

牙齿发育相关基因 Osr2 的生物信息学分析 *

尹积荣 杨 凯[△] 白玉兴 王邦康

(首都医科大学口腔医学院 北京 100050)

摘要 目的:为生物学实验研究 Osr2 与牙齿发育的关系提供思路和参考。方法 本文运用生物信息学的同源比对、进化分析等方法,对 Osr2 及其编码蛋白的生物信息学特征进行分析。结果 结果显示 Osr2 蛋白质无信号肽,是非跨膜的疏水性蛋白,具有 C2H2 型、CHY 型锌指结构域,是一类进化保守、高度同源的转录因子。结论 这一结果可为 Osr2 深入的结构与功能分析及利用提供进一步的信息与参考。

关键词 牙齿发育;生物信息学;同源比对;进化分析;Osr2

中图分类号:R78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)14-2720-04

Bioinformation analysis for tooth development-related genes Osr2*

YIN Ji-rong, YANG Kai[△], BAI Yu-xing, WANG Bang-kang

(Department of Orthodontics, Capital Medical University School of Stomatology, Beijing 100050, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of this research is to provide the idea and reference for biology experiment on the relationship between Osr2 and tooth development. **Methods:** Analysis the bioinformatics characteristics of Osr2 by softwares provided by Internet and homology alignment and phylogenetic analysis. **Results:** Results show that Osr2 located outside cytomembrane, has no signal peptide, hydrophobic protein with C2H2 type Zinc finger domain and CHY-type Zinc finger domain. Osr2 is the transcription factor with high conserved domain and evolution gradually. **Conclusion:** It will be very valuable for the deep study of the structure and function of Osr2 further.

Key words: Tooth development; Bioinformatics; Homology alignment; Phylogenetic analysis; Osr2

Chinese Library Classification (CLC): R78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2720-04

前言

生物信息学为分子生物学的研究提供了新的研究手段^[1]。迄今已发现 50 多种基因参与牙齿发育的表达调控^[2],牙齿是生物进化过程中变异较大的器官,除了牙齿数目、大小、形态的变异,哺乳动物只有单牙列而许多非哺乳动物却有多牙列。Osr2 是目前牙齿发育研究的过程中发现的新的信号分子。对于多种鱼类牙齿发育的研究表明多牙列的原因可能是牙齿发育过程中沿着颊舌向和近远中向不断相互作用的结果^[3-5]。有研究发现,Osr2 的缺失使 Bmp4 持续表达,从而激活 Bmp4-Msx1 信号通路导致多牙列的产生^[6]。

Osr2(odd-skipped related 2)是 Jiang R 在 2001 年筛选的一个转录因子,Osr2 最早在鼠发育的 E9.25 中肾的囊泡中表达,在颅面部以及四肢和肾脏的发育过程中都有表达^[7]。Osr2 编码锌指蛋白,在鄂部发育中高度表达,Osr2^{-/-} 可以导致鄂裂,Osr2 突变可以改变 Osr1, Pax9 和 Tgfb3 在鄂部发育过程中的表达,表明 Osr2 是鄂部发育的关键因子^[8-9]。Amano 等通过基因芯片技术发现 Osr2 在细胞的分化和发育过程中发挥重要作用^[10]。本文从生物信息学的角度出发,对 Osr2 进行生物信息学的分析,为今后研究 Osr2 在牙齿发育中的作用的生物学实验提供

参考。

1 材料和方法

1.1 鼠 Osr2mRNA 以及蛋白质序列

NM_054049.2 和 NP_473390.1

1.2 实验方法

将登录号 NM_198965.1 及 NP_945317.1 分别输入以下网址进行分析,Genbank(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)中查询各个物种基因与蛋白的序列,蛋白质序列号如表 1 所示。BlastP(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)工具查询 NCBI 的非冗余蛋白质数据库以了解其他物种中是否有相似的蛋白质存在,ProtParam(www.expasy.ch/tools/protparam)

工具预测蛋白质的理化性质,ProtScale(us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl)工具预测亲水性轮廓,SignalP3.0(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0)服务器预测可能的信号肽剪切位点;

TMHMM Server v.2.0(www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)预测跨膜信息,NetPhos(www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos)磷酸化位点分析,MotifScan(myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif-scan)搜寻已知功能基序,InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/In>

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30600718) 北京市自然科学基金(7072028)

作者简介:尹积荣(1974-)女,博士,主治医师,E-mail: yinjirong2002@yahoo.com.cn

[△]通讯作者 杨凯,女,博士,主任医师,E-mail: yangkai_cn@hotmail.com

(收稿日期 2011-04-28 接受日期 2011-05-10)

terProScan/) 预测蛋白质功能域与结构域 ;Models-2.0(www. NA 结合位点。Clustal X 软件进行蛋白质多序列比对并构建进
cbs.dtu.dk/ services/CPH models-2.0) 三级结构分析 ;Targetsan 化树,采用 Bootstrap 法产生随机种子自检验 500 次以验证进
(www.targetsan.org) 预测基因 mRNA 序列中可能的 microR- 化树的可靠性。TreeView 软件观察进化树结构。

表 1 Osr2 物种及蛋白质序列号和蛋白质相似度

Table 1 The species and their sequences number and identities of Osr2		
species	Accession number of sequence	identity
Mus musculus	NP_473390.1	100%
Rattus norvegicus	NP_001012118.1	98.55%
Schistosomamansoni	XP_002577950.1	71.43%
Caenorhabditis elegans	NP_509032.1	56.85%
Ixodes scapularis	XP_002404007.1	58.52%
Tribolium castaneum	XP_972086.2	77.67%
Anopheles gambiae	XP_555242.1	89.53%
Culex quinquefasciatus	XP_001854428.1	40.72%
Nasonia vitripennis	XP_001603713.1	84.21%
Apis mellifera	XP_001120905.1	80.2%
Strongylocentrotus purpuratus	XP_781182.2	70%
Ciona intestinalis	XP_002132064.1	83.15%
Branchiostoma floridae	XP_002587962.1	59.9%
Danio rerio	NP_001017694.1	64.87%
Xenopus laevis	NP_001090353.1	93.36%
Xenopustropicalis	XP_002934454.1	94.88%
Gallus gallus	NP_001162180.1	69.41%
Macaca mulatta	XP_001095371.1	97.24%
Pan troglodytes	XP_519877.1	97.64%
Homo sapiens	NP_001135934.1	97.64%
Canis lupus familiaris	XP_539101.1	96.85%
Equus caballus	XP_001491830.2	97.46%
Sus scrofa	XP_001928833.2	96.88%
Bos Taurus	NP_001029500.1	96.74%
Oryctolagus cuniculus	XP_002710756.1	97.46%

2 结果

2.1 鼠 Osr2 的理化性质、同源性分析及蛋白质不同发育阶段和组织表达丰度

通过对非冗余蛋白质数据库的检索 ,发现该蛋白在多个物种中具有高相似性的蛋白质 ,其相似性如表 1。理化性质分析

如表 2 结果可以看出该蛋白预测分子量为 30487.0 ,理论等电点为 9.51 ,为一碱性蛋白质 ,估计的蛋白质代谢半衰期在人类体外网织红细胞为 30 小时 ,不稳定指数为 50.12 ,为不稳定蛋白质。该基因发育阶段表达丰度依次为胚胎、幼年和成人,在新生儿的耳和视网膜中不表达 ,成人的肝、脑、脾、心中几无表达。

表 2 鼠 Osr2 的理化特性

Table 2 Physical and Chemical Properties of Mouse Osr2						
氨基酸组成	分子量	理论等电点	不稳定指数	半衰期	稳定与否	亲水性总平均值
Number of amino acids	Molecular weight	Theoretical pI	Instability index	The estimated half-life	Stable or not	Grand average of hydropathicity
276	30487.0	9.51	50.12	30hours	N	-0.412

2.2 鼠 Osr2 基因 mRNA 序列可能的 microRNA 结合位点分析

Targetsan 预测 Osr2 基因 mRNA 序列中可能的 microRNA 结合位点有 :在脊椎动物中高度保守的有 miR-138, miR-142-3p ;在哺乳动物中保守的有 miR-324-5p ,保守性较低的主要有 miR-694,miR-296-5p,miR-684,miR-338-5p,miR-

344/344-3p 等。
2.3 鼠 OSR2 亲水性、信号肽、跨膜区、磷酸化位点及结构域分析结果

TMHMM Server v.2.0 预测跨膜信息结果提示无明显跨膜区 ,为胞膜外蛋白(图 1A)。信号肽剪切位点预测结果提示该蛋

白无信号肽(图 1B)。磷酸化位点分析有 6 个 Ser、3 个 Thr、1 个 Tyr 结合位点(图 1C)。ProtScale 工具预测亲水性轮廓可见氨基酸主要为疏水性,小部分为亲水性(图 1D)。Motif Scan 预测该蛋白序列上具有 N 糖基化位点、cAMP-cGMP 依赖蛋白酪氨酸激酶位点、II 型酪氨酸激酶磷酸化位点、N 端豆蔻酰化位点、C 型磷酸激酶位点、酪氨酸激酶磷酸化位点。InterProScan 预测该蛋白主要具有 C2H2 型锌指结构域,分布及数量如图 2 所示。

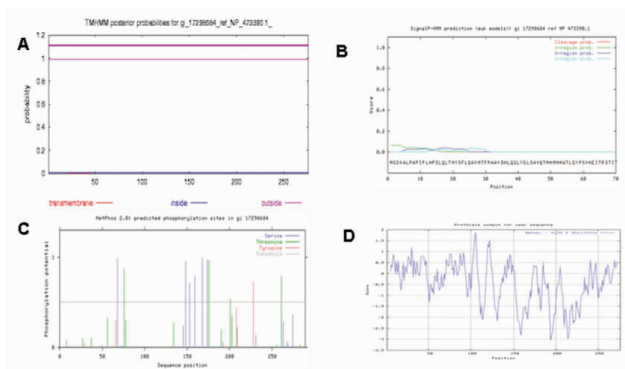


图 1 A 跨膜区分 B 信号肽分析 C 磷酸化位点分析 D 疏水性分析
Figure1 A Transmembrane domain analysis B Signal peptide analysis
C Phosphorylation site analysis D Hydrophobicity analysis



图 2 InterProScan 预测蛋白质结构域
Figure 2 Predicted protein domain

2.4 鼠 Osr2 三级结构预测结果

CPH 通过同源建模分析该蛋白质三级结构与 PDB 数据库中 ID:2EE8 的同源性 100%,氨基酸序列与鼠比对结果如图 3 所示。



图 3 Osr2 三级结构 2EE8 及与鼠氨基酸的比对
Figure3 Tertiary structure of Osr2 and alignment with mouse amino acid

2.5 Osr2 氨基酸多重序列比对及系统进化树的建立

结果如图 4、5 所示,在 15 种脊椎动物和 10 种非脊椎动物中,Osr2 的蛋白质进化保守,具有很高的同源性,其中有约 80 个氨基酸序列高度同源(图中红线所示部分),可能为其锌指结构域的氨基酸序列。

3 讨论

不同物种间氨基酸多重序列比对结果显示 Osr2 的蛋白质

进化保守,具有很高的同源性,其中有约 80 个氨基酸序列高度同源,可能为其锌指结构域的氨基酸序列。可以推断不是 Osr2 基因自身序列和结构的变异直接导致牙列数目的变化,而是在特定的生物通过与特定因子的相互作用导致 Osr2 表达量的差异使牙齿发生的信号通路发生改变而实现的。

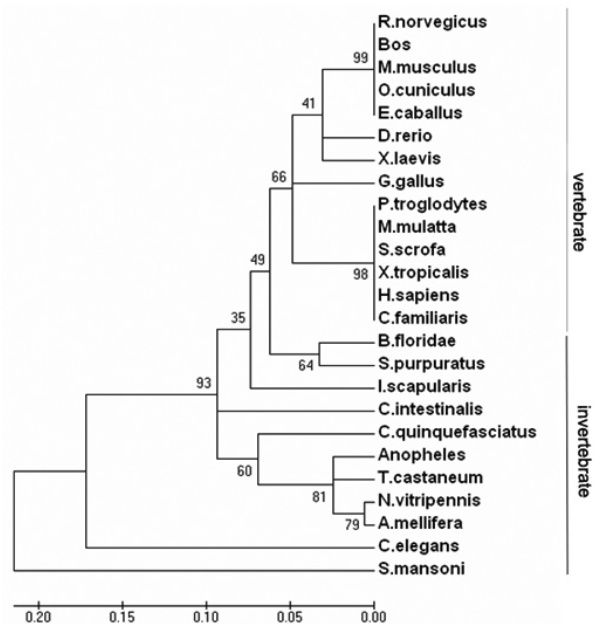


图 4 Osr2 系统进化树
Figure4 The phylogenetic tree of Osr2



图 5 Osr2 多重序列比对
Figure5 The multiple sequence alignment of Osr2

Msx1 和 Pax9 是牙齿发生的关键调节因子, Msx1 或 Pax9 的缺失都会导致牙齿发育停止在蕾状期而且伴随 Bmp4 表达的缺失^[11, 12]。通过建立目标基因鼠系, 在发育的牙齿间充质中从 Pax9 的位点条件灭活 Pax9 以及 Osr2 表达激活, 在 Osr2(-/-) 中, Bmp4 mRNA 表达上调而且向发育中牙齿的舌侧扩张, 在 Msx1^{-/-} 中, 鼠牙齿发育停止在蕾状期伴随间充质中 Bmp4 mRNA 表达缺失, 在 Msx1^{-/-}Osr2^{+/+} 鼠牙间充质中 Bmp4 mRNA 表达恢复, 而且第一磨牙牙齿形态形成得到挽救。表明 Osr2 是牙齿发生中存在于间充质中的抑制因子而且至少部分拮抗 Msx1-Bmp4 信号通路。鼠同时缺失 Osr2 和 Pax9 时牙齿发育停止在早期而且间充质中 Bmp4 和 Msx1 mRNA 的表达显著下调, 与 Pax9^{del/del} 时的情况相同与 Msx1^{-/-}Osr2^{-/-} 时相反。另外还发现 Osr2 与 Msx1 形成稳定的蛋白复合体而与 Pax9 的相互作用较弱^[13]。

近年来, microRNA 在生物发生发育中的作用得到更多的重视和研究。本研究预测 Osr2 是 miR-138、miR-142-3p、miR-324-5p 靶基因的可能性较高; 也可能是 miR-694、miR-296-5p、miR-684、miR-338-5p、miR-344/344-3p 的靶基因。目前 microRNA 在牙齿发育中研究较少, 在 Pitx2-Cre 鼠, 条件敲除上皮中的 Dicer1 导致多个分叉无釉质的切牙和无尖的磨牙产生, 以及切牙模式和切牙、磨牙大小和形态的改变。牙源性上皮标志物分化分析表明成牙细胞分化缺陷。结果表明 microRNAs 紧密的控制牙齿发育, 特定的 microRNA 调节牙上皮干细胞的分化^[14]。microRNA 基因芯片和原位杂交分析结果表明, 参与牙齿发育的 microRNA 主要表达于牙源性上皮, 条件敲除上皮的 Dicer-1 导致牙齿形状和釉质形成的显著偏差, microRNAs 通过精确调控保守的信号通路来调节牙齿形态的发育。microRNAs 在牙齿进化过程中发挥重要的作用^[15]。虽然有研究报道 Osr2 在保证人类只长出一排牙齿的过程中发挥重要作用, 但是具体的途径如何, microRNA 是否也在其中发挥作用还不十分清楚。因此, 研究 Osr2 与 microRNA 以及与牙齿发育的关系可以成为今后的出发点。

参考文献(References)

- [1] T.Charlie Hodgman. 生物信息学[M].北京 科学出版社 2010.
- [2] Sharpe PT. Homeobox genes and orofacial development [J]. Connect

Tissue Res, 1995, 32 (1-4):17-25.

- [3] Smith MM. Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved[J]. Evol Dev, 2003, 5:394.
- [4] Mikkola ML. Controlling the number of tooth rows [J]. Sci Signal. 2009, 25, 2(85):pe53.
- [5] Fraser GJ, Bloomquist RF, Streelman JT. A periodic pattern generator for dental diversity[J]. BMC Biol 2008;6:32.
- [6] Zhang Z, Lan Y, Chai Y, et al. Antagonistic actions of Msx1 and Osr2 pattern mammalian teeth into a single row [J]. Science, 2009, 323 (5918):1232-4.
- [7] Lan Y, Kingsley PD, Cho ES, et al. Osr2, a new mouse gene related to Drosophila odd-skipped, exhibits dynamic expression patterns during craniofacial, limb, and kidney development[J]. Mech Dev, 2001, 107: 175-179.
- [8] Lan Y, Ovitt CE, Cho ES, et al. Odd-skipped related 2 (Osr2) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis [J]. Development, 2004, 131:3207-3216.
- [9] Coulter DE, Swaykus EA, Beran-Koehn MA, et al. Molecular analysis of odd-skipped, a zinc finger encoding segmentation gene with a novel pair-rule expression pattern[J]. EMBO J, 1990, 9:3795-3804
- [10] Kawai S, Abiko Y, Amano A. Odd-skipped related 2 regulates genes related to proliferation and development [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(2):184-90
- [11] Chen, Y., Bei, M., Woo, I., et al. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis [J]. Development, 1996, 122: 3035-3044
- [12] Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K., et al. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities[J]. Genes Dev, 1998, 12:2735-2747
- [13] Zhou J, Gao Y, Zhang Z, et al. Osr2 acts downstream of Pax9 and interacts with both Msx1 and Pax9 to pattern the tooth developmental field[J]. Dev Biol, 2011, 353(2):344-53
- [14] Cao H, Wang J, Li X, et al. MicroRNAs play a critical role in tooth development[J]. J Dent Res, 2010, 89(8):779-84
- [15] Michon F, Tummers M, Kyyrönen M, et al. Tooth morphogenesis and ameloblast differentiation are regulated by micro-RNAs[J]. Dev Biol, 2010, 340(2):355-68