

小鼠富亮氨酸重复结构蛋白 Lrig2 基因、蛋白结构及组织定位分析*

柴立民^{1,2} 张园² 车永哲² 杨荣存^{2Δ}

(1 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室 北京 100700 ;

2 南开大学医学院分子免疫学实验室 天津 300071)

摘要 目的:分析小鼠富亮氨酸重复结构蛋白家族成员 Lrig2 的基因与蛋白的结构,明确其组织分布和定位,并对其功能进行初步预测。方法:利用生物信息学分析技术对小鼠 Lrig2 基因的染色体定位、蛋白结构进行分析预测,通过 RT-PCR、mRNA 原位杂交技术检测 Lrig2 基因在小鼠不同组织中的表达定位,通过系统进化树分析 Lrig2 与其他 Lrrs 蛋白家族成员的同源性。结果:生物信息学分析显示,Lrig2 是一种跨膜蛋白受体,是 Lrrs 蛋白超家族成员之一,胞外区含有 15 个 Lrr 模序、3 个免疫球蛋白样结构域,存在单一的跨膜结构域,Lrig2 在小鼠的多个组织中表达,其中在胸腺、脾脏等组织中表达较强;系统树分析显示,Lrigs 蛋白是 sLrPs 超家族成员,是一种跨膜蛋白受体。结论:Lrig2 在免疫组织中表达较强,推测其可能在肿瘤免疫应答进程中发挥重要的效能。

关键词 Lrr-免疫球蛋白结构域样蛋白 2;基因与蛋白结构;组织定位

中图分类号:Q95-3,Q75 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)11-2014-04

Structure and Tissue Localization Analysis of Mus Lrig2 Gene and Protein

CHAI Li-min^{1,2}, ZHANG Yuan², CHE Yong-zhe², YANG Rong-cun^{2Δ}

(1 Key laboratory of Chinese internal medicine of Ministry of Education, Dong zhimen hospital affiliated to Beijing university of Chinese medicine, Beijing 100700, China;

2 Department of Immunology, Nankai University School of Medicine, Tianjin 300071, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the gene and protein structure of Mus Leucine-rich repeat immunoglobulin-like domain protein 2 (Lrig2), and to definite its tissue distribution and localization, predict its biologic function. **Methods:** Bioinformatics analytical technique was used to analyze the chromosomal localization and protein structure of Mus Lrig2. The expression distribution of Lrig2 in mouse tissues was detected by RT-PCR and mRNA in situ hybridization. The phyletic evolution tree was used to analyze the homologous with Lrrs protein family. **Results:** Lrig2 was a transmembrane protein, which was one member of Lrr protein family. There were 15 Lrr motif and 3 immunoglobulin-like domains. This protein has one transmembrane domain. Lrig2 gene was expressed in several tissues, especially in thymus and spleen. Lrigs proteins belong to a new class of the sLRP family. It is a transmembrane protein. **Conclusions:** The expression of Lrig2 in immunity tissues were notably, which indicated that Lrig2 played important biologic function in immunologic response of cancer.

Key words: Mus Leucine-rich repeat immunoglobulin-like domain protein 2; Gene and protein structure; Tissues localization

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q75 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)11-2014-04

前言

富亮氨酸重复结构(Leucine-rich repeats Lrrs)是介导蛋白与蛋白之间相互作用的高度保守的氨基酸序列,通常由 20-29 个氨基酸残基组成,其中 11 个氨基酸高度保守。蛋白晶体结构分析显示,Lrr 由一个 b 片层和一个 a 螺旋通过 loop 环连接形成一个非球形的马蹄形分子结构域。基于 Lrr 的特殊结构,是 Lrr 蛋白容易与较小的球形蛋白结合,介导蛋白与蛋白之间的相互作用。LRR-免疫球蛋白样结构域蛋白(Lrr-immunoglobulin-like domains Lrigs)是最近发现的一种生长因子信号负向调

节因子,研究发现,LRRIG 是一种跨膜蛋白受体,其膜内蛋白结构可以通过自身的生物学机制,调节多种酪氨酸激酶受体的功能,包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)^[1]。我们通过生物信息学技术,对小鼠 Lrig 蛋白家族的重要成员 Lrig2 的基因及蛋白结构进行了深入的分析,利用 RT-PCR、mRNA 原位杂交技术,明确 Lrig2 在小鼠不同组织中的定位和分布。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划 No.2006AA020502)

作者简介:柴立民(1974-),男,医学博士,助理研究员,主要研究方向:中医药防治自身免疫性疾病的研究,

电话:010-84013190, E-mail: liminchai@hotmail.com

Δ通讯作者:杨荣存 ryang@nankai.edu.cn

(收稿日期:2011-03-05 接受日期:2011-03-30)

表 1 EST 数据、RT-PCR 分析 Lrig2 在小鼠不同组织中的分布

Table 1 Lrig2 tissue distribution based an EST data base sequences

Tissue Name	Transcripts per million	Gene	EST/Total EST
Intestine(小肠)	23		2/84236
Kidney(肾)	8		1/122453
Liver(肝)	0		0/108957
Lung(肺)	10		1/96442
Muscle(骨骼肌)	0		0/27256
Spleen(脾)	169		16/94430
Thymus(胸腺)	60		7/116168
Heart(心)	0		0/52131

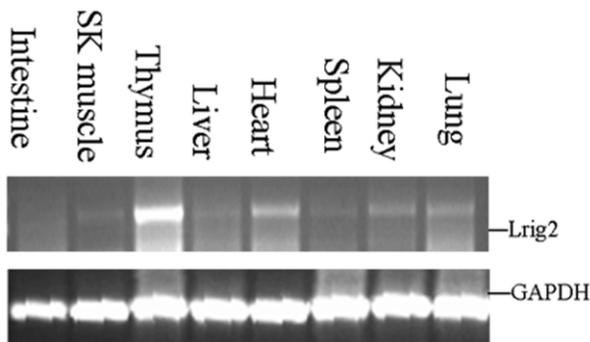


图 2 RT-PCR 检测 Lrig2 mRNA 在小鼠不同组织中的表达

Fig.2 Tissue distribution of Lrig2 by EST and RT-PCR. A, B, RT-PCR analysis for determine expression pattern of Lrig2 mRNA in organs of mouse

2.3 mRNA 组织原位杂交技术检测 Lrig2 mRNA 在小鼠不同组织中的分布

为进一步验证 RT-PCR 实验结果,本研究设计了地高辛标记的 Lrig2 mRNA 特异性探针,通过 mRNA 组织原位杂交技术确定 Lrig2 在小鼠不同组织中的表达定位。如图 3 所示,在小鼠胸腺、脾、心、肺和肾脏组织中,均检测到 Lrig2 mRNA 阳性表达。在肺、胸腺和脾脏组织中出现大量的散在阳性表达细胞,在脾脏中的阳性表达集中在脾索部位,在肾小球部位表达呈现强阳性。在小肠组织中未发现阳性细胞。原位杂交结果与 RT-PCR 结果吻合。

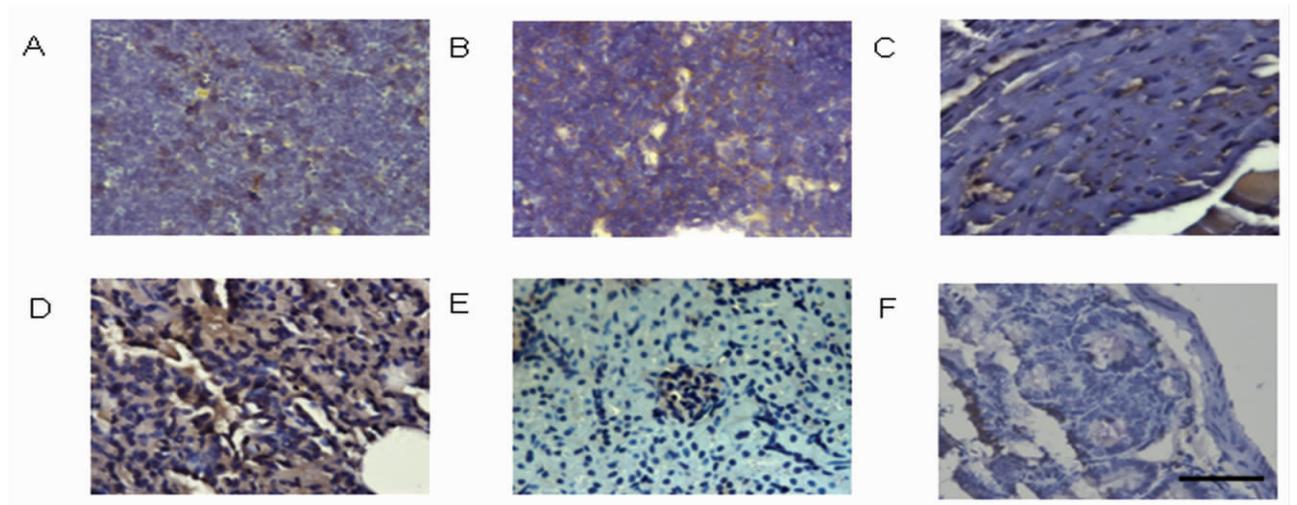


图 3 mRNA 原位杂交技术分析 Lrig2 的组织定位。A 胸腺 B 脾 C 心 D 肺 E 肾 F 小肠 × 400 倍 标尺为 100 nm

Fig.3 Localization of Lrig2 mRNA in tissues of mouse by in situ hybridization. The spacimens were observed and photographed under a light microscope at magnification of × 400. One bar represents 100 nm

2.4 小鼠 Lrig2 蛋白与 sLrPs 家族成员的同源性分析

本研究通过 ClustalW 和 ClustalX 软件分析小鼠 Lrig2 与其他 sLrPs 蛋白家族成员的同源性,研究中所用的所有蛋白序列均来自 NCBI reference sequences 公共数据库。根据表型群分析, sLrPs 蛋白 Class-I、II、III、IV、V 分别属于不同的系统树进化

分支。Lrig 蛋白不属于上述五种类别,是 sLrPs 蛋白超家族成员,属于一种跨膜蛋白受体。

3 讨论

Lrig 蛋白是最近发现的一组 Lrr 蛋白家族的成员,目前已

经确定了3种Lrig蛋白，Lrig1、Lrig2和Lrig3。研究发现，Lrig1是生长因子信号的负性调节蛋白，Lrig2、Lrig3的功能尚不清楚^[8-9]。本研究通过生物信息学、RT-PCR和mRNA原位杂交技术对小鼠Lrig2基因和蛋白的结构，以及其在小鼠不同组织的分布和定位发现，Lrig2基因序列位于小鼠3号染色体F2.2区域，预测其作为一种跨膜蛋白受体。其胞外区含有15个Lrr模序和3个免疫球蛋白结合结构域，是一种单一跨膜蛋白。在Lrig2蛋白的胞外区有12个糖基化位点，胞内区含有1个糖基化位点，2个酪氨酸磷酸化位点。EST数据分析显示，Lrig2在小肠、肾、肺、脾和胸腺中都有表达。但我们通过RT-PCR和mRNA原位杂交技术研究发现，Lrig2在胸腺呈强表达，在小肠中未发现有Lrig2 mRNA存在。其在胸腺、心脏和肺脏中的表达呈散在性，而在脾脏中主要集中在脾索区，在肾脏的肾小球部位表达较多。

胸腺、脾脏等免疫器官中呈现强表达。

Lrig1的功能已经比较明确，其对生长因子信号起负性调节作用并参与表皮干细胞的激活^[11-12]。Lrig1基因缺失的小鼠可以导致牛皮癣状表皮超常增生^[13]。Lrig2的功能尚不清楚，通过上述实验结果我们认为其功能可能与Lrig1相关。Lrig2在免疫器官中高表达，预示其可能在肿瘤的发生和发展过程中发挥重要的生理效应，对其功能进行深入的研究具有较高的研究价值。

参考文献(References)

- [1] Yi W, Holmlund C, Nilsson J, et al. Paracrine regulation of growth factor signaling by shed leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(4):504-512
- [2] Eddy SR. Profile hidden Markov models [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 755-763
- [3] Dolan J, Walshe K, Alsbury S, et al. The extracellular leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns [J]. *BMC Genomics*, 2007,8: 320-328
- [4] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes[J]. *J Mol Biol*, 2001, 305(3): 567-580
- [5] Tusnády GE, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(9): 849-850
- [6] Hofmann K, Stoffel W. Profilegraph: an interactive graphical tool for protein sequence analysis [J]. *Comput Appl Biosci*, 1992, 8(4): 331-337
- [7] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. *J Mol Biol*, 2004, 340(4): 783-795
- [8] Holmlund C, Haapasalo H, Yi W, et al. Cytoplasmic LRIG2 expression is associated with poor oligodendroglioma patient survival [J]. *Neuropathology*, 2009, 29(3):242-247
- [9] Holmlund C, Nilsson J, Guo D, et al. Characterization and tissue-specific expression of human LRIG2[J]. *Gene*, 2004, 332(5):35-43
- [10] Yoshiyuki M, Duenpim P, Masaru K, et al. Nephrocan, a Novel Member of the Small Leucine-rich Repeat Protein Family, Is an Inhibitor of Transforming Growth Factor- signaling [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47):36044-36051
- [11] Karlsson T, Mark EB, Henriksson R, et al. Redistribution of LRIG proteins in psoriasis [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(5):1192-1195
- [12] Hedman H, Henriksson R. LRIG inhibitors of growth factor signalling-double-edged swords in human cancer? [J]. *R.Eur J Cancer*, 2007, 43(4):676-682
- [13] Tanemura A, Nagasawa T, Inui S, et al. LRIG-1 provides a novel prognostic predictor in squamous cell carcinoma of the skin: immunohistochemical analysis for 38 cases [J]. *Dermatol Surg*, 2005, 31(4):423-430

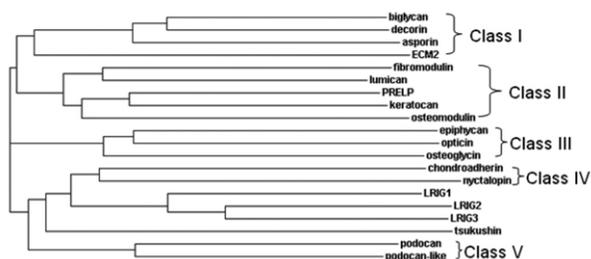


图4 系统进化树分析 Lrig2 与其他 sLrPs 蛋白家族成员的同源性
Fig.4 Phylogenetic tree analysis of Lrig2 together with other mouse sLrP members

富亮氨酸蛋白聚糖 / 蛋白质 (Small leucine-like proteoglycans/proteins, sLrPs)是一类在进化过程中保守的分泌性蛋白家族，包含一个由6-20个Lrr模序组成的核心蛋白序列，后翻译修饰的氨基葡聚糖序列、N-糖基化位点和酪氨酸硫酸化作用位点。sLrP家族成员在胶原纤维形成、细胞增生和分化、在不同组织中迁移等方面发挥重要的生物学效能。根据外显子数量、N-末端半胱氨酸相间的氨基酸残基和Lrr模序，可以把sLrP蛋白家族分为不同的亚型。通过共有序列T型(zxxxaxxxxFxxaxxLxLxxNxL)和S型(xxaPzxLPxxLxxLx-axxxxFxxaxxLxxLxxNxL)可以对Lrr模序进行鉴定，“z”为间断性的间隙，“x”表示为可变的氨基酸残基，“a”是缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸，“L”是异亮氨酸或亮氨酸。Class I、II sLrPs由12个Lrr模序组成的4个串联的STT模序，Class III sLrPs含有7个(ST)T(ST)2Lrr模序，II型胶原和软骨粘附素(Chondroadherin)是Class IV sLrPs，含有10个T型Lrrs^[10]。Lrig2蛋白含有12个T型Lrr模序和3个S型Lrr模序，与其他sLrPs亚型存在较大差异。系统树分析显示，Lrig蛋白属于sLrPs超家族成员之一，是一种跨膜蛋白受体。Lrig2组织分布和定位显示，其在