

哺乳动物 BMP4 蛋白功能位点的 进化踪迹分析

王 瀚^① 赵淑玲^① 何九军^① 杨小录^① 周 峰^② 侯颖春^{③*}

① 陇南师范高等专科学校生命科学与技术系 陇南 742500; ② 中国农业大学农业与生物技术学院 北京 100193;

③ 陕西师范大学生命科学院 西安 710062

摘要: 哺乳动物骨形态发生蛋白 (BMPs) 具有促进动物软骨形成, 调节细胞增殖、分化及迁移的多种功能。此外, 该蛋白在动物个体发育及人 (*Homo sapiens*) 肿瘤的发生、发展过程中也扮演着重要角色。本文以人源骨形态发生蛋白 4 (BMP4) 为种子序列, 利用多种生物信息学工具进行哺乳动物 BMP4 蛋白的序列查找及其同源蛋白的搜索, 共得到具有完整结构域的同源蛋白序列 72 条, 并以此为基础对哺乳动物 BMP4 的进化踪迹位点及相关的功能位点进行比较研究。结果表明, BMP4 蛋白家族的 TGF β -propeptide 结构域具 22 个全家族保守残基, 而 TGF- β 结构域仅具 84 个亚家族特异性残基。人 BMP4 蛋白 TGF- β 结构域的配基结合位点主要分布于结合口袋的边缘区域。本研究可为 BMP4 蛋白重要功能区残基的确定及未知功能位点的预测提供信息。

关键词: 骨形态发生蛋白 4; 进化踪迹分析; 配基结合口袋

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 01-21-10

Evolutionary Trace Analysis of Functional Sites of the BMP4

WANG Han^① ZHAO Shu-Ling^① HE Jiu-Jun^① YANG Xiao-Lu^①
ZHOU Feng^② HOU Ying-Chun^{③*}

① *College of Life Science, Longnan Teachers' College, Longnan 742500;* ② *College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193;* ③ *College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China*

Abstract: BMP4 is known for its critical roles in embryonic development, mesenchymal development, organogenesis, and the initiation and progression of tumor. To know the functionally important residues and 3D structure of BMP protein will be helpful for understanding its function and its relationship with other proteins in the BMP signal pathway. The present study aims to identify some functionally important residues and its interaction with corresponding ligands of BMP4 protein. Here, a total of 100 non-redundant protein sequences of BMP4 from various mammals were retrieved from NCBI database. Of the 100 sequences, only

基金项目 陇南师专 2014 年校级重点科研项目 (No. 2014LSZK01003) ;

*通讯作者, E-mail: ychhou@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 王瀚, 男, 副教授; 研究方向: 分子细胞生物学; E-mail: wangzhzhangy@126.com。

收稿日期: 2014-05-12, 修回日期: 2014-09-23 DOI: 10.13859/j.cjz.201501004

72 sequences were selected for multiple sequence alignment and the phylogenetic tree was split into 10 evenly distributed partitions, namely P1 - P10 in order of evolutionary time cut-off (Fig.1). Based on these results, detailed analyses on the evolutionary conservation information were performed through a variety of bioinformatics tools. Conservative analyses show that the TGF β -propeptide domain contains 22 highly conservative residues. However, the TGF- β domain only contains 84 class-specific residues (Fig.3). To further explore the functional binding sites of BMP4 protein, the ligand-binding pockets were predicted using software MetaPocket 2.0. The results show that there exist three binding sites and the ligand-binding sites are surrounded the pockets (Fig.4). This study will provide useful information for identifying key residues from functional regions and predicting unknown functional sites in BMP4 family.

Key words: Bone morphogenetic protein 4 (BMP4); Evolutionary trace analysis; Ligand-binding pockets

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族的成员。1965年由Urist等首先从脱钙骨基质提取物中分离得到, 目前已发现20余种BMP (Kawabata et al. 1998a, b)。BMP4基因作为BMP家族的一个重要成员, 1988年首次被克隆出来 (Wozney et al. 1998)。近年来研究发现, BMP4蛋白除了具有促进哺乳动物软骨形成的作用外, 还对细胞的增殖分化、凋亡和信号转导等方面具有重要的调节作用。此外, 在肿瘤的发生、发展过程中也扮演着重要的角色 (Bao et al. 2013, Liu et al. 2013, Wu et al. 2013)。有研究表明, BMP4能够作为一种重要的肿瘤抑制因子而对某些细胞的增殖产生抑制作用 (Fang et al. 2014)。此外, 作为TGF- β 超家族的成员, TGF- β 在正常细胞中能够抑制其发生癌变, 但在肿瘤细胞中却具有促进肿瘤发生的作用, 其机理尚不清楚 (Ascolani et al. 2014)。另有研究表明, BMP4蛋白中3个重要的氨基酸残基R286、W325及C373的突变与结肠癌发生密切相关 (Lubbe et al. 2011)。BMP/Smad 信号通路在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的调节作用。当BMP4蛋白与细胞膜上受体BMPR- II 结合后, BMPR- II 会磷酸化激活异聚体中BMPR- I 并与之形成受体复合物, 配体激活的受体复合物促使Smad1、Smad5及Smad8蛋白磷酸化, 此后Smad1/5/8与Smad4形成复合

体进入细胞核, 进而调节靶基因的转录 (丁祥云等 2012)。

进化踪迹 (evolutionary trace, ET) 是通过比较同源蛋白家族的蛋白序列、结构和功能的相似性, 统计分析在进化选择压力下, 蛋白的氨基酸残基或某个区域承受压力的能力和发生变化的可能性 (王文栋等 2014)。功能活性位点是蛋白质与其他配基相互作用的关键位点, 由大量紧密靠近且功能相关的氨基酸残基组成, 这些残基及其组成的空间结构在进化过程中比较保守, 一般位于蛋白质分子结构域或亚基之间的裂隙或凹陷部位 (Sottriffer et al. 2002, Campbell et al. 2003)。将进化踪迹分析与活性功能位点结合起来深入分析有助于发现蛋白质表面具有潜在应用价值的功能位点 (宋云龙等 2005)。

为了研究哺乳动物BMP4蛋白的进化踪迹并预测其表面的活性功能位点, 本文通过构建哺乳动物BMP4蛋白的系统发育树, 将BMP4蛋白家族的进化踪迹分析与活性功能位点研究相结合, 初步研究了BMP4蛋白的踪迹残基及配基结合位点, 以期揭示其重要的进化意义。

1 材料与方法

1.1 材料

各物种BMP4蛋白序列对比数据来自NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。以人 (*Homo sapiens*) BMP4序列作为种子序列, 利

用Blastp搜索NCBI nr数据库,获得100条哺乳动物BMP4蛋白序列,删除结构域不完整或重复序列后得到72条序列,利用Clustal XV1.81进行该家族的多重序列比对并利用TraceSuite II工具建立系统发育树(Innis et al. 2000)。

1.2 进化踪迹分析

为进一步确认通过上述方法获得的直系同源蛋白的可靠性,本文对所获得的所有直系同源蛋白使用Pfam批量注释工具进行结构域注释。随后使用MAFFT v6.859(Katoh et al. 2002)。采用L-INS-i方法对BMP4直系同源蛋白进行多序列比对,并将经优化后的结果利用TraceSuite II工具进行进化踪迹分析,同时将这些残基位置映射于人BMP4蛋白的三维结构上。

1.3 BMP4蛋白功能位点的预测

使用ExPASy网站上的ScanProsite工具(程博涵等 2013)及PredictProtein(Rost et al. 2004)进行蛋白功能位点分析。使用MetaPocket 2.0(Huang 2009)进行BMP4蛋白配基结合口袋和潜在结合位点的分析。

2 结果与分析

2.1 多元序列匹配与进化树构建

将BMP4蛋白进化踪迹系统树按照序列等同率平均划分为10个区间。基于序列等同率构建系统树(图1)。该蛋白家族大致可分为2个较大的亚家族。袋獾(*Sarcophilus harrisii*)、灰短尾负鼠(*Monodelphis domestica*)及白耳负鼠(*Didelphis albiventris*)等聚为一类,构成一个亚家族。其余68种动物形成一个较大的亚家族。其中,人BMP4蛋白及其他灵长类动物均参与了P1~P10的分组。人、苏门答腊猩猩(*Pongo abelii*)、东非狒狒(*Papio anubis*)及食蟹猴(*Macaca fascicularis*)等灵长类动物构成一个较小的亚家族。进化树显示这些物种之间的遗传距离较小、同源性较高、亲缘关系近,与传统的进化分类观点一致。其他物种如褐家鼠(*Rattus norvegicus*)与小家鼠(*Mus musculus*)

分别聚为一类,但与人等灵长类动物BMP4蛋白的进化关系较远,说明该蛋白在不同种属的物种之间具有一定的差异。因此,在以鼠类作为动物模型研究人类BMP4蛋白功能时,应当考虑物种之间的差异性。上述进化关系揭示了BMP4在哺乳动物进化过程中所表现出的同源性较高,蛋白序列的变化速度与进化距离大致相等,在哺乳动物的进化过程中具有重要意义。

2.2 BMP4蛋白功能位点的进化踪迹分析

经Pfam分析可知,BMP4蛋白主要由两个结构域组成,N端13~275区域为TGF- β propeptide结构域,C端305~408区域为TGF- β 结构域(图2)。

TraceSuite II通过不同的序列等同率对蛋白家族进行亚家族划分和系统树构建,实现蛋白家族保守残基及亚家族特异性残基的识别。基于72条序列的BMP4蛋白家族踪迹残基的位点图谱(图3)TGF β -propeptide结构域家族保守残基共22个,分别为C14、Q15、V16、L17、L18、G19、G20、A24、L26、I27、P28、E29、G31、K32、K33、K34、E37、I38、Q39、G43、R46及L62。在P9~P10下,完全保守的位点还包括R45、G48、E52、L53、L54、R55、D56、F57、E58、A59、T60、L61、Q63、M64、F65、G66、L67、R68、P71、Q72、P73、S74、P80、Y82、M83、R84、D85、L86、Y87、R88、L89、Q90及G92。在P10下S25与G44也是完全保守的位点。该结构域还包括亚家族特异性残基58个。另外,TGF- β 结构域无家族保守性残基,仅包含84个亚家族特异性残基。其中,在P8~P10区间出现亚家族特异性残基的几率较高。

2.3 人BMP4蛋白功能位点的踪迹残基分析

通过ScanProsite工具分析共找到23个Prosite位点。1个TGF- β 2家族保守结构,位于氨基酸286~408;1个TGF- β 1家族标签,位于氨基酸326~341;1个核定位基序(NLS-BP),位于氨基酸288~304;3个N-肉豆蔻酰基化位

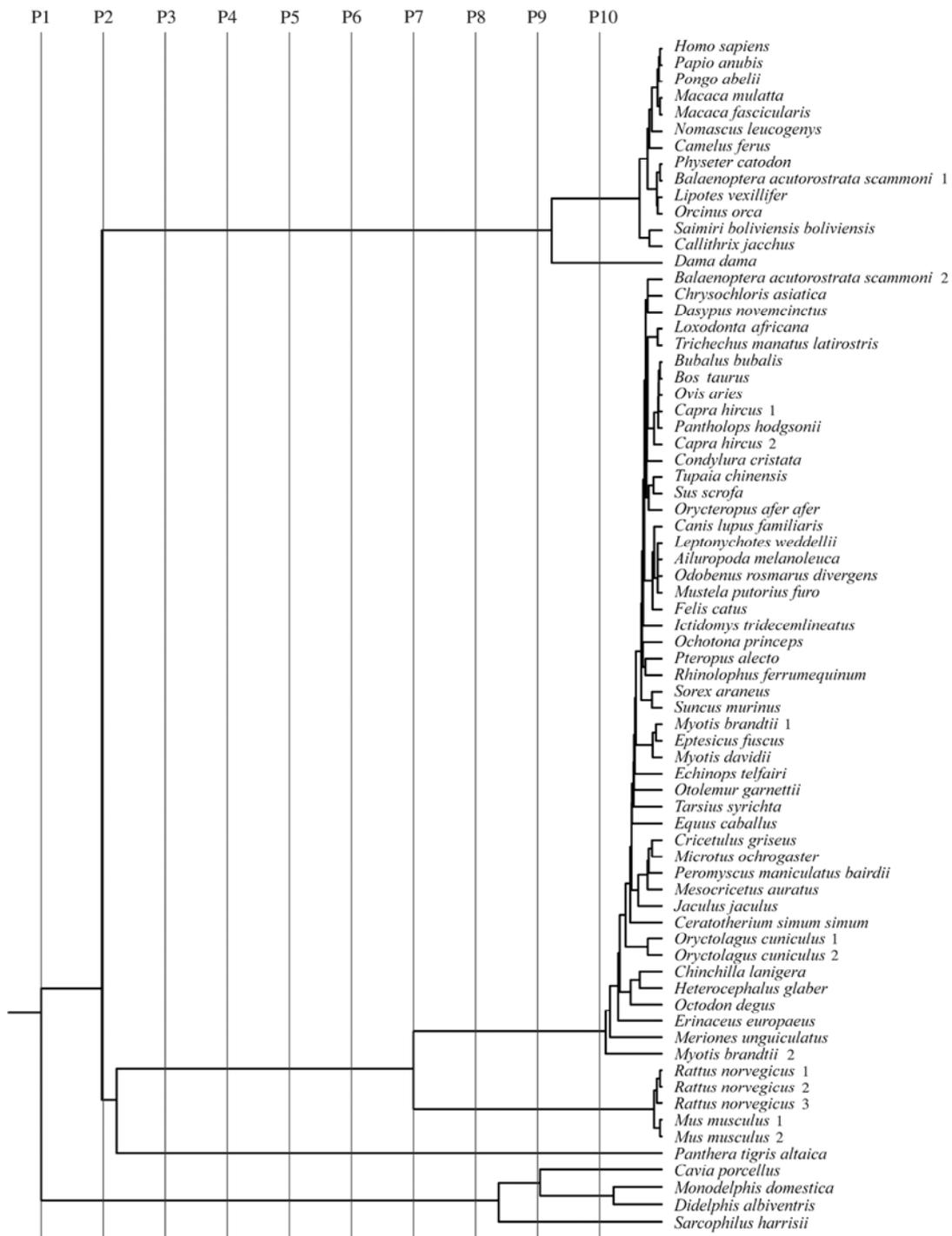


图1 72条BMP4同源序列结构比较的系统发育进化树

Fig. 1 The dendrogram of 72 sequences of BMP4

图中 P1 ~ P10 竖线表示基于序列等同率的亚家族划分。Vertical lines in dendrogram P1 to P10 show different partition identity cutoffs (PICs).
Homo sapiens. 人 (NP_001193.2); *Papio anubis*. 东非狒狒 (NP_00611258.1); *Pongo abelii*. 苏门答腊猩猩 (NP_002824799.1); *Macaca mulatta*. 猕猴 (NP_001084317.1); *Macaca fascicularis*. 食蟹猴 (EHH61386.1); *Nomascus leucogenys*. 白颊长臂猿 (转下页)

(接上页) (XP_003267752.1); *Camelus ferus*. 野骆驼 (XP_006185483.1); *Physeter catodon*. 抹香鲸 (XP_007102536.1); *Balaenoptera acutorostrata scammoni* 1. 小须鲸 1 (XP_007192940.1); *Balaenoptera acutorostrata scammoni* 2. 小须鲸 2 (XP_007192939.1); *Lipotes vexillifer*. 白鳍豚 (XP_007446029.1); *Orcinus orca*. 虎鲸 (XP_004279389.1); *Saimiri boliviensis boliviensis*. 亚马逊松鼠猴 (XP_003930566.1); *Callithrix jacchus*. 普通狨 (XP_002753963.2); *Dama dama*. 中东黇鹿 (Q29607.1); *Chrysochloris asiatica*. 金毛鼯 (XP_006864690.1); *Dasyurus novemcinctus*. 九带犏狨 (XP_004449379.1); *Loxodonta africana*. 非洲象 (XP_003408681.1); *Trichechus manatus latirostris*. 佛罗里达海牛 (XP_004370931.1); *Bubalus bubalis*. 印度水牛 (NP_001277806.1); *Bos taurus*. 家牛 (NP_001039342.1); *Ovis aries*. 绵羊 (NP_001103747.1); *Capra hircus* 1. 山羊 1 (NP_001272575.1); *Capra hircus* 2. 山羊 2 (AGL767331); *Pantholops hodgsonii*. 藏羚羊 (XP_005968706.1); *Condylura cristata*. 星鼻鼯鼠 (XP_004681919.1); *Tupaia chinensis*. 树鼯 (XP_006160615.1); *Sus scrofa*. 野猪 (NP_001094501.1); *Orycteropus afer afer*. 土豚 (XP_007946535.1); *Canis lupus familiaris*. 家犬 (NP_001274099.1); *Leptonychotes weddellii*. 威德尔海豹 (XP_006749118.1); *Ailuropoda melanoleuca*. 大熊猫 (XP_002919689.1); *Odobenus rosmarus divergens*. 太平洋海象 (XP_004404933.1); *Mustela putorius furo*. 蒙眼貂 (XP_004738867.1); *Felis catus*. 家猫 (XP_003987694.1); *Ictidomys tridecemlineatus*. 地松鼠 (XP_005338023.1); *Ochotona princeps*. 北美鼠兔 (XP_004584889.1); *Pteropus alecto*. 游狐蝠 (XP_006920236.1); *Rhinolophus ferrumequinum*. 马铁菊头蝠 (ACC64542.1); *Sorex araneus*. 鼯鼠 (XP_004601806.1); *Suncus murinus*. 臭鼯 (Q8MJV5.1); *Myotis brandtii* 1. 布氏鼠耳蝠 1 (XP_005873648.1); *Eptesicus fuscus*. 大棕蝠 (XP_008137260.1); *Myotis davidii*. 大卫鼠耳蝠 (XP_006776363.1); *Echinops telfairi*. 小马岛猬 (XP_004698653.1); *Otolemur garnettii*. 小耳大婴猴 (ACH56512.1); *Tarsius syrichta*. 菲律宾眼镜猴 (XP_008048560.1); *Equus caballus*. 马 (NP_001157442.1); *Cricetulus griseus*. 黑线仓鼠 (ERE88364.1); *Microtus ochrogaster*. 橙腹草原田鼠 (XP_005355432.1); *Peromyscus maniculatus bairdii*. 鹿鼠 (XP_006988364.1); *Mesocricetus auratus*. 金仓鼠 (XP_005085853.1); *Jaculus jaculus*. 非洲跳鼠 (XP_004649253.1); *Ceratotherium simum simum*. 白犀 (XP_004426219.1); *Oryctolagus cuniculus* 1. 欧洲野兔 1 (NP_001182652.1); *Oryctolagus cuniculus* 2. 欧洲野兔 2 (NP_001182652.1); *Chinchilla lanigera*. 毛丝鼠 (XP_005376826.1); *Heterocephalus glaber*. 裸鼯鼠 (XP_004892481.1); *Octodon degus*. 智利八齿鼠 (XP_004638796.1); *Erinaceus europaeus*. 刺猬 (XP_007527426.1); *Meriones unguiculatus*. 长爪沙鼠 (BAE78823.1); *Myotis brandtii* 2. 布氏鼠耳蝠 2 (EPQ12299.1); *Rattus norvegicus* 1. 褐家鼠 1 (NP_036959.2); *Rattus norvegicus* 2. 褐家鼠 2 (AAO25745.1); *Rattus norvegicus* 3. 褐家鼠 3 (Q06826.1); *Mus musculus* 1. 小家鼠 1 (AAO25745.1); *Mus musculus* 2. 小家鼠 2 (AAC37698.1); *Panthera tigris altaica*. 西伯利亚虎 (XP_007083397.1); *Cavia porcellus*. 豚鼠 (XP_005004602.1); *Monodelphis domestica*. 南方短尾负鼠 (XP_001362591.1); *Didelphis albiventris*. 白耳负鼠 (ABA86558.1); *Sarcophilus harrisii*. 袋獾 (XP_003758879.1)。



图 2 BMP4 蛋白结构域分析

Fig. 2 Analysis of the domain of BMP4

点 (N-myristoylation), 位于氨基酸 20 ~ 25 (GASHAS)、43 ~ 48 (GGRRSG)、131 ~ 136 (GTSENS); 5 个 PKC 磷酸化位点 (protein kinase C phosphorylation site), 位于氨基酸 30 ~ 32 (TGK)、116 ~ 118 (TVR)、285 ~ 287 (TRR)、293 ~ 295 (SPK)、298 ~ 300 (SQR); 2 个酰胺化位点 (amidation site), 位于氨基酸 30 ~ 33

(TGKK) 和 43 ~ 46 (GGRR); 5 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点 (casein kinase II phosphorylation site), 位于氨基酸 91 ~ 94 (SGEE)、102 ~ 105 (TGLE)、146 ~ 149 (SIPE)、154 ~ 157 (SSAE)、210 ~ 213 (TRWE); 4 个 N-糖基化位点 (N-glycosylation site), 位于氨基酸 143 ~ 146 (NLSS)、208 ~

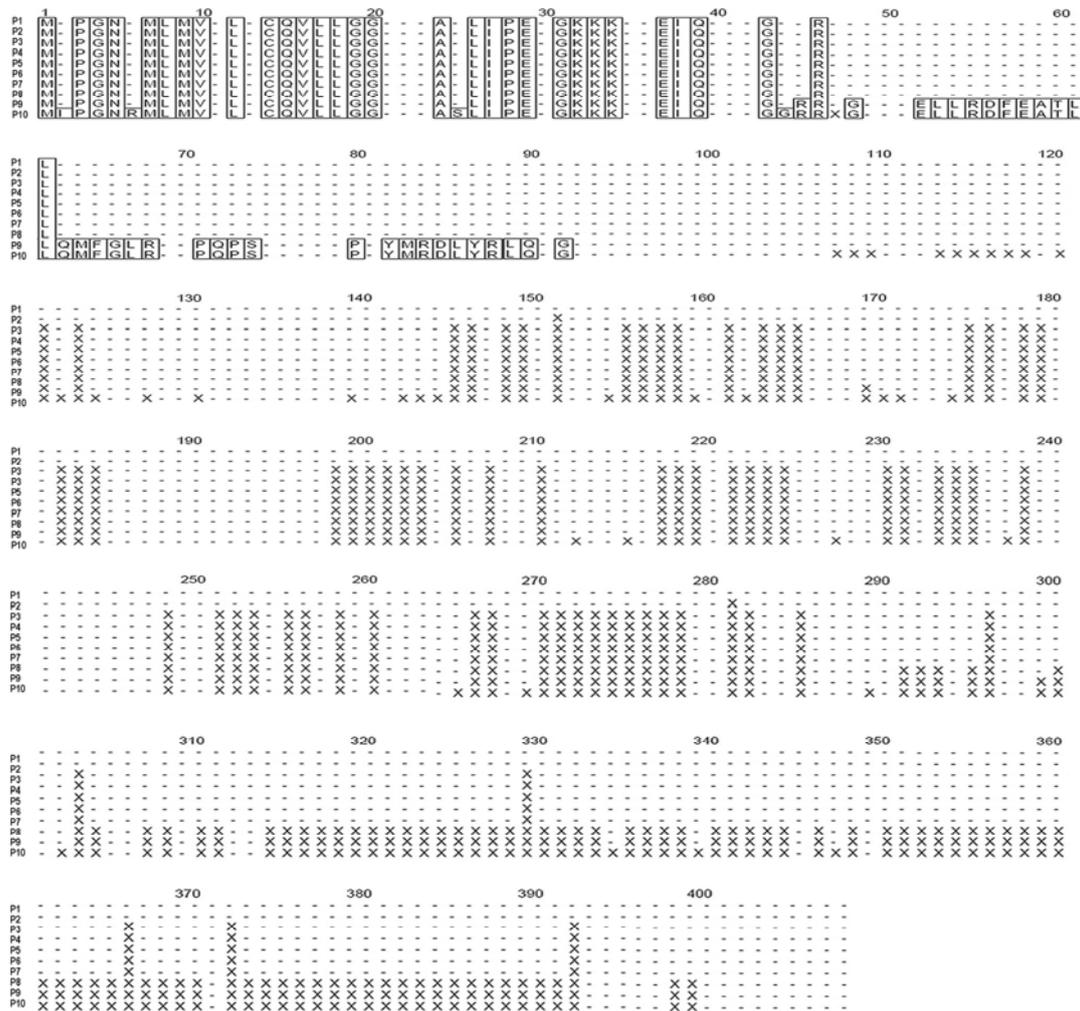


图3 哺乳动物BMP4蛋白的进化踪迹分析

Fig. 3 Evolutionary trace shows conserved consensus pattern

P1 ~ P10分别表示不同的亚家族分类。“x”表示序列特异性残基；“-”表示相应亚家族缺失的残基；方框中的残基表示保守残基。

P1 to P10 indicate the consensus sequences from all partitions, respectively. “x” indicates class-specific residues; “-” indicates residues that loss in class-specific family; the surrounded residues indicate conserved residues.

211 (NVTR)、350 ~ 353 (NSTN)、365 ~ 368 (NSSI)。1个cAMP和cGMP依赖蛋白激酶磷酸化功能位点 (cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation), 309 ~ 312 (RRhS)。PredictProtein 分析显示, TGFβ-propeptide结构域仅有4个蛋白结合位点, 残基组成分别为32 ~ 33、74 ~ 75、94、134与135, 均处于相关活性功能位点区。BMP4蛋白

表面形成的Prosites位点, 如磷酸化位点、N-糖基化位点以及多种类型的激酶磷酸化功能位点 (图4), 既可能是信号通路网络中调节正常细胞时空行为的重要功能位点, 也有可能是抑制或促进细胞恶性转化的分子基础。深入研究该蛋白表面各类功能活性位点, 具有重要的理论意义。

为进一步研究踪迹残基在蛋白质空间结

构上的分布规律及功能位点之间的关系, 本研究通过使用 SWISS-MODEL 在线预测获得人 BMP4 蛋白的空间结构模型。其建模的氨基酸残基范围为 307~408 区域, 为 BMP 蛋白 TGF- β 超家族区域。经 MetaPocket 2.0 分析, 该蛋白具有 3 个主要的配基结合位点, 其具体的氨基酸残基见表 1。结合位点主要位于 BMP 蛋白 TGF- β 超家族的保守区, 其中位点 1 主要有 21 个踪迹残基, 位点 2 有 11 个踪迹残基, 位点 3 最少, 只有 5 个残基组成。配基结合口袋 (pocket) 分析表明 (图 4), 3 个主要的结合位点位于结合口袋的边缘部位。

3 讨论

BMP4 基因与动物的生长发育密切相关, 据研究报道, BMP4 基因的表达在雌性动物生殖器官的发育 (Bai et al. 2014)、胚胎干细胞的分化 (Richter et al. 2014) 等方面都扮演着重要的角色。目前, 国内学者这方面的研究较多。如周建设等 (2011) 构建猪 (*Sus scrofa*) BMP4 基因 pET32a-BMP4 原核表达质粒, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达并分离纯化目的蛋白。李明等 (2008, 2010) 分别克隆了猪和黄牛 (*Capra hircus*) BMP4 基因全长编码序列及相关序列。为进一步研究家畜 BMP4 的生物学功能奠定了基础。石小卫等 (2011) 通过黄淮山羊的 BMP4 全长 cDNA 序列, 推导出蛋白序列, 进一步利用生物信息学工具对其结构进

行预测。目前, 该类研究大多倾向于基因表达及蛋白序列功能预测的研究。

生物在长期的进化过程中, 由于不同的进化历史导致了基因多样性, 反映出种间遗传物质的转移, 进而产生一定的直系同源基因, 而直系同源基因又具有序列变化速度与进化距离相当的特征, 因此, 可以通过直系同源蛋白进行相关功能位点的进化踪迹分析。研究发现, 功能残基在进化过程中比较保守, 因此, 蛋白质的功能和结构信息可通过同源序列的比对构建系统发生树, 并将该树划分为若干组, 找出每一组的共有序列, 经比较这些序列可得到进化踪迹残基, 并将其分别映射到相应的蛋白三维结构上进一步研究活性功能位点与蛋白质结构的关系 (Zhang et al. 2003, 宋云龙等 2005)。

在本研究中, 我们通过多种生物信息学软件分析 BMP4 蛋白的进化踪迹并得到其相应的配基结合位点。预测结果显示, 该蛋白保守性残基主要分布于 TGF- β 前体蛋白结构域, 共得到全家族保守残基 22 个。另一结构域为 TGF- β 结构域, 有研究表明, 该结构域拥有 7 个保守的半胱氨酸残基, 其中 6 个位于一个被称为半胱氨酸结 (cystein knot) 的结构中, 形成 3 个分子内二硫键; 另一个半胱氨酸残基参与形成分子间的二硫键, 这对 TGF- β 家族成员的二聚化具有重要意义 (严晓华等 2009)。在功能位点分析过程中, 因 SWISS-MODEL 仅构建出 TGF- β 结构域的三维结构图, 因此, 仅得到该结构域中 3

表1 BMP4蛋白表面配基特异结合位点

Table 1 The ligand binding sites on the surface of BMP4 protein

结合位点 Binding site	残基 Residues
1	Trp325, Trp385, Trp322, Tyr397, Ile326, Met383, Leu386, Glu388, Asp 324, Lys395, Cys341, Pro342, Phe343, Thr359, Asn362, Ser363, Lys370, Gly321, Leu384, Ala328, Asp387
2	Cys308, Arg309, His348, Leu349, Cys405, Pro342, Pro344, Leu345, Ala346, Asn307, Cys341
3	Trp322, Trp325, Ile326, Met383, Tyr397

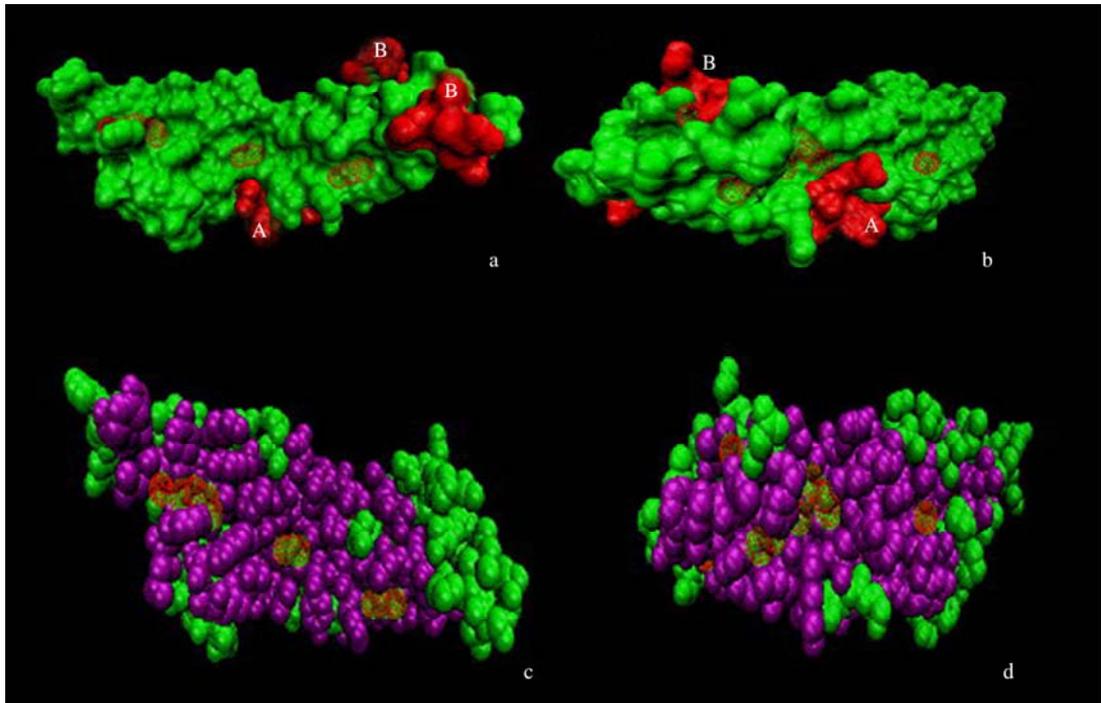


图4 BMP4表面部分踪迹残基及其功能位点

Fig. 4 Trace residues and function sites of BMP4

a、c. BMP4蛋白TGF- β 结构域; b、d. BMP4蛋白TGF- β 结构域背面。

a, c. The TGF- β domain of BMP4 protein; b, d. The reverse side of the TGF- β domain of BMP4 protein.

A. cAMP和cGMP依赖的蛋白激酶磷酸化位点; B. N-糖基化位点; 红色斑点分布区表示蛋白的空间折叠沟中潜在的配基结合口袋; 紫色区域表示相应的配基结合位点。

A. cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site; B. N-glycosylation site; Red dots corresponded to the sites of pocket, and purple corresponded to the ligand binding sites.

个比较大的配基结合位点。这些配基结合位点均由多个结构上比较相近的残基组成。而且, 在这3个主要的配基结合位点中, 3个半胱氨酸残基Cys308、Cys341及Cys405存在于前2个配基结合位点。预示该结合位点均位于蛋白重要的功能区域, 具有重要的进化意义。蛋白质表面的某些氨基酸残基具有一定的倾向性 (residue propensity), 某些特定残基更倾向于位于蛋白质相互作用位点区域。蛋白质相互作用的位点区域具有更多的芳香性和疏水性残基 (Janin et al. 2007, 艾观华等 2011)。分析显示, 这3个主要的功能位点分布有较多的芳香类残基, 如Trp、Tyr及Phe。其中第1和第3结合位

点分布较多。其他残基如Cys、Lys、Gly、Asp等大部分为极性氨基酸残基。

进一步分析表明, 配基结合位点与蛋白表面的配基结合口袋并非完全重合, 而是位于该结合口袋的周边区域。在蛋白质的进化过程中, 其内部的残基比较保守, 突变的概率较小, 据此可推测, 部分配基结合口袋中的氨基酸残基可能是重要的功能残基。基于长期进化形成的压力, 这些残基对于一些功能性同源蛋白来说至关重要, 因此, 导致这些氨基酸残基与其他配基相互作用的概率降低, 以免由于分子之间的相互作用导致这些重要功能区域的空间结构发生变化, 进而影响相应的生理功能。

参 考 文 献

- Ascolani G, Liò P. 2014. Modeling *TGF-β* in early stages of cancer tissue dynamics. *PLoS One*, 9(2): e88533.
- Bai T, Yang J, Chen B, et al. 2014. Genetic analysis of BMP4 gene in Chinese Han female population with premature ovarian insufficiency. *Climacteric*, 17(3): 304–306.
- Bao Z S, Zhang C B, Yan W, et al. 2013. BMP4, a strong better prognosis predictor, has a subtype preference and cell development association in gliomas. *Journal of Translational Medicine*, 11: 100.
- Campbell S J, Gold N D, Jackson R M, et al. 2003. Ligand binding: functional site location, similarity and docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(3): 389–395.
- Fang W T, Fan C C, Li S M, et al. 2014. Down regulation of a putative tumor suppressor BMP4 by SOX2 promotes growth of lung squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 135(4): 809–819.
- Huang B. 2009. MetaPocket: a meta approach to improve protein ligand binding site prediction. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 13(4): 325–330.
- Innis C A, Shi J, Blundell T L. 2000. Evolutionary trace analysis of TGF-beta and related growth factors: implications for site-directed mutagenesis. *Protein Engineering*, 13(12): 839–847.
- Janin J, Rodier F, Chakrabarti P, et al. 2007. Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr*, 63(1): 1–8.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, et al. 2002. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14): 3059–3066.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. 1998a. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Review*, 9(1): 49–61.
- Kawabata M, Inoue H, Hanyu A, et al. 1998b. Smad proteins exist as monomers *in vivo* and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO Journal*, 17(14): 4056–4065.
- Liu B H, Chen Q X, Tian D F, et al. 2013. BMP4 reverses multidrug resistance through modulation of BCL-2 and GDNF in glioblastoma. *Brain Research*, 1507: 115–124.
- Lubbe S J, Pittman A M, Matijssen C, et al. 2011. Evaluation of Germline *BMP4* Mutation as a cause of colorectal cancer. *Human Mutation*, 32(1): E1928–E1938.
- Richter A, Valdimarsdottir L, Hrafnkelsdottir H E, et al. 2014. BMP4 promotes EMT and mesodermal commitment in human embryonic stem cells via SLUG and MSX2. *Stem Cells*, 32(3): 636–648.
- Rost B, Yachdav G, Liu J. 2004. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Research*, 32(Suppl 2): W321–W326.
- Sottriffer C, Klebe G. 2002. Identification and mapping of small molecule binding sites in proteins: computational tools for structure-based drug design. *Farmacology*, 57(3): 243–251.
- Wozney J M, Rosen V, Celeste A J, et al. 1998. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242(4885): 1528–1534.
- Wu Q, Yao J R. 2013. BMP4, a new prognostic factor for glioma. *World Journal of Surgical Oncology*, 11(1): 264–270.
- Zhang Q, Wang L M, Chen Z Y, et al. 2003. Deducing functional epitopes for GDNF proteins and its specific GFRalpha co-receptors using phylogenetic approach. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 35(4): 331–337.
- 艾观华, 周建红, 方慧生. 2011. 基于蛋白质序列预测蛋白质-蛋白质相互作用位点研究进展. *药物生物技术*, 18(2): 165–169.
- 程博涵, 冷丽, 李辉. 2013. 鸡BMP4的结构与功能分析. *东北农业大学学报*, 44(9): 18–22.
- 丁祥云, 李毅, 史琨, 等. 2012. 骨形态发生蛋白4/Smad信号通路在小鼠原始卵泡发育中的作用及作用机制. *生殖与避孕*, 32(10): 649–680.
- 李明, 孙桂荣, 陈其新, 等. 2008. 猪骨形态发生蛋白 4 成熟肽 cDNA 的克隆及序列分析. *中国农学通报*, 24(12): 25–30.
- 李明, 石晓卫, 陈其新, 等. 2010. 黄淮山羊骨形态发生蛋白 4(BMP4)基因的克隆及优化表达. *中国兽医学报*, 30(10): 1363–1369.
- 石晓卫, 刘燕. 2011. 黄淮山羊骨形态发生蛋白 4 结构与功能分析. *中国草食动物*, 31(4): 12–16.
- 宋云龙, 亓云鹏, 张万年, 等. 2005. 真核DNA拓扑异构酶 I 蛋白超家族的进化踪迹分析与全新抗肿瘤药物结合位点的识别. *中国科学C辑: 生命科学*, 35(2): 182–190.

王文栋, 徐世清. 2014. 家蚕生物钟蛋白TIME-EA4的进化踪迹分析. *四川动物*, 33(2): 184-190.

严晓华, 章隽宇, 陈晔光. 2009. 抑制性Smad蛋白对TGF- β 超家族信号转导的调控及其生理意义. *细胞生物学杂志*, 31(2):

135-144.

周建设, 李明, 陈其新, 等. 2011. 猪BMP4基因原核表达及优化. *西北农业学报*, 20(1): 24-28.