

研究报告

Research Report

牛 *Phlda2* 基因的组织表达及生物信息学分析

赵姝君¹ 王敬姣¹ 王梦楠¹ 吴茜红¹ 李冬杰² 李世杰^{1*}

1 河北农业大学生命科学学院, 保定, 071001; 2 河北科技大学 生物科学与工程学院, 石家庄, 050018

* 通讯作者, lishijie20005@163.com

摘要 在人、鼠和猪中 *Phlda2* 基因是一个母源表达的印记基因, 编码一种胞浆蛋白, 具有与血小板同源的结构域。在牛中 *Phlda2* 基因的结构和功能还不清楚。本研究首先利用 RT-PCR 方法对 *Phlda2* 基因在牛组织中的表达进行了分析, 进而采用生物信息学方法对牛 *Phlda2* 基因的分子进化、启动子及蛋白的高级结构进行了分析和预测。结果表明 *Phlda2* 基因在牛的心、肝、脾、肺、肾、大脑、骨骼肌、皮下脂肪、卵巢和胎盘 10 个组织中均有表达。对包括人、小鼠、牛、猪、原鸡、非洲爪蟾、斑马鱼和袋鼠在内的 8 种动物 *Phlda2* 基因 mRNA 序列进化进行分析, 发现这 8 种动物的遗传距离小于 0.435, 且牛和猪遗传距离最近, 为 0.148, 与基因系统进化树分析的结果一致。牛 *Phlda2* 基因的启动子最可能位于该基因起始密码子上游 487~737 bp 区域, 包括 20 个转录因子结合位点。牛 *Phlda2* 基因编码亲水性蛋白, 其二级结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 蛋白三级结构包括一个由 β 片层和 α -螺旋构成的血小板同源结构域(PH)。以上研究结果将为进一步研究 *Phlda2* 基因的功能和分析基因表达调控的分子机理奠定基础。

关键词 牛, *Phlda2* 基因, 生物信息学, 组织表达

Tissue Expression and Bioinformatics Analysis of Bovine *Phlda2* Gene

Zhao Shujun¹ Wang Jingjiao¹ Wang Mengnan¹ Wu Xihong¹ Li Dongjie² Li Shijie^{1*}

1 College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071001; 2 College of Life Science and Technology, Hebei University, Shijiazhuang, 050018

* Corresponding author, lishijie20005@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.033.000505

Abstract In human, mice and pig, *Phlda2* is a maternally expressed imprinted gene and encodes cytoplasm protein with pleckstrin homology domain. In bovine, the gene structure and function of *Phlda2* gene have not been studied. In this study, the expression of *Phlda2* gene in bovine tissues was firstly analyzed by RT-PCR, then the molecular evolution, the promoter and protein conformation of bovine *Phlda2* gene were analyzed using software and on-line tool. The results showed that the *Phlda2* gene was expressed in nine detected tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, skeletal muscle, subcutaneous fat, ootheca and placenta). The genetic distance of 8 species (including human, mouse, bovine, pig, chicken, African frog, zebrafish and kangaroos) was less than 0.435, and bovine and pig shared the minimum (0.148), which accordant with the results of phylogenetic tree. Using promoter online software combined with transcription factor analysis, the potential promoter of bovine *Phlda2* was predicted to locate in 548~737 bp upstream the start codon. Protein software analysis showed that the *Phlda2* gene secondary structure is relatively simple including α -turn and random coil. These results may increase our understanding on bovine *Phlda2* gene and may provide informations to study its function and regulation mechanism.

Keywords Bovine, *Phlda2* gene, Bioinformatic analysis, Tissues expression

基因组印记是一种不遵循孟德尔定律的遗传学现象, 是指等位基因通过 DNA 或组蛋白的表观遗传修饰而产生的亲本基因差异表达的现象(Reik and Walter, 2001)。父源等位基因沉默, 而母源等位基因激活

基金项目 本研究由国家自然科学基金(31372312)和河北省自然科学基金项目(C2011204001)共同资助

的基因称为父源印记基因;反之,母源沉默父源激活的基因称为母源印记基因(Reik et al., 2003)。目前,印记基因的研究主要集中在人和小鼠中,被鉴定的印记基因总数超过 200 个,而牛中印记基因的研究相对较少,已经确认的只有 34 个(<http://igc.otago.ac.nz/Search.html>)。印记基因在染色体上成簇分布且高度保守(Thorvaldsen and Bartolomei, 2007)。成簇存在的印记基因,功能上互相关联,与个体的正常生长发育有紧密关系(Edwards et al., 2007)。

Phlda2 基因(pleckstrin homology-like domain, family A, member 2) 又被称为 *Tssc3* 基因,在人和小鼠的胎盘组织中被鉴定为父源印记基因,位于 *Cdkn1c/Kcnq1ot1* 印记区域中。*Cdkn1c/Kcnq1ot1* 印记区域位于人 11 号染色体,小鼠 7 号染色体(Qian et al., 1997)以及牛 29 号染色体上(Guillomot et al., 2010)。该印记区域主要包括 1 个母源印记的基因 *Kcnq1ot1* 及 8 个父源印记基因 *Ascl2*、*Tssc4*、*Cd81*、*Kcnq1*、*Cdkn1c*、*Slc22a18*、*Phlda2* 和 *Osbpl5* (Ager et al., 2008)。在哺乳动物中 *Phlda2* 基因调控胎盘的分化和胚胎早期的生长发育(Guillomot et al., 2010)。在 *Phlda2* 基因敲除小鼠中,胎盘生长过度,而 *Phlda2* 基因的过表达会导致胎盘发育迟缓(Salas et al., 2004)。在人的脑瘤等恶性肿瘤中,*Phlda2* 基因通过下调表达,参与肿瘤的发生(Müller et al., 2000)。

在牛中 *Phlda2* 基因的结构与功能还没有被系统研究,本研究首先利用 RT-PCR 方法对 *Phlda2* 基因在牛组织中的表达进行了分析,进而应用生物信息学方法对牛 *Phlda2* 基因的分子进化、启动子位点以及编码的蛋白结构进行了分析预测,以其为进一步研究牛 *Phlda2* 基因的功能奠定基础。

1 结果与分析

1.1 牛 *Phlda2* 基因组织表达分析

采用 RT-PCR 方法对 *Phlda2* 基因在牛组织中的表达进行分析,*Phlda2* 和 *GAPDH* 基因分别扩增得到 350 bp 和 550 bp 左右的片段,电泳检测结果见图 1,测序验证为目的条带。表明 *Phlda2* 基因在牛的心、肝、脾、肺、肾、大脑、骨骼肌、皮下脂肪、卵巢和胎盘 10 个被检测组织中均表达。

1.2 *Phlda2* 基因核酸进化分析

从 NCBI 核酸序列数据库查询各种动物 *Phlda2* 基因的 mRNA 序列,共获得 8 种动物 *Phlda2* 基因的完整的 CDS (coding sequence)序列(表 1)。8 种动物

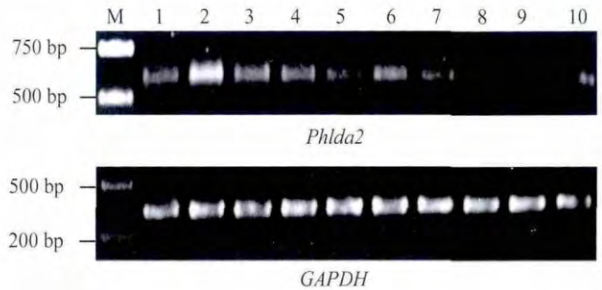


图 1 *Phlda2* 基因在牛的 10 个组织中的表达模式

注: M: DL 2 000 Marker; 泳道 1~10: 为心,肝,脾,肺,肾,大脑,骨骼肌,皮下脂肪,卵巢和胎盘

Figure 1 Expression of *Phlda2* in tissues

Note: M: DL 2 000 Marker; Lanes 1~10: Heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, skeletal muscle, subcutaneous fat, ootheca and placenta

的 *Phlda2* 基因 CDS 序列在 398~458 bp 之间,其中原鸡的编码序列最短,为 398 bp,而人的编码序列最长,为 458 bp。

利用 MEGA5 软件对上述 8 种动物的 *Phlda2* 核酸序列构建系统进化树,并进行分子进化遗传分析,结果如图 2 所示。选取的 8 种动物 *Phlda2* 核酸序列被分为两大组,其中斑马鱼和非洲爪蟾为一组,其余 6 种动物为一组。在第二组中,原鸡是单独的分支,剩下的人、小鼠、牛、猪和袋鼠为一分支。表明哺乳动物的进化距离比其它物种的距离近,其中牛与猪的进化距离最近。遗传距离矩阵见表 2,发现在被分析的 8 种动物中,牛与猪遗传距离相对最小,为 0.148。

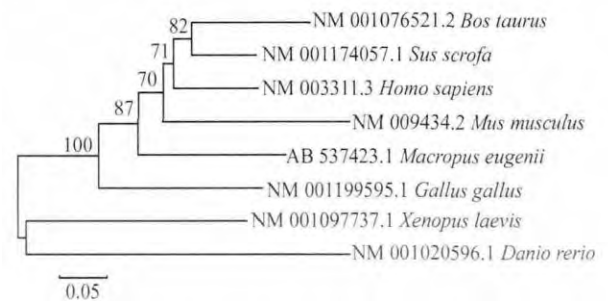


图 2 8 种动物 *Phlda2* 核酸的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of *Phlda2* gene sequence from 8 different animals

1.3 牛 *Phlda2* 基因启动子预测和转录因子结合位点分析

对牛 *Phlda2* 基因起始密码子上游 5 000 bp 的序列进行 3 种不同的在线软件预测,分析启动子结构。Promoter 2.0 软件分析结果(表 3)显示,发现潜在的启动子最可能位于 700 bp 附近。Neural Network Promoter prediction 软件预测结果(表 4)显示,584~634 bp 之间最有可能是启动子区域。用 Promoter Scan 在线

表 1 不同动物 *Phlda2* 基因查询信息
Table 1 Information of *Phlda2* genes in different animals

物种 Species	mRNA 序列号 mRNA accession No.	染色体上位置 Location on chr.	基因长度(bp) Size (bp)
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_003311	Chromosome="11"	458
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_009434	Chromosome="7"	434
牛 <i>Bos taurus</i>	NM_001076521	Chromosome="29"	428
猪 <i>Sus scrofa</i>	NM_001174057	Chromosome="2"	446
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NM_001199595	Chromosome="5"	398
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NM_001097737	未知 Unknown	410
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_001020596	Chromosome="25"	410
袋鼠 <i>Macropus eugenii</i>	AB537423	未知 Unknown	426

表 2 不同动物 *Phlda2* 基因的 CDS 进化距离矩阵
Table 2 genetic distance of *Phlda2* gene CDS among different animals

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8
人 <i>Homo sapiens</i>		0.017	0.017	0.015	0.018	0.020	0.020	0.017
小鼠 <i>Mus musculus</i>	0.241		0.018	0.018	0.019	0.020	0.020	0.019
牛 <i>Bos taurus</i>	0.205	0.271		0.015	0.018	0.020	0.020	0.019
猪 <i>Sus scrofa</i>	0.148	0.252	0.166		0.018	0.020	0.020	0.018
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	0.283	0.335	0.298	0.252		0.019	0.020	0.018
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	0.367	0.384	0.371	0.377	0.360		0.020	0.020
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	0.408	0.417	0.435	0.430	0.419	0.400		0.020
袋鼠 <i>Macropus eugenii</i>	0.223	0.303	0.267	0.219	0.278	0.375	0.435	

注: 左下角数据为两序列间遗传距离, 右上角数据标准差, 自展检验, 重复 5 000 次

Note: Under the diagonal was pairwise distance calculation; On the diagonal was Std. Err., bootstrap test (repeat 5 000 times)

软件分析, 且 cut-off 值设置为 0.8 预测 *Phlda2* 启动子。结果显示在启动子区正义链上的 487~737 bp, 启动子分值为 65.81, 且启动子剪切值=53.000 000。综合 3 个软件的预测结果, *Phlda2* 基因启动子可能位于 487~737 bp 区域内。

进一步用 Promoter Scan 在线软件对牛 *Phlda2*

基因起始密码子上游 5 000 bp 范围进行转录因子结合位点扫描分析, 在正义链上检测到包括 TFIID、Sp1、APRT-mouse-US、GCF、A P-2、NF-S、T-Ag、CTF/NF-1、EARLY-SEQ1、JCV_repeated_sequenc、PEA1、NFI、APRT-mouse_US 等共 20 种潜在的转录因子结合位点, 其中 AP-2 和 Sp1 结合位点出现频率较大,

表 3 Promoter 2.0 在线软件对牛 *Phlda2* 基因启动子预测结果
Table 3 Promoter predictions of bovine *Phlda2* gene with Promoter 2.0

位置	分值	可能性
Position	Score	Likelihood
400	0.582	临界预测 Threshold prediction
700	1.192	可能性较大的预测 High possibility prediction
2 100	0.598	临界预测 Threshold prediction
2 600	0.568	临界预测 Threshold prediction
3 500	0.555	临界预测 Threshold prediction
4 300	0.661	临界预测 Threshold prediction

表 4 Neural Network Promoter Prediction 在线软件对牛 *Phlda2* 基因启动子预测结果

Table 4 Promoter predictions of bovine *Phlda2* gene with Neural Network Promoter Prediction

起点	终点	分值
Start	End	Score
267	317	0.84
584	634	1.00
1 795	1 845	0.84
2 517	2 567	0.91
3 989	4 039	0.96
4 018	4 158	0.87

分别为 15 个和 30 个。

1.4 牛 *Phlda2* 蛋白物理性质分析及高级结构预测

通过 ExPASy 上的在线软件 ProtParam 和 ProtScale, 对牛 *Phlda2* 基因所编码的 142 个氨基酸序列进行基本理化性质分析, 表明该蛋白的分子量为 15.86 kD, 蛋白分子式为 $C_{695}H_{1118}N_{212}O_{206}S_4$ 理论等电点(pI)为 9.63。牛 *Phlda2* 蛋白由 20 种氨基酸组成, 其中 Arg 和 Ala 含量最高, 各占 14.1% 和 12%, His 含量最低(0.7%), 未发现特殊的硒半胱氨酸和吡咯赖氨酸。牛 *Phlda2* 蛋白状态不稳定, 其不稳定性系数(instability index)为 46.50 (>40), 该蛋白是一个亲水性蛋白, 总的平均亲水性为 -0.554。

利用在线软件 GOR4 对牛 *Phlda2* 蛋白进行二级结构分析, 发现牛 *Phlda2* 蛋白的二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 分别占 40.85% 和 40.14%, 其余 19.01% 为延伸结构。

利用 SWISSMODEL 软件预测牛 *Phlda2* 蛋白的

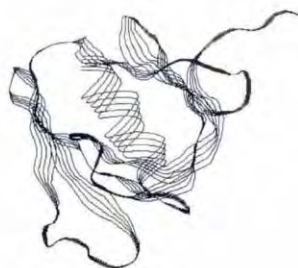


图 3 SWISS-MODEL Workspace 在线软件分析蛋白质三级结构
Figure 3 Protein secondary structure analysis of bovine *Phlda2* with SWISS-MODEL Workspace

三级结构(图 3), 该蛋白包括一个血小板同源结构域(pleckstrin homology, PH)结构域。PH 结构域主要由两组反向平行的 β 片层结构和一个长的 α -螺旋结构构成, 延伸链散布于整个蛋白质中。

2 讨论

利用生物信息学方法对基因结构、编码蛋白的理化性质及功能进行预测, 是目前生物学研究的新热点。*Phlda2* 蛋白和血小板都具有共同的血小板同源(pleckstrin homology domain, PH)结构域(Lemmon et al., 2002), 属于同一家族。血小板同源结构域通过结合磷酸烯醇脂, 调控细胞信号的转导(Itou and Takenawa, 2002)、细胞骨架的构成和细胞膜的运输(Lemmon et al., 2002)。在胚胎发育早期, *Phlda2* 基因可能通过细胞信号转导, 调节各滋养层按正常比例生长, 进而维持了胎盘结构和功能的稳定。利用 MEGA5 软件分析 *Phlda2* 核酸序列, 发现它在哺乳动物中结构保守, 这可能与它调控胚胎生长发育的重要功能有关。

基因的启动子和转录因子结合位点的预测, 可为了解该基因功能和调节机制提供了重要依据。通过 3 种在线软件的预测发现 *Phlda2* 基因的启动子位置可能位于起始密码子上游 487~737 bp 区域内。预测其转录因子结合位点有 20 种, 其中 AP-2 和 Sp1 的结合位点出现频率较大。转录因子 Sp1 对肿瘤有促进作用(白雪和邓红, 2010), 并调控细胞凋亡(Safe and Abdelrah, 2005)、DNA 甲基化(Wahori et al., 2008)、细胞生长分化(Samson and Wong, 2002)、以及与核酸代谢和氧化磷酸化相关的许多持家基因的表达(Zaidal et al., 1999)等生物过程。转录因子 AP-2 是一种具有高度保守序列的激活蛋白(Mitchell et al., 1987), 参与细胞分化(Schwartz et al., 2007)及肿瘤发生(Popa et al., 2004)。近来研究表明转录因子 AP-2 在哺乳动物的胚胎发育过程中起重要作用, 在 AP-2 基因敲除的小鼠中, 出现严重胸腹缺陷的症状(Hilger-ever et al.,

2000)。在多种肿瘤细胞系中, AP-2基因低表达或不表达, 而高水平的 AP-2可抑制肿瘤细胞的生长(Wajapeyee and Somasundaram, 2003)。Phlda2 基因富含 AP-2和 Sp1 转录因子的结合位点进一步预示了 Phlda2 基因在胚胎早期和癌症发生中的重要作用。

3 材料与方法

3.1 试验材料

试验用荷斯坦奶牛取自当地屠宰场, 动物屠宰后, 采集其包括心、肝、脾、肺、肾、骨骼肌、皮下脂肪、卵巢和胎盘在内的主要组织, 投入液氮中速冻保存, 备用于 RNA 的提取。

3.2 主要试剂

Taq DNA Mix 购自北京 Tiangen 生物公司; RNA 提取(TRIZol)试剂盒购自 Invitrogen 公司; 无 RNase 的 DNase- 购自大连宝生物公司; RT-PCR 试剂盒和快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。

3.3 总 RNA 提取与 cDNA 的合成

参照 RNA 提取试剂盒说明书提取心、肝、脾、肺、肾、骨骼肌、皮下脂肪、卵巢和胎盘组织的总 RNA, 用无 RNase 的 DNase- 除去 DNA 的污染后, 琼脂糖电泳及 Gene Quant 100 紫外分光光度计(GE, 美国)检测 RNA 质量和数量。利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一条链, 反应体系为 20 μ L, 其中总 RNA 1 μ L。合成的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.4 牛 Phlda2 基因的组织表达

利用 RT-PCR 检测牛 Phlda2 基因在组织中的表达。用于 RT-PCR 的内参基因 GAPDH 和目的基因 Phlda2 的参考序列, 引物序列, 退火温度及扩增片段长度见表 5。25 μ L 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), Taq DNA Mix 12.5 μ L, ddH₂O 10.5 μ L。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环;

72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。目的片段利用快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收后直接进行测序。

3.5 Phlda2 基因的生物信息学分析

核酸分子进化分析利用 MEGA5 (molecular evolutionary genetics analysis) 软件, 采用邻近相连算法 NJ (neighbor joining model) 和泊松校正 (poisson correction) 的方法, 构建系统进化树和遗传距离矩阵, 自展检验 (bootstrap test) 估计 NJ 法所构系统树的可靠性 (重复 5 000 次), 其余参数取默认值。

Phlda2 基因启动子位置是通过 Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), Promoter 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 和 Promoter Scan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) 在线软件分析进行预测, 利用 Promoter Scan 在线软件进行转录因子结合位点预测。

利用在线网站 ExPASy 的在线软件 ProtParam 和 ProtScale 分析 Phlda2 蛋白物理性质, 采用在线网站 GOR4 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 对蛋白二级结构进行预测和功能分析。

作者贡献

赵姝君是本研究的主要完成者, 在整个研究中贯穿始终, 完成材料的采集、数据的软件分析及论文初稿的撰写与修改; 王敬姣参与数据采集; 吴茜红和王梦楠协助数据处理; 李冬杰提供理论指导; 通讯作者李世杰为项目负责人, 进行理论指导和论文修改及整个研究的一切费用支出。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31372312)和河北省自然科学基金项目(C2011204001)资助, 衷心感谢河北农业大学生命科学学院对本研究的支持, 感谢实验

表 5 RT-PCR 引物

Table 5 Primers used for RT-PCR

	引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度($^{\circ}$ C) AT ($^{\circ}$ C)	片段长度(bp) Product size (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
Phlda2	Phlda2-L	AGCTGGATAAGCGAAGTGAC	54	557	NM-001076521
	Phlda2-R	AGAAAAGAGAATGAACCGAG			
GAPDH	GAPDH-L	GCACAGTCAAGGCAGAGAAC	50	367	BTU85042
	GAPDH-R	GCGTGGACAGTGGTCATAAG			

室同学对我的帮助！

参考文献

- Ager E.I., Pask A.J., Gehring H.M., Shaw G., and Renfree M.B., 2008, Evolution of the CDKN1C-KCNQ1 imprinted domain, *BMC Evolutionary Biology*, 8: 1163-1177
- Bai X., and Deng H., 2010, Research progress on relationship between transcription factor Sp1 and tumor, *Zhejiang Daxue Xuebao (Yixue Ban) (Journal of Zhe Jiang University (Medical Sciences))*, 39(2): 215-220 (白雪, 邓红, 2010, 转录因子 Sp1 与肿瘤关系研究的新进展, *浙江大学学报(医学版)*, 39(2): 215- 220)
- Edwards C.A., and Ferguson-Smith A.C., 2007, Mechanisms regulating imprinted genes in clusters, *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3): 281-289
- Guillomot M., Taghouti G., Constant F., Degrelle S., Hue I., Chavatte-Palmer P., and Jammes H., 2010, Abnormal expression of *Phlda2* gene in cloned bovine placenta, *Placenta*, 31(6): 482-490
- Hilger-ever M.K., Moser M., Schorle H., and Buettner R., 2000, Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control, *Gene*, 260(1): 1-12
- Ito T., and Takenawa T., 2002, Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signaling, *Cell Signal*, 14(9): 733-743
- Lemmon M.A., Ferguson K.M., and Abrams C.S., 2002, Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton, *FEBS Lett.*, 513(1): 71-76
- Mitchell P.J., Wang C., and Tjian R., 1987, Positive and negative regulation of transcription *in vitro*: Enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen, *Cell*, 50(6): 847-861
- Müller S., van den Boom D., Zirkel D., Köster H., Berthold F., Schwab M., Westphal M., and Zumkeller W., 2000, Retention of imprinting of the human apoptosis-related gene *TSSC3* in human brain tumors, *Human Molecular Genetics*, 9(5): 757-763
- Popa C., Dahler A.L., Serewko-Auret M.M., Wong C.F., Smith L., Barnes L.M., Strutton G.M., and Saunders N.A., 2004, AP-2 transcription factor family member expression, activity, and regulation in human epidermal keratinocytes *in vitro*, *Differentiation*, 72(5): 185-197
- Qian N., Frank D., O'Keefe D., Dao D., Zhao L., Yuan L., Wang Q., Keating M., Walsh C., and Tycko B., 1997, The *IPL* gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis, *Human Molecular Genetics*, 6(12): 2021-2029
- Reik W., and Walter J., 2001, Genome imprinting: Parental influence on the genome, *Nat. Rev. Genet.*, 2(1): 21-32
- Reik W., Santos F., and Dean W., 2003, Mammalian epigenomics: Reprogramming the genome for development and therapy, *Theriogenology*, 59(1): 21-32
- Safe S., and Abdelrah M., 2005, Transcription factor family and its role in cancer, *Eur. J. Cancer*, 41(16): 2438-2448
- Salas M., John R., Saxena A., Barton S., Frank D., Fitzpatrick G., Higgins M.J., and Tycko B., 2004, Placental growth retardation due to loss of imprinting of *Phlda2*, *Mechanisms of Development*, 121(10): 1199-1210
- Samson S., and Wong N.C., 2002, Role of sp1 in insulin regulation of gene expression, *Mol. Endocrinol.*, 29(3): 265-279
- Schwartz B., Melnikova V.O., Tellez C., Mourad-Zeidan A., Blehm K., Zhao Y.J., McCarty M., Adam L., and Bar-Eli M., 2007, Loss of AP-2 alpha results in deregulation of E-cadherin and MMP-9 and an increase in tumorigenicity of colon cancer cells *in vivo*, *Oncogene*, 26(28): 4049-4058
- Thorvaldsen J.L., and Bartolomei M.S., 2007, SnapShot, SnapShot: Imprinted gene clusters, *Cell*, 130(5): 958
- Wahori S., Yasui Y., Kudoh A., Sato Y., Nakayama S., Murata T., Isomura H., and Tsurumi T., 2008, Identification of phosphorylation sites on transcription factor Sp1 in response to DNA damage and its accumulation at damaged sites, *Cell Signal*, 20(10): 1795-1803
- Wajapeyee N., and Somasundaram K., 2003, Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2a) and the role of p53 and p21 WAF1/CIP1 in AP-2 alpha-mediated growth inhibition, *J. Biol. Chem.*, 278(52): 52093-52110
- Zaid A., Li R., Luciaková K., Barath P., Nery S., and Nelson B. D., 1999, On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes, *Bioenerg. Biomembr.*, 31(2): 129-135