

# 人和非洲象 *AXIN1* 基因的鉴定 与生物信息学分析

于芳芳, 柴思敏, 谷 龙, 郑 煜, 周 旭, 徐士霞, 任文华

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 隐睾是男性生殖器最常见的先天性异常之一。正常状态下, 人(*Homo sapiens*)在出生时睾丸就已经下降到阴囊, 而非洲象(*Loxodonta africana*)的睾丸始终位于腹腔内却能维持正常的生殖。本文通过克隆测序鉴定了隐睾症相关的基因 *AXIN1* 在人和非洲象两个物种中的差异, 并对其结构和理化性质进行生物信息学分析。结果表明, 与人相比, *AXIN1* 基因在非洲象中缺失第 9 个外显子(108 bp); 二者在理化性质、信号肽、跨膜区域、磷酸化位点、亚定位信息和结构域等方面没有显著性差异, 但是在核心启动子、蛋白互作、二级结构和三维结构等方面存在差异。本研究初步证明非洲象 *AXIN1* 基因第 9 个外显子的缺失引起蛋白质性质发生了一些重要变化, 为今后探讨这些改变是否和睾丸位置相关奠定了基础。

**[关键词]** 隐睾症, *AXIN1*, 基因鉴定, 生物信息学分析

**[中图分类号]** Q594 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2021)02-0069-11

## Identification and Bioinformatics Analysis of *AXIN1* Gene in *Homo sapiens* and *Loxodonta africana*

Yu Fangfang, Chai Simin, Gu Long, Zheng Yu, Zhou Xu, Xu Shixia, Ren Wenhua

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Cryptorchidism is one of the most common congenital abnormalities of the male genitalia. Under normal conditions, a man's testis have dropped to the scrotum at birth, while the testes of the *Loxodonta africana* are always in the abdominal cavity and they can reproduce normally. In this paper, we have identified the differences of cryptorchidism-related gene *AXIN1* between *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* through cloning and sequencing, and conducted bioinformatics analysis on its structure and physical and chemical properties. The results show that, compared with *Homo sapiens*, the *AXIN1* gene lacks the 9th exon(108 bp) in *Loxodonta africana*; the physical and chemical properties, signal peptide, transmembrane region, phosphorylation site, sub-localization and structural domain information of the *AXIN1* gene in the two species are not significant difference; but there are differences in core promoter, protein interaction, secondary structure and three-dimensional structure. This study preliminarily proves that the deletion of the 9th exon of the *AXIN1* gene of *Loxodonta africana* has caused some important changes in protein properties, which lays the foundation for future exploration of whether these changes are related to the location of the testis.

**Key words:** Cryptorchidism, *AXIN1*, gene identification, bioinformatics analysis

睾丸是雄性哺乳动物生殖系统的核心器官, 其发育常需伴随自身的下降, 这个下降过程是指睾丸从尿生殖嵴经腹腔降至阴囊。睾丸的下降过程分为两个阶段, 分别是腹腔内迁移阶段和腹股沟阴囊阶段。临床上把睾丸未下降到阴囊的现象称为隐睾。通常人在出生时就已经完全下降到阴囊内, 鼠类在出生后 3 周左右完成这一过程<sup>[1-4]</sup>。然而, 生理解剖学家们发现并不是所有的哺乳动物的睾丸都会下降到阴囊, 如金毛鼹、象等动物的睾丸未下降, 仍然保留在腹腔中; 人、黑猩猩等灵长类动物的睾丸则下降至体腔外的阴囊中<sup>[5]</sup>。隐睾的发生较为复杂, 涉及遗传、解剖、神经内分泌及环境等因素的相互作用<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2020-08-19.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(1872219、31370401).

通讯作者: 任文华, 教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学. E-mail: 08162@njnu.edu.cn

AXIN1(axis formation inhibitor)是体轴发育抑制因子,在胚胎发育过程中控制着体轴的形成,以前被鉴定为小鼠 Fused 基因座的产物,定位于人染色体 16p13.3,与小鼠蛋白具有 87%的相似性.目前已经证实了 *AXIN1* 基因在线虫、果蝇、斑马鱼、爪蟾、鸡、小鼠、大鼠、人中都非常保守;普遍表达于不同的组织,包括脑、胸腺、心脏、肺、肝、脾和肾等<sup>[6]</sup>. *AXIN1* 的突变会导致神经外胚层缺陷(不完全闭合、头部皱褶的畸形或截断)、心脏缺陷、胚轴重复和纯合子的早期胚胎致死<sup>[7]</sup>. *AXIN1* 的功能也与许多疾病和肿瘤的发生和发展有关.此外,*AXIN1* 与几种不同的蛋白质复合物结合,参与了 Wnt/转化生长因子(TGF- $\beta$ )、应激激活蛋白激酶 JNK1(JNK)和细胞肿瘤抗原 p53 信号通路<sup>[8-9]</sup>. 经典 Wnt 信号通路不仅调节脊椎动物和无脊椎动物的细胞增殖、分化、形态和运动,它的激活也是某些隐睾症的潜在病因<sup>[10]</sup>. *AXIN1* 作为 Wnt 信号通路中破坏复合物的中心支架,它直接与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导中的许多组分相互作用,如 LRP、DVL、PP2A、APC、CK1、GSK3 $\beta$  和  $\beta$ -catenin,可能在隐睾症的发展中起重要作用.对 113 名隐睾患者与 179 名健康的志愿者进行 SNP 分析,研究发现隐睾症患者和对照组之间 *AXIN1* 标签 SNP 的等位基因和基因型频率存在显著差异,这意味着这些等位基因和基因型可能是导致隐睾症发生的因素<sup>[11]</sup>.

通过对基因座的分析发现,人 *AXIN1* 具有两种亚型,a 亚型由 11 个外显子组成,基因转录产物全长为 3 675 bp,翻译蛋白含 862 个氨基酸残基;b 亚型在 3'编码区缺少框内第 9 个外显子,序列长度为 3 567 bp,翻译 826 个氨基酸<sup>[12]</sup>. 经过实验室的前期序列分析发现(待发表数据),对睾丸完全未下降物种(金毛鼹、非洲象、鸭嘴兽等)和睾丸完全下降物种(人、黑猩猩、小鼠等)的 *AXIN1* 基因进行序列比对,在睾丸完全未下降的物种中 *AXIN1* 基因的第 9 个外显子缺失. 本文分别选取睾丸完全未下降和睾丸完全下降中的代表物种非洲象和人进行生物信息学分析. 非洲象的 *AXIN1* 基因由 10 个外显子组成,基因转录产物全长为 2 733 bp,由 833 个氨基酸组成. 与人的 *AXIN1* a 亚型基因序列比对发现,非洲象缺失的部分为第 9 个外显子,共 108 bp,和人的 b 亚型相似. 因此本研究通过实验鉴定非洲象的 *AXIN1* 基因序列是否存在缺失,并通过生物信息学方法对人和非洲象的 *AXIN1* 基因进行分析,为进一步研究 *AXIN1* 基因与睾丸位置的相关性提供基本材料和理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

非洲象的肌肉样本(来自死亡个体)为本实验室保存. 组织裂解液(10 mmol/L Tris-cl, 500 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, PH=7.5~8.0);蛋白酶 k、Tris-饱和酚、苯酚、氯仿异戊醇(体积比 24:1)、醋酸钠购自上海生工生物有限公司;普通 Taq DNA polymerase 购自 TaKaRa;无水乙醇为国产分析纯.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因鉴定

用酚氯仿抽提法提取非洲象基因组 DNA. 取非洲象肌肉组织于 1.5 mL Eppendorf 管中,加入组织裂解液 600  $\mu$ L,蛋白酶 K(20 mg/mL)10  $\mu$ L,充分混匀,55  $^{\circ}$ C 消化过夜;去除已经消化好的样品,以 5 000 rpm 的速度于 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,除去杂质,取上清液至新的 1.5 mL Ep 管中;加入等体积 Tris-饱和酚,将离心管置于旋转皿上旋转 10 min~15 min,温和混匀两相,使管内内容物混成乳浊物;以 8 000 rpm 的速度于 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液至新的 1.5 mL Ep 管中;加入等体积氯仿异戊醇,颠倒混匀 10 min~15 min,再次以 8 000 rpm 的速度于 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min;将上层水相转移至新的 1.5 mL Ep 管中,加入 0.1 倍体积醋酸钠混匀,再加入 2.5 倍体积冷的无水乙醇,上下颠倒 Ep 管至溶液彻底混匀;-20  $^{\circ}$ C 冰箱沉淀 DNA 至少 3 h(可过夜);取出后以 12 000 rpm 的速度于 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,去除上清液,留沉淀;向 Ep 管中加入 1 mL 75%乙醇,以 12 000 rpm 的速度于 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min;倒掉乙醇,向 Ep 管中加入 1 mL 75%乙醇,再次离心,条件同上,做第二次洗脱;再次调转 Ep 管在离心机里的方向,以 12 000 rpm 的速度于 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,用 200  $\mu$ L 的枪小心吸走乙醇,然后开盖晾干乙醇;加入 50  $\mu$ L 双蒸水沉解,4  $^{\circ}$ C 保存.

通过 NCBI 在线网页(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)在外显子序列上设计引物,引物由上海生工生物有限公司合成,引物序列如下:

Loxodonta Africana F:5'AAGAGGAGAAGCGAACCAGC3',

Loxodonta Africana R:5'CCCGCCTTCTTCTGTGACTT 3'.

PCR 体系:基因组 DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 正反向引物各 1  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture 15  $\mu\text{L}$ , 用双蒸水补足至 25  $\mu\text{L}$ . PCR 反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环. 反应结束后对扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 然后由上海生工测序.

### 1.2.2 基因序列数据来源

本文所用数据均来源于 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 从中获取人和非洲象 *AXIN1* 基因的基因序列以及对应的氨基酸序列进行数据分析.

### 1.2.3 生物信息学分析

运用以下在线网站分别预测 *AXIN1* 基因和 *AXIN1* 蛋白性质: Neural Network Promoter Prediction ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 预测基因潜在核心启动子; NCBI 数据库中的 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对基因进行开放阅读框的分析; Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的分子量、分子式、等电点、脂肪系数、不稳定系数、半衰期、平均亲水系数, 以及氨基酸组成; ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale>) 进行蛋白质疏水性分析; SignalP5.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析信号肽; TMHMM Server.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白质的切割位点及跨膜区域; NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 预测磷酸化位点; PSORT II Prediction (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 分析蛋白的定位信息; SOPMA (<https://npsa-pbil.ibcp.fr>) 分析蛋白质的二级结构; I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 预测蛋白质的三维结构; Pymol 软件对人和非洲象两种蛋白质的三维结构叠合比对; MEGA 软件对人和非洲象的 *AXIN1* 蛋白质序列进行比对; STRING (<http://string-db.org>) 推测有可能与人和非洲象 *AXIN1* 有直接或间接相互作用的蛋白质; NCBI 的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白质的保守结构域.

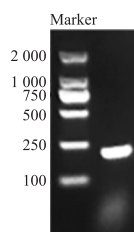
## 2 结果与讨论

### 2.1 非洲象 *AXIN1* 基因缺失的实验验证

首先利用 NCBI 数据库下载人和非洲象的 *AXIN1* 序列, 分别选取最长的转录本, 利用 MEGA 软件比对. 与人相比, 非洲象的 *AXIN1* 基因缺失第 9 个外显子 (108 bp) (图 1A). 通过构建基因组本地数据库, 以近亲缘物种的基因序列作为“query”筛选基因组中非洲象的序列, 将非洲象的每个外显子前后延伸 200 bp, 最后确保能够完整获得第 8 和第 10 个外显子之间的内含子序列. 根据 NCBI 数据库网站中的非洲象 *AXIN1* 序列设计引物, 分别在第 8 个和第 10 个外显子上设计上下游引物, 以提取的非洲象全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到约 200 bp 的条带 (图 1B). 将测序结果与本地 blast 的结果进行比对, 发现测序结果与下载的结果一致, 即第 8 个和第 10 个外显子之间全部为内含子序列, 没有第 9 个外显子的序列.

Homo_sapiens	Q R Y V Q E V M R R G R A C V R P A C A P V L H V V P A V S D M E L S E T E T R
Loxodonta_africana	Q R . . . . . T R

A. 人和非洲象 *AXIN1* 基因的蛋白质序列比对结果



B. 非洲象 *AXIN1* 基因缺失部分图

图 1 非洲象 *AXIN1* 基因缺失部分验证

Fig. 1 Verification of the missing part of the *Loxodonta africana* *AXIN1* gene

### 2.2 人和非洲象 *AXIN1* 基因的生物信息学分析

#### 2.2.1 人和非洲象 *AXIN1* 基因的核心启动子分析

本研究分别选取人和非洲象 *AXIN1* 基因的最长转录本进行分析, 研究结果 (表 1) 表明人 *AXIN1* 基因

共有两种核心启动子,分为 143 bp~193 bp、492 bp~542 bp,并且这两种核心启动子的得分值均为 0.8 及以上,因此推测这两处是人 *AXIN1* 基因核心启动子.

非洲象 *AXIN1* 并没有预测到核心启动子.

表 1 人和非洲象 *AXIN1* 基因的核心启动子

Table 1 Core promoter of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* *AXIN1* gene

	Start	End	Score
<i>Homo sapiens</i>	143	193	0.80
		AAGGTGTTGGCATTAAAGGTGAGACTTCGACGGCCACTCCGAGGCGCTCG	
	492	542	0.99
		CAAGAGCTTCATAAAGGGCTGCATCATGAAGCAGCTGATCGATCCTGCCA	
<i>Loxodonta africana</i>	无		

2.2.2 人和非洲象 *AXIN1* 基因的开放阅读框分析

本次研究的分析结果(图 2)表明,人和非洲象都在 ORF1 阅读框有最长的开放阅读框架.人 *AXIN1* 基因的开放阅读框架长度为 2 589 bp,编码 862 个氨基酸;非洲象 *AXIN1* 基因的开放阅读框架长度为 2 502 bp,编码 833 个氨基酸.

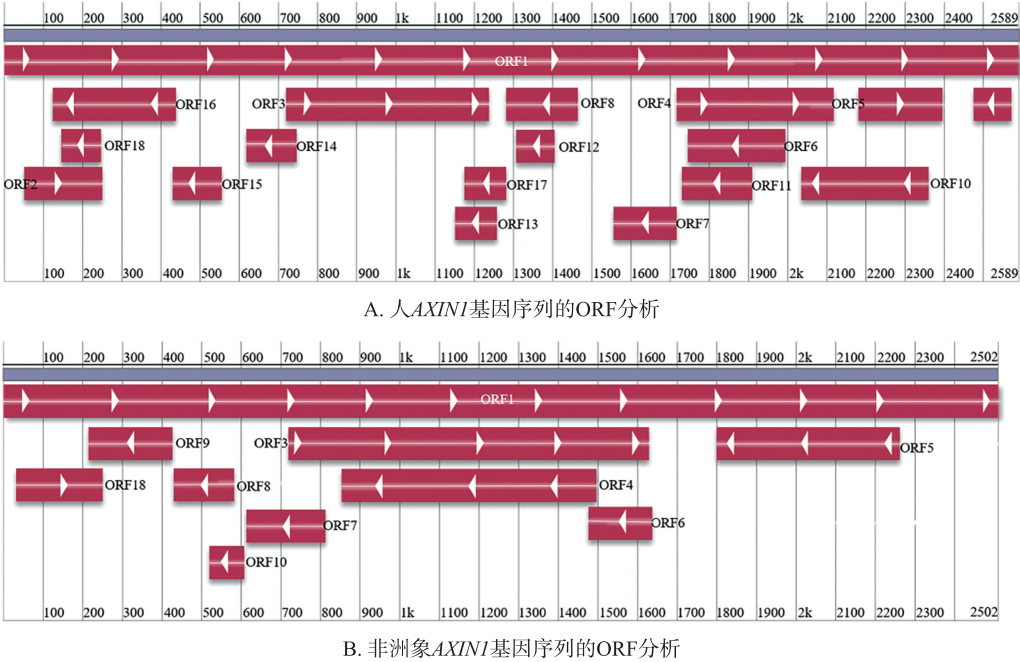


图 2 人和非洲象 *AXIN1* 基因序列的 ORF 分析

Fig. 2 ORF analysis of *AXIN1* gene sequence of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana*

2.2.3 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的理化性质分析

ProtParam 分析结果(表 2)表明,人 *AXIN1* 蛋白质的相对分子量为 959 340.97,分子式为  $C_{4158}H_{6544}N_{1240}O_{1300}S_{29}$ ,消光系数是 80 760;等电点(pI)是 6.50,该蛋白为酸性蛋白;带负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 125 个,带正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 117 个;不稳定系数是 54.62,该蛋白为不稳定蛋白;在网织红细胞中该蛋白的半衰期是 30 h;脂肪系数为 62.94;总平均亲水系数为-0.794;该蛋白是亲水性蛋白(负值为亲水性蛋白,正值为疏水性蛋白).

表 2 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的理化性质分析

Table 2 Analysis of physicochemical properties of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* *AXIN1* protein

	总氨基酸数	相对分子量	分子式	理论等电点	消光系数	不稳定系数	理论推导半衰期	脂肪系数	总平均亲水系数
<i>Homo sapiens</i>	862	95634.97	$C_{4158}H_{6544}N_{1240}O_{1300}S_{29}$	6.50	80760	54.62	30 h	62.94	-0.794
<i>Loxodonta africana</i>	833	92414.41	$C_{4030}H_{6349}N_{1183}O_{1265}S_{25}$	6.48	79020	55.89	30 h	63.84	-0.770



非洲象 *AXIN1* 蛋白质的相对分子量 92 414.41,分子式是  $C_{4030}H_{6349}N_{1183}O_{1265}S_{25}$ ,消光系数为 79 020;理论等电点为 6.48,该蛋白为酸性蛋白;带负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 118 个,带正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 110 个;其不稳定系数为 55.89,该蛋白为不稳定蛋白质;在哺乳动物网织红细胞内该蛋白的半衰期为 30 h;脂肪系数为 63.84;总平均亲水系数为-0.770,该蛋白是亲水性蛋白。

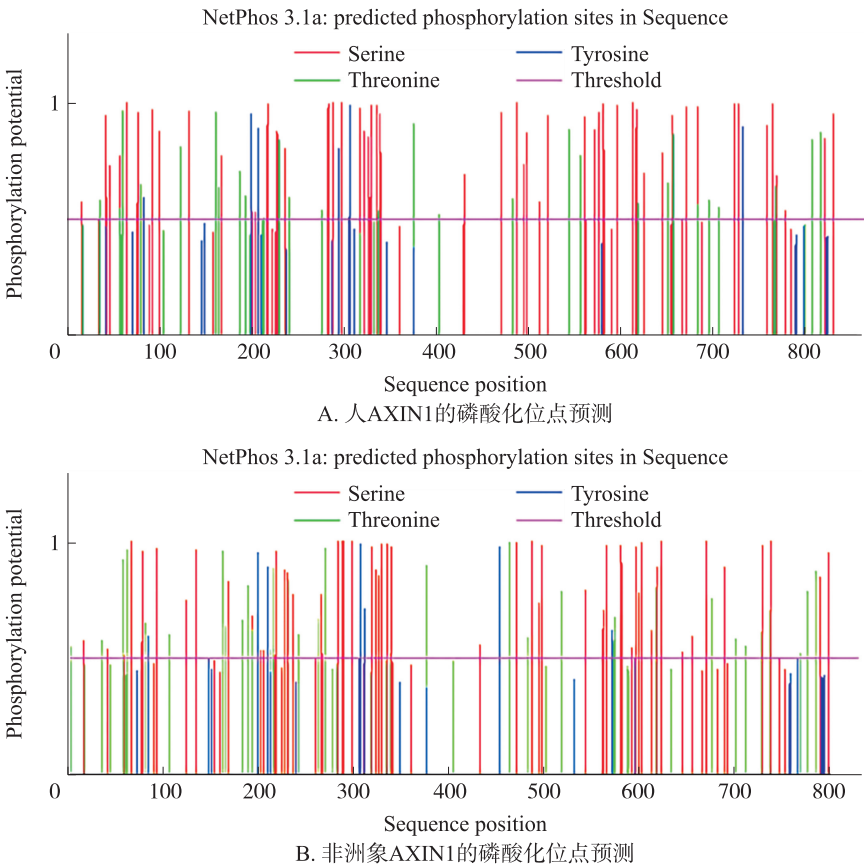
用 ProtScale 在线工具进行疏水性分析,同样可得出这两个蛋白为亲水性蛋白。

2.2.4 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的信号肽、跨膜区域预测

信号肽(SP)是许多新合成蛋白质的氨基末端的短氨基酸序列,能将蛋白质靶向到膜中或跨膜<sup>[13]</sup>。利用 Singal P5.0 sever 在线分析工具对人和非洲象的 *AXIN1* 信号肽进行预测,结果发现,两种蛋白质均不含信号肽。利用 TMHMM Sever.2.0 分析人和非洲象的 *AXIN1* 蛋白质发现也不存在跨膜区域。

2.2.5 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的磷酸化位点预测

磷酸化修饰是一种重要且常见的蛋白质翻译后修饰方式,蛋白质的可逆磷酸化与去磷酸化过程是真核细胞生命活动中最普遍的调控手段,广泛参与到细胞周期、分化和发育、代谢和神经活动、肌肉收缩和转录调节等生命过程中<sup>[14]</sup>。利用 NetPhos 3.1 Server 在线网页对蛋白质进行分析发现,人 *AXIN1* 蛋白质的磷酸化位点中置信度达到 90%以上的位点共有 39 个,非洲象 *AXIN1* 蛋白质的磷酸化位点共有 33 个(图 3)。



横坐标为序列位置,纵坐标为磷酸化的可能性. 阈值为 0.5(红横线)

图 3 人和非洲象 *AXIN1* 的磷酸化位点预测

Fig. 3 Phosphorylation site prediction of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* *AXIN1*

2.2.6 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的亚定位分析

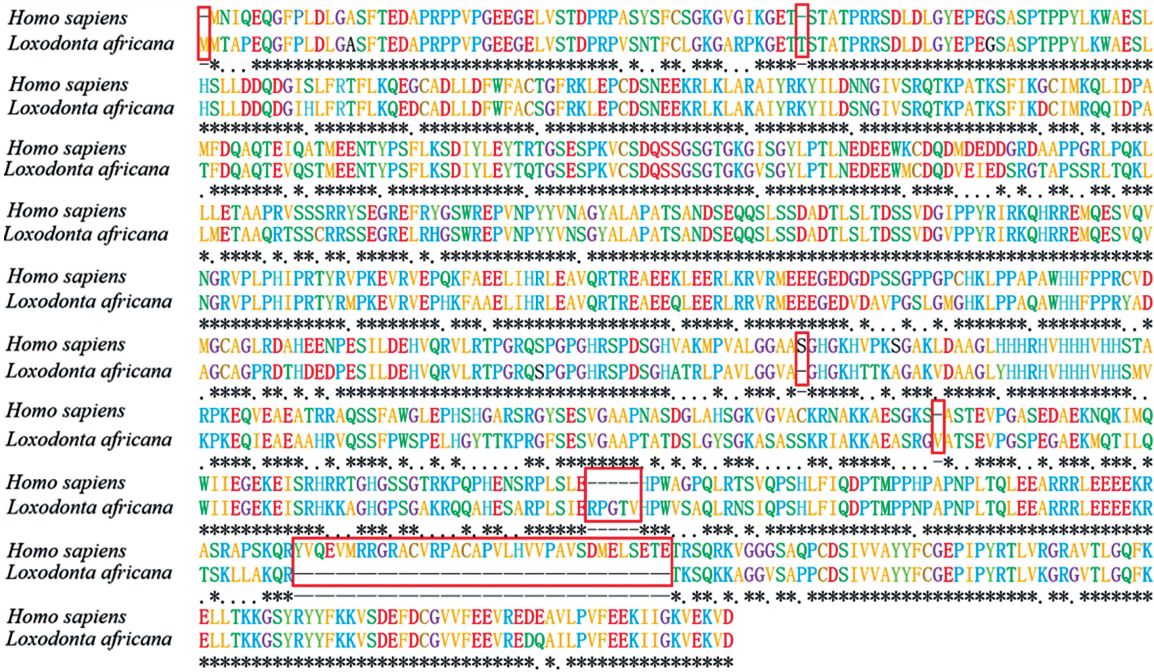
通过在线网页 PSORT II Prediction 预测蛋白质的定位信息,发现人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质位于相同的细胞结构中,分别为细胞质、线粒体和细胞核。其中人的 *AXIN1* 蛋白质存在于细胞质、线粒体和细胞核的概率分别为 73.9%、17.4%、8.7%;非洲象的 *AXIN1* 蛋白质存在于细胞质、线粒体和细胞核的概率为 69.6%、17.4%、13.0%(表 3)。

表 3 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的亚定位预测  
Table 3 Prediction of sublocalization of *AXIN1* protein in *Homo sapiens* and *Loxodonta africana*

	细胞质	线粒体	细胞核
<i>Homo sapiens</i>	73.9%	17.4%	8.7%
<i>Loxodonta africana</i>	69.6%	17.4%	13.0%

2.2.7 人和非洲象 AXIN1 蛋白质序列比对

通过 MEGA 软件对人和非洲象 AXIN1 的氨基酸序列比对发现(图 4),除了在第 9 个外显子有插入缺失之外,在第 1 位、第 57 位、第 513 位、第 617 位、第 675~679 位也存在插入缺失,此外两者的氨基酸位点存在多处不同。



“\*”表示人和非洲象 AXIN1 的氨基酸位点相同,“.”表示人和非洲象 AXIN1 的氨基酸位点不同,“-”表示在人或者非洲象的 AXIN1 中存在缺失,红框表示人和非洲象中插入缺失的序列

图 4 人和非洲象 AXIN1 蛋白序列比对结果

Fig. 4 Alignment results of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* AXIN1 protein sequence

2.2.8 人和非洲象 AXIN1 蛋白质的二级结构分析

利用在线分析软件 SOPMA 预测分析人和非洲象 AXIN1 蛋白质所形成的二级结构. 将蛋白质序列提交至 SOPMA,构象状态选择 3,包括  $\alpha$  螺旋(Hh)、 $\beta$  折叠片(Ee)和无规则卷曲(Cc),所得结果如图所示(图 5). 人 AXIN1 蛋白中分别有 233 个  $\alpha$  螺旋(27.03%),47 个  $\beta$  折叠片(5.45%)和 582 个无规则卷曲(67.52%);非洲象 AXIN1 蛋白中分别有 230 个  $\alpha$  螺旋(27.61%),50 个  $\beta$  折叠片(6.00%)和 553 个无规则卷曲(66.39%). 人和非洲象 AXIN1 二级结构的  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠片和无规则卷曲数量没有显著差别,但是它们的  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠片和无规则卷曲位置存在差别。

2.2.9 人和非洲象 AXIN1 蛋白质的三维结构预测

通过在线网站 I-TASSER 对人和非洲象 AXIN1 的氨基酸序列进行同源三维建模(图 6),两种蛋白质都由一条链构成,红色代表蛋白质的 N 端,深蓝色代表蛋白质的 C 端. 用 Pymol 软件对两种蛋白质的三维结构进行比对,能够获得两者相互重叠的一系列三维坐标. 二者重叠的结构能够用来计算 RMSD (root mean square deviation) 值,RMSD 值衡量的是两个结构之间的区别程度. RMSD 越小,相似度越高. 研究分析表明,RMSD=30.713,说明两者的蛋白结构差异较大。

2.2.10 人和非洲象 AXIN1 蛋白质互作关系预测

本研究通过 STRING 在线网站推测可能与人和非洲象 AXIN1 有直接或间接相互作用的蛋白质. 利用此网站获得蛋白互作网络图(图 7),并将相互作用的蛋白质信息绘制成表格(表 4、5). 与人 AXIN1 有相互作用的蛋白质是 GSK3 $\beta$ 、APC、CTNNB1、SIAH1、LRP5、LRP6、DVL1、GSK3A、TNKS、AMER1;与非洲象 AXIN1 有相互作用的蛋白质是 GSK3 $\beta$ 、APC、CTNNB1、DVL1、GSK3A、CSNK1A1、CSNK1E、DVL2、LRP5、SIAH1。



### A. 人AXIN1蛋白质的二级结构

### B. 非洲象AXIN1蛋白质的二级结构

图5 人和非洲象 AXIN1 蛋白质的二级结构预测

**Fig. 5** Prediction of the secondary structure of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* AXIN1 protein

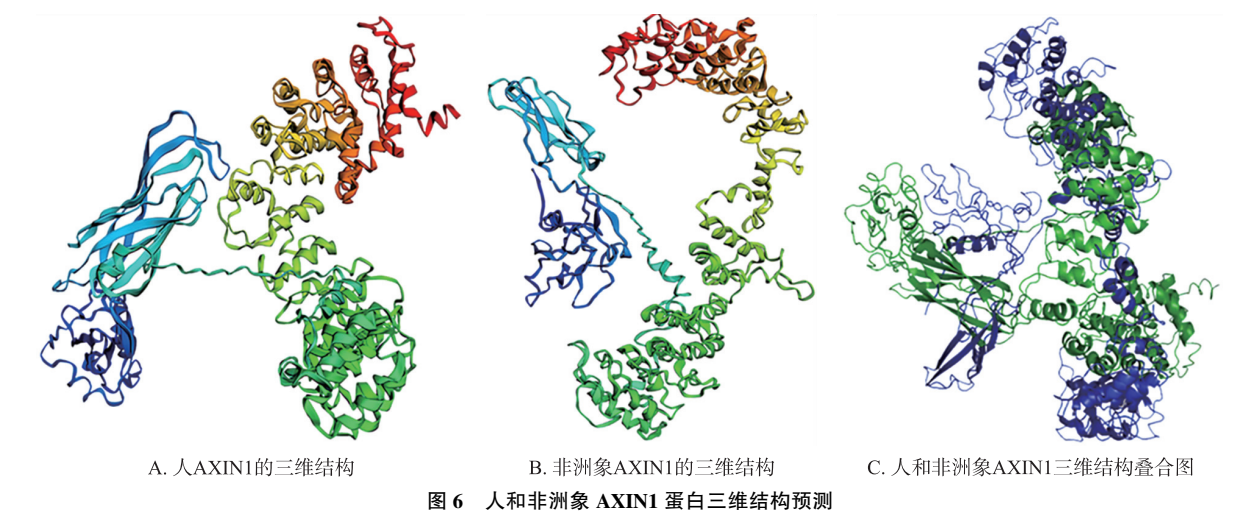


Fig. 6 Prediction of the three-dimensional structure of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* AXIN1 protein

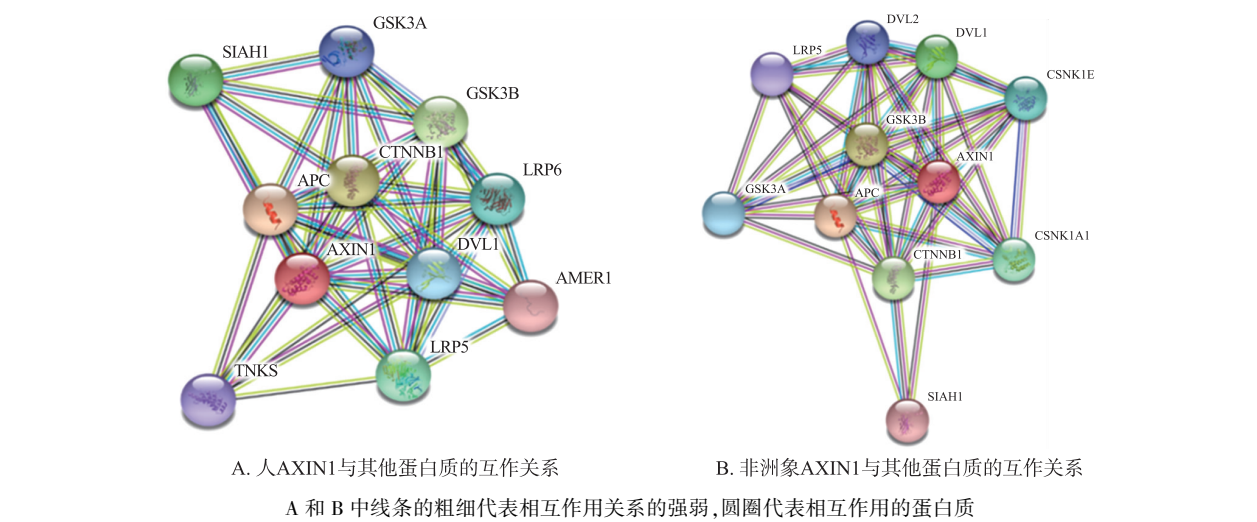


Fig. 7 Prediction of the interaction between *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* AXIN1 and other proteins

表 4 人 AXIN1 与其他蛋白质的互作关系信息表

Table 4 Information table of interaction between *Homo sapiens* AXIN1 and other proteins

蛋白质简称	注释	得分
APC	Adenomatous polyposis coli protein,Tumor suppressor Promotes rapid degradation of CTNNB1 and participates in Wnt...	0.999 0
CTNNB1	Catenin beta-1;Key downstream component of the canonical Wnt signaling pathway,In the absence of Wnt,forms a co...	0.999 0
GSK3β	Glycogen synthase kinase-3 beta;Constitutively active protein kinase that acts as a negative regulator in the hormonal C...	0.999 0
SIAH1	E3 ubiquitin-protein ligase SIAHT;E3 ubiquitin-protein ligase that mediates ubiquitination and subsequent proteasomal...	0.997 0
LRP5	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5;Component of the Wnt-Fzd-LRP5-LRP6 complex that triggers beta-cat...	0.997 0
LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6;Component of the Wnt-Fzd-LRP5-LRP6 complex that triggers beta-cat...	0.996 0
DVL1	Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1; Participates in Wnt signaling by binding to the cytoplasmic C-term...	0.996 0
GSK3A	Glycogen synthase kinase 3 alpha;Constitutively active protein kinase that acts as a negative regulator in the hormonal...	0.999 4
TNKS	Tankyrase-1;Poly-ADP-ribosyltransferase involved in various processes such as Wnt signaling pathway,telomere length...	0.992 0
AMER1	APC membrane recruitment protein 1;Regulator of the canonical Wnt signaling pathway. Acts by specifically binding ph...	0.999 0



表 5 非洲象 *AXIN1* 与其他蛋白质的互作关系信息表

Table 5 Information table of interaction between *Loxodonta africana* *AXIN1* and other proteins

蛋白质简称	注释	得分
APC	Adenomatous polyposis coli protein isoform X1(2836 aa)	0.995
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta;Belongs to the protein kinase superfamily( 433 aa)	0.995
CTNNB1	Catenin beta 1;Catenin(cadherin-associated protein) ,beta 1,88kDa(780 aa)	0.988
DVL1	Dishevelled segment polarity protein 1(621 aa)	0.977
CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1;Belongs to the protein kinase superfamily( 337 aa)	0.955
CSNK1E	Uncharacterized protein;Casein kinase 1,epsilon;Belongs to the protein kinase superfamily(416 aa)	0.936
GSK3A	Glycogen synthase kinase 3 alpha;Belongs to the protein kinase superfamily( 482 aa)	0.935
DVL2	Dishevelled segment polarity protein 2(737 aa)	0.918
LRP5	Low-density lipoprotein receptor-related protein;Component of the Wnt-Fzd-LRP5-LRP6 complex that triggers beta-cat...	0.912
SHAH1	E3 ubiquitin-protein ligase;E3 ubiquitin-protein ligase that mediates ubiquitination and subsequent proteasomal degra...	0.902

2.2.11 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的保守结构域预测

本研究通过 NCBI 的 CCD 数据库推测人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的保守结构域,发现人和非洲象的 *AXIN1* 蛋白质中都具有 4 个保守结构域,分别是 RGS\_Axin、DIX、Axin\_TNKS\_binding、Axin\_b-cat\_bind super family(图 8)。

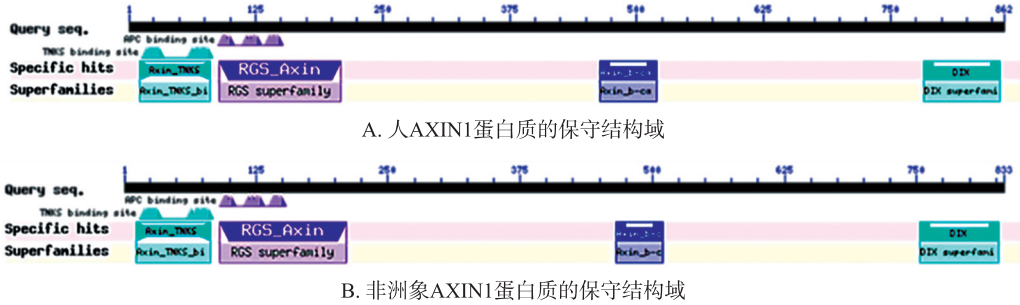


图 8 人和非洲象 *AXIN1* 蛋白质的保守结构域预测

Fig. 8 Prediction of the conserved domains of *Homo sapiens* and *Loxodonta africana* *AXIN1* protein

3 结论

精子发生和精子储存的温度需要低于 37 ℃,睾丸作为精子发生的重要场所,需要保持低温环境<sup>[15]</sup>. 睾丸下降至阴囊的胎盘哺乳动物,通过睾丸自身的调节可以使睾丸保持低温状态;而对于海豹、海牛、鲸类等睾丸下降而无阴囊的物种来说,可能不需要睾丸下降到体外实现降温,如鲸类和海豹已经进化出独特血管结构来冷却睾丸,鲸类用冷的浅表静脉血降低睾丸动脉血的温度,海豹中存在血管逆流换热系统实现睾丸冷却<sup>[16]</sup>. 而对于非洲象等睾丸未下降的物种来说,他们的体温与许多阴囊型哺乳动物相似,体内也没有类似的冷却系统. Sharma 等的进化研究结果表明睾丸下降是胎盘哺乳动物的祖先状态,随后在非洲兽总目的进化过程中转变为未下降睾丸,但是关于非洲象等物种睾丸未下降的原因需要解剖学和实验进一步研究<sup>[15]</sup>.

*AXIN1* 是一种重要的抑癌基因,其蛋白含有多个重要的功能结构域,可以与多种蛋白质相互作用来行使生物学功能,参与多种信号通路的传导<sup>[8]</sup>. 人 *AXIN1* 具有两种亚型,a 亚型由 11 个外显子组成,b 亚型由 10 个外显子组成,b 亚型中缺失的第 9 个外显子能够与 Wnt 信号通路中的 PP2A 蛋白质结合<sup>[12]</sup>. PP2A 是四种主要的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶之一,是一种异源三聚体酶,其核心二聚体是由 36 kDa 催化亚基 C 和 65 kDa 调节亚基 A 组成,B 亚基的大小范围为 24 kDa~130 kDa. PP2A 广泛表达并在细胞周期调控、细胞转化、细胞分裂等过程中起作用<sup>[17]</sup>. Hsu 等<sup>[17]</sup>推测缺乏 PP2A 结合结构域的 *AXIN1* 蛋白可以刺激 GSK-3β/β-catenin 相互作用而不会被 PP2A 调节,会使下游的 β-catenin 继续被磷酸化,进而导致 β-catenin 在细胞质中被降解. Kaftanovskaya 等<sup>[18]</sup>的研究表明肌源性转录物的产生依赖于 β-catenin 到达细胞核与 TCF/LEF 结合形成复合物,β-catenin 的条件性敲除会导致提睾肌无法形成,进而导致腹腔内隐睾. 最近的研究结果也表明,INSL3 信号通过 Notch 和 Wnt/β-catenin 通路刺激引带细胞发育<sup>[18]</sup>. 本研究依托实验室



前期研究结果,对人和非洲象的 *AXIN1* 基因进行鉴定发现,与人 *AXIN1* 基因的 a 亚型相比,非洲象的基因缺失第9个外显子,与人的 b 亚型相似. 非洲象 *AXIN1* 基因第9个外显子的缺失可能导致其蛋白结构缺失与蛋白 PP2A 结合的结构域,导致 Wnt 信号通路中的  $\beta$ -catenin 在细胞质中被降解,提睾肌无法形成;同时 INSL3 的信号无法传导,引带细胞的发育受到限制,进而导致隐睾症的发生. 因此认为非洲象 *AXIN1* 第9个外显子的缺失可能是导致非洲象睾丸未下降的因素.

对于核心启动子的预测分析发现,人有两种核心启动子,说明人有两种转录本,这与文献中结果相符合. 对于非洲象的核心启动子预测并没有发现核心启动子,关于其原因需要实验进一步研究. *AXIN1* 能够与多种蛋白质相互作用,但是人和非洲象的相互作用蛋白存在差别. LRP5 和 LRP6 是低密度脂蛋白家族的成员,在 Wnt 信号通路中,作为一种跨膜受体,能够与 Wnt 分泌性糖蛋白结合,从而启动信号通路<sup>[19]</sup>. AMER1 (APC membrane recruitment 1) 是在脊椎动物中保守的 1135 个氨基酸的质膜相关蛋白,通过充当  $\beta$ -catenin 破坏复合体的支架蛋白并促进质膜上 *AXIN1* 的稳定,在 Wnt 信号传导中发挥其负调控作用<sup>[20]</sup>. CSNK1A1 基因编码酪蛋白激酶 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ),是 Wnt 信号通路的关键调节因子,它的缺失诱导 Wnt 信号和 p53 信号激活<sup>[21]</sup>. CSNK1E 编码的酪蛋白激酶 1 $\epsilon$  是丝氨酸/苏氨酸选择性激酶家族的成员,该激酶具有多种分子底物和生物学功能,包括对 Wnt 信号通路的调控以及在调控昼夜节律等方面发挥作用<sup>[22]</sup>. 细胞质 DVL 蛋白家族通过 *AXIN1* 和 GSK3 $\beta$  的连接,充当 Wnt 信号通路的正调节剂,调节细胞增殖、极性和细胞命运. 目前研究表明 DVL1 和 DVL2 与乳腺癌、前列腺癌等癌症相关<sup>[23]</sup>. TNKS 是包含 18 个成员的聚合酶 (PARP) 蛋白质超家族,具有通过减少 *AXIN1* 升高 WNT 的表达来增加  $\beta$ -catenin 的能力<sup>[24]</sup>. 与人相比较发现,非洲象的 *AXIN1* 蛋白能够与 CK1 $\alpha$  结合抑制 Wnt 信号的启动,可能会导致  $\beta$ -catenin 在细胞质中被泛素化而降解,从而无法启动细胞核中 WNT 靶基因的转录激活. 人的 *AXIN1* 蛋白能够与 TNKS 结合导致细胞中的  $\beta$ -catenin 升高,非洲象的 *AXIN1* 蛋白不能与 TNKS 结合,可能导致细胞中的  $\beta$ -catenin 降低,从而对睾丸下降产生影响. 因此,和人相比较,蛋白互作能力的差异可能也导致非洲象睾丸未下降的一个原因. 人 *AXIN1* 的第 57 位氨基酸位于 TNK 蛋白质结合区域,表 5 中的数据表明,非洲象 *AXIN1* 不能与 TNKS 结合,所以非洲象中第 57 位氨基酸的插入可能是导致 *AXIN1* 无法与 TNKS 结合. *AXIN1* 的第 507~712 位氨基酸能够与 AXAM (axin associating molecule) 结合,AXAM 能通过下调  $\beta$ -catenin 的水平来抑制 Wnt 信号通路<sup>[6]</sup>. 非洲象 *AXIN1* 蛋白质的第 513 位、第 617 位、第 675~679 位在这段区域内存在插入和缺失,可能影响 AXAM 与 *AXIN1* 结合,对  $\beta$ -catenin 的水平产生影响,进而导致睾丸下降的表型出现异常,但是关于插入缺失对睾丸下降的影响需要实验进一步研究. 除了插入和缺失之外,在人和非洲象的 *AXIN1* 蛋白质序列中还有氨基酸位点存在差异,因为人和非洲象的亲缘关系相距甚远,且实验室前期在睾丸完全未下降和睾丸完全下降的物种中没有发现特异性的氨基酸位点,因此,氨基酸位点的差异是否会对睾丸下降产生影响还需要实验进一步研究.

生物信息学的分析是对基因功能以及结构等的预测,关于人和非洲象 *AXIN1* 基因在睾丸下降中的功能有待于进一步探讨和研究. 接下来将利用分子生物学和细胞生物学相关实验技术研究第9个外显子缺失氨基酸插入缺失,重要的氨基酸位点的差异对睾丸下降中信号通路的影响. 此外,还将利用基因编辑技术在小鼠体内探究 *AXIN1* 基因第9个外显子缺失对睾丸下降这一表型的影响.

#### [参考文献]

- [1] 李芳芳,张树山,吴彩凤,等. 影响哺乳动物睾丸下降的若干因素及其研究进展[J]. 上海农业学报,2014,30(4):144-147.
- [2] IVELL R, HARTUNG S. The molecular basis of cryptorchidism[J]. Molecular human and reproduction,2003,9(4):175-181.
- [3] HUTSON J M, LI R, SOUTHWELL B R, et al. Regulation of testicular descent[J]. Pediatric surgery international,2015,31(4):317-325.
- [4] WERDELIN L, NILSSONNE A. The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals;a phylogenetic view[J]. Journal of theoretical biology,1999,196(1):61-72.
- [5] HUTSON J M, SOUTHWELL B R, LI R, et al. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism[J]. Endocrine reviews,2013,34(5):725-752.

- [6] 邹海鹰. Axin1 与 Axin2 激活 JNK 的分子机制[D]. 厦门:厦门大学,2009.
- [7] ZENG L,FAGOTTO F,ZHANG T,et al. The mouse fused locus encodes Axin,an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation[J]. Cell,1997,90(1):181-192.
- [8] XU H,FENG Y,JIA Z,et al. AXIN1 protects against testicular germ cell tumors via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Oncology letters,2017,14(1):981-986.
- [9] ARNOLD H K,ZHANG X,DANIEL C J,et al. The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc[J]. EMBO journal,2009,28(5):500-512.
- [10] JIANG J,TANG S,XIA J,et al. C9orf140,a novel Axin1-interacting protein,mediates the negative feedback loop of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. Oncogene,2018,37(22):2992-3005.
- [11] ZHOU B,TANG T,CHEN P,et al. The variations in the AXIN1 gene and susceptibility to cryptorchidism[J]. Journal of pediatric urology,2015,11(3):132.e1-132.e5.
- [12] PEGINA S N,MARTIC T N,KOKOTOVIC T,et al. AXIN-1 protein expression and localization in glioblastoma[J]. Collegium antropologicum,2009,35 Suppl 1(1):101.
- [13] ALMAGRO A J J,TSIRIGOS K D,SØNDERBY C K,et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. Nature biotechnology,2019,37(4):420-423.
- [14] 陈培燕. 多肽的磷酸化修饰及多肽与蛋白质、核酸相互作用研究[D]. 厦门:厦门大学,2012.
- [15] SHARMA V,LEHMANN T,STUCKAS H,et al. Loss of RXFP2 and INSL3 genes in Afrotheria shows that testicular descent is the ancestral condition in placental mammals[J]. PLoS biology,2018,16(6):e2005293.
- [16] BLIX A S,FAY F H,RONALD K. On testicular cooling in phocid seals[J]. Polar research,1983,1(3):231-234.
- [17] HSU W,ZENG L,COSTANTINI F. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain[J]. Journal of biological chemistry,1999,274(6):3439-3445.
- [18] KAFTANOVSKAYA E M,FENG S,HUANG Z,et al. Suppression of insulin-like3 receptor reveals the role of  $\beta$ -catenin and Notch signaling in gubernaculum development[J]. Molecular endocrinology,2011,25:170-83.
- [19] JANDA C Y,DANG L T,YOU C,et al. Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and  $\beta$ -catenin signalling[J]. Nature,2017,545(7653):234-237.
- [20] TANNEBERGER K,PFISTER A S,KRIZ V,et al. Structural and functional characterization of the Wnt inhibitor APC membrane recruitment 1(Amer1)[J]. Journal of biological chemistry,2011,286(22):19204-19214.
- [21] CARRERAS P J,von STECHOW L,SIDDAPPA R,et al. Systems biology approach identifies the kinase Csnk1a1 as a regulator of the DNA damage response in embryonic stem cells[J]. Science signaling,2013,6(259):ra5.
- [22] GOLDBERG L R,KIRKPATRICK S L,YAZDANI N,et al. Casein kinase 1-epsilon deletion increases mu opioid receptor-dependent behaviors and binge eating1[J]. Genes brain and behavior,2017,16(7):725-738.
- [23] FABIJANOVIC D,ZUNIC I,MARTIC T N,et al. The expression of SFRP1,SFRP3,DVL1,and DVL2 proteins in testicular germ cell tumors[J]. APMIS,2016,124(11):942-949.
- [24] PU Y,ZHANG S,CHANG Z,et al. Discovery of new dual binding TNKS inhibitors of Wnt signaling inhibition by pharmacophore modeling,molecular docking and bioassay[J]. Molecular biosystems,2017,13(2):363-370.

[责任编辑:黄 敏]