi with CRE could silence CHIP expression in transiently transfected cells

293T cells were transfected with the indicated vectors, and extracts were analysed 48 h later by Western blot using anti-Myc or anti-GFP antibodies.

2.3 pLoxP/CHIPi 与 CRE 重组酶相互作用后降低了内源 CHIP mRNA 水平, 并特异性地抑制内源 CHIP 蛋白的表达

为了进一步说明 pLoxP/CHIPi 与 CRE 相互作用后可以有效地使内源 CHIP 基因沉默, 我们在 P19 细胞上共转染了 pLoxP/CHIPi 和 pBS/Cre 的质

粒. 通过 RT-PCR 的方法检测内源 CHIP mRNA 水平的变化. 结果发现, 当分别单转染 pBS/U6 或 pLoxP/CHIPi 或 pBS/Cre 时, CHIP 的 mRNA 水平没有大的差异(图 4a 第 1 排第 1、2、4 行对比), 说明这些质粒单独作用都不会引起 CHIP mRNA 水平的变化; 当将 pLoxP/CHIPi 和 pBS/Cre 共转后, CHIP 的 mRNA 水平显著下降(图 4a 第 1 排第 3 行对比 1、2、4 行), 而作为内参 β -actin 的 mRNA 水平不受影响(图 4a 第 2 排). 这些结果说明 pLoxP/CHIPi 与 CRE 相互作用后可以特异性地降低内源 CHIP mRNA 的水平. 我们利用免疫印迹实验重复以上结果, 发现共转染 pLoxP/CHIPi 和 pBS/Cre 后, 内源 CHIP 蛋白量也显著降低(图 4b 第 1 排), 而 β -actin 蛋白量没有显著变化(图 4b 第 2 排).

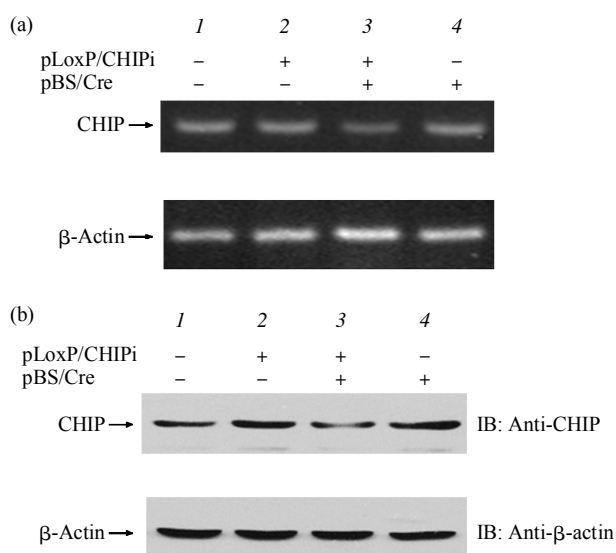


Fig. 4 pLoxP/CHIPi with CRE could inhibit endogenous CHIP

P19 cells were transfected with the indicated vectors, and extracts were analyzed 48 h later. (a) RT-PCR showing pLoxP/CHIPi with CRE could decrease the mRNA level of endogenous CHIP. (b) Western blot showing pLoxP/CHIPi with CRE could inhibit endogenous CHIP protein expression.

2.4 pLoxP/CHIPi 与 CRE 重组酶相互作用后可以有效拮抗外转 CHIP 引起的对 TGF- β 信号通路的抑制

本实验小组已经报道过 CHIP 可以与 TGF- β 信号转导途径中的重要成员 Smad 蛋白相结合, 并对 Smads 介导的基因转录活性有抑制作用^[14, 16]. 我们采用了高灵敏度的荧光素酶报告分析实验, 来验证

pLoxP/CHIPi 对于 Smads 介导的基因转录活性是否有影响. (CAGA)₁₂-Luc 是响应 TGF- β 的报告系统, 其启动子上含有 12 个重复的 Smads 结合的核苷酸序列, 下游含有荧光素酶报告基因(图 5a). TGF- β 信号通路的活化可以高效启动该系统, 引起下游荧光素酶基因的表达. (CAGA)₁₂-Luc-Mv1Lu 细胞已稳定整合了该报告基因, 持续激活的 TGF- β RI (T204D)可诱导该荧光素酶活性显著升高. 实验结果表明, 过量表达 CHIP 能明显抑制 TGF- β RI (T204D)对该荧光素酶报告系统的激活, 当 pLoxP/CHIPi 与 pBS/Cre 共转染时, TGF- β RI (T204D)激活荧光素酶报告系统的活性得到了恢复, 说明共转质粒可以有效地拮抗 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制作用(图 5b 5 与 3 比较).

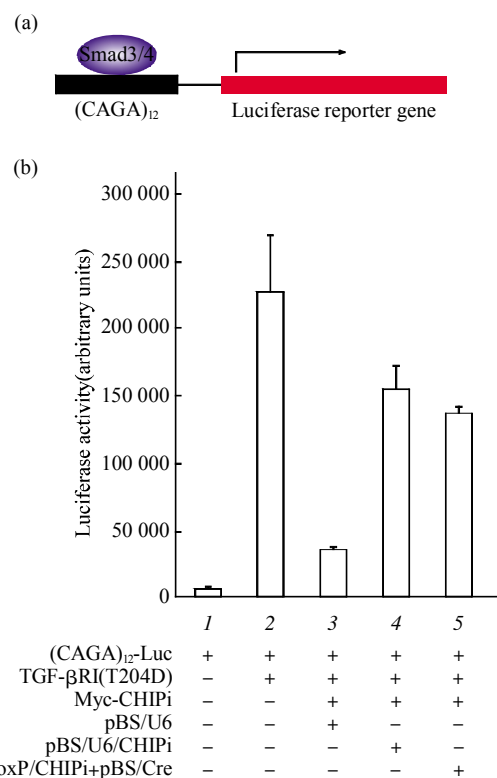


Fig. 5 pLoxP/CHIPi with CRE could reverse transcriptional inhibition induced by CHIP

(CAGA)₁₂-Luc-Mv1Lu cells were transfected with the indicated vectors, and extracts were analyzed 48 h later. (a) Diagram of Smad3/4 response luciferase reporter system. (b) pLoxP/CHIPi with CRE facilitates the transcriptional activities induced by a constitutively active TGF- β receptor.

2.5 pLoxP/CHIPi 与 CRE 重组酶相互作用后可以促进 TGF- β 信号通路转录活性

我们拟检测 CRE 控制的 pLoxP/CHIPi 能否对 TGF- β 信号通路产生影响. 利用荧光素酶报告系

统发现, 在 TGF- β 1 刺激下, 下游荧光素酶活性较本底升高了约 15 倍(图 6 1 与 2 比较); 进而共转染 pLoxP/CHIPi 和 pBS/Cre 后, 荧光素酶活性较单纯 TGF- β 1 刺激组又升高了约 4 倍(图 6 中 5 与 2 比较), 是本底水平的 60 倍; 而同时共转染 pLoxP/CHIPi 或 pBS/Cre, 荧光素酶活性没有显著变化(图 6 中 3, 4 与 2 比较). 上述结果表明, CRE 重组酶与 pLoxP/CHIPi 共同作用下可以有效地封闭内源 CHIP 的表达, 从而达到解除 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制作用. 这些结果, 反向验证了 CHIP 对 TGF- β 信号途径的抑制性调节作用.

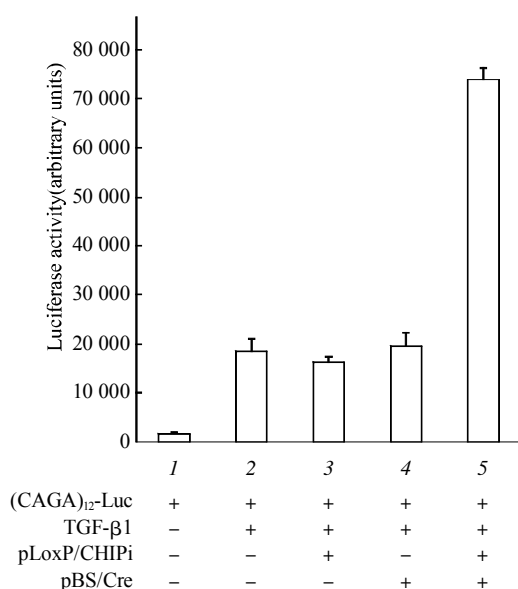


Fig. 6 pLoxP/CHIPi with CRE could enhance TGF- β signal transcriptional activity

(CAGA)₁₂-Luc-Mv1Lu cells were transfected with the indicated vectors. 24 h after transfection, the cells were treated with TGF- β (7.5 μ g/L) for 18 h, then extracts were analyzed as described previously.

3 讨 论

TGF- β 信号通路是迄今为止了解到的最为广泛和复杂的信号转导通路之一, 其在各种生理病理过程都起着非常重要的作用, 尤其是在肿瘤的发生、浸润和转移等诸多过程中起到重要的生物学作用^[19]. 因此对于 TGF- β 信号通路的调控, 特别是对于其下游蛋白 Smads 的调控研究显得尤为重要. 本实验室通过酵母双杂交实验, 以 Smad1 蛋白为诱饵, 筛选出 Smad1 的相互作用蛋白 CHIP. 研究表明, CHIP 可以特异性地抑制 TGF- β 信号通

路的活化, 并且这种抑制作用是通过 Smad 蛋白水平的调控达到的^[14, 16].

本研究应用条件基因沉默实验反向研究 CHIP 对 TGF- β 信号通路的影响. 本文基于同向 LoxP 与 CRE 相互作用会删除两个 LoxP 之间的靶基因的特性, 构建了 CHIP 的可调控 siRNA pLoxP/CHIPi 真核表达质粒. 分别从对外源表达和内源表达的 CHIP mRNA 和蛋白质水平的影响检测, 证明该系统对于外源或内源 CHIP 可以有效地特异性抑制. 通过荧光素酶报告系统, 证明该系统可以有效地拮抗由 CHIP 引起的 TGF- β 信号通路的抑制, 并能成功激活 TGF- β 信号通路, 解除内源 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制. 因为该系统是 CRE 依赖性的, 当不加入 CRE 蛋白酶, pLoxP/CHIPi 是无效基因, 不会影响内源 CHIP mRNA 的水平. 当加入 CRE 蛋白酶后, pLoxP/CHIPi 被剪切, 翻译出 CHIP siRNA, 特异性地使 CHIP 基因沉默. 这种系统避免了直接转入 siRNA 表达质粒不能受控的缺点, 使得研究某些对细胞增殖、分化、凋亡有影响的基因功能变得容易.

本研究成功地构建了 CRE 依赖性调控的基因沉默系统, 并证明了该系统具有高效性, 为定向敲除 CHIP 奠定了基础. 利用这种系统, 只需构建 pLoxP siRNA 转基因小鼠, 并使之与组织特异性或组织诱导性 CRE 小鼠杂交就可以得到条件基因沉默小鼠. 该方法不需要条件基因敲除小鼠构建时在 ES 细胞上繁琐的同源重组操作等复杂过程, 因此该技术相对于经典的条件基因敲除具有省时、省力、节约资金等优点. 但由于 RNAi 是在转录水平上干扰靶基因的表达, 从而降低靶基因的蛋白质表达水平, 不同于经典基因敲除彻底敲除靶基因, 因此, 该技术更适合作为基因功能初步研究的有效工具.

利用 CRE 实现条件性地表达 siRNA 的思路已有初步尝试. Lauriane 等^[20]首先使用 H1 启动子表达的 siRNA, 在 GFP 基因的条件性抑制上成功发现了 CRE 介导表达 siRNA 的功能. 随后, 利用可调控的系统表达 siRNA 不断发展, 从应急启动子诱导^[21]到四环素诱导表达^[22], 人们都试图可控地表达 siRNA, 从对内源基因的表达进行条件性沉默, 并且已有实验小组在小鼠体内得以实现^[23, 24].

我们的研究首次将可在时间和空间上加以控制的条件基因沉默系统引入到 CHIP 研究领域, 也为研究 TGF- β 信号的抑制性调控增添了新的手段,

对更深入地从分子水平认识疾病的致病机理及寻找相应的药物靶点具有重要意义。

致谢 感谢哈佛大学医学院施扬博士提供 pBS/U6 质粒, 感谢美国 Duke 大学王小凡教授提供 (CAGA)₁₂-Lux 质粒, 以及在实验过程中给予的有益指导。

参 考 文 献

- Kilby N J, Snaith M R, Murray J A. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, 1993, **9**(12): 413~421
- Dymecki S M. FLP recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(12): 6191~6196
- Nspoll C A, Lemteux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric cha2 conne synthetase gene in *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, **2**(4): 279~289
- Guo S, Kempthues K J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *Caenorhabditis elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, **81**(4): 611~620
- Fire A, XU S, Montgomery K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**(6669): 806~811
- Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R, *et al.* A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, **296**(5567): 550~553
- Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **20**(5): 497~500
- Sui G C, Soohoo B, Affar E I, *et al.* A DNA vector based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(8): 5515~5520
- Ballinger C A, Connell P, Wu Y, *et al.* Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(6): 4535~4545
- Meacham G C, Patterson C, Zhang W, *et al.* The Hsc70 co2chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**(1):100~105
- Xu W, Marcu M, Yuan X, *et al.* Chaperone dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c/ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(20): 12847~12852
- Zhou P, Fernandes N, Dodge I L, *et al.* ErbB2 degradation mediated by the co-chaperone protein CHIP. *J Biol Chem*, 2003, **278**(16): 13829~13837
- Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, *et al.* CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*, 2002, **10**(1): 55~67
- Li L Y, Xin H, Xu X L, *et al.* CHIP mediates degradation of Smad proteins and potentially regulates Smad2 induced transcription. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(2): 856~864
- Li R F, Shang Y, Liu D, *et al.* Differential ubiquitination of smad1 mediated by CHIP: implications in the regulation of the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Mol Biol*, 2007, **374**(3): 777~790
- Xin H, Xu X, Li L, *et al.* CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor β signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin mediated degradation. *J Biol Chem*, 2005, **280**(21): 20842~20850
- 徐夏莲, 辛 宏, 张新军, 等. 利用四环调控系统研究 CHIP 对 TGF- β 信号通路的抑制性调节. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **32**(6): 557~561
- Xu X L, Xin H, Zhang X J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(6): 557~561
- Li X N, Huang M, Zheng H L, *et al.* CHIP promotes Runx2 degradation and negatively regulates osteoblast differentiation. *J Cell Biol*, 2008, **181**(6): 959~972
- Massague J, Blain S W, Roger S L. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 2000, **103**(2): 295~309
- Lauriane Fritsch, Luis A Martinez, *et al.* Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs. *EMBO reports*, 2004, **5**(2): 178~182
- Yang W, Paschen W. Conditional gene silencing in mammalian cells mediated by a stress-inducible promoter. *BBRC*, 2008, **365**(3): 521~527
- Zhang J, Wang C, Ke N, *et al.* A more efficient RNAi inducible system for tight regulation of gene expression in mammalian cells and xenograft animals. *RNA*, 2007, **13**(8): 1375~1385
- Chang H S, Lin C H, Chen Y C, *et al.* Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown. *Am J Pathol*, 2004, **165**(5): 1535~1541
- Seidler B, Schmidt A, Mayr U, *et al.* A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown *in vivo* by using avian retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(29): 10137~10142

Construction of a Conditional CHIP Knocking Down System in The Study of The CHIP-regulated TGF- β Signaling*

SHANG Yu, XU Xia-Lian, XIN Hong, CHANG Zhi-Jie**

(School of Medicine, Department of Biological Science and Biotechnology, State Key Laboratory of Membrane Biology,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract To establish a conditional knocking down system by RNA interfering, the cassette of LoxP-neo-LoxP was inserted into the pBS/U6/CHIPi construct. The destination vector is named pLoxP/CHIPi, which generates an siRNA targeting CHIP (C-terminal hsc70 interacting protein) gene, dependent on expression of the CRE recombinase. In this conditional knocking down model, it is demonstrated that the siRNA of CHIP could effectively decrease not only the mRNA level but also the exogenous or endogenous protein level in mammalian cells after CRE recombinase was expressed, as testing by RT-PCR and Western blot analysis. Luciferase assay showed that transfection of pLoxP/CHIPi with Cre released the CHIP-mediated inhibition of TGF- β signaling. Significantly, pLoxP/CHIPi facilitated the TGF- β signal transduction in the presence of CRE. These results demonstrate that the conditional knocking down system was successfully constructed, and was applicable for further investigation of the negatively regulatory effect of CHIP on TGF- β signal pathway. The study also provide a powerful tool for further study on the molecular mechanisms and path-physiologic basis related to CHIP-mediated TGF- β signal pathway.

Key words condition knockdown, CHIP, TGF- β , inhibition

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00779

*This work was supported by grants from Tsinghua Yu-Yuan Medical Sciences Fund(20240005-06) and National Basic Research Program of China (2006CB910102, 2002CB513007).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62785076, Fax: 86-10-62773624, E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

Received: November 13, 2008 Accepted: January 9, 2009