

文章编号 1006-8147(2017)05-0389-05

论 著

人 SRGAP1 蛋白结构和功能预测

高红叶,褚新雷,李艳霞,郑 红

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤流行病与生物统计研究室,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津 300060)

摘要 目的:利用生物信息学对人 Slit-Robo GTP 酶激活蛋白 1(SRGAP1)蛋白质的理化性质,信号肽,亲水性/疏水性,跨膜区域,蛋白质二级结构、三级结构,蛋白质间的相互作用及 GO 注释进行预测分析。**方法:**使用多种分析软件对 SRGAP1 蛋白进行在线预测分析。**结果:**SRGAP1 理化性质分析结果显示,人 SRGAP1 蛋白有 1 085 个氨基酸,等电点为 6.36;生物信息学预测分析结果显示,SRGAP1 是无信号肽、无跨膜结构的亲水不稳定蛋白质。二级结构存在 19 个 α 螺旋和 11 个 β 折叠,预测到 10 个与 SRGAP1 存在相互作用的蛋白。SRGAP1 蛋白在调控 GTP 酶活性,细胞迁移,信号通路中有重要的作用。**结论:**系统预测分析了等电点为 6.36 的人 SRGAP1 蛋白理化性质、结构和功能,为将来探索 SRGAP1 具体功能和分子机制提供了一定的思路和理论基础。

关键词 Slit-Robo GTP 酶激活蛋白 1;生物信息学;结构;功能

中图分类号 Q811.4

文献标志码 A

Structural and Functional prediction of SRGAP1 in human

GAO Hong-ye, CHU Xin-lei, LI Yan-xia, ZHENG Hong

(Department of Cancer Epidemiology and Biostatistics, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To analyze the physical and chemical properties and structural functions of human Slit-Robo GTPase activator protein 1 (SRGAP1) by bioinformatics. **Methods:** SRGAP1 was predicted and analyzed by multiple analysis software online. **Results:** SRGAP1 protein was composed of 1 085 amino acids, with isoelectric point of 6.36. Predictive results suggested that it was a hydrophilic and unstable protein without signal peptide and transmembrane domain. The secondary structure predictive analysis showed that it contained 19 α -helices and 11 β -sheets. Ten proteins interacted with SRGAP1 were predicted. SRGAP1 played an important role in the regulation of small GTPase activity, cell migration and signal transduction. **Conclusion:** These results may provide some ideas and theoretical basis for further exploration of SRGAP1 functional studies and molecular mechanisms.

Key words Slit-Robo GTPase activator protein 1; bioinformatics; structure; function

Slit/Robo 在调控中枢神经系统发育的轴突导向、细胞迁移、树突生长等过程中起到重要作用^[1],且其在不同肿瘤发生发展中发挥重要生物学功能,如参与调控肿瘤细胞黏附迁移、增殖和死亡以及促进肿瘤新生血管形成等^[2]。Slit-Robo GTP 酶激活蛋白(SRGAP)家族是一组 Slit-Robo 信号下游的 RhoGAP 分子,主要包括 SRGAP1、SRGAP2、SRGAP3 和 ARHGAP4 4 个蛋白成员^[3-4]。RhoGAP 结构域具有水解 RhoGTPase 的活性。SRGAP 分子在神经系统的发育过程中起到重要作用^[5]。同时有研究表明,SRGAP1 是乳头状甲状腺癌的易感性候选基因^[6]。SRGAP1 与肿瘤的发生发展存在一定的关系。许多遗传学研究表明,SRGAP 分子与神经系统疾病密切

相关,其表达失调可以引起严重的精神疾病^[7-10]。对 SRGAP 蛋白分子的深入研究为其在神经系统发育过程中的作用机制的阐明、各种神经系统疾病及各种肿瘤的治疗、抗肿瘤药物的开发及预后检测提供指导意见等方面具有重要意义。近年来关于 SRGAP1 蛋白对 RhoGTP 酶活性调控作用的研究比较多,但对人 SRGAP1 蛋白的生物信息学研究报道较少。本研究主要借助多种生物信息学方法,对人 SRGAP1 蛋白的理化性质、信号肽与跨膜区、亲疏水性、亚细胞定位、二级结构中 α 螺旋区和 β 折叠区、三级结构模型及与 SRGAP1 相互作用的蛋白等进行预测分析,为将来更深入探索 SRGAP1 在肿瘤及多种精神性疾病中的生物学功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人 SRGAP1:氨基酸序列(Q7Z6B7)来自 UniProt 网站(<http://www.uniprot.org/>)。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81470153)

作者简介 高红叶(1989-),女,硕士在读,研究方向:生物化学与分子生物学;通信作者:郑红,E-mail:zhengh1964@163.com。

1.2 方法 SRGAP1 蛋白的理化性质利用 ProtParam 网站 (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析; SRGAP1 蛋白序列的信号肽预测利用 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);SRGAP1 蛋白序列跨膜区分析使用 TMHMM 网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);SRGAP1 蛋白的亲水性分析利用 ProtScale 网站 (<http://expasy.org/tools/protscale.html>);PSORTII (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 和 NLS- Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)分析 SRGAP1 蛋白亚细胞定位,进行核定位序列预测;SRGAP1 蛋白质二级结构中的 α 螺旋区和 β 折叠区利用 Jpred4.0(<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>)在线分析;三级结构模型由 Swiss-Model 和 Structural Analysis and Verification Server(<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>)进行预测并进行合理性验证;利用 String 软件预测 SRGAP1 蛋白相互作用蛋白;利用 Gene Ontology Consortium (<http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>)对 SRGAP1 分子功能及其参与的生物功能进行预测。

2 结果

2.1 SRGAP1 蛋白理化性质分析 利用 ProtParam 对人 SRGAP1 蛋白序列进行分析,结果显示,人 SRGAP1 蛋白具有 1 085 个氨基酸;相对分子量为 124 264.3 Da;是酸性蛋白质,理论等电点为 6.36;半衰期为 30 h;属于不稳定性蛋白质,不稳定系数为 59.01;脂肪族氨基酸系数为 73.61。

2.2 人 SRGAP1 蛋白信号肽与跨膜区预测和分析 利用信号肽预测服务器 SignalP 4.1 Server 对人 SRGAP1 蛋白序列进行分析,得到如图 1 的预测结果。其中 C、Y、S 的最大值分别为 0.114、0.103、0.107,S-mean、D 值分别为 0.093、0.097,D-cut-off=0.450。预测结果显示人 SRGAP1 蛋白没有信号肽,为非分泌蛋白。使用 TMHMM 2.0 对人 SRGAP1 进行分析,得到如图 2 的预测结果,显示人 SRGAP1 不含跨膜区,说明人 SRGAP1 可能不是跨膜蛋白质。

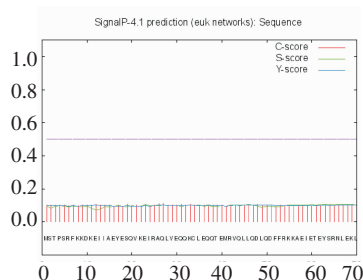


图1 人 SRGAP1 信号肽预测

Fig 1 Signal peptide analysis of SRGAP1 in human

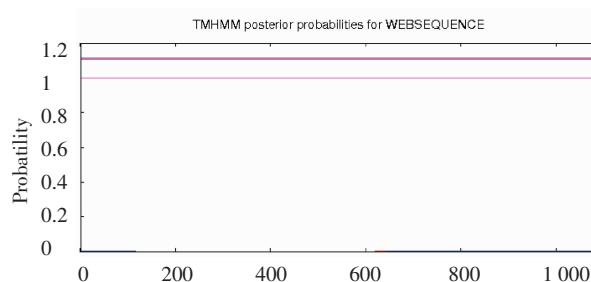


图2 人 SRGAP1 跨膜区预测

Fig 2 Transmembrane structure of SRGAP1 in human

2.3 人 SRGAP1 亲水性预测 使用 ProtScale 对人 SRGAP1 蛋白进行亲水性预测,结果如图 3 所示,人 SRGAP1 蛋白最强亲水性位点在 908 位谷氨酸(E),分值为-3.433。最强疏水性位点在 631 位甲硫氨酸(M),分值为 2.156。ProtScale 软件预测该蛋白亲水性氨基酸分布在整个氨基酸序列中,明显多于疏水性氨基酸个数,因此说明人 SRGAP1 是亲水性蛋白质。

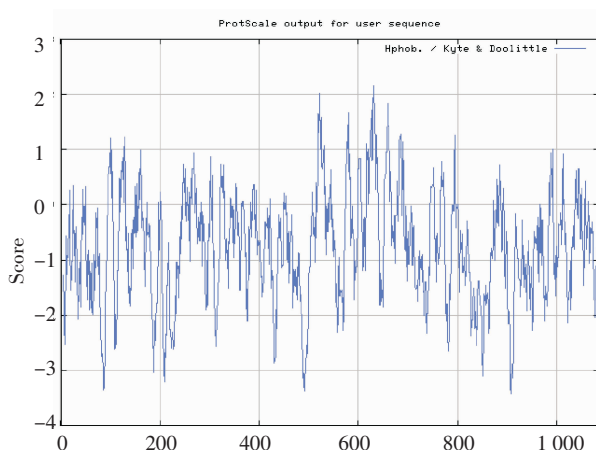


图3 人 SRGAP1 亲水性分析

Fig 3 Hydrophilicity analysis of SRGAP1 of human

2.4 人 SRGAP1 亚细胞定位与核定位序列预测和分析 PSORTII 采用模糊 K 阶最近邻法 (KNN)分析蛋白序列的亚细胞定位,对人 SRGAP1 进行预测分析,结果显示人 SRGAP1 最有可能定位在细胞核,k=23。将人 SRGAP1 蛋白氨基酸序列提交到核定位预测服务器 cNLS-mapper,默认设置 cut-off score 为 5.0,发现其存在一段一元核定位序列 PSIAKRRANQQ(score=6)在 423-433 位氨基酸之间。

2.5 人 SRGAP1 的二级结构预测 使用基于 Jnnet 神经网络算法的 Jpred4.0 在线预测软件,对人 SRGAP1 蛋白的二级结构进行预测。结果如图 4 所示。人 SRGAP1 有 19 个 α 螺旋区和 11 个 β 折叠区。

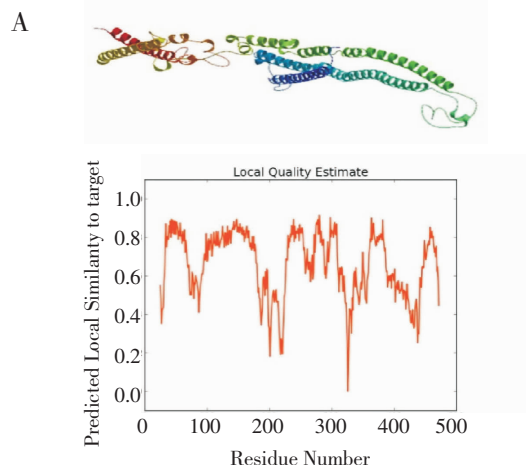


H: α 螺旋结构:E: β 折叠结构

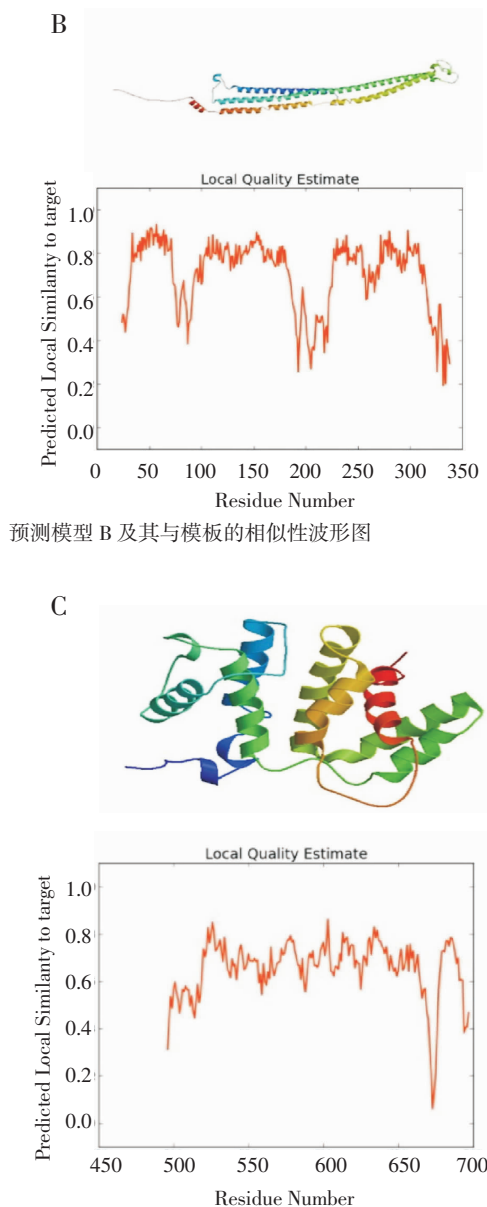
图4 人SRGAP1二级结构预测

Fig 4 The secondary structure prediction of human SRGAP1

2.6 人 SRGAP1 的三级结构预测与分析 将人 SRGAP1 氨基酸序列提交到 Swiss-Model 网站,采用同源建模方法与 PDB 数据库已知结构的蛋白质序列比对进行预测得到 3 个预测结果,如图 5 所示,由图可见,相比 A、B 两个模型,C 模型的波形相似图更稳定,说明 C 模型可能更趋于合理。利用 Structural Analysis and Verification Server 对预测模型 C 的合理性进行验证,得到拉曼图如图 6 所示,图中有白色、浅黄色、黄色、红色颜色由浅到深,颜色越深,说明该区域二面角越合理。由图知模型中绝大多数氨基酸在合理的红色区域。



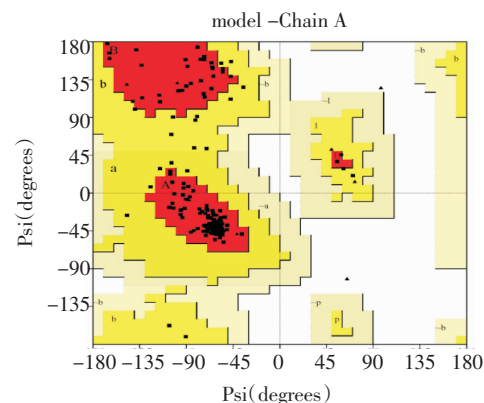
预测模型 A 及其与模板的相似性波形图



预测模型 C 及其与模板的相似性波形图

图 5 人 SRGAP1 三级结构预测

Fig 5 Tertiary structure prediction of human SRGAP1



▲:甘氨酸; ■:除甘氨酸外的其他氨基酸

图 6 人 SRGAP1 预测三级结构模型 C 的拉曼图分析

Fig 6 Ramachandran plotanalysis of predicted 3D model C of human SRGAP1

2.7 人 SRGAP1 相互作用蛋白分析 利用 String 蛋白质相互作用预测网站对人 SRGAP1 进行分析,得到如图 7 所示 10 个与其作用紧密的蛋白质。所预测具体相互作用蛋白的信息及相应的得分见表 1,可见得分最高的是 ROBO1。

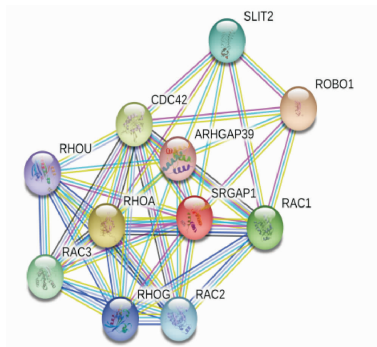


图 7 与人 SRGAP1 蛋白质相互作用的蛋白质预测
Fig 7 Proteins predicted to interact with human SRGAP1

表 1 与人 SRGAP1 相互作用可能性较大的 10 种蛋白质

Tab 1 Ten proteins most likely to interact with human SRGAP1

蛋白名称缩写	蛋白全称	得分
ARHGAP39	Rho GTPase activating protein 39	0.918
CDC42	cell division cycle 42	0.978
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	0.941
RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	0.934
RAC3	ras-related C3 botulinum toxin substrate3	0.941
RHOA	ras homolog family member A	0.985
RHOG	ras homolog family member G	0.931
RHOU	ras homolog family member U	0.926
ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1	0.988
SLIT2	slit homolog 2	0.938

2.8 人 SRGAP1 蛋白的 GO 注释分析 使用 Gene Ontology Consortium 对人 SRGAP1 进行基因本体论的分析,结果见表 2。从分子功能上来说,SRGAP1 具有 GTP 酶激活活性,这也与相互作用蛋白预测的结果中显示的与 RhoGTP 酶家族的成员相互作用的结果一致;此外,SRGAP1 还参与细胞迁移负调控、GTP 酶正调控和相关细胞信号转导等生理活动。

表 2 人蛋白 GO 注释分析结果

Tab 2 The gene ontology of human SRGAP1

本体论	ID	类型	相关基因数目
参与的生理活动	GO:0030336	细胞迁移负调控	2 160
	GO:0043547	GTP 酶正调控	6 842
	GO:0051056	小 GTP 酶参与调节的信号转导的调控	3 904
	GO:0007165	信号转导	107 217
	GO:0005096	GTP 酶激活活性	5 392
分子功能	GO:0005515	蛋白结合	139 360
	GO:0048365	Rac GTP 酶结合	678

3 讨论

SRGAP1 是轴突导向分子 Slit2-Robo1 下游信号通路中的重要分子,在中枢神经系统中高度表达,特别在树突发育早期起关键作用^[11]。另外其在调控细胞粘附、运动和极化,介导基因转录调节,诱导凋亡等方面均发挥重要作用。SRGAP 蛋白家族主要通过其自身 RhoGAP (Rho GTPase-activating protein) 结构域调控 RhoGTP 酶的活性,其主要共有的下游调控基因包括 RhoA、Rac1 和 Cdc42 等。RhoA、Rac1 和 Cdc42 都属于小 GTPase 蛋白家族,参与多种细胞进程,例如细胞膜骨架重构、细胞伪足形成以及细胞极性的改变等,从而促进细胞的运动能力,但是各自又具有各自的调控方式^[12]。Rac1 的一个主要的生物学功能是调控细胞迁移起始过程中肌动蛋白的聚合,促进层状伪足和胞膜皱褶形成,还可以引起染色质聚集和核膜变形以及降低细胞质的含量,这些特性的改变均可以导致肿瘤细胞侵袭的发生^[13]。RhoA 蛋白家族可以促进应力纤维蛋白丝和黏着斑的形成以促进细胞迁移^[14]。RhoGTP 酶家族的明星分子 Cdc42 是细胞分裂周期控制蛋白,其有调节细胞增殖、迁移以及肿瘤细胞的恶性转变等功能,在黑色素瘤、乳腺癌和结直肠癌等中均有报道^[15-16]。激活的 SRGAP1 可以失活 Cdc42,在转染 Robo1 和胞外给与 Slit 的情况下,Cdc42 的活性被显著地下调^[17]。SRGAP1 对下游 GTP 酶的分子开关效应具有细胞特异性,在 HEK293 细胞中过表达 SRGAP1 可以降低 Cdc42 和 RhoA 的活性,但是 Rac1 的活性升高。与此相反,有研究发现 SRGAP1 可以降低 Rac1 的活性,但是对 Cdc42 和 RhoA 的活性没有影响^[18]。SRGAP1 是一个乳头状甲状腺癌的易感基因,同时全基因组连锁关联性分析发现,SRGAP1 是乳头状甲状腺癌的低渗透性基因^[9]。总之,SRGAP1 参与了多种神经系统发育进程和细胞迁移过程,很可能成为具有潜力的癌症治疗靶点。

对蛋白质的理化性质、结构等的生物信息学的预测分析,可以为功能研究和分子机制进一步探索提供一定的思路和理论基础。本文利用生物信息学对人 SRGAP1 蛋白结构进行预测分析,发现氨基酸长度为 1 085aa 的 SRGAP1 蛋白等电点为 6.36;SRGAP1 蛋白是亲水性蛋白,含有一段一元核定位序列,提示其可能在细胞核内发挥功能。而 UniProt 数据库中亚细胞定位显示其在胞质中。这提示 SRGAP1 蛋白在细胞中定位有可能随着时空动态而发生着变化,其更进一步确定需要将来更多的实验验证;二级结构预测形成 19 个 α 螺旋,11 个 β 折

叠区;三级结构建模并进行拉曼图分析,进一步验证了三级结构预测模型的稳定性,说明建模结果可靠;生物功能结构域分析显示 SRGAP1 蛋白 N 末端有 FCH 结构域,中心有 RhoGAP 结构域和 C 末端有 SH3 结构域。F-BAR 结构域形成具有带正电荷的凹表面的香蕉形二聚体,其结合带负电荷的脂质膜^[19]。SH3 结构域与细胞内富含脯氨酸尾的 Robo 相互作用,这种相互作用可以激活 RhoGAP 结构域,其反过来抑制 Cdc42 活性^[20]。它们可以诱导长管形式的膜变形。SRGAP1 蛋白参与细胞迁移负调控、GTP 酶正调控和相关细胞信号转导等生理活动,同时在一些疾病的发生和发展中有着重要的作用。SRGAP1 相互作用蛋白分析中,得分最高的是 ROBO1,这与饶毅等研究所提示的 SRGAP1 是 Robo1 分子的细胞内效应分子,是传递 slit-Robo 排斥信号途径的重要组成蛋白的研究结果一致^[17]。除在上述已有文献研究证实的 RhoA、Rac1 和 Cdc42 等作为 SRGAP1 下游调控基因外,预测结果显示其他 Rac、Rho 家族蛋白成员(如 Rac2、Rac3、RhoG、RhoU)等与 SRGAP1 有相互作用,虽然目前文献支持较少但也可将来更深入探索 SRGAP1 分子机制以及在肿瘤和多种精神性疾病中的生物学功能提供一定的指导方向和理论基础。

参考文献:

- [1] Braisted J E, Ringstedt T, O'leary D D. Slits are chemorepellents endogenous to hypothalamus and steer thalamocortical axons into ventral telencephalon[J]. *Cereb Cortex*, 2009,19(Suppl 1):i144
- [2] Qiu H, Zhu J, Yu J, et al. SLIT2 is epigenetically silenced in ovarian cancers and suppresses growth when activated[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011,12(3):791
- [3] Coutinho-Budd J, Ghukasyan V, Zylka M J, et al. The F-BAR domains from srGAP1, srGAP2 and srGAP3 regulate membrane deformation differently[J]. *J Cell Sci*, 2012,125(Pt 14):3390
- [4] Ma Y, Mi Y J, Dai Y K, et al. The inverse F-BAR domain protein srGAP2 acts through srGAP3 to modulate neuronal differentiation and neurite outgrowth of mouse neuroblastoma cells[J]. *PLoS One*, 2013,8(3):e57865
- [5] Carlson B R, Lloyd K E, Kruszewski A, et al. WRP/srGAP3 facilitates the initiation of spine development by an inverse F-BAR domain, and its loss impairs long-term memory[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(7):2447
- [6] He H, Bronisz A, Liyanarachchi S, et al. SRGAP1 is a candidate gene for papillary thyroid carcinoma susceptibility[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013,98(5):E973
- [7] Surakka I, Whitfield J B, Perola M, et al. A genome-wide association study of monozygotic twin-pairs suggests a locus related to variability of serum high-density lipoprotein cholesterol[J]. *Twin Res Hum Genet*, 2012,15(6):691
- [8] Saito H, Osaka H, Sugiyama S, et al. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2)[J]. *Am J Med Genet A*, 2012,158A(1):199
- [9] Al-Hakim A K, Bashkurov M, Gingras A C, et al. Interaction proteomics identify NEURL4 and the HECT E3 ligase HERC2 as novel modulators of centrosome architecture[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012,11(6):M111
- [10] Dennis M Y, Nuttle X, Sudmant P H, et al. Evolution of human-specific neural SRGAP2 genes by incomplete segmental duplication [J]. *Cell*, 2012,149(4):912
- [11] Li X, Chen Y, Liu Y, et al. Structural basis of Robo proline-rich motif recognition by the srGAP1 Src homology 3 domain in the Slit-Robo signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2006,281(38):28430
- [12] Rolland Y, Marighetti P, Malinverno C, et al. The CDC42-interacting protein 4 controls epithelial cell cohesion and tumor dissemination[J]. *Dev Cell*, 2014,30(5):553
- [13] Navarro-Lérida I, Pellinen T, Sanchez S A, et al. Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion[J]. *Dev Cell*, 2015,32(3):318
- [14] Insall R H, Machesky L M. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks[J]. *Dev Cell*, 2009,17(3):310
- [15] Fantin A, Lampropoulou A, Gestri G, et al. NRP1 regulates CDC42 activation to promote filopodia formation in endothelial tip cells[J]. *Cell Rep*, 2015,11(10):1577
- [16] Lee S, Craig B T, Romain C V, et al. Silencing of CDC42 inhibits neuroblastoma cell proliferation and transformation[J]. *Cancer Lett*, 2014,355(2):210
- [17] Wong K, Ren X R, Huang Y Z, et al. Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway[J]. *Cell*, 2001,107(2):209
- [18] Yamazaki D, Itoh T, Miki H, et al. srGAP1 regulates lamellipodial dynamics and cell migratory behavior by modulating Rac1 activity[J]. *Mol Biol Cell*, 2013,24(21):3393
- [19] Wang Q, Navarro M V, Peng G, et al. Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009,106(31):12700
- [20] Rittinger K, Walker P A, Eccleston J F, et al. Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP[J]. *Nature*, 1997,388(6643):693

(2017-01-04 收稿)