

Flightless I 与核质转运蛋白 Importin β 及核孔蛋白 Nup88 的相互作用

廖声友, 王翠华, 汤冬娥, 魏金梅, 贺玉娇, 熊海庭, 徐凤梅, 高学娟, 刘小会, 刘朗夏

广东省高校功能蛋白质研究重点实验室 暨南大学生命与健康工程研究院, 广东 广州 510632

廖声友, 王翠华, 汤冬娥, 等. Flightless I 与核质转运蛋白 Importin β 及核孔蛋白 Nup88 的相互作用. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1247-1254.

Liao SY, Wang CH, Tang DE, et al. Interaction of Flightless I with Nup88 and Importin β . Chin J Biotech, 2015, 31(8): 1247-1254.

摘要: Flightless I (FLII) 是一个在肿瘤中高表达的蛋白, 前期研究提示 FLII 可能参与核质转运过程, 为鉴定 FLII 是否与核膜结合蛋白相互作用, 构建 GST-FLII、GST-LRR 融合蛋白重组质粒并转化至大肠杆菌 Rosetta 进行诱导表达, 使用 GST 琼脂糖珠进行融合蛋白的纯化。通过 SDS-PAGE 对纯化蛋白进行验证之后, 利用 GST-pull down 及免疫共沉淀技术证明了 FLII 与 Importin β 、Nup88 蛋白的相互作用, 并鉴定 FLII 上的 LRR 结构域为相互作用区域。研究结果提示 FLII 可能参与了 Importin β 的部分生物学作用, 为进一步分析 FLII 与 Importin β 、Nup88 的生物学功能奠定了基础。

关键词: 分子生物学, RNA 转运, GST-pull down, 免疫共沉淀, Flightless I, Importin β , Nup88

Interaction of Flightless I with Nup88 and Importin β

Shengyou Liao, Cuihua Wang, Dong'e Tang, Jinmei Wei, Yujiao He, Haiting Xiong, Fengmei Xu, Xuejuan Gao, Xiaohui Liu, and Langxia Liu

Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Key Laboratory of Functional Protein Research of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong 510632, Guangzhou, China

Abstract: High expression of Flightless I (FLII) is associated to multiple tumors. Based on our previous study that FLII might be involved in the nuclear export, we assessed the possible interaction of FLII with the nuclear envelop associating proteins Importin β and Nup88. We first constructed GST-FLII, GST-LRR recombinant plasmids and transformed them into

Received: January 23, 2015; **Accepted:** April 30, 2015

Corresponding author: Langxia Liu. Tel: +86-20-85222573; E-mail: langxialiu@gmail.com, tliulx@jnu.edu.cn.

网络出版时间: 2015-05-26

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150526.1645.001.html>

the Rosetta strain to produce GST-FLII, GST-LRR fusion protein. After purification of these proteins, GST-pull down, as well as co-immunoprecipitation, were used to test the interaction of FLII with Importin β and Nup88. FLII interacted with Importin β and Nup88, and FLII LRR domain is responsible for these interactions. Thus, FLII may play a role in nuclear export through interaction with Importin β and Nup88.

Keywords: molecular biology, RNA traffic, GST-pull down, CO-IP, Flightless I, Importin β , Nup88

核孔复合物是贯穿于核膜上作为细胞核质物质交换的主要通道,由不同的核孔蛋白形成巨大的蛋白复合体,跨双层脂质核膜。近年来,核孔蛋白复合体蛋白 88 (Nup88) 在人卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌肿瘤边缘等其他恶性肿瘤中过度表达,在胃癌肝癌等实体瘤中也呈高表达,而在对应的正常组织中则表达较弱,提示其与肿瘤的侵袭及形成能力密切相关^[1-5],目前 Nup88 已被提议作为一种肿瘤标志物^[2]。Importin β 家族蛋白作为最主要的核质转运受体,在真核生物中分布广泛。Importin 家族成员的 N 端可以结合 RanGTP^[6]、中部结合核孔蛋白 (Nups)^[7]、C 端结合底物 (Cargo)^[8]或接头蛋白 (Adaptor)^[9],从而将底物带入或带出细胞核。Importin β 家族蛋白在核质转运中起到了极其重要的作用,因此 Importin β 家族蛋白本身的表达调控也成为了调节核质转运的一种重要方式。

Flightless I (FLII) 蛋白包含 N 端 15 个重复的 LRR (Leucine-rich repeat) 结构域和 C 端 5 个重复的 GLD (Gelsolin-like repeat) 结构域^[10]。LRR 结构域是蛋白与蛋白,蛋白与 DNA/RNA 相互作用的区域,与 Ras 信号转导通路相关^[11-12],而 GLD 结构域主要与 actin 相关^[13],然而两种结构对于结合多种核受体蛋白起转录共调节作用是必要的^[14-20]。前期研究发现 FLII 是一个癌症相关蛋白,FLII 的相互作用组学提示 FLII 与多种核转运蛋白相互作用,并鉴定到两个关键

的核质转运蛋白 Nup88 和 Importin β ,说明 FLII 可能在核转运过程中起调节作用,或参与其部分生物学功能。早期研究发现,FLII 参与胚胎发育^[21]、信号转导、免疫应激^[12-14,18,22-27]等过程,并具有与核激素受体(NR)协同 NCOA2 和 CARM1 一起发挥作用而激活转录等功能^[14]。然而 FLII 作为一种核激素受体蛋白,其在转录后的相关功能及作用机制尚未清楚,对 FLII 是否与核转运蛋白 Importin β 、核孔蛋白 Nup88 相互作用,及是否调节核质转运过程没有相关文献报道。本文研究通过 GST-pull down 及免疫共沉淀技术证明了 FLII 与核转运蛋白 Importin β 、核孔蛋白 Nup88 相互作用,并发现 LRR 结构域在其相互作用过程中起重要作用。为进一步研究 FLII 是否调节核质转运过程及三者之间的生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肺腺癌细胞 H1299 购于中国科学院上海细胞生物研究所。原核表达载体 pGEX-4T-1 由实验室保存。FLII cDNA 购于长沙赢润生物科技有限公司。琼脂糖粉购于美国 Invitrogen 公司。限制性内切酶 (*Bam*H I, *Sal* I)、T4 DNA 连接酶、*PrimeStar HS* DNA Polymerase、DNA marker 购于 TaKaRa 公司。凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于天根公司。Importin β , Flightless I 抗

体购于 Santa Cruz 公司。HRP 偶联鼠二抗购于 Protein Tech Group 公司。胎牛血清购于德国 PAA 公司。DMEM 完全培养基购于 Gibco 公司。GST 琼脂糖珠购于 GE Healthcare 公司。IPTG、预染蛋白 marker 和 R250, G250 染色试剂盒购自斯佳生物公司。

1.2 方法

1.2.1 pGEX-4T-1-FLII、pGEX-4T-1-LRR 重组质粒的构建

从 NCBI 数据库中检索人 Flightless I 基因 CDS 序列,利用 Primer 5.0 软件设计 Flightless I 全长与 LRR 结构域片段引物。通过基因序列分析选择上游引物酶切位点为 *Bam*H I, 下游引物酶切位点为 *Sal* I。引物序列如表 1 所示,由 Invitrogen 公司合成。以 FLII cDNA 载体为模板利用引物 PCR 扩增 FLII 基因及 LRR 片段,将扩增的片段用 *Bam*H I 与 *Sal* I 双酶切后克隆至同样酶切的 pGEX-4T-1 载体中,用 T4 DNA 连接酶连接目的片段与载体,经转化后用抗性筛选阳性克隆,并以双酶切法进行鉴定。选取双酶切正确的阳性克隆送至 Invitrogen 公司测序。

表 1 GST-FLII 及 GST-LRR 载体构建引物序列
Table 1 PCR primer sequence for GST-FLII and GST-LRR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Primer-F	ATAGGATCCATGGAGGCCACCGGG GTGCTG
FLII-R	ATAGTCGACAGGCCAGGGCCTTGC AGAA
LRR-R	ATAGTCGACAGTCCTCCGTGAAGA ACTCGGA

Restriction sites were underlined. F: forward primer; R: reverse primer.

1.2.2 GST 融合蛋白的诱导表达及融合蛋白的纯化、Western blotting 鉴定

将 GST 融合蛋白质粒及表达 GST 的空载体转化至大肠杆菌 Rosseta 感受态细胞中,在含有氨苄抗生素的平板上划线,37 °C 过夜培养后挑取单菌落,将其接种于 10 mL LB 培养液中,37 °C 振荡培养过夜,第 2 天,按 1:100 的比例接种于 100 mL LB 液体培养基中,当 OD_{600} 吸光值达到 0.6-0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,室温诱导 4-6 h;离心收集菌体,加入含有蛋白酶抑制剂的 EBC 裂解液冰上裂解菌体 10 min,再进行超声破碎 20 min,4 °C 离心收集上清,加入 DTT 至终浓度 1 mmol/L。按照 GE 公司 GST Fusion Protein Spin Purification Kit 说明书,0.5 mL 的 GST 珠子悬液,静置 30 min,待其完全沉降后,10 倍体积的 PBS 清洗纯化柱,将裂解上清过柱,10 倍体积的清洗缓冲液清洗纯化柱,然后 3 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱蛋白,利用 SDS-PAGE 及后续的 Western blotting 分析蛋白的纯化情况。

1.2.3 GST-pull down 检测 FLII、LRR 与 Importin β 、Nup88 的相互作用

H1299 细胞经 EBC 裂解液 (含 0.5 mmol/L PI、1 mmol/L PMSF) 冰上裂解 30 min 后,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清并用 BCA 法测定蛋白浓度,将纯化的 GST 融合蛋白与 H1299 全细胞裂解液混合,4 °C 旋转孵育过夜,用 EBC 裂解液清洗珠子 5 次,向所得样品中加入 2 \times SDS 上样缓冲液,煮沸 10 min 后进行 Western blotting 检测结合蛋白。

1.2.4 免疫共沉淀实验

H1299 细胞中加入 EBC 裂解液冰上裂解细

胞 30 min,裂解后 12 000 r/min、4 °C 离心 30 min,收集上清后加入 IgG 和 Protein A/G plus Agarose 进行预洗,BCA 法测定蛋白浓度后将 H1299 细胞裂解液分成 2 份,每份 1 mg 蛋白量。以 IgG 抗体作为阴性对照,Importin β 抗体为实验组,细胞裂解液与抗体 4 °C 旋转孵育过夜,18 h 后加 Protein A/G 琼脂糖珠孵育 4 h,用 EBC 裂解液清洗珠子 5 次,向样品中加入 2 \times SDS 上样缓冲液,煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE、Western blotting 检测结合蛋白。

2 结果

2.1 pGEX-4T-1-LRR、pGEX-4T-1-FLII 载体的构建

PCR 的目的片段双酶切后克隆至 pGEX-4T-1 载体中,经连接转化等步骤筛选阳性克隆,将阳性克隆质粒进行双酶切鉴定。1%的琼脂糖凝胶电泳显示 LRR 酶切片段长度约 1 500 bp,FLII 酶切片段长度约 3 800 bp,见图 1 和图 2。表明目的片段 LRR (图 1) 和 FLII (图 2) 已成功克隆

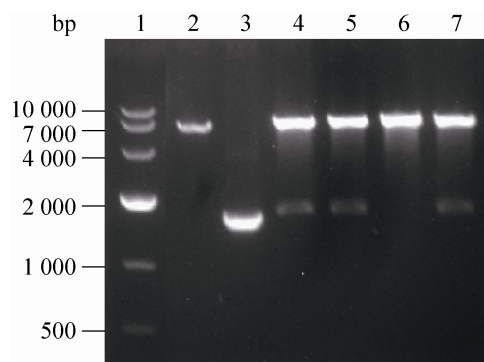


图 1 pGEX-4T-1-LRR 载体双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pGEX-4T-1-LRR by enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: pGEX-4T-1 plasmid digested with *Bam*H I and *Sal* I; 3: LRR fragment amplified with PCR; 4-7: pGEX-4T-1-LRR positive clone digested with *Bam*H I and *Sal* I.

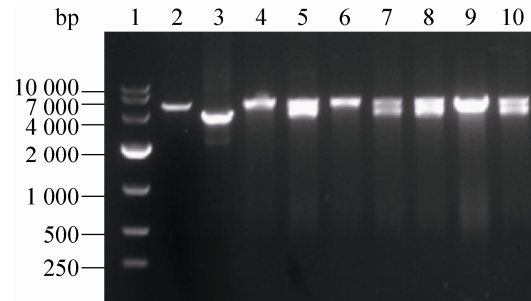


图 2 pGEX-4T-1-FLII 载体双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pGEX-4T-1-FLII by enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: pGEX-4T-1 plasmid digested with *Bam*H I and *Sal* I; 3: FLII fragment amplified with PCR; 4-7: pGEX-4T-1-FLII positive clone digested with *Bam*H I and *Sal* I.

至载体 pGEX-4T-1 中。选取双酶切正确的 LRR 质粒 1 号及 FLII 质粒 2 号进行测序,测序结果与 NCBI 数据库 Flightless I 基因及 LRR 片段完全匹配,证明 pGEX-4T-1-LRR、pGEX-4T-1-FLII 质粒构建成功。

2.2 GST、GST-FLII、GST-LRR 蛋白的诱导表达及纯化

将构建好的 GST 标签载体转化到 Rosetta 菌株里,IPTG 诱导菌株表达 GST 融合蛋白,收集菌体超声破碎裂解细胞,经过过柱纯化洗脱等步骤,使用 SDS-PAGE 检测纯化效果,蛋白电泳考马斯亮蓝染色结果见图 3、4。经 IPTG 诱导后,表达产物在 26 kDa 出现了一条明显的 GST 蛋白条带 (图 3,泳道 2),并成功将 GST 蛋白纯化 (图 3,泳道 5)。同样的经 IPTG 诱导后,表达产物在 172 kDa 和 83 kDa 分别出现了明显的 GST 融合蛋白条带 (图 4,泳道 2 和 10),并经过纯化等步骤也成功将 GST-FLII (图 4,泳道 6) 和 GST-LRR (图 4,泳道 14) 融合蛋白纯化。表明 GST 及 GST 融合蛋白已经成功诱导并纯化。

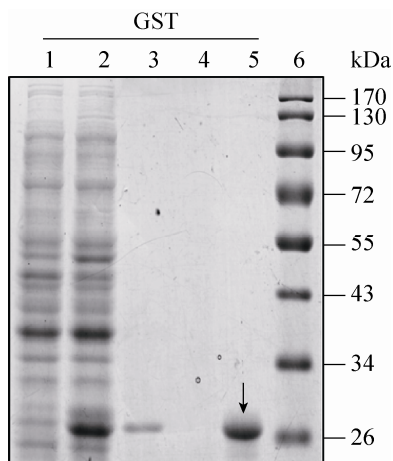


图3 GST 蛋白的诱导表达及纯化

Fig. 3 Purification and analysis of GST protein. 1: non-induced recombinant optimization strain; 2: induced recombinant optimization strain; 3: precipitation from cell lysate; 4: eluent; 5: purified GST protein; 6: protein marker.

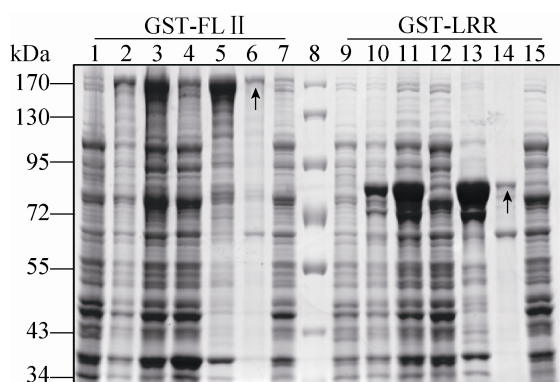


图4 GST-FLII 与 GST-LRR 蛋白的诱导表达

Fig. 4 Purification and analysis of GST fusion protein. 1: GST-FLII non-induced recombinant optimization strain; 2: GST-FLII induced recombinant optimization strain; 3: GST-FLII whole-cell protein; 4: supernatant from GST-FLII cell lysate; 5: precipitation from GST-FLII cell lysate; 6: purified GST-FLII protein; 7: eluent; 8: protein marker; 9: GST-LRR non-induced recombinant optimization strain; 10: GST-LRR induced recombinant optimization strain; 11: whole-cell protein; 12: supernatant from GST-LRR cell lysate; 13: precipitation from GST-LRR cell lysate; 14: purified GST-LRR protein. 15: eluent.

2.3 GST-pull down 验证 LRR、FLII 与 Nup88、Importin β 的相互作用

为验证 GST-LRR、GST-FLII 与 Nup88、Importin β 是否直接相互作用,使用纯化的 GST 蛋白和 GST-LRR、GST-FLII 融合蛋白分别和 H1299 的全细胞裂解液混合并低温孵育过夜,通过蛋白相互作用的特异性结合,获得与 GST-LRR、GST-FLII 相互作用的蛋白复合物,并进行 Western blotting 分析。使用 Nup88 抗体检测结果显示,在 GST 对照中无 Nup88 蛋白条带存在,而在 GST-LRR、GST-FLII 中有明显的 Nup88 蛋白条带存在,使用 Importin β 抗体检测结果显示在对照中没有 Importin β 蛋白条带,在 GST-LRR 与 GST-FLII 中都有 Importin β 蛋白条带,见图 5。结果表明 GST-LRR 与 GST-FLII 能特异地与 Nup88、Importin β 蛋白结合。因此验证 FLII 和 Nup88、Importin β 蛋白存在特异

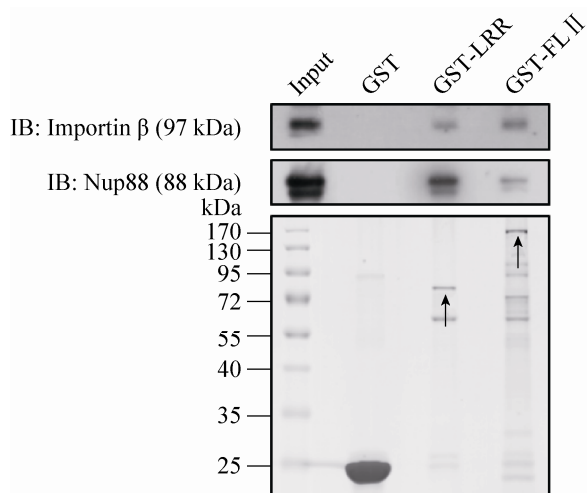


图5 GST-pull down 验证 LRR、FLII 与 Nup88、Importin β 的相互作用

Fig. 5 Identification of interaction by GST-pull down. H1299 cell lysate was incubated with GST and GST fusion protein, after separated in SDS-PAGE, protein was transferred to PVDF membrane and incubated with anti-Nup88 and anti-Importin β antibody.

性的相互作用, 并且 LRR 结构域作为相互作用结构域, 发现其可以独立地与 Nup88、KPNB1 蛋白相互作用。

2.4 免疫共沉淀实验验证 Importin β 与 FLII 的相互作用

为了进一步确认在细胞正常生理状态下 FLII 和 Importin β 存在相互作用, 运用免疫共沉淀实验进行验证。用 Importin β 抗体进行免疫共沉淀实验, IgG 为阴性对照, 分别与 H1299 全细胞裂解液进行孵育, 通过 Protein A/G 琼脂糖珠沉淀相互作用蛋白复合体, 并进行 Western blotting 分析。检测结果如图 6 所示, Importin β 抗体检测到免疫沉淀中具有 Importin β 蛋白, 说明免疫沉淀 Importin β 实验正确, 同时用 FLII 抗体在免疫沉淀 Importin β 的样品中检测到有明显的共沉淀 FLII 蛋白条带存在, 结果表明内源 Importin β 与 FLII 存在特异的相互作用, 与 GST-pull down 结果相一致。

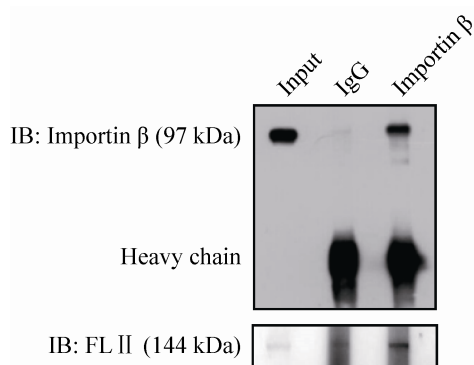


图 6 免疫共沉淀实验验证 Importin β 和 FLII 的相互作用

Fig. 6 Identification of interaction between Importin β and FLII by co-immunoprecipitation. H1299 cell lysate was immunoprecipitated with control mouse IgG antibody or anti-Importin β antibody, after separated in SDS-PAGE, protein was transferred to PVDF membrane and incubated with anti-FLII and anti-Importin β antibody.

3 讨论

Flightless I (FLII) 蛋白含有 1 256 个氨基酸, 分子量为 145 kDa, 是一个高度保守的蛋白, 编码包括 C-端肌动蛋白结合类凝溶胶蛋白结构域 (GEL domain) 和 N-端富含亮氨酸重复的蛋白与蛋白结合区域 (LRRs domain)^[28-31]。然而两种结构对于结合多种核受体蛋白起转录共调节作用是必要的^[14-20]。已有相关文献证明 FLII 参与基因的转录起始, 通过蛋白相互作用直接或间接调节结合到基因的启动子区域, 从而调节转录活性^[16,32]。FLII 蛋白在癌细胞中高表达^[33], 而在正常组织中相对表达较弱, 表明 FLII 在癌细胞中发挥重要作用。研究中利用 GST-pull down 及免疫共沉淀实验证实 FLII 与 Nup88 及 Importin β 具有特异性的相互作用, 首先纯化出 GST-FLII 蛋白及其相互作用结构域 GST-LRR 蛋白, 并与 H1299 全细胞裂解液进行沉淀。结果显示, FLII 与 Nup88 及 Importin β 都有相互作用, 并且发现 LRR 作为相互作用结构域可以单独与 Nup88 及 Importin β 蛋白相互作用。Importin β 免疫共沉淀 H1299 全细胞裂解液, 结果显示, Importin β 与 FLII 蛋白在细胞内也存在特异性的相互作用。其三者的相互作用与前期蛋白相互作用组学结果相一致, 表明 FLII 可能参与了 Nup88 及 Importin β 的部分生物学功能。

FLII 的质谱相互作用组学鉴定提示 FLII 与多种核转运相关蛋白有联系, FLII 作为一种既可以与 Importin β 结合又可以与核孔蛋白 Nup88 结合的相互作用蛋白, 在体内可能参与二者在核转运过程中的功能, 然而 FLII 作为一种核激素受体蛋白是否具有核转运功能还有待进一步验证。Nup88 作为一种恶性肿瘤的分子标志物,

而 Importin β 在肿瘤中具有调控作用, 因此研究 FLII 蛋白与 Nup88、Importin β 的分子作用机制具有重要意义。本研究证明 FLII 与核转运蛋白有特异性的相互作用, 并发现 LRR 可以单独行使其与 Nup88 及 Importin β 之间的相互作用功能。为研究 FLII 与 Nup88、Importin β 三者体内的分子机制提供了理论基础, 研究结果为进一步分析 FLII 与 Nup88、Importin β 三者的生物学功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Emterling A, Skoglund J, Arbman G, et al. Clinicopathological significance of Nup88 expression in patients with colorectal cancer. *Oncology*, 2003, 64(4): 361–369.
- [2] Hashizume C, Nakano H, Yoshida K, et al. Characterization of the role of the tumor marker Nup88 in mitosis. *Mol Cancer*, 2010, 9: 119.
- [3] Martínez N, Alons A, Moragues MD, et al. The nuclear pore complex protein Nup88 is overexpressed in tumor cells. *Cancer Res*, 1999, 59(21): 5408–5411.
- [4] Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference—a silent but an efficient therapeutic tool. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(6): 1774–1789.
- [5] Zhao ZR, Zhang ZY, He XQ, et al. Nup88 mRNA overexpression in colorectal cancers and relationship with p53. *Cancer Biomark*, 2010, 8(2): 73–80.
- [6] Chook YM, Blobel G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature*, 1999, 399(6733): 230–237.
- [7] Bayliss R, Littlewood T, Stewart M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell*, 2000, 102(1): 99–108.
- [8] Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, et al. The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science*, 2003, 302(5650): 1571–1575.
- [9] Cingolani G, Petosa C, Weis K, et al. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, 1999, 399(6733): 221–229.
- [10] Claudianos C, Campbell HD. The novel Flightless I gene brings together two gene families, actin-binding proteins related to gelsolin and leucine-rich-repeat proteins involved in Ras signal transduction. *Mol Biol Evol*, 1995, 12(3): 405–414.
- [11] Goshima M, Kariya K, Yamawaki-Kataoka Y, et al. Characterization of a novel Ras-binding protein Ce-FLI-1 comprising leucine-rich repeats and gelsolin-like domains. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257(1): 111–116.
- [12] Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 1995, 374(6518): 183–186.
- [13] Higashi T, Ikeda T, Murakami T, et al. Flightless I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of diaphanous-related formins (DRFs) Daam1 and mDia1 in cooperation with active Rho GTPase. *J Biol Chem*, 2010, 285(21): 16231–16238.
- [14] Lee YH, Campbell HD, Stallcup MR. Developmentally essential protein Flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(5): 2103–2117.
- [15] Lee YH, Stallcup MR. Interplay of Fli-I and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(18): 5052–5059.
- [16] Wu L, Chen H, Zhu Y, et al. Flightless I homolog negatively regulates ChREBP activity in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(11): 2688–2697.
- [17] Waters JM, Lindo JE, Arkell RM, Cowin AJ. Regeneration of hair follicles is modulated by Flightless I (Flii) in a rodent vibrissa model. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(4): 838–847.

- [18] Muller AJ, Hoffmann C, Galle M, et al. The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. *Cell Host Microb*, 2009, 6(2): 125–136.
- [19] Khurana S, Chakraborty S, Zhao X, et al. Identification of a novel LXXLL motif in alpha-actinin 4-spliced isoform that is critical for its interaction with estrogen receptor alpha and co-activators. *J Biol Chem*, 2012, 287(42): 35418–35429.
- [20] Hayashi T, Funato Y, Terabayashi T, et al. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of Flightless I to myeloid differentiation primary response gene (88). *J Biol Chem*, 2010, 285(24): 18586–18593.
- [21] Kopecki Z, Yang GN, Arkel RM, et al. Flightless I over-expression impairs skin barrier development, function and recovery following skin blistering. *J Pathol*, 2014, 232(5): 541–552.
- [22] Cowim AJ, Adams DH, Strudwick XL, et al. Flightless I deficiency enhances wound repair by increasing cell migration and proliferation. *J Pathol*, 2007, 211(5): 572–581.
- [23] Li J, Yin HL, Yuan J. Flightless I regulates proinflammatory caspases by selectively modulating intracellular localization and caspase activity. *J Cell Biol*, 2008, 181(2): 321–333.
- [24] Morasso MI. The Influence of Flightless I : regeneration versus wound healing. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(4): 816–817.
- [25] Jeong KW. Flightless I (*Drosophila*) homolog facilitates chromatin accessibility of the estrogen receptor alpha target genes in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(2): 608–613.
- [26] Kopecki Z, Yang GN, Arkel RM, et al. Flightless I over-expression impairs skin barrier development, function and recovery following skin blistering. *J Pathol*, 2014, 232(5): 541–552.
- [27] Ruzehaji N, Kopecki Z, Melville E, et al. Attenuation of Flightless I improves wound healing and enhances angiogenesis in a murine model of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2014, 57(2): 402–412.
- [28] Davy DA, Ball EE, Matthaei KI, et al. The Flightless I protein localizes to actin-based structures during embryonic development. *Immunol Cell Biol*, 2000, 78(4): 423–429.
- [29] Campbell H, Schimansky T, Claudianos C, et al. The *Drosophila melanogaster* Flightless I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like and leucine-rich repeat domains and is conserved in *Caenorhabditis elegans* and humans. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90(23): 11386–11390.
- [30] Campbell HD, Webb GC, Young IG. A human homologue of the *Drosophila melanogaster* sluggish-A (proline oxidase) gene maps to 22q11.2, and is a candidate gene for type-I hyperprolinaemia. *Hum Genet*, 1997, 101(1): 69–74.
- [31] Seward ME, Easley CA, McLeod JJ, et al. Flightless I, a gelsolin family member and transcriptional regulator, preferentially binds directly to activated cytosolic CaMK-II. *FEBS Lett*, 2008, 582(17): 2489–2495.
- [32] Choi JS, Choi SS, Kim ES, et al. Flightless-1, a novel transcriptional modulator of PPARgamma through competing with RXRalpha. *Cell Signal*, 2015, 27(3): 614–620.
- [33] Liu YT, Yin HL. Identification of the binding partners for Flightless I, a novel protein bridging the leucine-rich repeat and the gelsolin superfamilies. *J Biol Chem*, 1998, 273(14): 7920–7927.

(本文责编 陈宏宇)