

斑马鱼核纤层蛋白 Lamins 的生物信息学分析

张衡璐¹, 黄惠敏¹, 叶芝旭¹, 王志华³, 何志旭^{1,2,3,*}, 舒莉萍^{2,3,4,*}

(贵州医科大学 1. 附属医院儿科学教研室; 2. 组织工程与干细胞实验中心;
3. 免疫学教研室; 4. 动物实验中心, 贵阳 550004)

【摘要】 目的 了解斑马鱼核纤层蛋白(lamins)的重要遗传信息。方法 在 UCSC、Vega 及 Ensemble 数据库上收集了不同物种核纤层蛋白家族相关蛋白质序列,利用 ClustalX 工具进行分析,并用 MEGA 4.0 软件绘制进化树;通过 NCBI 网站上 BLAST 工具将斑马鱼核纤层蛋白的蛋白质序列与不同物种的相对应的蛋白质序列进行对比,最后将人类、小鼠及斑马鱼的 lamins 基因信息,进行共线性分析。结果 对核纤层蛋白相关基因进行生物信息学分析后显示斑马鱼的核纤层蛋白与人类的相似程度高,推断 *lmna*、*lmnb1* 和 *lmnb2* 基因在进化过程中高度保守。结论 编码斑马鱼 lamins 的基因 *lmna*、*lmnb1* 和 *lmnb2* 等可能是人类 *LMNA*、*LMNB1* 和 *LMNB2* 等基因的直向同源物。

【关键词】 斑马鱼;核纤层蛋白;*lmna* 基因;进化树;共线性分析

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2016)04-0351-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.004

Bioinformatic analysis of the sequences of lamins from different species

ZHANG Heng-lu¹, HUANG Hui-min¹, YE Zhi-xu¹, WANG Zhi-hua²,
HE Zhi-xu^{1,2,3,*}, SHU Li-ping^{2,3,4,*}

(1. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, 2. Stem Cell and Tissue Engineering Research Center,
3. Department of Immunology, 4. Laboratory Animal Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 **Objective** Type A lamins are encoded by LMNA and a major component of the nuclear lamina, which have been suggested to play important roles in chromatin organization, transcription, DNA replication, and cell apoptosis. The aim of this study was to analyze the bioinformation of zebrafish lamins. **Methods** A phylogeny analysis was figured out with protein sequences of different species by Clustal X and MEGA 4.0 software. Then we compared the lamin protein sequences of different species with that of zebrafish by BLAST tool from NCBI. A figure of synteny analysis results was done with *lamin* sequence information of humans, murine and zebrafish cited from UCSC, Vega and Ensemble. **Results** The analysis results showed that *lmna*, *lmnb1*, and *lmnb2* genes of zebrafish are highly conservative and they may be homology of human *LMNA*, *LMNB1* and *LMNB2* genes. **Conclusions** Zebrafish lamins and human lamins have homologous sequence similarity, indicating that these two genes are orthologous genes.

【Key words】 Zebrafish; Lamins; *lmna* gene; Phylogeny analysis; Synteny analysis

Corresponding author: SHU Li-ping, E-mail: gyslp-456@163.com, HE Zhi-xu, E-mail: hzx@gmc.edu.cn

近年来,大量研究表明编码核纤层蛋白的基因尤其是 *lmna* 基因突变会引起一系列的疾病,即核纤层病(laminopathy)。目前已证实有 180 多种的 *lmna* 基因的不同突变引起的疾病^[1], *lmna* 基因突

[基金项目] 国家自然科学基金(编号:31260284)。

[作者简介] 张衡璐(1990-),女,硕士研究生,专业:儿科血液病学。E-mail: 364124396@qq.com

[通讯作者] 舒莉萍(1974-),博士,副教授,研究方向:干细胞基础与临床。E-mail: gyslp-456@163.com

何志旭(1967-),博士,教授,研究方向:小儿血液病学。E-mail: hzx@gmc.edu.cn

变可导致横纹肌疾病、脂肪代谢障碍综合征、周围神经病变、早衰综合征等^[2]。新的动物模型的建立和新技术的应用将会加深对核纤层蛋白病的认识,进而为治疗提供新的思路和途径。

核纤层(nuclear lamina)是位于细胞核内染色质与核膜之间的网状结构,主要由核纤层蛋白和核纤层结合膜蛋白组成。核纤层蛋白(lamins)属于 V 型中间纤维蛋白家族(intermediate filament, IF)成员,它是细胞骨架的重要组成部分,也是唯一一类存在于细胞核的 IF 蛋白质^[3],可维持核膜正常形态,并提供染色体锚着位^[4],同时在核染色体周期性的解体和重组装过程中也发挥重要作用^[5]。此外,核纤层蛋白还广泛分布于核质,影响 DNA 复制、DNA 损伤修复和转录^[6]。

核纤层蛋白可按其一级结构、生化特征和在细胞周期中细胞定位的不同分为 A 型核纤层蛋白和 B 型核纤层蛋白^[4]。真核细胞可表达出两种类型的核纤层蛋白^[7]。细胞分裂过程中核纤层蛋白会被修饰,发生构象上的转变,使核纤层发生解聚或重组^[8]。

斑马鱼是研究发育的理想模式生物,具有独特的优势,其在对基因功能和疾病发病机制的研究中具有广泛诱人的应用前景。本文通过对斑马鱼核纤层蛋白 lamins 的生物信息学分析,以期了解斑马鱼中 lamins 基因和人类相关基因的进化关系,为进一步利用斑马鱼研究 *lmna* 基因及核纤层蛋白病提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 进化树分析

在 NCBI、Ensemble 数据库中收集人、黑猩猩、小鼠、斑马鱼、非洲爪蟾、黑腹果蝇、秀丽隐杆线虫 7 个不同物种核纤层蛋白家族相关蛋白质,将蛋白质序列利用 ClustalX 1.83 程序进行多序列比对,并在此基础上,利用 MEGA 6.0 软件进行进化树绘制。

1.2 蛋白质序列比对分析

通过 NCBI 网站中的 BLAST 工具分别将斑马鱼与人类、小鼠、黑猩猩、非洲爪蟾的 lamin A、lamin B1 和 lamin B2 等蛋白质两两比较,进行斑马鱼核纤层蛋白家族的相关蛋白质与其他物种之间的相似性分析。

1.3 共线性分析

通过 NCBI 数据库找出 *lmna*、*lmnb1* 及 *lmnb2* 基

因在物种人与小鼠分别处于的染色体,并分别找出同时出现在其染色体上相关的 8 种基因,利用 NCBI 网站中的 MapViewer 功能找出这些基因在斑马鱼的具体位置,汇总、对比 *lmna*、*lmnb1* 及 *lmnb2* 基因在人、小鼠、斑马鱼上的表达,最后在 UCSC、Vega 及 Ensemble 数据库上比对基因信息,进行绘图。

2 结果与分析

2.1 进化树结果分析

斑马鱼核纤层蛋白主要有 lamin A、lamin B1、lamin B2 及 lamin L3 等,为了进一步了解核纤层蛋白家族中的分类,在 NCBI 数据库中搜索所有存在于人类、小鼠、黑猩猩、非洲爪蟾、斑马鱼、黑腹果蝇、秀丽隐杆线虫的核纤层蛋白编码的蛋白质序列。利用 ClustalX 1.83 程序进行蛋白质多序列比对,并在此基础上,利用 MEGA 6.0 软件进行进化树绘制(图 1),以确定 lamins 家族的直系同源关系。斑马鱼核纤层蛋白被编码的基因均位于不同的染色体:斑马鱼 *lmna* 位于 16 号染色体,斑马鱼 *lmnb* 有两种类型,*lmnb1* 位于 10 号染色体,*lmnb2* 位于 5 号染色体,进化树提示它们与相对应的人类基因存在直向同源关系,即拥有共同的祖先基因。斑马鱼 *lmnl3* 定位在 23 号染色体上,与非洲爪蟾的 lamin LIII 存在直向同源关系。

2.2 蛋白质序列相似性检测

进化树分析提示核纤层蛋白在进化的过程中是相对保守的,并且斑马鱼与人类、小鼠、黑猩猩、非洲爪蟾之物种间的相应序列同源性都很高,但果蝇和线虫核纤层蛋白与人类相关蛋白质的同源性则相差较远,这一现象与物种衍变过程相一致,一般来说,物种之间的同源性越高,序列之间的相似性越高,为了检测核纤层蛋白的相似性,通过 NCBI 网站中的 BLAST 工具分别将斑马鱼与人类、小鼠、黑猩猩、非洲爪蟾的 lamin A、lamin B1 和 lamin B2 等蛋白质两两比较,进行斑马鱼核纤层蛋白家族的相关蛋白质与其他物种之间的相似性分析。

斑马鱼 lamin A 蛋白质与小鼠的相似性最高,达到 67%,与人类的相似性为 62%;斑马鱼 lamin B1 与黑猩猩的相似性最高,达到 72%,与人类的相似性为 70%;斑马鱼 lamin B2 与非洲爪蟾和人类的相似性一样,均为 68%(表 1)。

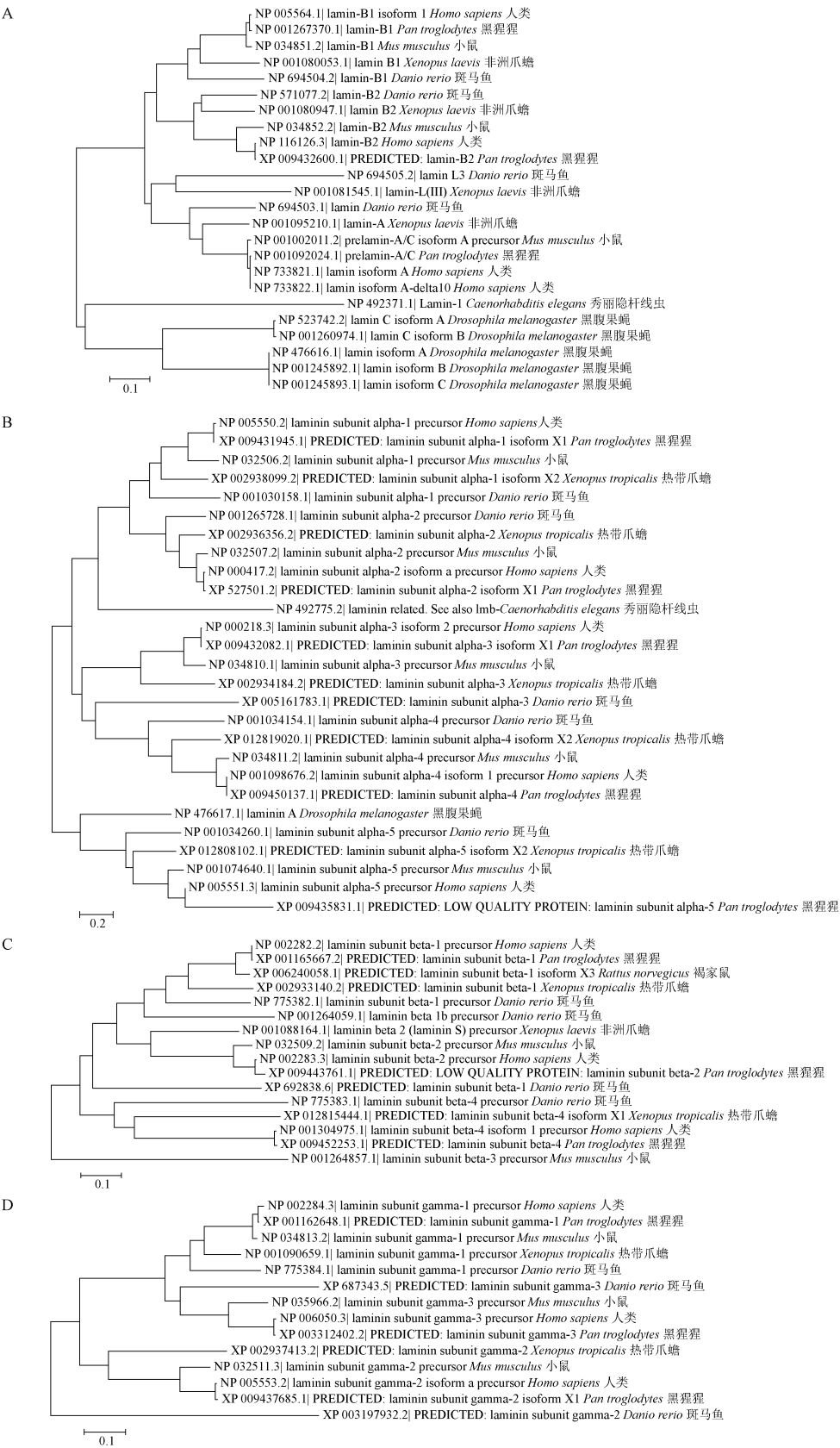


图 1 Lamins 家族的进化树分析

Note. A:Lamin A, lamin C, lamin B1, lamin B2. B:Laminin alpha 1, laminin alpha 2, laminin alpha 3, laminin alpha 4, laminin alpha 5. C:Laminin beta 1a, laminin beta 1b, laminin beta 4. D:Laminin gamma 1, laminin gamma 2, laminin gamma 3

Fig.1 Phylogeny reconstruction of the lamin family

表 1 Lamins 蛋白质序列两两比对信息

Tab. 1 Comparison of the two blasts of lamin proteins in different animals

蛋白质种类 Types of protein	物种 Species	相似度 Identities/%
LaminA	人类 <i>Homo sapiens</i>	62.00
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	62.00
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	67.00
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	62.00
LaminB1	人类 <i>Homo sapiens</i>	70.00
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	72.00
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	69.00
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	66.00
LaminB2	人类 <i>Homo sapiens</i>	68.00
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	66.00
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	64.00
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	68.00
Laminin alpha 1	人类 <i>Homo sapiens</i>	50.26
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	51.93
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	50.03
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	51.37
Laminin alpha 2	人类 <i>Homo sapiens</i>	56.64
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	56.88
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	57.15
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	55.14
Laminin alpha 3	人类 <i>Homo sapiens</i>	28.46
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	28.34
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	27.95
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	28.80
Laminin alpha 4	人类 <i>Homo sapiens</i>	45.94
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	45.58
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	45.34
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	46.86
Laminin alpha 5	人类 <i>Homo sapiens</i>	47.19
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	48.11
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	46.81
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	51.23
Laminin beta 1a	人类 <i>Homo sapiens</i>	66.91
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	66.74
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	67.19
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	64.00
Laminin beta 1b	人类 <i>Homo sapiens</i>	55.18
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	55.07
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	54.78
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	51.27
Laminin beta 4	人类 <i>Homo sapiens</i>	41.53
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	41.40
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	None
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	41.07
Laminin gamma 1	人类 <i>Homo sapiens</i>	68.93
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	68.99
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	69.11
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	67.84
Laminin gamma 2	人类 <i>Homo sapiens</i>	32.95
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	33.98
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	32.62
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	28.78
Laminin gamma 3	人类 <i>Homo sapiens</i>	38.73
	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	61.17
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	39.77
	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	None

2.3 共线性分析

为进一步明确编码斑马鱼核纤层蛋白的基因与人类基因的进化关系,本文分析了进化过程中相对保守的 *lmna*、*lmnb1* 及 *lmnb2* 基因,研究它们在斑马鱼染色体上的基因定位关系。斑马鱼的 *lmna*、*lmnb1* 及 *lmnb2* 基因分别定位于斑马鱼基因组的第 16、10 号和 22 号染色体上。如图 2A 所示,在斑马鱼 *lmna* 基因附近的 *scnm1*、*lysmd1*、*cct3*、*pear1*、*prune*、*bnip1*、*cdc32se1* 和 *thbs3a* 基因分别在小鼠 3 号染色体、人类的 1 号染色体上,相距非常接近,稍有不同的是基因之间的位置,这可能是由于进化过程中出现过染色体内部片段的倒转,这种现象在进化过程中经常出现。同样,在 *lmnb1*、*lmnb2* 基因附近也有类似的现象,这些基因由于其他因素(染色体重组或基因插入等)排列在一起的几率非常小,它们在基因组中的定位呈现高度保守的同线性,提示斑马鱼的 *lmna*、*lmnb1* 和 *lmnb2* 基因是人类直线同源基因。在进化史上,鱼类和哺乳动物从共同的祖先分开进化后,硬骨鱼发生了一次全基因组范围内的染色体复制现象(whole-genome duplication, WGD)^[9],相一致的是斑马鱼的 *lmna*、*lmnb1* 和 *lmnb2* 基因也发生了复制现象。综合上述的分析结果,可以确定斑马鱼的 *lmna*、*lmnb1* 及 *lmnb2* 基因确实是人类 *lmna*、*lmnb1* 及 *lmnb2* 基因的直向同源物。如图 2B 所示,在斑马鱼 *lmnb1* 基因附近 *lox*、*dcp*、*aldh7a1*、*phax*、*megf10*、*prrc1*、*slc12a2* 和 *slc37a6* 基因在小鼠第 18 号染色体,人的第 5 号染色体上,*lmnb1* 基因的附近也发现了这 8 个基因。如图 2C 所示,在斑马鱼 *lmnb2* 基因附近 *s1pr4*、*lsm7*、*tmprss9*、*timmm13*、*oaz1*、*tle2*、*aes* 和 *gan11a* 基因在小鼠第 10 号染色体,人的第 19 号染色体上 *lmnb2* 基因的附近也发现了这 8 个基因。

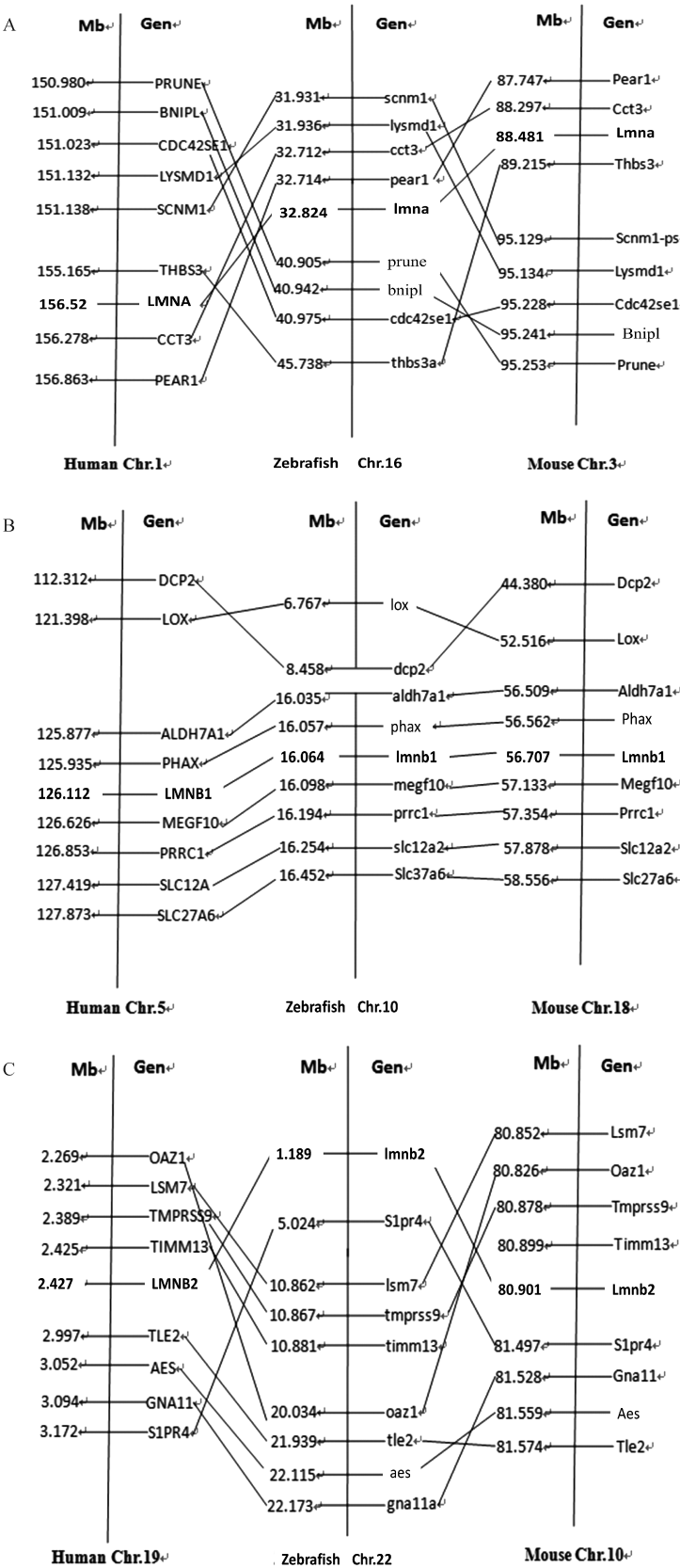
3 讨论

核纤层普遍存在于高等动物真核细胞的细胞核中,核纤层蛋白除了参与细胞核的形状和大小的维持,还参与 DNA 的复制、有丝分裂中染色体的重组、细胞信号传导和细胞凋亡等过程^[10, 11]。模式生物作为基因功能研究的一种有用的工具,大多数的生长发育过程在长期的进化过程中具有高度的保守性,是研究人类发育、系统功能、疾病发生发展等的重要工具。因此采用模式生物研究 lamins 的功能,有助于进一步了解人类同源基因。斑马鱼具有胚胎

透明、体外发育、体积小、繁殖率高及鱼种发育遗传背景清晰等优点使其成为研究脊椎动物,特别是研究人类发育和疾病的模式物种之一。故本文选择了斑马鱼作为研究的模式生物。

核纤层蛋白出现在大部分后生生物中,但在酵母、其他单细胞生物中不存在^[11],脊椎动物间的核纤层蛋白具有相似的结构,但也有各自的特点。在哺乳动物中,核纤层蛋白主要由 3 个基因编码的 7 种蛋白质组成。A 型核纤层 *lmna* 编码 4 种蛋白质: lamin A、lamin Δ 10、lamin C 和 lamin C2。其中 lamin A、lamin C 是主要的剪切转录本^[12]。B 型核纤层蛋白由 *LMNB1* 及 *LMNB2* 两种基因编码,通常情况下,无脊椎动物只有一个单一的 B 型核纤层蛋白,但有一些例外,诸如黑腹果蝇有两种类型,被称 lamin DMO(B 型核纤层蛋白)和 Lam C(A 型核纤层蛋白)^[13]。线虫有一个单一的 B 型核纤层蛋白(LMN-1)。非洲爪蟾有三个 B 型核纤层蛋白, lamins 的同源基因不存在于酿酒酵母、拟南芥中^[14]。本文通过数据库查阅到斑马鱼中有 4 种主要编码核纤层蛋白的基因:*lmna*、*lmnb1*、*lmnb2* 及 *lmnbL3*,为了证实斑马鱼的这四种基因编码的核纤层蛋白与哺乳动物的核纤层蛋白家族之间的关系,即是否具有同源性及相似性,对斑马鱼核纤层蛋白进行进化分析,主要通过邻接法推断斑马鱼核纤层蛋白的进化史以了解其相关的生物信息,为进一步研究斑马鱼核纤层蛋白编码基因的功能奠定基础。

进化树分析的结果提示,斑马鱼 lamin L3 与非洲爪蟾的 lamin L III 有一定的相关性,非洲爪蟾的 lamin L III 属于 B 型核纤层蛋白,故推测斑马鱼核纤层蛋白 L3 也属于 B 型核纤层蛋白。斑马鱼的 lamin A 与人类的有一定相关性,属于 A 型核纤层蛋白,而 lamin B1 和 lamin B2 属于 B 型核纤层蛋白,即斑马鱼 lamins 也是由 A 型核纤层蛋白和 B 型核纤层蛋白构成。斑马鱼的 lamin A、lamin B1 和 lamin B2 的进化程度较高,与人类有一定的相关性,而黑腹果蝇、线虫与人类则有较远的进化关系。同时,两两蛋白序列比对分析结果,斑马鱼 Lmna 的蛋白质序列与人类的有 62% 的相似性, lamin B1 有 70% 相似性, lamin B2 则有 68% 的相似性,这也证实斑马鱼的 lamin A、lamin B1 和 lamin B2 与其他物种的相似程度较高。共线性分析斑马鱼的 *lmna*、*lmnb1* 和 *lmnb2* 基因的位置得出在不同的物种之间核纤层蛋白家族是具有相关性的。在斑马鱼 *lmna*、*lmnb1* 和



注: A: *lmna* 基因, B: *lmnb1* 基因, C: *lmnb2* 基因。
图 2 *lmna*, *lmnb1*, *lmnb2* 各基因的共线性分析(人类、斑马鱼、小鼠)
Note. A: *lmna*; B: *lmnb1*; C: *lmnb2*.

Fig. 2 Synteny analysis of the *lmna*, *lmnb1*, *lmnb2* in human, zebrafish and mouse

lmn b2 基因附近查找的相关基因也可在人类与小鼠的相对应基因附近查询到,也能说明该基因家族在进化的过程中是相对保守的。在进化史上,鱼类和哺乳动物从共同的祖先分开进化后,硬骨鱼发生了一次全基因组范围内的染色体复制现象(whole-genome duplication, WGD)^[15],而以上关于斑马鱼核纤层蛋白生物信息的初步分析,也证实了斑马鱼的核纤层蛋白也发生了该复制现象。

综上所述,斑马鱼的核纤层蛋白与人类的相似程度高,具有直向同源性,提示基因在进化过程中高度保守。斑马鱼可作为一种新型模式生物来研究 *lmna* 基因及其相关领域,为今后对核纤层蛋白的研究提供了一条可拓展的新思路。

参 考 文 献

[1] Zhang H, Kieckhaefer JE, Cao K. Mouse models of laminopathies [J]. Aging Cell, 2013, 12(1):2-10.

[2] Worman HJ, G Bonne. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(10):2121-2133.

[3] Dittmer TA, Misteli T. The lamin protein family[J]. Genome Biol, 2011, 12(5):222.

[4] Lee JS, Hale CM, Panorchan P, et al. Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration[J]. Biophys J, 2007, 93(7):2542-2552.

[5] Worman HJ, Courvalin JC. The inner nuclear membrane[J]. J Membrane Biol, 2000, 177(1):1-11.

[6] 任晓丹, 刘新光, 周中军. 核纤层蛋白在细胞衰老机制作用中的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(7):1441-1446.

[7] Ramaiah JM, Parnaik VK. An essential GT motif in the lamin A promoter mediates activation by CREB-binding protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 348(3):1132-1137.

[8] 周剑涛. 核纤层蛋白与细胞增殖[J]. 生命的化学, 1997, 17(03):25-26.

[9] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Dev Dyn, 1995, 203(3):253-310.

[10] Prokocimer M, Davidovich M, Nissim-Rafinia M, et al. Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(6):1059-1085.

[11] Melcer S, Gruenbaumand Y, Krohne G. Invertebrate lamins[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(10):2157-2166.

[12] Liu B, Zhou Z. Lamin A/C, laminopathies and premature ageing [J]. Histol Histopathol, 2008, 23(6):747-763.

[13] Bossie CA, Sanders MM. A cDNA from Drosophila melanogaster encodes a lamin C-like intermediate filament protein[J]. J Cell Sci, 1993, 104(Pt 4):1263-1272.

[14] Hutchison CJ. Lamins: building blocks or regulators of gene expression[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(11):848-858.

[15] Postlethwait JH, Yan JH, Gates MA, et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map [J]. Nat Genet. 1998. 18(4):345-349.

[收稿日期] 2015-12-24