

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01198

小鼠内耳发育核心转录因子的保守性及调控网络的比较分析

陈志强¹, 韩新焕², 魏钦俊², 邢光前¹, 曹新²

1. 南京医科大学第一临床医学院, 南京 210029;
2. 南京医科大学基础医学院, 南京 210029

摘要: 在脊椎动物内耳发育中, *Six1*、*Six4*、*Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5*、*Gbx2*、*Irx2/3*、*Msx1* 等基因作为核心调控基因参与听基板的诱导过程。文章通过生物信息学方法, 对小鼠内耳发育的核心转录因子进行保守性分析并研究其相互调控关系, 得到小鼠内耳发育过程中核心转录因子的基因调控网络。与文献中已知的小鼠内耳发育基因调控关系相比, *Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5* 基因在内耳发育中仍然起主要调控者的角色, *Six1* 则处于被多个转录因子调节的地位, *Gbx2*、*Irx2/3*、*Msx1* 在调控网络中也起到重要作用。对出现的差异进行了合理的分析, 同时结合构建的调控网络预测了可能存在的 *Msx1* 对 *Six1*、*Gbx2* 的调控作用。序列预测结果也发现了一些新的调控关系, 所涉及的转录因子包括 *Sox5*、*Lhx2*、*Rax*、*Otx1*、*Otx2*、*Pitx1*、*Pitx2*、*Nkx2-5*、*Irx4*、*Irx6*、*Dlx2*、*Hmx1/2/3*、*Pou4f3*、*Pax4*、*Tlx2*。文章为深入了解内耳发育调控机制提供了基础信息。

关键词: 内耳发育; 转录因子; 调控网络

Comparative analysis of conservation and regulatory network on core transcription factors in mouse inner ear development

CHEN Zhi-Qiang¹, HAN Xin-Huan², WEI Qin-Jun², XING Guang-Qian¹, CAO Xin²

1. The First Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;
2. School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: During vertebrate inner ear development, several core genes, such as *Six1*, *Six4*, *Pax2*, *Pax8*, *Foxi1*, *Dlx5*, *Gbx2*, *Irx2/3*, and *Msx1*, are crucial to the regulation of the otic placode induction. In order to get the gene regulatory network during inner ear development, bioinformatics methods were adopted to analyze conservation and regulation of the core transcription factors in mice. *Pax2*, *Pax8*, *Foxi1*, and *Dlx5* remained to be the main regulators during inner ear development, which was consistent with the gene regulatory network from literature. *Six1* was regulated by many transcription factors, and *Gbx2*, *Irx2/3*, and *Msx1* played important roles in the regulatory network. The differences in the constructed

收稿日期: 2013-04-22; 修回日期: 2013-07-21

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 201210312014), 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(重点)(编号: 2012JSSPITP1045)和江苏高校优势学科建设工程项目资助

作者简介: 陈志强, 本硕连读生, 专业方向: 临床医学。E-mail: erwin_0108@sina.com

通讯作者: 韩新焕, 副教授, 研究方向: 数学与计算机应用。E-mail: hxinhuan@163.com

网络出版时间: 2013-8-26 19:41:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130826.1941.001.html>

regulatory network were reasonably analyzed. It was predicted that *Msx1* regulated the expression of *Six1* and *Gbx2*. In addition, several transcription factors, such as *Sox5*, *Lhx2*, *Rax*, *Otx1*, *Otx2*, *Pitx1*, *Pitx2*, *Nkx2-5*, *Irx4*, *Irx6*, *Dlx2*, *Hmx1/2/3*, *Pou4f3*, *Pax4* and *Tlx2*, were found to be involved in the regulatory network. Our results provide an improved understanding of the regulatory mechanism during inner ear development.

Keywords: inner ear development; transcription factors; regulation network

脊椎动物内耳的形成起始于菱脑两侧的表面外胚层, 先后经过听基板、听窝、听囊、听泡等阶段, 发育为耳蜗囊及前庭囊, 逐渐形成内耳的完整结构。听基板的诱导是内耳发育过程中最早发生的事件之一, 是内耳形态发生的起始事件。位于表面外胚层的前基板区(Pre-placodal region, PPR)在 FGF、Wnt、BMP、Shh、Notch 等多条信号通路的相互作用下开始向听基板特化^[1,2]。

在小鼠的内耳发育研究中, *Pax2* 和 *Pax8* 是较早发现的在 PPR 表达的基因, 是听基板形成过程中的主要转录因子。*Dlx* 家族成员(*Dlx3b/4b* 和 *Dlx5/6*)和 *Foxi* 家族成员(*Foxi1* 和 *Foxi3*)也在 PPR 中表达, 参与了内耳发育的起始环节。*Msx1* 参与听基板的诱导, 调控听基板形成过程。此外, *Six1/Eya*、*Six4*、*Gbx2*、*Irx1/2/3* 等均参与了听基板早期发育过程, 对小鼠内耳形成具有不可缺少的调节作用。

因此, 转录因子可能构成了内耳发育的潜在核心调控网络, 且在发育分子进化上具有高度的保守性。本研究通过生物信息学方法, 对小鼠内耳发育相关核心转录因子的保守性及基因启动子区域进行了分析, 并预测了 *Six1*、*Six4*、*Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5*、*Gbx2*、*Irx2*、*Irx3*、*Msx1* 等转录因子之间的调控关系。

1 材料和方法

1.1 数据资料

Six1、*Six4*、*Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5*、*Gbx2*、*Irx2*、*Irx3*、*Msx1* 基因序列来源于 GenBank 数据库。

物种: 家鼠(*Mus musculus*), 褐家鼠(*Rattus norvegicus*), 黑线仓鼠(*Cricetulus griseus*), 人类(*Homo sapiens*), 猕猴(*Macaca mulatta*), 苏门答腊猩猩(*Pongo abelii*), 牛(*Bos taurus*), 野猪(*Sus scrofa*), 家猫(*Felis catus*), 树鼩(*Tupaia chinensis*), 鸡(*Gallus*

gallus), 斑胸草雀(*Taeniopygia guttata*), 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*), 斑马鱼(*Danio rerio*), 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)。这 15 个物种分别来自哺乳纲、鸟纲、两栖纲、鱼纲, 能够在一定程度上代表脊椎动物门中的常见物种。

1.2 保守性分析

利用多序列比对软件 Clustal Omega^[3](<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 分别对 *Six1*、*Six4*、*Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5*、*Gbx2*、*Irx2*、*Irx3*、*Msx1* 蛋白序列进行比对, 得到其保守结构域的比对结果。

1.3 启动子区域的预测

在 GenBank 数据库中分别获得小鼠 *Six1*、*Six4*、*Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5*、*Gbx2*、*Irx2*、*Irx3*、*Msx1* 基因上游 2 000 bp 序列, 将这段序列作为相应基因的潜在启动子区域。利用 PromoterScan^[4](<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) 以及 Promoter 2.0 Prediction Server^[5](<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 在线分析相应基因上游 2 000 bp 序列, 预测可能存在的启动子区域。

1.4 转录因子结合位点的预测

利用 ConSite^[6](<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite/>)、PROMO^[7,8](<http://algggen.lsi.upc.edu/>)、Cister^[9](<http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>)、JASPAR 数据库^[10,11](<http://jaspar.genereg.net/>) 对 *Six1*、*Six4*、*Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5*、*Gbx2*、*Irx2*、*Irx3*、*Msx1* 基因上游 2 000 bp 序列进行 TFBS 的预测^[12]。

1.5 核心基因调控网络的预测

根据 TFBS 预测的结果, 本研究使用 BioTapestry 软件^[13,14]进行小鼠内耳发育核心基因调控网络的构


```

Irx2_ M. musculus      RKNATRDATATLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ R. norvegicus   RKNATRDATATLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ H. sapiens      RKNATRDATATLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ G. gallus       RKNATRDATATLKAWLQEHKKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ X. laevis       RKNATRDATATLKAWLQEHKKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2a_ D. rerio       RKNATRDATATLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ B. taurus       RKNATRDATATLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ M. mulatta      RKNATRDATATLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ P. abelii       RKNATRDATATLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx2_ T. guttata      RKNATRDATATLKAWLQEHKKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN

Irx3_ M. musculus      ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ R. norvegicus   ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ H. sapiens      ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ X. laevis       ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ D. rerio       ----TRESTSTLKAWLSEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ B. taurus       ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ S. scrofa       ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ M. mulatta      ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ C. griseus     ----TRESTSTLKAWLNEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
Irx3_ T. rubripes    ----TRESTSTLKAWLSEHRKNFYPTKGEKIMLAIITKMTLTQVSTWVFANARRRLKKN
**:*:*:*****.*****

```

图 6 Irx2 和 Irx3 保守域的多序列比对结果

```

Msx1_ M. musculus      RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ R. norvegicus   RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ H. sapiens      RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ G. gallus       RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ X. laevis       RKPRTPFFTSQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLNLTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ B. taurus       RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ S. scrofa       RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ T. chinensis    RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ M. mulatta      RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
Msx1_ C. griseus     RKPRTPFFTAQLLALERKFRQKQYLSIAERAEFSSSLSTETQVKIWFQNRRAKAKRLQ
*****:*:*****.*****

```

图 7 Msx1 保守域的多序列比对结果

研究结果, 脊椎动物包括小鼠在内的内耳发育转录调控过程至少涉及了 *Six1*、*Six4*、*Pax2*、*Pax8*、*Foxi1*、*Dlx5*、*Gbx2*、*Irx2/3*、*Msx1* 等多个基因^[15]。

Six1 和 *Six4* 基因在听基板形成初期即开始表达, 并一直贯穿整个听基板发育阶段。Six 家族蛋白均包含一个与 DNA 结合的同源异形域和一个 N 末端的 Six 结构域。Six 蛋白通过该结构与辅助因子结合, 从而调控转录过程。辅助因子为 Groucho 或 Dach 蛋白时, Six 蛋白抑制下游靶基因的转录; Six 蛋白与 Eya 蛋白相互作用, Six 则作为转录激活子。Six1 靶基因的激活对 Pax 基因的正常表达是必不可少的, 而 Pax 基因则进一步参与听基板的形成, 从而在 *Six1* 与 *Pax2* 之间形成正反馈环^[16,17]。在小鼠内耳发育的基因调控网络中, *Six1* 与其辅助因子处于被多个转录因子调控的地位, 接受多条上游信号通路的

调节。

Foxi1 基因在听基板形成中起重要作用。在 *Foxi1* 敲除的斑马鱼能观察到听基板形态异常, 同时可观察到 *Pax2*、*Pax8*、*Dlx* 基因表达受影响。*Pax2* 敲除的小鼠表现出严重的耳蜗、内淋巴管及球囊畸形^[18]。虽然 *Pax8* 敲除的小鼠未显示出耳部发育障碍, 但 *Pax2/Pax8* 敲除小鼠的内耳发育只能停留在听泡阶段, 提示 *Pax2* 和 *Pax8* 功能上存在部分重叠, 对于内耳发育早期阶段具有非常重要的作用^[19]。而在 *Foxi1* 敲除的小鼠上未观察到听基板发育异常改变, 可能是由于 *Foxi1* 与 *Foxf2* 存在功能上的重叠。对斑马鱼及爪蟾的实验结果^[20,21]表明, *Foxi1* 是 PPR 特化相关基因的重要调控者, 敲除 *Foxi1* 将导致 *Six1/4* 及其辅助因子 *Eya1* 表达下降, 而过表达 *Foxi1* 会产生 PPR 特化相关基因的异位表达。

表 1 小鼠内耳发育核心基因启动子区域转录因子的结合位点

基因	转录因子	结合位点 1	结合位点 2	结合位点 3	结合位点 4
<i>Six1</i>	Pax2	661~667	779~786*	986~993*	1949~1956*
	Foxi1	378~389	687~698*		
	Dlx5	701~716*	703~718*	1569~1584*	
	Irx2	379~395	378~394		
	Irx3	378~394			
	Msx1	725~740	727~742	1567~1582*	
	Sox5	646~652*	709~715*		
	Lhx2	701~717*	765~781*	1568~1584*	
	Rax	764~780*	1659~1675*		
<i>Six4</i>	Six1	1374~1390			
	Otx2	84~100*			
	Nkx2-5	98~106			
	Rax	1575~1591*			
<i>Pax2</i>	Dlx5	1702~1717			
<i>Pax8</i>	Foxi1	814~825			
	Gbx2	530~546			
<i>Foxi1</i>	Pax2	302~308*	1814~1821*		
	Pax8	467~472	1420~1425	1611~1616	
	Dlx5	224~239	226~241		
	Irx4	72~88*	1138~1154*	1196~1212*	
	Irx6	1138~1154*	1196~1212*		
	Dlx2	224~239*			
<i>Dlx5</i>	Six1	1847~1863			
	Foxi1	728~739			
	Dlx5	224~239	226~241	1941~1956	
	Msx1	1321~1336			
	Pitx1	186~202*			
	Hmx1/2/3	1940~1956*			
	Lhx2	1319~1335*			
	Rax	1320~1336*			
	Nkx2-5	134~149	516~524	863~878	
<i>Gbx2</i>	Msx1	1157~1172*			
	Otx1	207~223*	210~226*		
	Pitx2	207~223*			
	Lhx2	285~301*	1155~1171*		
	Pou4f3	86~101*	743~758*		
	Rax	1155~1171*			
<i>Msx1</i>	Dlx5	204~219	687~702	689~704	
	Pax4	202~218*			
	Pitx2	290~236*			
	Otx2	120~136*	1125~1141*		
	Lhx2	202~218*	203~219*		
	Tlx2	590~606*			
	Pou4f3	1972~1987*			
	Rax	202~218*			

注：“*”表示根据不同预测软件得到的一致结果。

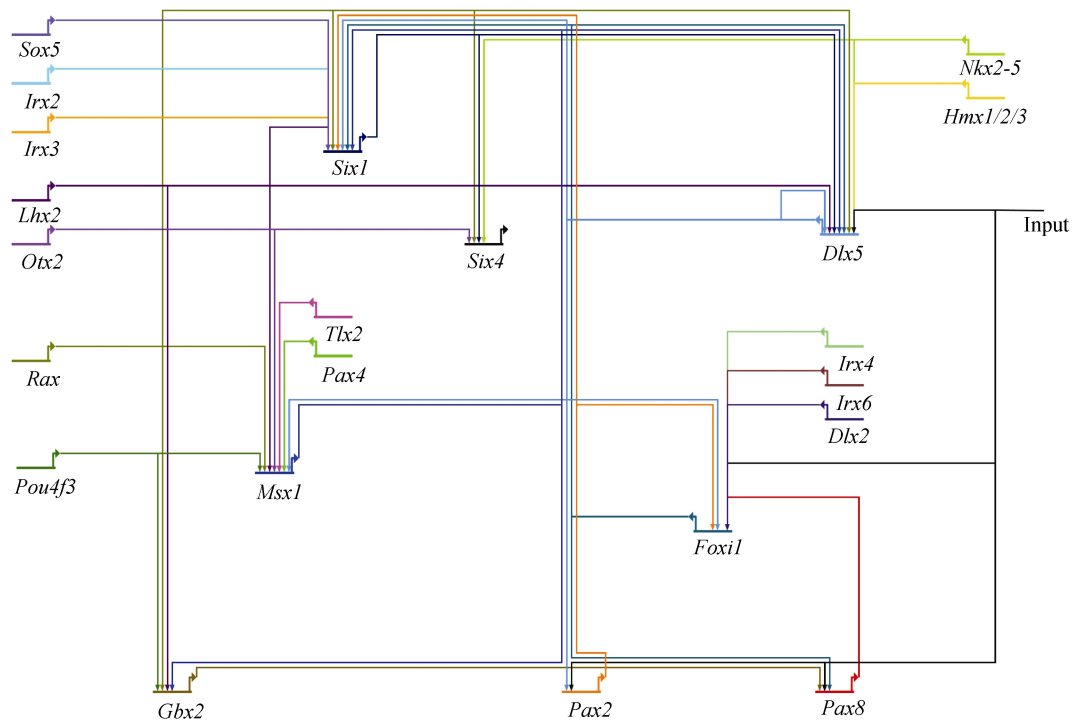


图 8 根据生物信息学方法预测的小鼠内耳发育基因调节网络

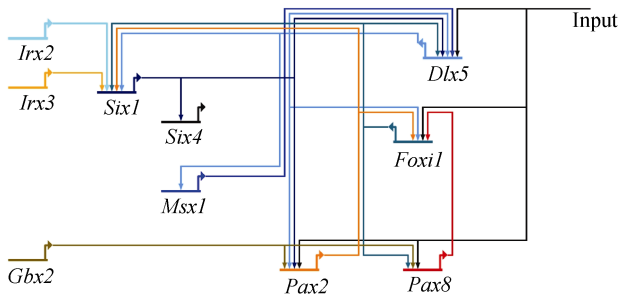


图 9 根据文献归纳的脊椎动物内耳发育基因调节网络

本研究对照基于生物信息学预测获取的以及经文献总结的脊椎动物内耳发育基因调节网络, 也发现 *Pax2*、*Pax8*、*Dlx5*、*Foxi1* 基因在内耳发育中起主要调控者的作用, *Six1* 则处于被多个转录因子调节的地位, *Irx2/3*、*Gbx2*、*Msx1* 基因在内耳转录因子调控中同样起到了重要的作用。同时, 通过对生物信息学预测和与文献总结的调控网络图进行比较, 也存在一些差异, 如: *Pax2* 基因的表达是否直接被 *Six1* 调节、以及 *Pax2* 表达是否受控于 *Gbx2*。一方面, Bricaud 等^[22]对斑马鱼的研究已经证实 *Six1* 能促进 *Pax2b* 的表达。 *Six1* 的表达水平也受到 *Pax2b* 的反作用, 这种反作用与我们的预测是一致的。另一

方面, Steventon 等^[23]的实验验证在脊椎动物中, *Gbx2* 对 *Pax2* 具有正调控作用。敲除 *Gbx2* 基因将会导致 *Pax2* 的表达降低, 使得听泡无法正常发育。而 *Gbx2* 单独无法诱导 *Pax2*, 提示在这一过程中需要其他辅助因子与 *Gbx2* 共同作用。

通过分析对照图 8 和图 9 网络图, 以及复习相关文献, 在内耳发育调控相关核心转录因子中, 我们更加感兴趣的是 *Msx1* 基因。既往关于 *Msx1* 的实验研究主要关注 *Msx* 与 *Dlx* 之间的相互作用。软件预测与文献总结得到的结果均支持 *Msx1* 与 *Dlx5* 之间具有双向调控关系。在听基板形成过程中, *Msx1* 与 *Dlx* 家族成员的表达在空间上具有很高的同步性, *Dlx* 蛋白常常在表达 *Msx1* 的区域附近被检测到, 也提示 *Dlx* 与 *Msx1* 在听基板形成的过程中共同起调控作用。 *Msx* 及 *Dlx* 的序列均含有同源异型结构域, 两者结合形成异源二聚体, 在体内以此种相互作用机制进行转录水平上的调控^[24]。但也有研究表明^[25], *Msx1* 与 *Dlx5* 之间也可以通过相互平行的方式起作用, 调节下游靶基因的表达。在器官发生过程中, *Msx1* 与 *Dlx5* 之间作用机制的多样性确保了机体能够根据不同的功能需要, 从而导致各不相同的调控结局。最近的一项研究利用染色质免疫共沉淀技术

证实了 *Dlx5* 能够与 *Msx1* 结合, 并上调 *Msx1* 的表达, 进一步说明了两者之间的相互关系^[26]。在预测得到的基因调控网络中, 我们发现转录因子 *Msx1* 不仅能与 *Dlx5* 的启动子区域结合, 还能与 *Six1*、*Gbx2* 的启动子区域发生作用。这一结果提示在小鼠内耳发育过程中, 转录因子 *Msx1* 很有可能与 *Six1* 及 *Gbx2* 的启动子序列结合, 并调节 *Six1* 及 *Gbx2* 的表达, 进而对小鼠内耳发育的基因调控网络产生深远的影响。目前对 *Msx1* 下游基因的研究并未涉及 *Six1* 或 *Gbx2*, 也没有实验证据能够直接证实 *Six1* 或 *Gbx2* 是 *Msx1* 的新的靶基因, 但不同软件对这一结果的预测均较一致, 提示 *Msx1* 的下游基因包括 *Six1* 及 *Gbx2* 的可能性较大。为了确认这一预测结果的正确性, 亟待实验研究对 *Msx1* 的下游靶基因做进一步的分析。

序列预测结果也发现了一些尚未被了解的调控关系, 所涉及的转录因子包括 *Sox5*、*Lhx2*、*Rax*、*Otx1*、*Otx2*、*Pitx1*、*Pitx2*、*Nkx2-5*、*Irx4*、*Irx6*、*Dlx2*、*Hmx1/2/3*、*Pou4f3*、*Pax4*、*Tlx2*。既往的研究主要关注于这些转录因子在其他系统的发育中所起的调控作用, 并没有深入地研究其在内耳中的功能, 对预测得到的新的调控关系也未有相关的实验报道。*Lhx2*、*Rax*、*Otx1*、*Otx2*、*Pitx1*、*Pitx2*、*Irx4*、*Dlx2*、*Pax4* 对眼的发育起到了不同程度的调控作用^[27-36], *Sox5*、*Tlx2* 参与神经系统的早期发育^[37,38], *Nkx2-5*、*Irx6* 则主要调节心脏的发育过程^[39,40], 而 *Hmx1/2/3*、*Pou4f3* 共同调控内耳的发育过程^[41-43]。这些转录因子在进化上具有较高的保守性, 对多条胚胎发育相关的信号通路有着直接或间接的调节作用, 如 *Notch*、*Wnt* 通路等。由于眼和耳在发育过程中起源于共同的胚胎原基, 胚胎早期原基的分化是由一组相似的转录因子来调节的, 因此在眼发育中起主要调控作用的转录因子很可能也参与了内耳的发育调控。类似地, 在神经系统及心脏发育中起调控作用的转录因子也有可能参与构成内耳的基因调控网络。*Hmx1/2/3*、*Pou4f3* 是内耳发育不可或缺的转录因子, 预测的结果提示了可能存在的新的调控关系, 如 *Hmx1/2/3* 能够调节 *Dlx5* 的转录、*Pou4f3* 能调节 *Msx1*、*Gbx2* 基因的表达。

目前, 转录因子调控网络的预测方法主要是通过通过对 TFBS 的预测, 构建出基因调控网络。预测算法

主要包括 *de novo* 算法、结合 ChIP-Chip 等高通量实验数据的预测算法以及系统发育足迹分析法。*de novo* 算法是通过计算方法搜索输入序列上游的模体 (motif), 利用位置权重矩阵 (Position weight matrix, PWM)^[44] 预测转录因子结合的序列。TRANSFAC 和 JASPAR 是广泛应用的转录因子模体信息的数据库^[45]。Khan 等^[46]对鸡基因组调控关系的研究就是在 *de novo* 算法的基础上进行的。结合 ChIP-Chip 等高通量实验数据的预测算法通过对 ChIP-Chip 结果的高通量数据进行整合, 根据探针相对应的序列与转录因子结合力的强弱, 从而预测可能存在的 TFBS^[47]。系统发育足迹分析法则比较相距不同物种的序列, 寻找序列中在进化上保守性较高的区域, 从而确定 TFBS^[48]。ConSite 软件即利用了该算法, 通过比较人鼠同源序列, 继而确定 TFBS。Habib 等^[49]对真菌的研究主要采用了这种方法。Whitfield 等^[50]的研究综合运用了 *de novo* 算法中的模体构建及系统发育足迹分析法中的保守性比较, 对人类启动子中的 TFBS 进行了研究。通过对现有的预测方法进行比较和考虑, 我们应用 ConSite、PROMO、Cister、JASPAR 等工具并采用 *de novo* 算法及系统发育足迹分析法, 进行 TFBS 的预测, 并构建基因调控网络。该方法降低了仅使用单一预测算法带来的假阳性结果^[51], 不仅能反映出我们所做的工作, 而且与以往研究相比得到的结果也基本上是可信的。

本文通过生物信息学方法得到的预测结果与来源于文献总结的调控关系相一致, 并在此基础上预测了一些新的调控关系, 进一步丰富了内耳发育的基因调节网络。预测结果与功能研究之间存在差异的原因可能有以下 3 点: 一是目前利用生物信息学针对 TFBS 的预测算法或多或少存在缺陷, 所得的预测结果无法较全面地反映机体内基因与转录因子相互作用的实际情况, 例如在预测 *Pax2* 的转录调节关系时丢失了与 *Six1* 及 *Gbx2* 的关联; 二是基因转录过程受多种因素影响, 在不同环境下的基因转录情况会有所不同, 在不同物种之间进行的体内或体外实验所得到的结果都有可能存在较大的差别; 三是到目前为止, 仍然未完全了解脊椎动物包括小鼠内耳发育中的基因调控关系, 根据文献总结的基因调控网络可能存在着遗漏, 例如预测结果包含了目前未知的 *Six1*、*Gbx2* 对 *Msx1* 的转录调节。

生物信息学在分子生物学领域的应用正在以前所未有的速度发展。虽然通过生物信息学方法对基因进行启动子及 TFBS 分析仍然存在一定的局限性,但这些工作对于基因表达调控的发育生物学研究起到了很好的前瞻性作用。本文首次利用生物信息学方法对小鼠内耳发育过程中的核心转录因子的基因保守性及相互调控关系进行分析,为内耳发育相关基因调控的深入探索奠定了重要的基础。当前,随着系统生物学理论的发展和完善,发育调控受到基因、蛋白、信号通路、细胞层面的多种影响,呈现时空特异性和浓度梯度性表达已获共识^[52],利用系统生物学的观点对疾病相关基因的研究也日趋增加^[53-55],相信今后从系统层面对内耳发育调节网络的进一步研究必将为耳科疾病的临床分子诊断和治疗提供更加全面的理论依据。

参考文献(References):

- [1] Chatterjee S, Kraus P, Lufkin T. A symphony of inner ear developmental control genes. *BMC Genet*, 2010, 11: 68. [DOI](#)
- [2] Brown AS, Epstein DJ. Otic ablation of smoothed reveals direct and indirect requirements for Hedgehog signaling in inner ear development. *Development*, 2011, 138(18): 3967–3976. [DOI](#)
- [3] Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li WZ, Lopez R, McWilliam R, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 2011, 7(1): 539. [DOI](#)
- [4] Prestridge DS. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J Mol Biol*, 1995, 249(5): 923–932. [DOI](#)
- [5] Knudsen S. Promoter2.0: for the recognition of PolIII promoter sequences. *Bioinformatics*, 1999, 15(5): 356–361. [DOI](#)
- [6] Sandelin A, Wasserman WW, Lenhard B. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Suppl. 2): W249–W252. [DOI](#)
- [7] Messeguer X, Escudero R, Farre D, Núñez O, Martínez J, Alba MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 2002, 18(2): 333–334. [DOI](#)
- [8] Farré D, Roset R, Huerta M, Aduara JE, Rosello L, Alba MM, Messeguer X. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3651–3653. [DOI](#)
- [9] Frith MC, Hansen U, Weng ZP. Detection of *cis*-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics*, 2001, 17(10): 878–889. [DOI](#)
- [10] Portales-Casamar E, Thongjuea S, Kwon AT, Arenillas D, Zhao X, Valen E, Yusuf D, Lenhard B, Wasserman WW, Sandelin A. JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D105–D110. [DOI](#)
- [11] Bryne JC, Valen E, Tang MH, Marstrand T, Winther O, da Piedade I, Krogh A, Lenhard B, Sandelin A. JASPAR, the open access database of transcription factor-binding profiles: new content and tools in the 2008 update. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D102–D106. [DOI](#)
- [12] 陈鸿飞, 王进科. 转录因子相关数据库. *遗传*, 2010, 32(10): 1009–1017. [DOI](#)
- [13] Longabaugh WJR, Davidson EH, Bolouri H. Computational representation of developmental genetic regulatory networks. *Dev Biol*, 2005, 283(1): 1–16. [DOI](#)
- [14] Longabaugh WJ, Davidson EH, Bolouri H. Visualization, documentation, analysis, and communication of large-scale gene regulatory networks. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789(4): 363–374. [DOI](#)
- [15] Grocott T, Tambalo M, Streit A. The peripheral sensory nervous system in the vertebrate head: a gene regulatory perspective. *Dev Biol*, 2012, 370(1): 3–23. [DOI](#)
- [16] Sato S, Ikeda K, Shioi G, Ochi H, Ogino H, Yajima H, Kawakami K. Conserved expression of mouse *Six1* in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR. *Dev Biol*, 2010, 344(1): 158–171. [DOI](#)
- [17] Christophorou NAD, Bailey AP, Hanson S, Streit A. Activation of *Six1* target genes is required for sensory placode formation. *Dev Biol*, 2009, 336(2): 327–336. [DOI](#)
- [18] Burton Q, Cole LK, Mulheisen M, Chang W, Wu DK. The role of *Pax2* in mouse inner ear development. *Dev Biol*, 2004, 272(1): 161–175. [DOI](#)
- [19] Bouchard M, de Caprona D, Busslinger M, Xu PX, Fritsch B. *Pax2* and *Pax8* cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev Biol*, 2010, 10(1): 89. [DOI](#)
- [20] Kwon HJ, Bhat N, Sweet EM, Cornell RA, Riley BB. Identification of early requirements for preplacodal ectoderm and sensory organ development. *PLoS Genet*, 2010, 6(9): e1001133. [DOI](#)

- [21] Pieper M, Ahrens K, Rink E, Peter A, Schlosser G. Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm. *Development*, 2012, 139(6): 1175–1187. [DOI](#)
- [22] Bricaud O, Collazo A. The transcription factor *six1* inhibits neuronal and promotes hair cell fate in the developing zebrafish (*Danio rerio*) inner ear. *J Neurosci*, 2006, 26(41): 10438–10451. [DOI](#)
- [23] Steventon B, Mayor R, Streit A. Mutual repression between *Gbx2* and *Otx2* in sensory placodes reveals a general mechanism for ectodermal patterning. *Dev Biol*, 2012, 367(1): 55–65. [DOI](#)
- [24] Chung IH, Han J, Iwata JY, Chai Y. *Msx1* and *Dlx5* function synergistically to regulate frontal bone development. *Genesis*, 2010, 48(11): 645–655. [DOI](#)
- [25] Han J, Mayo J, Xu X, Li J, Bringas P Jr, Maas RL, Rubenstein JL, Chai Y. Indirect modulation of *Shh* signaling by *Dlx5* affects the oral-nasal patterning of palate and rescues cleft palate in *Msx1*-null mice. *Development*, 2009, 136(24): 4225–4233. [DOI](#)
- [26] Sajan SA, Rubenstein JL, Warchol ME, Lovett M. Identification of direct downstream targets of *Dlx5* during early inner ear development. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(7): 1262–1273. [DOI](#)
- [27] Hagglund AC, Dahl L, Carlsson L. *Lhx2* is required for patterning and expansion of a distinct progenitor cell population committed to eye development. *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e23387. [DOI](#)
- [28] Muranishi Y, Terada K, Furukawa T. An essential role for *Rax* in retina and neuroendocrine system development. *Dev Growth Differ*, 2012, 54(3): 341–348. [DOI](#)
- [29] Sakurai Y, Kurokawa D, Kiyonari H, Kajikawa E, Suda Y, Aizawa S. *Otx2* and *Otx1* protect diencephalon and mesencephalon from caudalization into metencephalon during early brain regionalization. *Dev Biol*, 2010, 347(2): 392–403. [DOI](#)
- [30] Nishihara D, Yajima I, Tabata H, Nakai M, Tsukiji N, Katahira T, Takeda K, Shibahara S, Nakamura H, Yamamoto H. *Otx2* is involved in the regional specification of the developing retinal pigment epithelium by preventing the expression of *sox2* and *fgf8*, factors that induce neural retina differentiation. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e48879. [DOI](#)
- [31] Larsen KB, Lutterodt M, Rath MF, Møller M. Expression of the homeobox genes *PAX6*, *OTX2*, and *OTX1* in the early human fetal retina. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27(5): 485–492. [DOI](#)
- [32] Markitantova YV, Avdonin PP, Grigoryan EN, Zinov'eva RD. Identification of the *Pitx1* embryogenesis regulatory gene in a regenerating newt retina. *Dokl Biol Sci*, 2010, 435(1): 421–424. [DOI](#)
- [33] Liu Y, Semina EV. *Pitx2* Deficiency results in abnormal ocular and craniofacial development in zebrafish. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e30896. [DOI](#)
- [34] Star EN, Zhu M, Shi Z, Liu H, Pashmforoush M, Sauve Y, Bruneau BG, Chow RL. Regulation of retinal interneuron subtype identity by the Iroquois homeobox gene *Irx6*. *Development*, 2012, 139(24): 4644–4655. [DOI](#)
- [35] Feng L, Eisenstat DD, Chiba S, Ishizaki Y, Gan L, Shibasaki K. *Brn-3b* inhibits generation of amacrine cells by binding to and negatively regulating *DLX1/2* in developing retina. *Neuroscience*, 2011, 195: 9–20. [DOI](#)
- [36] Rath MF, Bailey MJ, Kim JS, Coon SL, Klein DC, Møller M. Developmental and daily expression of the *Pax4* and *Pax6* homeobox genes in the rat retina: localization of *Pax4* in photoreceptor cells. *J Neurochem*, 2009, 108(1): 285–294. [DOI](#)
- [37] Shim S, Kwan KY, Li MF, Lefebvre V, Šestan N. Cis-regulatory control of corticospinal system development and evolution. *Nature*, 2012, 486(7401): 74–79. [DOI](#)
- [38] Niu WZ, Zou YH, Shen CC, Zhang CL. Activation of postnatal neural stem cells requires nuclear receptor TLX. *J Neurosci*, 2011, 31(39): 13816–13828. [DOI](#)
- [39] Guner-Ataman B, Paffett-Lugassy N, Adams MS, Nevis KR, Jahangiri L, Obregon P, Kikuchi K, Poss KD, Burns CE, Burns CG. Zebrafish second heart field development relies on progenitor specification in anterior lateral plate mesoderm and *nkx2.5* function. *Development*, 2013, 140(6): 1353–1363. [DOI](#)
- [40] Star EN, Zhu MY, Shi ZW, Liu HQ, Pashmforoush M, Sauve Y, Bruneau BG, Chow RL. Regulation of retinal interneuron subtype identity by the Iroquois homeobox gene *Irx6*. *Development*, 2012, 139(24): 4644–4655. [DOI](#)
- [41] Quina LA, Kuramoto T, Luquetti DV, Cox TC, Serikawa T, Turner EE. Deletion of a conserved regulatory element required for *Hmx1* expression in craniofacial mesenchyme in the dumbo rat: a newly identified cause of congenital ear malformation. *Dis Model Mech*, 2012, 5(6): 812–822. [DOI](#)
- [42] Feng Y, Xu QL. Pivotal role of *hmx2* and *hmx3* in zebrafish inner ear and lateral line development. *Dev Biol*, 2010, 339(2): 507–518. [DOI](#)
- [43] Masuda M, Dulon D, Pak K, Mullen LM, Li Y, Erkman L, Ryan AF. Regulation of *POU4F3* gene expression in hair

- cells by 5' DNA in mice. *Neuroscience*, 2011, 197: 48–64. [DOI](#)
- [44] Nandi S, Ioshikhes I. Optimizing the GATA-3 position weight matrix to improve the identification of novel binding sites. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 416. [DOI](#)
- [45] 侯琳, 钱敏平, 朱云平, 邓明华. 转录因子结合位点生物信息学研究进展. *遗传*, 2009, 35(4): 365–373. [DOI](#)
- [46] Khan MAF, Soto-Jimenez LM, Howe T, Streit A, Sosinsky A, Stern CD. Computational tools and resources for prediction and analysis of gene regulatory regions in the chick genome. *Genesis*, 2013, 51(5): 311–324. [DOI](#)
- [47] Oh YM, Kim JK, Choi S, Yoo JY. Identification of co-occurring transcription factor binding sites from DNA sequence using clustered position weight matrices. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(5): e38. [DOI](#)
- [48] Hannehalli S. Eukaryotic transcription factor binding sites-modeling and integrative search methods. *Bioinformatics*, 2008, 24(11): 1325–1331. [DOI](#)
- [49] Habib N, Wapinski I, Margalit H, Regev A, Friedman N. A functional selection model explains evolutionary robustness despite plasticity in regulatory networks. *Mol Sys Biol*, 2012, 8(1): 619. [DOI](#)
- [50] Whitfield TW, Wang J, Collins PJ, Partridge EC, Aldred SF, Trinklein ND, Myers RM, Weng ZP. Functional analysis of transcription factor binding sites in human promoters. *Genome Biol*, 2012, 13(9): R50. [DOI](#)
- [51] Simcha D, Price ND, Geman D. The limits of de novo DNA motif discovery. *PloS ONE*, 2012, 7(11): e47836. [DOI](#)
- [52] Nurse P, Hayles J. The cell in an era of systems biology. *Cell*, 2011, 144(6): 850–854. [DOI](#)
- [53] Cheong R, Rhee A, Wang CJ, Nemenman I, Levchenko A. Information transduction capacity of noisy biochemical signaling network. *Science*, 2011, 334(6054): 354–358. [DOI](#)
- [54] Lander AD. Pattern, growth, and control. *Cell*, 2011, 144(6): 955–969. [DOI](#)
- [55] Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(1): 56–68. [DOI](#)

•科学新闻•

植物种子和器官大小调控研究取得新进展

植物种子和器官大小是重要的产量性状,大小调控也是一个基本的发育生物学问题。然而,植物决定其种子和器官最终大小的分子机理目前并不清楚。为了揭示植物种子和器官大小调控的分子机理,中国科学院遗传与发育生物学研究所李云海研究组已在拟南芥中分离了一系列大种子和器官的突变体 *da* (*DA* 是汉字“大”的意思)。该研究组以前的研究工作表明,*DA1* 编码一个泛素受体蛋白,通过抑制细胞分裂从而调控植物种子和器官大小(Li, et al., 2008, *Genes & Development*, 22:1331–1336)。为了进一步理解植物种子和器官大小调控的分子机制,在科技部和国家自然科学基金的资助下,李云海研究组最近报道了 *DA2* 基因的功能。*DA2* 基因编码了一个 E3 泛素连接酶。*da2-1* 突变体具有比野生型更大的种子和器官,过量表达 *DA2* 产生小的种子和器官,表明 *DA2* 蛋白是种子和器官大小调控的关键因子。细胞学分析表明,*DA2* 是通过抑制细胞分裂,从而调控植物种子和器官大小。*DA1* 和 *DA2* 蛋白均通过调控母本珠被细胞分裂决定种子大小。遗传学分析显示,*DA1* 和 *DA2* 基因协同调控植物种子和器官大小。进一步的生物化学实验表明,*DA1* 和 *DA2* 蛋白在体内和体外可以直接相互作用。该研究首次在植物中揭示了泛素受体 *DA1* 与 E3 泛素连接酶 *DA2* 协同调控植物种子和器官大小的分子机制,首次建立了泛素相关蛋白 *DA1* 和 *DA2* 等调控植物种子和器官大小的遗传机理。另外,*DA2* 蛋白与水稻中调控粒宽的关键因子 *GW2*(*GRAIN WIDTH AND WEIGHT2*)具有一定的同源性。因此,该研究不仅在理论上为植物种子和器官大小调控机理的研究提供重要思路,也将为作物高产育种提供理论基础。该研究成果于 2013 年 9 月 18 日在线发表于国际植物学杂志 *The Plant Cell* 上(Xia T, Li N, Dumenil J, Li J, Kamenski A, Bevan MW, Gao F, Li Y. The Ubiquitin Receptor *DA1* Interacts with the E3 Ubiquitin Ligase *DA2* to Regulate Seed and Organ Size in *Arabidopsis*. DOI:10.1105/tpc.113.115063)。

(夏天、李娜、李云海)