

小鼠肝脏 RNA 编辑酶 ADAR1 4 种剪切体：克隆、表达及功能分析 *

张德新^{1)**} 赵澎涛¹⁾ 赵青川²⁾ 罗晓星³⁾ 聂勇战⁴⁾

苏映军⁴⁾ 杨静华⁴⁾ R. RABINOVICI⁴⁾ 樊代明^{1)**}

¹⁾第四军医大学全军消化疾病研究所肿瘤生物学国家重点实验室, 西安 710032;

²⁾第四军医大学普通外科学系, 西安 710032; ³⁾第四军医大学药理学系, 西安 710032;

⁴⁾ Department of Surgery, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA)

摘要 RNA 编辑是 DNA 转录为 RNA 后遗传信息发生改变的一种方式. A-to-I RNA 编辑酶 ADAR1 (adenosine deaminase that acts on RNA 1) 具有将 pre-mRNA 中特定的腺嘌呤核苷转变为次黄嘌呤核苷的功能. 通过 RT-PCR 技术从小鼠肝脏组织中克隆了小鼠 A-to-I RNA 编辑酶 ADAR1 的 4 种剪切体, 采用荧光示踪技术研究其在细胞内定位, 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统构建了 ADAR1 重组杆状病毒并在 sf9 昆虫细胞内将其进行了表达, 最后对表达产物进行了活性鉴定. 结果发现, 小鼠 ADAR1 在小鼠肝脏组织中主要以 4 种剪切方式存在, 分别命名为 ADAR1-La\Lb 和 ADAR1-Sa\Sb. 这 4 种 ADAR1 剪切体在细胞内分布有着明显的区别, ADAR1-La\Lb 主要分布于胞浆, 而 ADAR1-Sa\Sb 主要分布于细胞核及核仁. Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达的 4 种 ADAR1 剪切体蛋白的双链 RNA 编辑活性明显不同, 提示各个 ADAR1 剪切体的底物识别和特异性 RNA 编辑功能可能有所不同. ADAR1 剪切体的克隆和表达以及它们在细胞内定位和编辑活性的差异的发现为进一步研究其结构和功能的关系及寻找它们的新底物奠定了基础.

关键词 RNA 编辑, 杆状病毒, 重组蛋白, ADAR1

学科分类号 Q718

RNA 编辑是指 DNA 转录成 RNA 后除 RNA 剪切外的其他加工过程, 它以核苷酸的删除、添加或修饰等方式改变了遗传信息. RNA 编辑是近年来国际上一个活跃的前沿研究领域, 它揭示了生物进化过程中基因修饰和调控的另一个重要途径, 是对于中心法则的重要补充^[1]. 目前发现的 RNA 编辑现象主要出现于 pre-mRNA 和 tRNA 中, 而对 RNA 起编辑作用的酶称为 RNA 编辑酶. 在 pre-mRNA 中它主要以脱氨基的方式对 RNA 中的核苷酸起转化或修饰作用. 在哺乳动物细胞等真核细胞中, 主要存在着两种 pre-mRNA 核苷酸脱氨酶, 即 ADAR (adenosine deaminase that acts on RNAs) 和 CDAR (cytosine deaminase that acts on RNAs). ADARs 可使 pre-mRNA 的某些腺嘌呤核苷 (adenosine) 变为次黄嘌呤核苷 (inosine), 即 A-to-I 转换. 而 CDARs 则可将胞嘧啶核苷 (cytosine) 脱氨基为尿嘧啶核苷 (uridine), 即 C-to-U 转换. 这些转换使得遗传密码

发生转变, 从而使其编码的蛋白质结构和功能也发生改变^[2]. ADAR1 为第一个被发现的人 A-to-I RNA 编辑酶, 可被干扰素 α 和 β 所诱导, 但诱导表达的 ADAR1 存在着几种剪切形式, 而且他们受到诱导时的表达量不同^[3,4]. 我们克隆了小鼠 ADAR1 全长 cDNA, 发现小鼠肝脏中的 ADAR1 存在着多种剪切形式. 从结构分析中发现, ADAR1 cDNA 的不同剪切可能导致 ADAR1 的底物识别、结合能力以及在细胞内转运和定位发生改变. 为进一步研究小鼠 ADAR1 的结构及功能的多样性及其可能意义, 我们克隆了小鼠 ADAR1 几种主要剪切体, 研究了其表达蛋白在细胞内的定位. 最后我们在杆状病毒表达系统中表达了小鼠 ADAR1 的几种重组剪切

*国家自然科学基金资助项目 (30371337).

** 通讯联系人. Tel: 029-68855516, E-mail: dx66@163.com

收稿日期: 2006-05-31, 接受日期: 2006-06-26

体, 并对其双链 RNA 编辑功能进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞株、质粒. 大肠杆菌菌株 DH5 α 、穿梭质粒宿主菌 DH10BAC、杆状病毒宿主草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) sf9 昆虫细胞系均为美国 Life Technologies 公司产品。

1.1.2 试剂. 逆转录酶 (SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase)、引物、总 RNA 提取试剂 TRIZOL、胎牛血清、细胞培养液、杆状病毒表达系统 (BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systems)、Sf-900 II SFM 无血清昆虫培养液、转染试剂 Cellfectin 购自美国 Life Technologies 公司; 高保真 DNA 聚合酶 (Vent DNA Polymerase) 购自美国 Promega 公司; mRNA 提取试剂盒 (Poly(A) PureTM mRNA Purification Kit) 购自美国 Ambion 公司; 限制性内切酶、连接酶购自美国 New England Biolabs; QIAquick Gel Extraction Kit 质粒提纯试剂盒为美国 Qiagen 公司产品; α -³²P-ATP 购自美国 Amersham Pharmacia 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR. 根据我们前期研究结果, 针对小鼠 ADAR1 全长 cDNA 序列, 设计其编码区 PCR 引物, 并在上、下游引物的 5'端分别引入了 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点. 取刚刚处死的小鼠肝脏组织 2 g, 按说明书用 TRIZOL 试剂提取总 RNA, 随后用 Poly(A) PureTM mRNA Purification Kit 从总 RNA 中提纯 mRNA. 取 0.5 μ g 小鼠肝脏组织 mRNA, 用 SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase 根据使用说明书进行 cDNA 第一链合成. 取 1 μ l cDNA 为模板、前述人工合成寡核苷酸为引物, 采用 Vent DNA Polymerase 进行高保真 PCR 扩增. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min. 取 5 μ l PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳, 鉴定 PCR 产物的大小。

1.2.2 重组质粒的克隆和鉴定. 从凝胶中回收 ADAR1 的 PCR 产物, 纯化后连接入 pCR2.1 质粒载体中, 经测序验证序列的正确性后, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶进行酶切, 然后亚克隆至穿梭质粒 pFASTBAC-HTb 中, 构建四种重组质粒并命名为 pFAST-ADAR1-La/Lb 和 Sa/Sb。

1.2.3 重组质粒的转座和重组 Bacmid 的提纯. 将

5 μ l 1 mg/L 的 pFAST-ADAR1 以热休克法转化 100 μ l DH10BAC 感受态细菌, 在含有卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG 和 X-GAL 的 LB 平皿上进行筛选. 48 h 后当大部分菌落长到直径约 1~2 mm 时, 将平皿转入 4 $^{\circ}$ C 冰箱内继续放置 24 h. 挑取白色菌落, 接种于含有卡那霉素、庆大霉素、四环素的 LB 培养基中进行扩增培养. 按产品说明书中推荐的方法提纯重组 Bacmid, 然后在 0.5%琼脂糖凝胶中电泳 12 h 鉴定重组 Bacmid。

1.2.4 sf9 细胞的转染及重组病毒收集. 在 6 孔培养板中加入对数生长期的 sf9 细胞, 然后将重组 Bacmid 用 Cellfectin 按 Bac-To-Bac 说明书转化 sf9 细胞, 48 h 后收集感染上清. 取 20 μ l 初次感染上清接种于长有 8 $\times$ 10⁶ 个 sf9 细胞的 T-75 培养瓶中, 28 $^{\circ}$ C 培养 72 h 进行病毒扩增, 取少量含有病毒的上清, 按说明书推荐的方法进行病毒滴度测定。

1.2.5 重组蛋白的表达及纯化. 在 1 L 圆柱型塑料培养瓶中以悬浮方式培养 200 ml 对数期 sf9 细胞 (2 $\times$ 10⁶/ml), 继而接种已测定滴度的重组杆状病毒, 使感染时的 MOI 值为 5~10. 在 28 $^{\circ}$ C 以 130 r/min 培养 48 h 后, 4 $^{\circ}$ C 下以 1 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 向细胞沉淀中加入冷却的细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 5 mmol/L 2-mercaptoethanol, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L PMSF, 1% Nonidet P-40), 在 4 $^{\circ}$ C 下用超声探头粉碎细胞 1 min 后, 按照 BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systems 说明书的方法利用 Ni-NTA 层析法在中性条件下纯化 ADAR1 重组蛋白, 洗脱液经聚丙烯酰胺凝胶电泳检验纯度. 将蛋白质含量达 90%以上的洗脱液收集, 经 PBS 充分透析后进行蛋白质定量, 分装后-70 $^{\circ}$ C 储存。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳及重组蛋白纯度测定. 用 2 $\times$ 上样缓冲液等量稀释洗脱液, 然后在 10%的聚丙烯酰胺凝胶上进行凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电泳结束后用考马斯亮蓝进行染色. 将染色的凝胶用激光密度扫描仪进行密度扫描, 计算 ADAR1 蛋白积分密度占总蛋白质积分密度百分比, 从而得出重组蛋白 ADAR1 的纯度。

1.2.7 小鼠 ADAR1 剪切体的细胞内定位. 将上述 4 种 ADAR1 剪切体 cDNA 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后连入 pEGFP-N1 载体 (Clonetech 公司), 使 ADAR1 与 EGFP 的 N 端相连并保持蛋白质的阅读框. 用 LipofectAmine 2000 将这些重组质粒用瞬时转染法分别转入 NIH 3T3 成纤维细胞, 8~12 h

后在荧光显微镜下观察嵌合蛋白定位情况.

1.2.8 小鼠 ADAR1 剪切体的双链 RNA 编辑活性测定. ADAR1 的双链 RNA 底物合成: 以含 α -tropomyosin 基因的 pBluescript SK(+/-) 质粒为底物, 利用 RNA 聚合酶体外转录的方法合成双链 RNA. 首先将 pBluescript SK(+/-) 质粒用 *EcoR* I 或 *Hind* III 限制性内切酶线性化并纯化后, 加入 T7 和 SP6 RNA 聚合酶体进行外转录, 并同时掺入 α - 32 P-ATP. 合成完毕后, 用 Sephadex G25 纯化, 除去游离的寡核苷酸. 将两条互补的单链 RNA 混合, 94°C 加热 3 min, 让其自然冷却到室温, 即复性成双链互补 RNA. ADAR1 活性的检测: 取 0.1 μ g 等量的每种 ADAR1 重组剪切体蛋白, 分别加入 10 μ l 编辑缓冲液 (10 mmol/L Hepes, pH 7.8, 100 mmol/L KCl, 50 mmol/L EDTA, 15% glycerol) 中, 然后加入 1 μ l 32 P-labeled dsRNA (5×10^3 cpm) 和 1 μ l RNase 抑制剂, 用编辑缓冲液调整体积至 20 μ l, 于 37°C 孵育 2 h, 加入 2 $\times$ 等体积蛋白酶 K 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 0.2% SDS, and 0.5 g/L proteinase K), 于 37°C 孵育 1 h, 再用酚和氯仿抽提 1 次, 取上清液移至另 1 个 Appendorf 管中, 以乙醇沉淀其中的 RNA. 干燥后将沉淀充分溶解于 10 μ l 核苷酸酶 P1 缓冲液中 (5 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 1 U RNase P1), 并加入 1 μ l 的核苷酸酶 P1, 于 37°C 孵育 2 h, 将双链 RNA 降解成单核苷酸, 取 4 μ l 点于薄层层析 (TLC) 膜片上, 立于装有少量硫酸铵-异丙醇 (95:5) 溶液的扁槽中, 待有层析液接近 TLC 顶端时取出, 吹干后于 -70°C 压片曝光 24 h, 洗片后观察结果.

2 结 果

2.1 小鼠 ADAR1 cDNA 的克隆及鉴定

所使用的 PCR 引物为: ADAR1-L 正向引物 5' GTCAGGATCCTCTCAAGGGTTCAGGGGACCCAC 3'; ADAR1-S 正向引物 5' GTCAGGATCC-AAGAGAAGTACACACAGTGCTCC 3'; 共用反向引物 5' GTCAGGATCC-AAGAGAAGTACACACAGTGCTCC 3'; 共用反向引物 5' GTCAGGATCC-AAGAGAAGTACACACAGTGCTCC 3'. 经过 PCR 扩增, 成功地将小鼠 ADAR1 的 4 种剪切体扩增并克隆入 pCR2.1 质粒中, 测序鉴定显示, 所得到的小鼠 ADAR1 的序列与 GenBank 中所登录的序列一致 (GenBank Number AF291876). 经限制性内切酶酶切后定向克隆于 pFASTBAC-HTb 载体中 6 $\times$ his tag 之 C 端后.

ADAR1 四种剪切体的示意图见图 1.

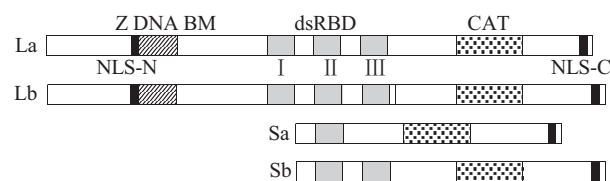


Fig. 1 Schematic diagrams of the splicing forms of ADAR1

The four splicing forms have two different putative translation initiation codons and the same termination codon and are 3.5 kb, 3.6 kb, 1.8 kb and 2.0 kb in length, respectively. Z DNA BM: Z DNA binding motif; dsRBD: Double-stranded RNA binding domain; CAT: Catalytic domain; NLS: Nuclear localization signal.

2.2 重组 Bacmid 的鉴定

将 4 种重组 pFAST-HTb-ADAR1 质粒分别转入大肠杆菌 DH10BAC 后, 经过蓝白筛选挑选白色菌落. 经过扩增后用改进的质粒提纯法提取 Bacmid, 在 0.5% 的琼脂糖中进行电泳, 结果显示在 23 kb 后存在一条电泳条带, 符合重组 Bacmid 的分子质量.

2.3 小鼠 ADAR1 重组蛋白的表达、纯化和检测

将小鼠 ADAR1 的重组 Bacmid 转染 sf9 昆虫细胞, 72 h 后收集培养液上清并重新感染新的 sf9 昆虫细胞进行扩增. 经过病毒滴度测定后, 发现 4 种重组病毒的滴度约为 $2 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$ pfu/ml. 将重组病毒感染悬浮生长的 sf9 细胞, 48 h 后离心收集细胞并加入裂解液裂解, 用 Ni-NTA 亲和层析法进行纯化并进行 SDS-PAGE, 结果见图 2. 可以看出 Imidazole 浓度为 100 mmol/L 进行洗脱时, 在第一

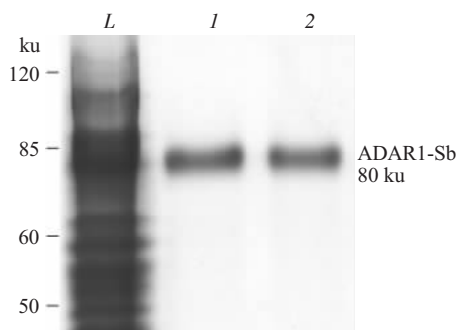


Fig. 2 Purification of recombinant ADAR1 protein by Ni-NTA affinity chromatography

Sf9 cells infected with recombinant ADAR1 baculoviruses were harvested three days after infection. These cells were lysed in Tris lysis buffer and the lysate (L) was added to Ni-NTA resin column and eluted with 100 mmol/L imidazole (I, 2), shown here is ADAR1-Sb. The elutes were subjected to SDS-PAGE and the fraction of the highest concentration of ADAR1 was dialyzed against PBS and stored at -70°C.

管中 ADAR1 重组蛋白的含量为最高. 激光密度扫描后证实, 洗脱液中 ADAR1 重组蛋白的纯度均 > 91%.

2.4 小鼠 ADAR1 剪切体重组蛋白在细胞内的定位

将小鼠 ADAR1-La/Lb 和 Sa/Sb 剪切体基因分别克隆入含有增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因的质粒中, 使 ADAR1 的 C 端与 EGFP 的阅读框相连. 在进行质粒扩增后瞬时转染 NIH 3T3 细胞, 在荧光显微镜下观察 EGFP 蛋白在细胞内的定位及转运, 发现 ADAR1-La/Lb 主要分布于细胞浆, 而 ADAR1-Sa/Sb 主要分布于细胞核内, 结果见图 3.

2.5 小鼠 ADAR1 剪切体重组蛋白的双链 RNA 编辑活性的测定

A-to-I RNA 编辑酶的主要活性之一就是可以在体外非特异性地作用于双链 RNA 中的腺嘌呤核苷酸(adenosine), 使之脱氨基而变为次黄嘌呤(inosine). 为了解 ADAR1 不同剪切体的双链 RNA 编辑活性变化, 本实验对 ADAR1 剪切体重组蛋白的 RNA 编辑活性进行了测定和比较. 结果表明, 相同质量的四种 ADAR1 剪切体重组蛋白的双链 RNA 编辑活性差异巨大, ADAR1-Lb 和 ADAR1-Sb 的双链 RNA 编辑活性最高, ADAR1-La 的活性较低, 而 ADAR1-Sa 活性最低, ADAR1-Lb 的活性约为 Sa 活性的 100 倍(图 4).

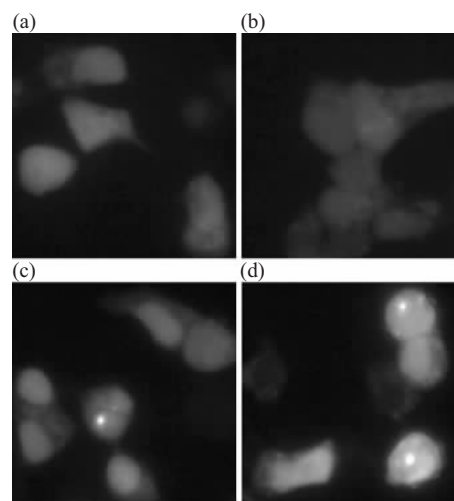


Fig. 3 Cellular localization of ADAR1 splicing forms in NIH 3T3 cells

The four splicing alternatives of ADAR1 were cloned into EGFP-N1 vector and the recombinant plasmid was transiently transfected into NIH 3T3 cells with LipofectAmine 2000. Three days after transfection, the cells were examined under a fluorescent microscope and the recombinant ADAR1 proteins were localized as either cytoplasmic or nuclear. (a) La, (b) Lb, (c) Sa, (d) Sb.

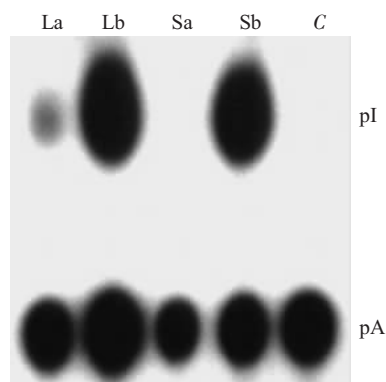
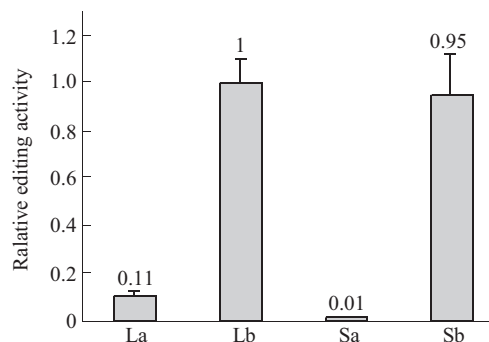


Fig. 4 Double-stranded RNA editing activity of ADAR1 splicing variants

Equal amount of recombinant ADAR1 splicing alternatives were incubated with ^{32}P -labelled double-stranded RNA. After nuclease P1 treatment, the substrates were run on a TLC plate and the TLC plate was exposed to an X-ray film at -70°C . After 24 h exposure, the film was visualized by autoradiography. The intensity of each spot was quantitated with ScionImage at www.scion.com. The specific editing activity of each protein was calculated by dividing the ratio of A-to-I conversion by the amount of the recombinant protein used in the initial reaction. The relative activity was normalized to the Lb form of the four ADAR1 splicing proteins.



3 讨 论

RNA编辑现象的存在不仅是对于中心法则的

补充而且具有重要的生物学意义, 它改变了先前的传统观点, 即遗传密码从 DNA 转录为 mRNA 再翻译成蛋白质的过程保持一致的观点, 而是在转录后

有可能被加工和修饰, 进而改变了遗传密码, 得到的蛋白质将与从 DNA 预测的蛋白质有所不同. 以 A-to-I RNA 编辑酶 ADAR1 为例, 某些基因特定位点的腺嘌呤核苷(A)在 ADAR1 的作用下脱氨基而转变为次黄嘌呤核苷(I), 而在核苷酸中次黄嘌呤核苷的功能与鸟嘌呤(G)的功能是一致的, 因而从形式上讲是 A-to-I 的转换, 而在功能上讲就发生了 A-to-G 的转换. 这些转换如果发生在编码区, 那么翻译出来的氨基酸就有可能不同于原来预测的氨基酸, 如果发生在非编码区则可能会影响转录子的稳定性和蛋白质的翻译效率^[9], 如果出现在内含子中, 也可能使蛋白质的剪切位点发生变化产生新的剪切子, 就像 ADAR2 那样可以编辑自己的 pre-mRNA, 从而产生数个剪切子, 即不同功能的蛋白质^[9]. 在先前的研究中我们发现并克隆了小鼠 ADAR1 的 cDNA. 通过和人 ADAR1 的 cDNA 进行同源性对比, 发现该 cDNA 包含有最长的编码区域, 即小鼠的 ADAR1-L. 在后续的研究中发现, 与人 ADAR1 不同的是, 小鼠 ADAR1 的 cDNA 有更多的剪切形式, 小鼠免疫或炎症相关细胞中的 ADAR1 的剪切子也随着炎症程度的提高在变化^[7]. 特别是在小鼠的大脑中, 同时存在着不同的 ADAR1 剪切体, 其中 80% 与人 ADAR1 的同源. Liu 等^[8]在研究人细胞 ADAR1 表达时, 发现干扰素 γ 可诱导 ADAR1 的不同剪切体的表达, 主要是 ADAR1-S 为主. 而在我们的研究中发现, 在自然状态下小鼠肝脏中就存在着 ADAR1 的多种剪切体, 这是否与 ADAR1 在肝脏中具有较多的底物有待进一步研究. 虽然 ADAR1 在人多种组织、器官中都具有较高的表达, 但遗憾的是目前发现的 ADAR1 的主要底物都存在于大脑中, ADAR1 在其他组织、器官中表达的意义和功能还有待于进一步挖掘和探索. ADAR1 蛋白具有几个结构域, 它们分别是位于 N 端的 3 个 DNA 结合域 (其中包括 Z DNA 结合域) 和位于 C 端的催化域. 如果 ADAR1 中的剪切发生 DNA 结合域, 则可能会影响 ADAR1 对于底物的选择和结合, 由此也可推测不同的剪切体有不同的底物或对不同的底物的编辑特异性不同. 虽然双链 RNA 非特异编辑活性是所有 A-to-I RNA 编辑酶的共同特征, 但这种活性的差异可能反映了这些不同的 A-to-I RNA 编辑酶或其各种剪切体对各种底物的结合能力的不同, 从另外一方面也佐证了还存在着更多的 A-to-I RNA 编辑酶的底物. RNA 编辑酶 ADAR1 的细胞内定位与其功能有着重要的

关系. 特别是对于一些病毒来说, ADAR1 在细胞内的定位与其是否能受到编辑关系更加密切. 由于 ADAR1 的底物为 mRNA, 而 mRNA 即可以存在于细胞核内, 也可以存在于细胞核外. ADAR1 不同剪切体一方面对于底物的亲和力上表现不同, 另一方面在细胞内定位上也有不同. 已知在 ADAR1 中存在着多种调节 ADAR1 在细胞核内、外穿梭的序列, 这些序列不仅仅为 ADAR1N 端和 C 端的 NLS, 而且存在于 ADAR1 的中间部位, 还可能存在着目前不为人所知的入核、出核信号. ADAR1 剪切体中不同入核、出核信号的组合导致它们 ADAR1 在细胞内的定位有所不同. 这种定位不同的本身就会造成对不同底物的作用结果的不同. RNA 编辑现象不仅对人体或动物细胞的基因表达或蛋白质编码有关, 而且哺乳动物细胞对病毒的防御及小干扰 RNA 的功能都会产生影响^[9~12]. 这些方面的研究将会对 RNA 编辑的认识更加深入. 我们在本实验中克隆和表达了 ADAR1 的几种剪切体, 一方面肯定了在小鼠肝脏中 ADAR1 的各种具有活性的剪切体存在, 另外一方面也证实了这些剪切体在细胞内定位和功能的不同, 为进一步研究 ADAR1 结构与功能的关系及发现新的 ADAR1 底物提供了新的支持和证据.

参 考 文 献

- 1 Keller W, Wolf J, Gerber A. Editing of messenger RNA precursors and of tRNAs by adenosine to inosine conversion. *FEBS Lett*, 1999, **452** (1~2): 71~76
- 2 Valente L, Nishikura K. ADAR gene family and A-to-I RNA editing: diverse roles in posttranscriptional gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2005, **79**: 299~338
- 3 Patterson J B, Thomis D C, Hans S L, *et al.* Mechanism of interferon action: double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons. *Virology*, 1995, **210** (2): 508~511
- 4 George C X, Wagner M V, Samuel C E. Expression of interferon-inducible RNA adenosine deaminase ADAR1 during pathogen infection and mouse embryo development involves tissue-selective promoter utilization and alternative splicing. *J Biol Chem*, 2005, **280** (15): 15020~15028
- 5 Yang W, Chendrimada T P, Wang Q, *et al.* Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, **13** (1): 13~21
- 6 Rueter S M, Dawson T R, Emeson R B. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*, 1999, **399** (6731): 75~80
- 7 Yang J H, Luo X, Nie Y, *et al.* Widespread inosine-containing mRNA in lymphocytes regulated by ADAR1 in response to inflammation. *Immunology*, 2003, **109** (1): 15~23

- 8 Liu Y, George C X, Patterson J B, *et al.* Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (7): 4419~28
- 9 Taylor D R, Puig M, Darnell M E, *et al.* New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol*, 2005, **79** (10): 6291~6298
- 10 Hartwig D, Schutte C, Warnecke J, *et al.* The large form of ADAR 1 is responsible for enhanced hepatitis delta virus RNA editing in interferon-alpha-stimulated host cells. *J Viral Hepat*, 2006, **13** (3): 150~157
- 11 Yang W, Wang Q, Howell K L, *et al.* ADAR1 RNA deaminase limits short interfering RNA efficacy in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2005, **280** (5): 3946~3953
- 12 Zheng Z M, Tang S, Tao M. Development of Resistance to RNAi in Mammalian Cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, **1058**: 105~118

Functional Characterization and Comparison of Four Splicing Alternatives of Mouse Liver A-to-I RNA Editing Enzyme ADAR1*

ZHANG De-Xin^{1)**}, ZHAO Peng-Tao¹⁾, ZHAO Qing-Chuan²⁾, LUO Xiao-Xing³⁾,
NIE Yong-Zhan⁴⁾, SU Ying-Jun⁴⁾, YANG Jing-Hua⁴⁾, R. RABINOVICI⁴⁾, FAN Dai-Ming^{1)**}

¹⁾State Key Laboratory of Cancer Biology and PLA Institute for Digestive Diseases,

Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

²⁾Department of General Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

³⁾Department of Pharmacology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

⁴⁾Department of Surgery, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA)

Abstract The posttranscriptional modification of messenger RNA precursors by base deamination can alter profoundly the function of the encoded proteins. Adenosine deaminases that act on RNA (ADARs) are capable of catalyzing the site-specific conversion of adenosine to inosine in pre-mRNA transcripts, thereby affecting coding potential of mature mRNAs. ADAR1 is a member of ADAR1 family and is abundantly expressed in the brain and ubiquitously present in most tissues of the mammals. Alternatively spliced forms of ADAR1 cDNA were cloned from the mouse liver and the localization of these splicing forms were examined under a fluorescent microscope by fusing them to EGFP. The cDNAs of these splicing forms were cloned into a baculovirus expression vector and the recombinant protein of these splicing forms were produced in insect cells and purified with Ni-NTA resin. The double-stranded RNA editing activity of the recombinant proteins were determined and compared. The results showed four major splicing forms of ADAR1 were naturally present in mouse liver and consisted of cDNAs of 3.5 kb, 3.6 kb, 1.8 kb and 2.0 kb in length, respectively. These three splicing forms were La, Lb, Sa and Sb forms and found to have two distinct translation initiator codons. Furthermore, the four splicing forms of ADAR1 protein were localized to either the cytoplasm or nucleus of NIH 3T3 cells as shown by fluorescent microscopy. The double-stranded RNA editing activity of the four splicing forms also differ significantly, with the Lb form possessing the highest editing activity. In summary, four major mouse ADAR1 splicing forms are present naturally in the mouse liver with either cytoplasmic or nuclear localizations and widely varied editing activities, which indicate they might have different substrates and functions.

Key words RNA editing, baculovirus, recombinant protein, ADAR1

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30371337).

**Corresponding author . Tel: 86-29-68855516, E-mail: dx66@163.com

Received: May 31, 2006 Accepted: June 26, 2006