

富亮氨酸重复超家族新成员 LRRC4 的克隆 与在脑瘤中的表达分析*

王洁如 钱 骏 董 利 李小玲 谭 琛 李 江 张必成 周 洁 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 在染色体 7q31-32 多种肿瘤杂合性丢失 (loss of heterozygosity, LOH) 高频区, 采用表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 介导的定位候选克隆策略获得了一个定位于人染色体 7q31-32 的新基因 (GenBank 登录号: AF196976)。该基因编码 653 个氨基酸, 蛋白质理论 pI/M : 6.58/72.7 ku。它包含七个典型的 LRR、一个 IgC2 样结构域。此外, 它还包含一个 N 端信号肽、一个 C 端跨膜区。其结构特征表明它是富亮氨酸重复 (leucine-rich repeat, LRR) 超家族的新成员。经过人类基因组命名委员会的同意, 将该基因命名为 LRRC4。此外, 通过序列相似性匹配还获得了定位于小鼠 6 号染色体的 LRRC4 的同源基因 (GenBank 登录号: AF290542)。RNA 印迹和 RT-PCR 检测发现 LRRC4 在正常脑组织相对特异表达, 而在多种原发性脑瘤表达明显下调或缺失。综合考虑 LRRC4 基因的序列特征及表达谱, 提示 LRRC4 基因可能在神经系统中发挥重要作用。

关键词 新基因, 富亮氨酸重复, 脑瘤

学科分类号 R73

细胞遗传学研究表明染色体 7q 与多种人类肿瘤密切相关, Zenklusen 等^[1]用染色体转移的方法将人类 7 号染色体导入鼠来源的鳞癌细胞株中, 发现插入的染色体能将肿瘤细胞的成瘤时间延长 2~3 倍, 部分细胞的恶性表型被完全抑制, 而丢失了插入 7 号染色体的细胞克隆则又恢复了其恶性表型。Ogata 等^[2]将人类完整的 7 号染色体导入已丢失 7q31-32 区域的永生化人类成纤维细胞株 KMST-6 和 SUSM-1 细胞, 发现这些细胞出现了终末分化的特性。提示在 7 号染色体上可能存在抑瘤基因。

分子遗传学研究发现 7q31-32 区域多个位点的等位基因杂合性丢失是头颈部肿瘤、散发性肾癌、原发性乳腺癌、胃肠癌、骨髓性白血病、前列腺癌、卵巢癌等的常见分子事件^[3~7]。最近, 我们实验室采用微卫星位点分析法也发现 7q31-32 区域 D7S500-D7S509-D7S495 是鼻咽癌的 LOH 高频缺失区^[8]。这些实验证据强烈提示染色体 7q31-32 区域存在一个或多个抑瘤基因。因此, 我们试图通过表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 介导的定位候选克隆策略克隆该区域内肿瘤相关的新基因。

本研究中, 通过搜寻该区域可能代表新基因的 EST, 差异 RT-PCR 方法筛选在正常组织和肿瘤活检组织中表达差异的 EST, 我们获得了一个来源

于胎脑组织的 EST H23117。进一步通过 cDNA 克隆测序和 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA end, RACE), 成功地克隆了该 EST 代表的新基因。生物信息学分析表明该基因是一个新的亮氨酸丰富重复序列^[9] (leucine-rich repeats, LRRs) 超家族成员, 经过人类基因组国际命名委员会同意将其命名为 LRRC4。此外, 我们对该基因的正常组织表达谱、原发性脑瘤中的表达, 序列特征及其可能的功能进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料

60 例经病理确诊的常见原发性脑瘤标本 (包括 20 例胶质瘤、20 例脑膜瘤和 20 例垂体腺瘤) 及 10 例少量脑挫裂伤正常脑组织由湘雅医院神经外科提供, 于无菌条件下取出相应组织, 液氮保存备用。

* 国家高技术“863”计划资助项目 (102-10-01-05、Z19-01-01-03), 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1998051008), 美国中华医学会项目 (96-655), 湖南省自然科学基金项目 (00JJY20108) 和国家自然科学基金项目 (30100191) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2001-07-03, 接受日期: 2001-09-12

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提: 根据 TRIZOL™ 试剂盒 (GIBICOL/BRL 公司) 操作说明提取组织标本 RNA, 溶于 DEPC 处理水. 用 DNaseI 消化 RNA 中痕量的 DNA, 反应体系为: 10 mmol/L Tris·HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 6 mmol/L MgCl₂, 1 μl 反应体积含 1 U RNasin, 1 μg RNA 样品用 1 U DNaseI 消化. 37℃ 1 h. 苯酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 风干, 溶于 DEPC 处理水中. 逆转录前, 取 2 μl RNA 样品为模板, 进行常规 PCR 扩增 GAPDH 目的片段, 以保证 RNA 样品中 DNA 消化完全.

1.2.2 引物设计与合成: 用 Primer 3 软件设计 RT-PCR 及 RACE 反应引物, 大连宝生物工程有限公司合成.

1.2.3 差异 RT-PCR: 根据逆转录试剂盒 (Promega 公司) 说明作逆转录反应, 反应体积 20 μl. 取 2 μl 逆转录产物作模板, 加入基因特异引物 (left: 5' ttggcccaataaacctctc 3'; right: 5' acaggttgtagcttgcgcgt 3') 和 GAPDH 引物 (left: 5' gtcacatgacacatttggtatc 3'; right: 5' ctgtagccaaattcgtgtcatcac 3') (作为内参照), 进行差异 RT-PCR 反应. 50 μl PCR 反应体系中含 KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 200 mmol/L, Tris·HCl 10 mmol/L, pH 8.0, 基因特异引物 0.1 mmol/L, GAPDH 引物 0.1 mmol/L, 模板 cDNA 2.5 μl, TaqDNA 聚合酶 3U, 石蜡油覆盖. 反应参数: 95℃ 变性 5 min, 94℃ 1 min, 59℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min. 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.4 cDNA 克隆测序: 包含相应 EST 的 cDNA 克隆购自 Research Genetics Inc, 用质粒纯化试剂盒 (Promega 公司) 抽提、纯化, API 自动测序仪测序.

1.2.5 RACE 反应: 以成人脑 cDNA 文库 (由夏家辉院士馈赠) DNA 作模板, 基因特异引物 (GSP1: 5' agttgagttccacaagtgaagccagcc 3', GSP2: 5' gagctggagatgtcagggaaccactt 3') 与载体臂公用引物 lamda gt10reverse (5' gaggtggcttatgagtattttccagggtta 3') 行巢式 PCR 反应. 反应参数: 94℃ 1 min, 94℃ 30 s, 68℃ 4 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物. 选用上海华舜生物工程有限公司的核酸纯化试剂盒所提供的方法对 PCR 产物进行凝胶电泳回收, pGEM-T EASY system (Promega 公司) 亚克隆,

TA 自动测序分析仪测定核苷酸序列.

1.2.6 RNA 印迹: 人 Multiple Tissue Northern (MTN™) Blots 购自 CLONTECH 公司. EcoRI 和 HindIII 双酶切包含差异片段的质粒 (反应体系 20 μl, 37℃ 60 min), 酶切后回收目的片段 (胶回收试剂盒由上海华舜公司提供). 以此目的片段为模板, 按随机引物探针标记试剂盒 (CLONTECH 公司) 说明, α-³²P-dCTP (北京亚辉公司) 1.85 × 10⁶ Bq, 标记探针, 37℃ 18 h. 根据文献 [10] 操作程序, 68℃ 杂交, 2 × SSC、0.05% SDS 室温下淋洗膜 2 次, 然后 37℃ 洗膜 20 min, 0.1 × SSC、0.1% SDS 45℃ 洗膜 10 min, -70℃ 放射自显影.

1.2.7 生物信息学分析: 代表新基因的 EST 通过查询 Unigene 及 dbEST 等数据库获得. cDNA 序列及其编码的氨基酸序列采用 Blast 程序与 GenBank 和 Swiss-protein 等数据库中进行同源性比较. 应用 ClustalW1.8 进行氨基酸多序列比较分析. 蛋白质基序的查询和家族分析使用 Prosite 数据库 Pfam 数据库及 SMART 程序. 蛋白质定位分析采用 SPORT 程序.

2 结 果

2.1 H23117 代表的新基因的 cDNA 克隆

为了克隆 7q31-32 多种肿瘤共同缺失区的肿瘤相关基因, 采用 EST 介导的定位候选克隆, 查询该区域内 D7S500-D7S509-D7S495 位点附近代表新基因的 EST, 用差异 RT-PCR 检测其在正常组织和肿瘤活检组织中的表达差异, 发现 EST H23117 在脑瘤活检组织中表达下调 (资料未显示). 通过 Unigene 查询发现该 EST 来自一个包含 24 个 EST 的克隆重叠群 Hs. 108681 (其中绝大部分 EST 来源于脑), 且该重叠群与来源于小鼠及大鼠的重叠群 Mm. 40158 和 Rn. 45188 高度同源, 其同源性分别高达: 92.2% 和 95.9%. 提示 H23117 代表的新基因具有高度的保守性. 为了克隆该 EST 代表的新基因, 从 IMAGE 国际合作组购买包含 EST H23117 的 cDNA 克隆 51970. 对其插入片段进行直接测序表明插入片段长度为 1521 bp, 与 GenBank 中的已知基因序列进行同源匹配表明它代表一个新基因. 对其核酸序列进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 分析发现: 该序列 3' 端有 polyA 尾及终止密码子 TGA, 但其 5' 端第一个起始密码子 ATG 前未发现同框的终止密码子. 表明其阅读框 5' 端不完整. 因此, 我们在该序列

的 5' 端设计基因特异引物 GSP1 和 GSP2, 与脑文库载体臂引物行巢式 PCR, 测序获得了该基因的完整的编码 cDNA 片段 (GenBank 登录号: AF196976). ORF 分析表明该基因 cDNA 序列含有 1 962 bp 的完整的开放阅读框架, 编码 653 个氨基酸. 其起始密码子 ATG 位于第 141 位核苷酸, 前有同框的终止密码子, 终止密码子 TGA 位于 2 102 位, 其 3' 端含加尾信号 AATTTAA 及 polyA 尾. 与人类基因组草图序列进行 BLAST 分析进一步说明它是一个新基因, 至少包含 2 个外显子. 同时, 通过匹配, 还获得了定位于小鼠 6 号染色体上的与该基因有 92% 同源的基因 (GenBank 接受号: AF290542). 查询 Unigene 数据库表明它来源于克隆重叠群 Mm. 40158, 说明该小鼠基因是我们克隆的新基因的鼠同源基因.

2.2 LRRC4 基因编码区序列特征

运用因特网中 GenBank/EMBL/DBJ、PDB、Swiss protein 等多种软件分析发现新基因编码 653 个氨基酸 (图 1a), 蛋白质理论 pI/m : 6.58/72.7 ku. PSORT 软件预测它定位于胞膜. 同源性

分析未发现它与任何已知蛋白质同源, 表明它为一个新蛋白质. SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) 程序分析 (图 1b) 发现: 其第 1~46 位氨基酸为信号肽, 第 73~288 位氨基酸中存在 7 个典型的亮氨酸丰富重复序列 (leucine rich repeat, LRR) (图 2a), 其 N 端 (第 45~79 位) 和 C 端 (第 300~351 位) 各有一个富含半胱氨酸的 LRR 结构域, 一个免疫球蛋白 IgC2 样结构位于 365 位~431 位. 此外, 在第 528 位还含有一 23 个氨基酸的跨膜区. 包围 7 个 LRR 的 N 端和 C 端富含半胱氨酸的区域与其他 LRR 蛋白的同源性分析表明该区域与多个 LRR 家族成员如 slit 蛋白^[11]、trk 受体^[12]、Toll 受体^[13] 存在较高的同源性 (图 2b、图 2c). 进一步分析其结构组成发现该基因与多个物种的 LRR 超家族成员的结构组成相同 (资料未显示). 以上分析表明克隆的新基因为进化上高度保守的 LRR 超家族新成员^[13]. 经过人类基因组国际命名委员会的同意, 我们将其命名为 LRRC4 (GenBank 登录号: AF196976).

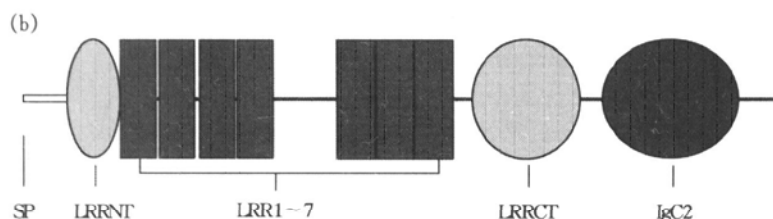
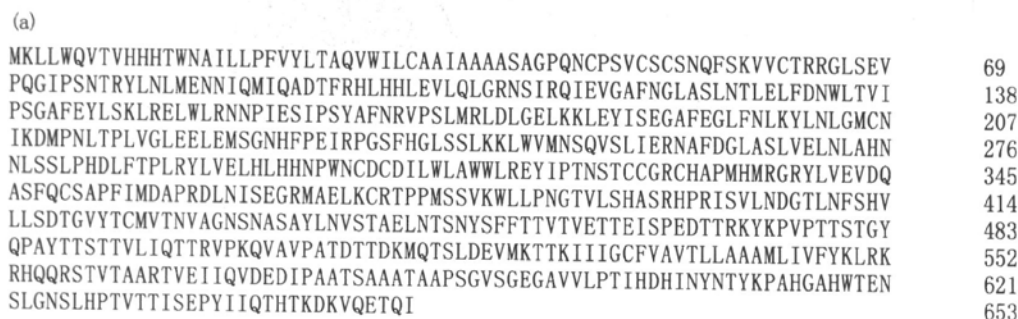


Fig. 1 Primary structural properties of LRRC4 (653 amino acids)

(a) sequence of putative protein of LRRC4. (b) structure features of the deduced sequence of 653 residues by SMART. SP: signal peptide; LRR1-7: leucine-rich repeats; LRRNT: leucine rich repeat N-terminal domain; LRRCT: leucine rich repeat C-terminal domain; IgC2: immunoglobulin C2 domain; TR: transmembrane region.

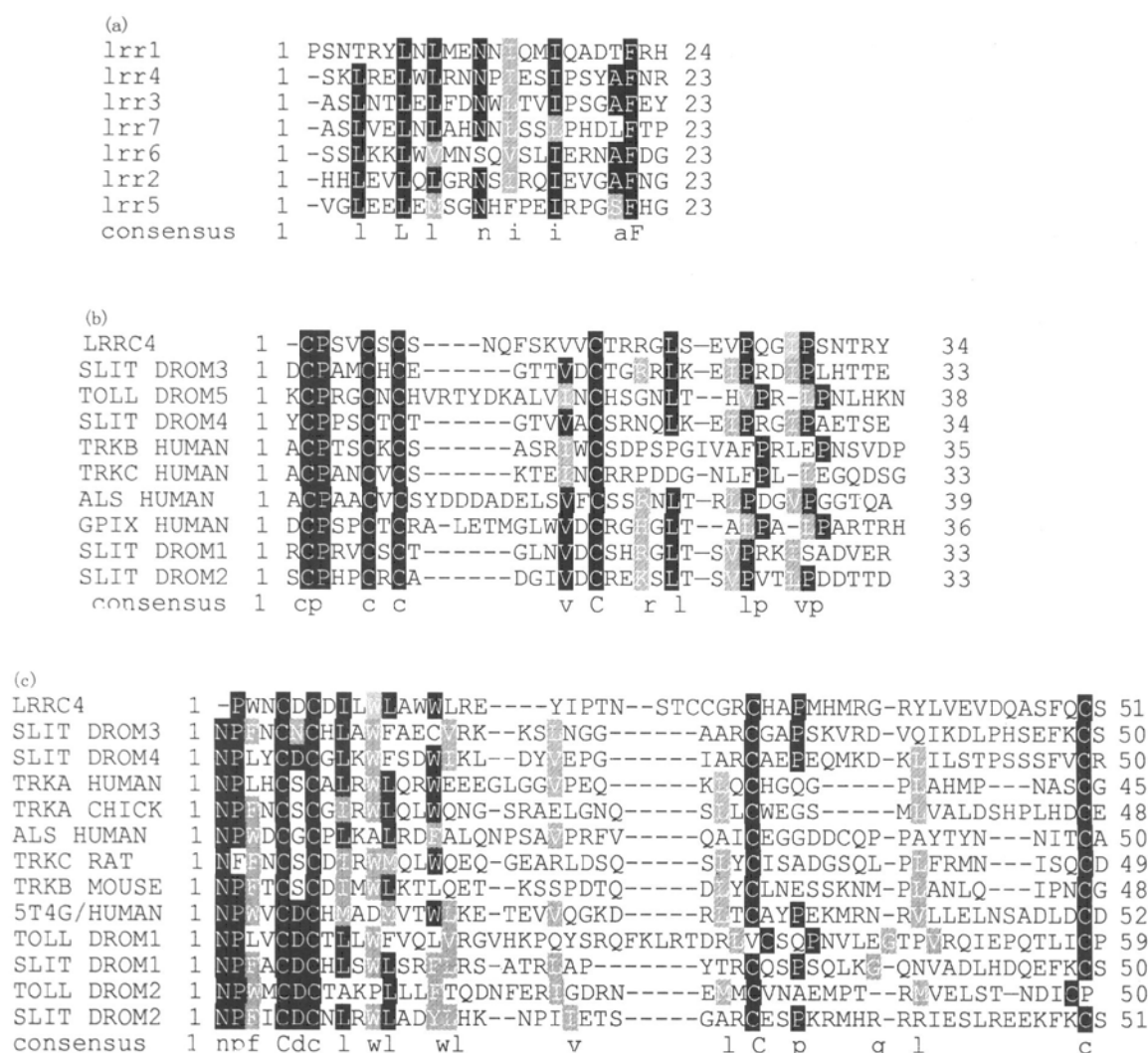


Fig 2 Alignment of LRRC4 with other leucine rich repeat proteins

(a) alignment of seven leucine-rich repeats in LRRC4; (b) alignment of LRRNT with other leucine-rich repeat proteins by SMART; (c) alignment of LRRCT with other leucine-rich repeat proteins by SMART.

2.3 LRRC4 基因组织表达谱及在脑瘤中的表达

以 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切包含 EST H23117 的 cDNA 克隆, 回收插入片段后用随机引物法标记作为探针, 与成人 8 种 MTN 组织膜进行杂交, 结果显示: LRRC4 基因在正常人脑组织中表达较高, 而在肝、胰、心、肺、骨骼肌、胎盘和肾中未检测到表达 (图 3)。提示 LRRC4 在人脑组织相对特异表达。为了进一步确证 LRRC4 在脑瘤组织和正常脑组织的表达差异, 在 LRRC4 基因编码区设计特异引物, 以 GAPDH 作为内对照, 进行 RT-PCR 检测, 结果显示 LRRC4 基因在 80% (48/60) 的常

见原发性脑瘤标本中表达下调 (图 4)。

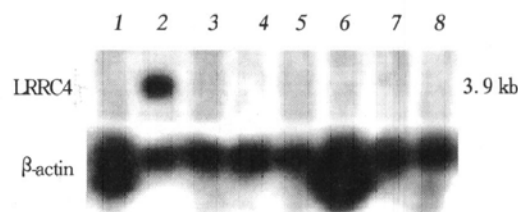


Fig 3 Expression of LRRC4 in normal tissues by Northern blot

1: heart; 2: brain; 3: placenta; 4: lung; 5: liver; 6: skeletal muscle; 7: kidney; 8: pancreas.

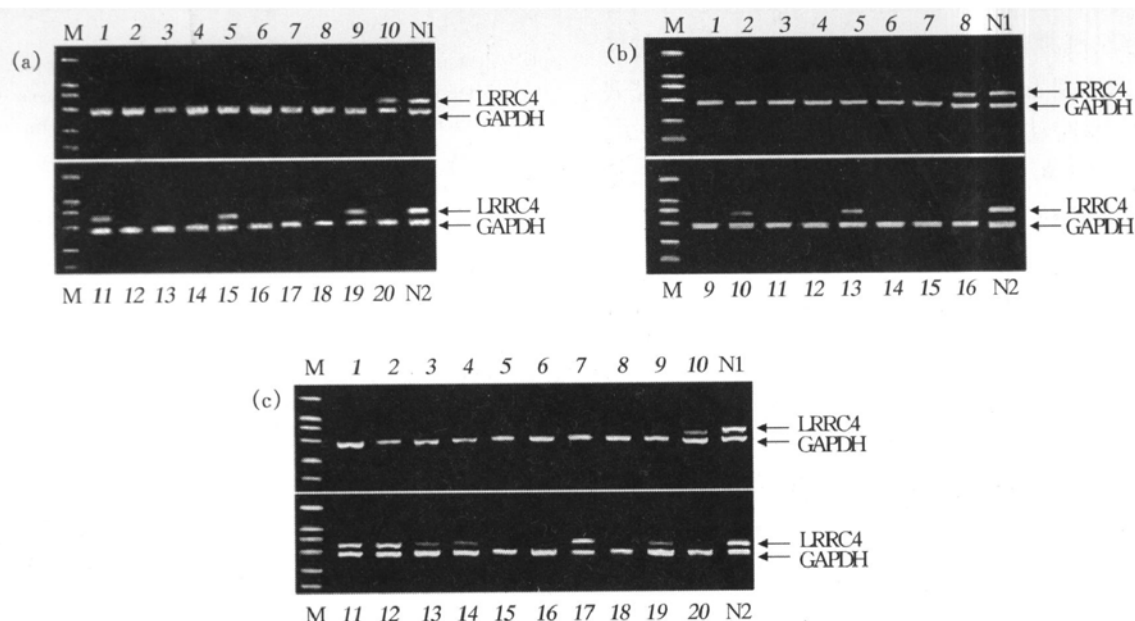


Fig. 4 Differential expression of LRRC4 in normal brain tissue and primary brain tumor biopsies

(a) differential expression in gliomas; (b) differential expression in meningiomas; (c) differential expression in pituitary adenomas.

1 ~ 20: brain tumor biopsy; N1, N2: normal brain tissue.

3 讨 论

EST 是一段长约 200~ 500 bp 的能反映基因表达信息的核苷酸序列。至 2001 年 9 月 21 日, dbEST 数据库中的 EST 已达 8 970 331 条 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>)。由于人类基因组计划的实施, 大量的已知 EST 被定位, 从 EST 入手, 结合生物信息学和实验手段克隆新基因已成为快速、高效的克隆策略而得到广泛应用。本研究正是运用了 EST 介导的定位候选克隆方法从多种肿瘤高频缺失区 7q31-32 成功地克隆了一个 LRR 超家族新成员 LRRC4。生物信息学预测 LRRC4 定位于胞膜, 编码 653 个氨基酸, 蛋白质理论 pI/m 为 6.58/72.7 ku。含有 7 个典型 LRR 结构域、两个富含半胱氨酸的 LRR 结构, 一个免疫球蛋白 IgC2 样结构和一个跨膜区。其结构组成与多个 LRR 蛋白相同。同时, 通过与人类基因组 HTG 数据库匹配, 我们还克隆了位于小鼠 6 号染色体的与人 LRRC4 基因同源性高达 92% 的同源基因。这些结果说明 LRRC4 基因是在人、鼠中高度保守的属于 LRR 超家族的新成员。

富亮氨酸重复 (LRR) 结构域最早于 1985 年由 Takahashi 等^[14] 从人血清 α_2 -糖蛋白中发现, 它因亮氨酸残基在该结构中呈规律性重复而得名。LRR 通常由 22~ 26 个氨基酸残基组成, 其保守的

序列为: $L_{xx}L_xL_{xx}N_xL$ 。其中 x 可以是任意氨基酸, 亮氨酸残基 L 能被具有疏水性的脂肪族氨基酸如蛋氨酸、异亮氨酸或缬氨酸取代。LRR 通常被 N 端或 C 端富含半胱氨酸的区域间断^[9, 15]。从人工合成的猪核糖核酸酶抑制蛋白晶体立体结构中发现: 每一个 LRR 由一个 $\beta\alpha$ 单元组成, 这些重复单元形成了拉长的非球状的马蹄形结构。在这一结构中, 保守的亮氨酸残基形成疏水的核心, 而其他非保守的氨基酸残基暴露于马蹄形外周而形成了配体结合表面^[9, 15]。在酵母、果蝇、哺乳动物及植物中均发现有 LRR 结构域存在, 包含 LRR 结构域的蛋白质被称为 LRR 蛋白, 迄今已发现 406 种 LRR 蛋白, 广泛分布于胞浆、胞膜和细胞外基质中。它们构成了进化上保守的功能多样的蛋白质超家族。

目前的研究表明所有 LRR 蛋白的功能均与蛋白质相互作用有关, 至少一半的 LRR 蛋白参与信号转导通路^[9, 15]。大量证据表明 LRR 家族成员与神经系统的发育和功能有关^[16, 17]。如, Toll, connectin, slit, chaptin, tartan 等在果蝇的神经系统的发育与分化中起重要作用^[11, 13, 18, 19]; 此外, 大量研究也表明 IgC2 样结构域也与神经系统的功能密切相关^[18, 20]。在脊椎动物的神经系统, 含有该结构域的神经细胞粘附分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) 如 Ng-CAM 等, 广泛存在于发

育或成熟的神经系统; 并通过介导细胞之间的粘附, 参与控制神经元发育的一系列过程^[20]. 对同时包含 LRR 和 IgC2 样结构域的 trk 家族的研究表明: 四种哺乳动物神经营养因子 NGF, BDNF, NT-3 和 NT-4 可与一个或多个 trk 受体结合, 活化细胞内的多条信号通路如 Ras/ERK, NF-kappaB, PI3K/Akt, MAPK 等, 影响神经系统的发育和功能^[12]. 研究还发现 trk 家族成员中的每一个 LRR 结构域均为神经营养因子受体的高亲和力的结合位点^[12, 18]. 本研究克隆的富亮氨酸家族新成员 LRRC4 既包含 LRR 功能域也含有 IgC2 样结构. 更重要的是它在正常人脑组织相对特异表达, 而在其他组织未能检测到表达. 这些结果提示 LRRC4 基因可能在神经系统的发育和功能中发挥重要作用.

LRR 的功能除了通过蛋白质之间的相互作用, 参与多种信号通路外, 近来有不少研究提示 LRR 结构域与肿瘤有关. 酵母腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase) 通过其 LRR 与 RAS 蛋白相互作用, 参与 P21/GTP 信号通路的调控, 而该通路是恶性胶质瘤中的重要信号通路^[9, 21]. Inohara 等^[22]的研究表明 Nod1 能调节凋亡和 NF-kappa B 的活化, 癌胚抗原 5T4^[23] 与肿瘤转移有关. 此外, Anna 等^[24]发现 GAC1 在恶性胶质瘤中扩增和过表达, Chernova 等^[25]报道 LGI1 在恶性脑瘤中发生重排而表达下调. 在本研究中, RT-PCR 检测发现 LRRC4 在多种原发性脑瘤包括胶质瘤、脑膜瘤和垂体瘤活检组织表达明显下调或缺失, RNA 印迹分析证实了该结果 (资料未显示). 尽管 LRRC4 基因在脑瘤中表达下调的作用机制未明, 但 LRRC4 的克隆仍将为进一步研究脑瘤的分子机理提供重要线索.

参 考 文 献

- Zenkhusen J C, Weintraub L A, Green E D. Construction of a high-resolution physical map of the approximate 1-Mb region of human chromosome 7q31.1-q31.2 harboring a putative tumor suppressor gene. *Neoplasia*, 1999, **1** (1): 16~22
- Ogata T. Chromosome 7 suppresses the indefinite division of non-tumorigenic immortalized human fibroblast cell lines KMST6 and SUSM-1. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (10): 6036~6042
- Zenkhusen J C, Conti C J, Green E D. Mutational and functional analyses reveal that ST7 is a highly conserved tumor-suppressor gene on human chromosome 7q31. *Nat Genet*, 2001, **27** (4): 392~398
- Tan G L, Xiao J Y, Tian Y Q, *et al.* Analysis of deletion mapping on chromosome 7q31.1-q36 in nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 1998, **4** (3): 165~171
- Knuutila S, Aalto Y, Autio K, *et al.* DNA copy number losses in human neoplasms. *American Journal of Pathology*, 1999, **155** (3): 683~694
- Zenkhusen J C, Hodges L C, Lacava M, *et al.* Definitive functional evidence for a tumor suppressor gene on human chromosome 7q31.1 neighboring the Fra7G site. *Oncogene*, 2000, **19** (13): 1729~1733
- Zenkhusen J C, Weitzel J N, Ball H G, *et al.* Allelic loss at 7q31.1 in human primary ovarian carcinomas suggests the existence of a tumor suppressor gene. *Oncogene*, 1995, **11** (2): 359~363
- 唐湘娜, 阳剑波, 邓龙文, 等. 鼻咽癌染色体 7q32 区域微缺失的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2000, **17** (3): 153~156
- Tang X N, Yang J B, Deng L W, *et al.* *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2000, **17** (3): 153~156
- Kobe B, Deisenhofer J. The leucine rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in Biochemical Science*, 1994, **19** (10): 415~421
- Sambook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 363~371
- Brose K, Tessier-Lavigne M. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching cell migration. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, **10** (1): 95~102
- Potapoutian A, Reichardt L F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology*, 2001, **11** (3): 272~280
- Imler J L, Hoffmann J A. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol*, 2000, **67** (6): 767~773
- Takahashi N, Takahashi Y, Putnam F W. Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich α_2 -glycoprotein of human serum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (7): 1906~1910
- Buchanan S G, Gay N J. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 1996, **65** (1~2): 1~44
- Taguchi A, Wanaka A, Mori T, *et al.* Molecular cloning of novel leucine-rich repeat proteins and their expression in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, **35** (1-2): 31~40
- Windisch J K, Marksteiner R, Lang M E, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3, and neurotrophin 4, bind to a single leucine-rich motif of TrkB. *Biochemistry*, 1995, **34** (35): 11256~11263
- Suzuki Y, Sato N, Masaya T, *et al.* cDNA cloning of a novel membrane glycoprotein that is expressed specifically in glial cells in the mouse brain. LIG-1, a protein with leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains. *J Biol Chem*, 1996, **271** (37): 225~227
- Kaprielian Z, Imondi R, Runko E. Axon guidance at the midline of the developing CNS. *Anat Rec*, 2000, **261** (5): 176~197
- 刘耀波, 汪家政, 范明. 与神经生长相关的神经系统特异性蛋白质. *军事医学科学院院刊*, 2000, **24** (3): 213~216
- Liu Y B, Wang J Z, Fan M. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2000, **24** (3): 213~216
- Bredel M, Pollack I F. The P21-Ras signal transduction pathway and growth regulation in human high grade gliomas. *Brain Research Reviews*, 1999, **29** (2~3): 232~249
- Inohara N, Koseki T, del Pesol L, *et al.* Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, 1999, **274** (21): 14560~14567
- Myers K A, Rahr-Saund V, Davison M D, *et al.* Isolation of a

- cDNA encoding 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein. An antigen associated with metastasis contains leucine-rich repeats. *J Biol Chem*, 1994, **269** (12): 9319~ 9324
- 24 Anna A, Zhu X X, Vogt N, *et al.* GAC1, a new member of the leucine rich repeat superfamily on chromosome band 1q32.1, is amplified and overexpressed in malignant gliomas. *Oncogene*, 1998, **16** (23): 2997~ 3002
- 25 Chernova O B, Somerville R P T, Cowell J K. A novel gene, LG II, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene*, 1998, **17** (22): 2873~ 2881

Identification of LRRC4, a Novel Member of Leucine-rich Repeat (LRR) Superfamily, and Its Expression Analysis in Brain Tumor*

WANG Jie-Ru, QIAN Jun, DONG Li, LI Xiao-Ling, TAN Chen,

LI Jiang, ZHANG Bi-Cheng, ZHOU Jie, LI Gui-Yuan**

(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to clone novel gene associated with tumor in human chromosome 7q31-32 harboring one or more tumor suppressor gene, expressed sequence tag (EST) -mediated positional cloning strategy was used and a novel human brain cDNA was identified. The isolated cDNA encodes a polypeptide of 653 amino acids with a theoretical molecular mass of 72.7 ku and a calculated isoelectric point of 6.58. The deduced amino acids contains seven typical leucine-rich repeats (LRRs) flanked by N- and C-terminal cysteine-rich LRR region, one immunoglobulin C2 like domain, one signal peptide at N-terminal and one transmembrane region at C-terminal. Amino acid sequence of this novel gene exhibits high similarity and similar domain organization as many other LRR proteins. Analysis of this novel gene shows no significant homology to any reported genes in database of GenBank. So it is a novel member of leucine-rich repeat superfamily and designated as LRRC4 according to the guide of HUGO Gene Nomenclature Committee (GenBank Accession No. AF196976). Northern Blot and RT-PCR analysis revealed that normal expression of LRRC4 was highly specific for brain, whereas absent or significantly down-regulated in primary brain tumors including glioma, meningioma and pituitary adenoma. In addition, mouse homology of LRRC4 has been mapped to mouse chromosome 6 by similarity analysis (GenBank Accession No. AF290542). Taking the structural properties and expression patterns into consideration, LRRC4 may play an important role in nervous system.

Key words leucine-rich repeat, novel gene, primary brain tumor

* This work is supported by grants from the State 863 High-Tech R&D Program (102-10-01-05, Z19-01-01-03), State Key Basic Research Program, Fundamental Investigation on Human Carcinogenesis (G1998051008), Chinese Medicine Board of New York, Inc. (96-655), Hunan Province Natural Science Grants (00JJY20108) and the National Natural Science Foundation of China (30100191).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: lgy@public.cs.hn.cn

Received: July 3, 2001 Accepted: September 12, 2001