

Advances in LRRFIP Family

Xiaoting Zhao, Guangdong Ji

Institute of Evolution & Marine Biodiversity, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao Shandong
Email: jamesdong@ouc.edu.cn

Received: May 24th, 2016; accepted: Jun. 27th, 2016; published: Jun. 30th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

LRRFIPs was originated as proteins interacting with leucine-rich repeat flightless I gene (FLI); it is involved many functions, including acting as a transcriptional repressor to inhibit TNF α and NF κ B activity, interacting with other proteins to regulate Wnt/ β -catenin signaling pathway for cytoskeleton rearrangement, and function as cytosolic nucleic acid sensor against exogenous virus. Phylogenetic analysis revealed that LRRFIP1 and LRRFIP2 in mammals, LRRFIP1a, LRRFIP1b and LRRFIP2 in fishes are all evolved from single proto LRRFIP in early multicellular organisms.

Keywords

LRRFIP, Transcriptional Repressor, Cytoskeleton Rearrangement, Cytosolic Nucleic Acid Sensor, Evolution

LRRFIP家族的研究进展

赵晓婷, 汲广东

中国海洋大学海洋生命学院, 海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛
Email: jamesdong@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016年5月24日; 录用日期: 2016年6月27日; 发布日期: 2016年6月30日

摘要

LRRFIP蛋白是能与富含亮氨酸重复序列的FLI (flightless I)蛋白相互作用的分子, 参与许多生物学过程,

包括作为转录抑制因子抑制TNF α 以及NF κ B的活性, 能与其他蛋白相互作用调控Wnt/ β -catenin信号通路进而参与细胞骨架的重排以及作为胞质内外源核酸感受器参与抗病毒过程等。系统进化分析显示, 高等哺乳动物中的LRRFIP1和LRRFIP2, 以及鱼类中LRRFIP1a, LRRFIP1b和LRRFIP2都是由早期多细胞动物中单一的原始的LRRFIP进化而来。

关键词

LRRFIP, 转录抑制子, 细胞骨架重排, 胞质核酸感受器, 进化

1. 引言

LRRFIP (leucine-rich repeat in flightless-interaction protein)是一种可与富含亮氨酸重复序列的 FLI (flightless I)蛋白相互作用的分子, 在上世纪 90 年代就已经在人的 T 淋巴瘤细胞克隆出了 LRRFIP1 蛋白, 只不过那时称之为 GCF2 (GC-binding factor2), 之所以称之为 GCF2 因子, 主要是因为它是利用已在表皮癌细胞中被克隆出来的 GCF cDNA 进行核酸杂交得到的两个分子中的一个, 这个 GCF 是能够结合在某些基因启动子富含 GC 的区域, GCF2 功能与这个早先发现的 GCF 类似, 都能抑制这些基因的表达, 如结合在表皮生长因子受体 EGFR 基因启动子富含 GC 的区域并抑制其表达[1], 但这两者的蛋白序列是不同的。几乎在同一时期, 人们又在人和老鼠中发现了 FLAP 蛋白, 它含有 N 端卷曲螺旋域, 通过 GST pull down 实验证明其与 FLI LRR 能够相互作用; 在 CHO-K1 细胞系含有 TRIP (TAR RNA interacting protein) 蛋白且其 N 末端与 FLAP 蛋白的 N 端卷曲螺旋域高度同源[2] [3], 说明这两个基因很可能是同源基因(或一个物种中一个基因的不同剪切体), 现在它们都被重新命名为 LRRFIP1 蛋白。稍晚一些时间, 人们利用酵母双杂交系统又进一步证实了人的 LRRFIP1 能与 FLI 蛋白的 LRR 结构域相互作用, 并且发现了另一个新的与之作用的蛋白 LRRFIP2, 它与 LRRFIP1 具有一定的同源性(啮齿类 LRRFIP1 和 LRRFIP2 同源性在 41%左右) [4], 初步推测它们竞争结合同一位点, 执行相似的功能。

2. LRRFIP 的结构

lrrfip 基因的一个显著特点就是有很多亚型或剪切变体。例如, 通过在 NCBI 搜索人类基因组数据库, 我们发现 *lrrfip1* 和 *lrrfip2* 至少分别存在 49、32 种变体, 其他脊椎动物中也存在类似情况, 这可能与基因表达的差异调控有关[5]。对于 LRRFIP1 亚型 3 而言, 它包含了一个 N 端未知功能的结构域, 一个由 87 个氨基酸组成的卷曲螺旋和一个核酸结合区域(图 1) [6], 其实在几乎所有物种的 LRRFIP1 同源蛋白中, 均发现卷曲螺旋结构, 且该结构高度保守。LRRFIP2 也存在这个保守的卷曲螺旋结构, 但并不存在与 LRRFIP1 类似的 DNA 结合结构域, 且 N 端结构变化较大。

3. LRRFIP1 的功能

LRRFIP1 广泛表达在各组织器官, 定位于细胞质或者细胞核中, 与细胞系或细胞状态相关[7], 具有许多复杂功能。在细胞核里, 主要作为转录抑制子来降低表皮生长因子受体的表达、PDGF α 链的表达以及直接调控 TNF α 的表达, 而 TNF α 可以激活 NF κ B, 因此 LRRFIP1 可以抑制 NF κ B 的活性[8], 后来有研究发现, LRRFIP1 能与 TNF 上游启动子区域的已结合 polycomb 的非编码 RNA 直接结合, 形成抑制复合物调控 TNF 的表达[9]。另外, TNF 启动子区域的多态性也会影响 LRRFIP1 对它的调控, 不仅如此, 谷氨酸转运子 *EAAT2* 基因启动子区域存在一种普遍的突变形态: 这种突变消除了 AP-2 基因调控位点, 同时产生了转录抑制因子 LRRFIP1 的结合位点, 导致大鼠缺血脑中 LRRFIP1 呈现高表达状态, 与血浆中谷氨酸浓度升高以及人中风早期高频的神经功能恶化有关[10]。

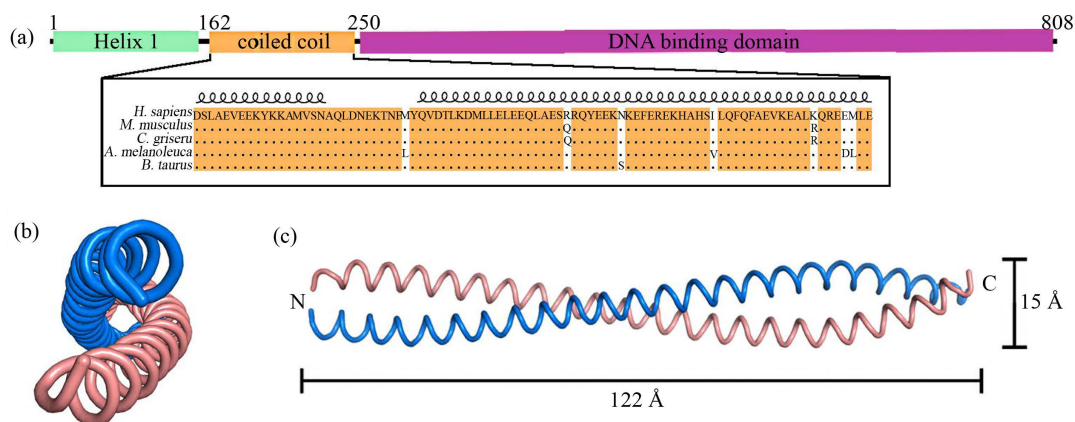


Figure 1. Structure of LRRFIP1 [6]. (a) Domain structure of LRRFIP1 (b) End-on and (c) side views of the LRRFIP1-CC homodimer

图 1. LRRFIP1 的结构[6]。(a) LRRFIP1 结构域 (b) 卷曲螺旋二聚体的末端视图 (c) 侧面图

胞质中, LRRFIP1 能与其他蛋白如 Fli-I、Dvl 等相互作用[11], 也会通过调控 RhoA 的表达来影响细胞骨架结构。例如, 外源 LRRFIP1 可以激活 β -catenin 依赖的转录过程, 但却被 Fli-I 所抑制; LRRFIP1 可以和 p300 协同作用来调控 β -catenin 和 LEF1/TCF 的转录, 但 Fli-I 能打破它们的这种协同作用, 它们的互作参与了细胞骨架的重排过程[7]。除此以外, LRRFIP1 能与结合了 GSK-3 β 的 Dvl 相互作用, 通过抑制 β -catenin 的磷酸化, 来调控 Wnt 非经典信号通路的平面细胞极性[12]以及癌细胞中的经典 Wnt 信号通路[4]。LRRFIP1 还能促进细胞的转变, 如沉默 LRRFIP1 能上调 β -catenin 的磷酸化水平并降低其在核内表达的水平从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 达到反转上皮细胞间质转型(EMT)的目的[13]。不仅如此, LRRFIP1 会正向调控 RhoA 的表达, 而过表达 LRRFIP1 反而会抑制 RhoA 的表达, 进而破坏 actin 或者细丝蛋白的结构[14]。RhoA 可与 LARG 蛋白的 RGS 结构域互作, 通过调节整合素依赖的 RhoA 激活来诱导细胞粘附、迁移与浸润等过程, 促进结肠、直肠癌细胞的转移[15]。

在免疫方面, LRRFIP1 能与 Fli-I 和髓系分化因子 88 (Myd88)相互作用, 而且能够通过 Myd88 相互作用正调控 TLR 免疫反应以及核因子 NF- κ B [16]。胞质中的 LRRFIP1 能结合双链 RNA, 是一种胞内模式识别受体, 能够探测外源病毒[17], 此时 LRRFIP1 可以直接与 dsRNA 以及 AT 或 GC 含量丰富的 dsDNA 结合[18]。已经证明机体在受到 poly(I:C)、poly(dA:dT)或 poly(dG:dC) dsDNA 的刺激后, 过表达 LRRFIP1 能够显著增强 IFN- β 的表达量[19], 同时, 特异性地敲降 LRRFIP1 的 siRNA 能抑制 β 干扰素的产生, 进一步的研究表明, LRRFIP1 能够与 β -catenin 相互作用并使得后者激活并结合到转录因子 IRF3 的羧基端, 从而启动 IFN β 的转录, 说明 LRRFIP1 能够调节 I 型干扰素的表达, 而该调节过程是通过识别 B 型、Z 型 DNA 和 dsRNA、RNA 病毒实现的[20]。另外也发现, LRRFIP1 能增加 IFN- β 在肝细胞中的表达, 丙肝病毒的存在可以增强这种诱导作用, 但是并不能诱导胞质中 LRRFIP1 的表达, 过表达 LRRFIP1 可以抑制丙肝病毒的复制[21]。

LRRFIP1 还有其他功能, 如 *lrrfip1* 被 miR-132 敲降之后, 能抑制平滑肌细胞的增殖[22]; 磷酸化的 LRRFIP1 会下调其本身的抑制活性, 促使巨噬细胞多核化[23]; LRRFIP1 能调控血栓形成, 通过与血小板表面相关的蛋白相互作用来改变血小板细胞骨架结构, 影响血小板的凝血功能[24]。另外, *lrrfip1* 基因的 SNP 与肥胖、炎症以及精神分裂等病症有关[25]。

4. LRRFIP2 的功能

相比 LRRFIP1, LRRFIP2 的功能研究较少。研究发现, 它在各组织如肺、肝、脑、肌肉等的细胞中

都有广泛表达, 主要参与细胞内信号通路的活化和调控, 在发育和免疫中起作用[26]。在发育方面, LRRFIP2 在其基因组第 26-29 外显子上发生的突变和林奇综合症有关[27]。LRRFIP2 能够与 Dvl 相互作用来增加细胞内 β -catenin 的表达水平, 并激活 β -catenin/LEF(淋巴细胞增强子结合因子)/TCF(T 细胞因子)依赖的转录活性, 爪蟾胚胎中高表达 LRRFIP2 可诱导双脊形成和 Wnt 靶向基因的表达, 说明 LRRFIP2 在 Wnt 信号转导过程中起作用[28]。在免疫方面, LRRFIP2 和 LRRFIP1 可以竞争性地和 MyD88 相互作用来激活 TLR4 信号通路[4], 由于 LRRFIP2 含有很多丝氨酸残基, 有研究者发现了对 LPS 刺激敏感的第 202 位磷酸化位点的变化。进一步的研究发现, 这个位点的磷酸化修饰可以动态调控 LRRFIP2-MyD88 之间的相互作用, 从而调控 TLR4 信号通路的强度和持续时间[29]。另外, 也发现泛素化修饰 LRRFIP2 可以降低其对 LPS 刺激的敏感性[30], 而在 LPS 刺激巨噬细胞之后, LRRFIP2 能正向调控 NF κ B 以及促进细胞因子的产生。最近的研究表明, 在巨噬细胞中, LRRFIP2 是炎性复合体活化的负向调控蛋白, LRRFIP2 可以通过与 NLRP3 相互作用促进 Flightless-I 蛋白发挥其抑制 Caspase-1 活性的功能, 从而抑制炎性复合体的活化以及 IL-1 β 的剪切成熟[26]。在无脊椎动物如凡纳滨对虾中也发现了 LRRFIP2 基因, 在昆虫细胞中过表达 LRRFIP2 可以增强抗微生物多肽的表达, 对肠炎弧菌的抵抗具有一定效果[31]。

5. LRRFIP 的演化

蛋白同源性搜索发现, LRRFIP 仅存在于后生动物中, 在植物、真菌和原生生物中并没有发现它的同源基因, 它是一类非常小的蛋白家族。选择几种代表性物种的同源基因的蛋白利用邻接法(NJ)构建该基因的系统进化树, 结果如图 2 所示: 在低等多细胞动物海绵中, 只有单拷贝的 LRRFIP, 已知的文昌鱼中

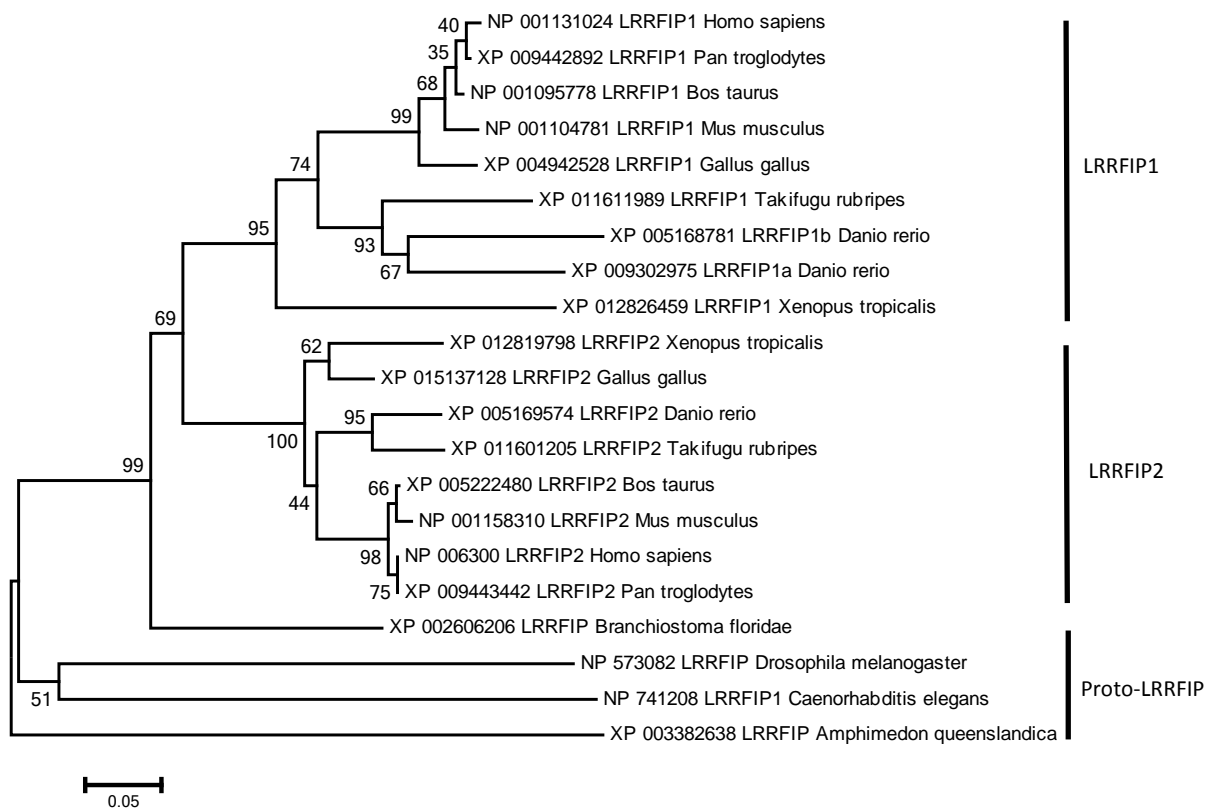


Figure 2. Phylogenetic tree of LRRFIP

图 2. LRRFIP 系统进化树

只含有一个 LRRFIP, 而当进化到脊椎动物时, 明显的分为两簇, 一簇为 LRRFIP1, 另一簇为 LRRFIP2, 在鱼类如斑马鱼中, 由于基因组的复制, LRRFIP1 还分化出 LRRFIP1a 和 LRRFIP1b, 它们分别处在第 9 和第 6 号染色体上, 但 LRRFIP2 (在第 13 号染色体上) 并没有发生复制现象。

6. 总结与展望

通过 20 多年的研究, 人们对 LRRFIP 基因家族有了初步的认识。LRRFIP 不仅能够作为转录抑制因子在发育中起作用, 而且还可以作为模式识别受体识别外源核酸, 在免疫反应中起作用。在医学上, LRRFIP1 与癌细胞转移, 血栓形成, 炎症反应等都有关系, 因此, 需要在模式生物中利用基因组编辑技术如 TALEN、Cas9 或 NgAgo-gDNA 对 LRRFIP 基因家族的基因功能以及调控机制进行深入的研究。同时, 由于 LRRFIP 基因在低等无脊椎动物中如文昌鱼中只有单拷贝, 研究它的功能或许能为高等物种同源基因的功能研究提供有益启示。

基金项目

山东省自然科学基金(ZR2012CM015)。

参考文献 (References)

- [1] Khachigian, L.M., Santiago, F.S., Rafty, L.A., *et al.* (1999) GC Factor 2 Represses Platelet-Derived Growth Factor A-Chain Gene Transcription and Is Itself Induced by Arterial Injury. *Circulation Research*, **84**, 1258-1267. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.84.11.1258>
- [2] Liu, Y.T. and Yin, H.L. (1998) Identification of the Binding Partners for Flightless I, A Novel Protein Bridging the Leucine-Rich Repeat and the Gelsolin Superfamilies. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 7920-7927. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.14.7920>
- [3] Wilson, S.A., Brown, E.C., Kingsman, A.J., *et al.* (1998) TRIP: A Novel Double Stranded RNA Binding Protein Which Interacts with the Leucine Rich Repeat of Flightless I. *Nucleic Acids Research*, **26**, 3460-3467. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/26.15.3460>
- [4] Dai, P., Jeong, S.Y., Yu, Y., *et al.* (2009) Modulation of TLR Signaling by Multiple MyD88-Interacting Partners including Leucine-Rich Repeat Fli-I-Interacting Proteins. *Journal of Immunology*, **182**, 3450-3460. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0802260>
- [5] Gubern, C., Camos, S., Hurtado, O., *et al.* (2014) Characterization of Gcf2/Lrrfip1 in Experimental Cerebral Ischemia and Its Role as a Modulator of Akt, mTOR and Beta-Catenin Signaling Pathways. *Neuroscience*, **268**, 48-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.051>
- [6] Nguyen, J.B. and Modis, Y. (2013) Crystal Structure of the Dimeric Coiled-Coil Domain of the Cytosolic Nucleic Acid Sensor LRRFIP1. *Journal of Structural Biology*, **181**, 82-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2012.10.006>
- [7] Kostianets, O., Antoniuk, S., Filonenko, V., *et al.* (2012) Immunohistochemical Analysis of Medullary Breast Carcinoma Autoantigens in Different Histological Types of Breast Carcinomas. *Diagnostic Pathology*, **7**, 161. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1596-7-161>
- [8] Ye, Y., Perez-Polo, J.R., Qian, J., *et al.* (2011) The Role of microRNA in Modulating Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiological Genomics*, **43**, 534-542. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00130.2010>
- [9] Shi, L., Song, L., Fitzgerald, M., *et al.* (2014) Non-Coding RNAs and LRRFIP1 Regulate TNF Expression. *Journal of Immunology*, **192**, 3057-3067.
- [10] Mallolas, J., Hurtado, O., Castellanos, M., *et al.* (2006) A Polymorphism in the EAAT2 Promoter Is Associated with Higher Glutamate Concentrations and Higher Frequency of Progressing Stroke. *The Journal of Experimental Medicine*, **203**, 711-717. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051979>
- [11] Ohtsuka, H., Oikawa, M., Ariake, K., *et al.* (2011) GC-Binding Factor 2 Interacts with Dishevelled and Regulates Wnt Signaling Pathways in Human Carcinoma Cell Lines. *International Journal of Cancer*, **129**, 1599-1610. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25837>
- [12] Strudwick, X.L. and Cowin, A.J. (2012) Cytoskeletal Regulation of Dermal Regeneration. *Cells*, **1**, 1313-1327. <http://dx.doi.org/10.3390/cells1041313>
- [13] Douchi, D., Ohtsuka, H., Ariake, K., *et al.* (2015) Silencing of LRRFIP1 Reverses the Epithelial-Mesenchymal Transi-

- tion via Inhibition of the Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway. *Cancer Letters*, **365**, 132-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.05.023>
- [14] Shen, D.W., Pouliot, L.M., Gillet, J.P., *et al.* (2012) The Transcription Factor GCF2 Is an Upstream Repressor of the Small GTPase RhoA, Regulating Membrane Protein Trafficking, Sensitivity to Doxorubicin, and Resistance to Cisplatin. *Molecular Pharmaceutics*, **9**, 1822-1833. <http://dx.doi.org/10.1021/mp300153z>
- [15] Ariake, K., Ohtsuka, H., Motoi, F., *et al.* (2012) GCF2/LRRFIP1 Promotes Colorectal Cancer Metastasis and Liver Invasion through Integrin-Dependent RhoA Activation. *Cancer Letters*, **325**, 99-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.012>
- [16] Bagashev, A., Fitzgerald, M.C., Larosa, D.F., *et al.* (2010) Leucine-Rich Repeat (in Flightless I) Interacting Protein-1 Regulates a Rapid Type I Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **30**, 843-852. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2010.0017>
- [17] Broz, P. and Monack, D.M. (2013) Newly Described Pattern Recognition Receptors Team up against Intracellular Pathogens. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 551-565. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3479>
- [18] Suriano, A.R., Sanford, A.N., Kim, N., *et al.* (2005) GCF2/LRRFIP1 Represses Tumor Necrosis Factor Alpha Expression. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 9073-9081. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.20.9073-9081.2005>
- [19] 李婷婷, 何小兵, 贾怀杰, 等. 小鼠 LRRFIP1 基因的克隆及 LRRFIP1 天然免疫模式识别功能的研究[J]. 中国兽医科学, 2015, 45(6): 649-653.
- [20] Yang, P., An, H., Liu, X., *et al.* (2010) The Cytosolic Nucleic Acid Sensor LRRFIP1 Mediates the Production of Type I Interferon via a Beta-Catenin-Dependent Pathway. *Nature Immunology*, **11**, 487-494. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1876>
- [21] Liu, Y., Zou, Z., Zhu, B., Hu, Z., Zeng, P. and Wu, L. (2015) LRRFIP1 Inhibits Hepatitis C Virus Replication by Inducing Type I Interferon in Hepatocytes. *Hepatitis Monthly*, **15**, e28473.
- [22] Choe, N., Kwon, J.S., Kim, J.R., *et al.* (2013) The microRNA miR-132 Targets Lrrfip1 to Block Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Hyperplasia. *Atherosclerosis*, **229**, 348-355. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.009>
- [23] Rotival, M., Ko, J.H., Srivastava, P.K., *et al.* (2015) Integrating Phosphoproteome and Transcriptome Reveals New Determinants of Macrophage Multinucleation. *Molecular & Cellular Proteomics*, **14**, 484-498. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M114.043836>
- [24] Goodall, A.H., Burns, P., Salles, I., *et al.* (2010) Transcription Profiling in Human Platelets Reveals LRRFIP1 as a Novel Protein Regulating Platelet Function. *Blood*, **116**, 4646-4656. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-04-280925>
- [25] Plourde, M., Vohl, M.C., Bellis, C., *et al.* (2013) A Variant in the LRRFIP1 Gene Is Associated with Adiposity and Inflammation. *Obesity*, **21**, 185-192. <http://dx.doi.org/10.1002/oby.20242>
- [26] Jin, J., Yu, Q., Han, C., *et al.* (2013) LRRFIP2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages by Promoting Flightless-I-Mediated Caspase-1 Inhibition. *Nature Communications*, **4**, Article No. 2075. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3075>
- [27] Pinheiro, M., Pinto, C., Peixoto, A., *et al.* (2011) A Novel Exonic Rearrangement Affecting MLH1 and the Contiguous LRRFIP2 Is a Founder Mutation in Portuguese Lynch Syndrome Families. *Genetics in Medicine*, **13**, 895-902. <http://dx.doi.org/10.1097/GIM.0b013e31821dd525>
- [28] Liu, J., Bang, A.G., Kintner, C., *et al.* (2005) Identification of the Wnt Signaling Activator Leucine-Rich Repeat in Flightless Interaction Protein 2 by a Genome-Wide Functional Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 1927-1932. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409472102>
- [29] Gunawardena, H.P., Huang, Y., Kenjale, R., *et al.* (2011) Unambiguous Characterization of Site-Specific Phosphorylation of Leucine-Rich Repeat Fli-I-Interacting Protein 2 (LRRFIP2) in Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Mediated Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 10897-10910. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.168179>
- [30] Buchsbaum, S., Bercovich, B., Ziv, T. and Ciechanover, A. (2012) Modification of the Inflammatory Mediator LRRFIP2 by the Ubiquitin-Like Protein FAT10 Inhibits Its Activity during Cellular Response to LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **428**, 11-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.110>
- [31] Zhang, S., Yan, H., Li, C.Z., *et al.* (2013) Identification and Function of Leucine-Rich Repeat Flightless-I-Interacting Protein 2 (LRRFIP2) in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS ONE*, **8**, e57456. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057456>

再次投稿您将享受以下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>