

## 研究报告

### Research Report

# 鱼类细胞肿瘤抗原p53蛋白的比较研究以及使用计算方法分析其蛋白质相互作用网络

Suchitra , Kiran D. , Jitendra K. , Samiran , Jayasankar 

鱼类遗传与生物技术部, ICAR-中央淡水水产养殖研究所, 布巴内斯瓦尔, 奥里萨邦, 751002, 印度

 通讯作者, kirancife@gmail.com;  作者

计算分子生物学, 2015 年, 第 4 卷, 第 8 篇 doi: 10.5376/cmb.cn.2015.04.0008

本文首次以英文发表在 Computational Molecular Biology 2015, Vol. 5, No. 3, 1-9 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式:





Kumari et al., 2015, Comparative Study of Cellular Tumor Antigen p53 Protein of Fishes and Analysis of its Protein Interaction Network using Computational Approach, Computational Molecular Biology, Vol.5, No.3, 1-9 (doi: 10.5376/cmb.2015.05.0003)

**摘要** 生物信息学领域的进展已经促进了解全球基因网络及其蛋白质产品。在本研究中, 使用生物信息学工具进行 9 种鱼的细胞肿瘤抗原 p53 蛋白的比较分析。细胞肿瘤抗原 p53 作为肿瘤抑制基因, 在细胞凋亡和基因组稳定性中起作用。本研究的结果表明, 大多数物理化学性质在 Q92143 (*Xiphophorus maculatus*) 和 O57538 (*Xiphophorus helleri*) 中几乎相同。为了了解全球网络的细胞肿瘤抗原 p53, 我们使用 STRING 9.1 工具, 并推测这种蛋白质与几个其他蛋白质相互作用, 但功能节点-CHEK1, BCL2, MDM4 在斑马鱼、青鳞和红木瓜狗头中具有高置信分数。强关联相互作用见于 mdm2 和 p53 之间, 在 *Danio rerio* 中具有良好的高分。我们还研究了细胞肿瘤抗原 p53 和斑马鱼 Mdm2 之间的分子对接。此外, 我们调查了存在于所有九个不同的蛋白质序列中的保守区域, 尽管物质已形成, 但该区域仍由进化保持。本研究将进一步支持了解鱼中各种细胞途径的作用和相关蛋白。这项工作也有用于研究 p53 蛋白的结构和功能分析。

**关键词** 细胞肿瘤抗原 p53; 序列分析; 蛋白质相互作用网络; 保守区; 生物信息学; 理化性质; Mdm2

## Comparative Study of Cellular Tumor Antigen p53 Protein of Fishes and Analysis of its Protein Interaction Network using Computational Approach

Suchitra Kumari , Kiran D. Rasal , Jitendra K. Sundaray , Samiran Nandi , P. Jayasankar

Reza Talebi , Ahmad Ahmadi , Fazlolah Afraz , Seyed Zeyaeedin Mirhoseini 

Fish Genetics and Biotechnology Division, ICAR- Central Institute of Freshwater Aquaculture, Bhubaneswar, Orissa, 751002, India

 Corresponding author, kirancife@gmail.com;  Authors

**Abstract** Progress in the field of Bioinformatics has been facilitated to understand the global network of genes and their protein products. In present study, comparative analysis of Cellular tumor antigen p53 proteins of nine fishes were carried out using Bioinformatics tools. Cellular tumor antigen p53 acts as a tumor-suppressor and having role in apoptosis, genomic stability. The results of this study indicate that, most of physico-chemical properties were almost same in Q92143 (*Xiphophorus maculatus*) and O57538 (*Xiphophorus helleri*). In order to understand global network of Cellular tumor antigen p53, we have used STRING 9.1 tool and speculated that this protein interacting with several other protein but functional node -CHEK1, BCL2, MDM4 were common in *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Tetraodon miurus* with high confidence score. The strong association interaction has seen between mdm2 and p53 with a good high score in *Danio*

收稿日期: 2015 年 09 月 07 日  
接受日期: 2015 年 09 月 07 日  
发表日期: 2015 年 09 月 07 日

erio. We also studied the molecular docking between Cellular tumor antigen p53 and Mdm2 of Zebrafish. Also, we have investigated conserved region present in all nine different protein sequences which specifies, that region maintained by evolution despite speciation. The present study will further support to understand the roles and associated proteins in various cellular pathways in fish. This work is also useful for the study of structural and functional analysis of p53 protein. **Keywords** Cellular tumor antigen p53; Sequence analysis; Protein interaction network; Conserved region; Bioinformatics; Physico-chemical properties; Mdm2

虽然细胞肿瘤抗原 p53 大约在三十年前被发现, 但仍然与癌症研究领域中的大多数成果有关 (Kruse and Gu, 2009; Lu et al., 2009)。细胞肿瘤抗原 p53 或 p53 是由 TP53 基因编码的蛋白质, 其是肿瘤抑制基因最重要的。该基因在除了某些鱼类之外的人类和哺乳动物中得到了很好的研究。它也称为肿瘤抑制物 p53、磷酸蛋白 p53、抗原 NY-CO-13、p53、转化相关蛋白 53 (TRP53), 其在细胞凋亡中起重要作用, 如在肿瘤发育和基因组稳定性中的程序性细胞死亡 (Kruse and Gu, 2009; Storer and Zon, 2010)。

肿瘤抑制基因 p53 蛋白作为一个转录因子, 在其相互作用网络中控制许多基因的表达, 其由上游调节子和下游靶基因组成 (Fields and Jang, 1990)。在细胞和个体水平上 p53 具有抑制肿瘤发生和保护个体的能力。P53 是一种位点特异性 DNA 结合蛋白 (Kern et al., 1991), 其在其网络中反式激活基因 (Fields and Jang, 1990; Lu et al., 2007)。因此, 如果 p53 突变, 则可导致肿瘤形成。p53 的活性和表达通过多层调节来监测, 主要是通过泛素连接酶, 如翻译后水平上的 Mdm2 和 Mdm4 (Le et al., 2009)。Mdm2 蛋白结合 p53 并使其失活。Mdm2 是一种 E3 泛素连接酶, 其在活性 p53 的形成中上调, 其中多泛素化肿瘤抑制剂 p53 用于蛋白酶体靶向 (Oren, 1999)。据报道, 由于 mdm2 吗啉代的脱靶效应 (Robu et al., 2007), mdm2 缺陷型斑马鱼胚胎显示生长阻滞和高水平的凋亡 (Storer and Zon, 2010)。在哺乳动物中, p53 的稳定性和功能由许多翻译后修饰调节, 而在斑马鱼中, 调节 mRNA 和蛋白质的水平响应于不同类型的应激已经被证实 (Brooks and Gu, 2003; Langheinrich et al., 2002; Storer and Zon, 2010)。p53 基因的突变将使其肿瘤抑制机制和其它因素失活, 这将导致肿瘤形成。单个氨基取代也将影响 p53 的表达 (Petitjean et al., 2007)。在小鼠模型中已经充分研究了由于突变导致的 p53 功能丧失 (Leng et al., 2003; Olive et al., 2004)。因此, 其功能受到翻译后

调节以及相互作用的 p53 结合蛋白的调节, 例如 p53 的 mdm2 和 E3 泛素连接酶。

在本研究中, 我们已经使用生物信息学工具来比较分析九个不同鱼的细胞肿瘤抗原 p53 蛋白序列。我们已经探索了肿瘤抑制 p53 基因及其蛋白质序列在鱼之间的机制, 因为已有很多学者对人类和哺乳动物的 p53 进行了研究, 但关于鱼类的研究却鲜见报道。在最近的生物信息学时代, 已经开发了几种工具和算法来理解原子水平的生物分子和预测潜在的机制。进一步了解使用细胞机制与蛋白质修饰鱼类中的肿瘤抑制 p53 调控将有助于了解调节 p53 组织特异性反应的体内基本机制。

## 1 材料与方法

我们已使用不同的生物信息学工具来研究具有特定目的的肿瘤抑制因子 p53 蛋白质。

### 1.1 数据收集

UniProt 是容易获得的蛋白质序列数据库 (<http://www.uniprot.org/>)。我们从九种不同的鱼中检索了总共九种蛋白质序列用于我们的研究 (表 1)。我们已经检索了 FASTA 格式的蛋白质序列。

### 1.2 理化表征

ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 是 expasy 工具, 其用于基于序列计算给定蛋白质的物理和化学参数。我们使用 ProtParam 工具计算了九个检索蛋白质序列的几种物理化学性质, 如理论等电点 (pI)、分子量、正负残基总数、消光系数、半衰期、不稳定性指数、脂肪指数和总平均亲水性 (GRAVY)。

### 1.3 比对和系统发育研究

为了研究不同蛋白质序列之间的比较, 我们使用全局多序列比对 (MSA) 程序分析来自不同鱼类的

p53 蛋白质序列。目前,多序列比对(MSA)方法被广泛用于评估蛋白质研究中的序列保守性和蛋白质结构域保守性。在此步骤中,使用 Clustal Omega (Sievers et al., 2011)工具进行 MSA 分析。为了解不同蛋白质序列之间的系统发育关系,我们通过分类

图描绘了这些序列的进化关系。Prosite, ScanProsite(de Castro et al., 2006)工具用于鉴定预测图案命中的编号。(http://prosite.expasy.org/scanprosite/)。

表 1 细胞肿瘤抗原 p53 信息

Table 1 List of Cellular tumor antigen p53

S.No.	Accession no.	Name of protein	Organism
1.	P79734	Cellular tumor antigen p53	<i>Danio rerio</i>
2.	Q92143	Cellular tumor antigen p53	<i>Xiphophorus maculatus</i>
3.	O57538	Cellular tumor antigen p53	<i>Xiphophorus helleri</i>
4.	P79820	Cellular tumor antigen p53	<i>Oryzias latipes</i>
5.	O93379	Cellular tumor antigen p53	<i>Ictalurus punctatus</i>
6.	P25035	Cellular tumor antigen p53	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
7.	O12946	Cellular tumor antigen p53	<i>Platichthys flesus</i>
8.	Q9W679	Cellular tumor antigen p53	<i>Tetraodon miurus</i>
9.	Q9W678	Cellular tumor antigen p53	<i>Barbus barbus</i>

#### 1.4 基因本体和蛋白质-蛋白质相互作用网络的分析

我们进一步研究了使用 Uniprot 鉴定的 p53 的生物学和分子功能基因本体论(http://www.uniprot.org/)。使用 STRING (Franceschini et al., 2013)(用于检索相互作用蛋白质的搜索工具)来研究 p53(http://string-db.org/)的蛋白质-蛋白质相互作用网络。

#### 1.5 三维结构分析和分子对接

基于同源结构模型,利用同源建模构建 p53 三维模型。通过使用针对 PDB 数据库中可用的 3D 结构的 PSI-BLAST(NCBI, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)来鉴定与我们的靶模板具有最高序列同源性的结构模板。使用的标准如序列同一性百分比、e 值、链长度和查询覆盖率。该模型使用目标模板定位方法由 SWISS 模型构建。SAVES(结构分析和验证服务器)是集成的服务器用于验证模型(http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/)。使用 PatchDock 在 p53 和 Mdm2 之间进行分子对接,随后使用 FireDock(http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/) 细

化结构。Patchdock 是基于表面补丁匹配和具有快速搜索过滤和评分的更可靠的对接工具。它使用高级数据结构和空间搜索模式。它产生了几何结构后通过 FireDock 进一步过滤。使用 Patch Dock 计算两种配合物的对接得分和原子接触能(ACE)。

## 2 结果与讨论

我们使用计算算法比较分析来自不同鱼的肿瘤抑制抗原 p53。p53 已经在哺乳动物系统中与一些模式鱼一起被研究。在 Q92143(月光鱼)和 O57538(剑尾鱼)中大多数理化性质的值几乎相同,比如长度、理论 pI、阳性 R 组、阴性 R 组和脂肪酸指数等(表 2)。所有蛋白质的不稳定性指数的值高于 40,表明所有 9 种蛋白质都是不稳定的。计算 p53 的消光系数(EC)值有助于蛋白质-配体和蛋白质-蛋白质相互作用的研究。Q9W679 和 Q9W678 的 pI 值大于 7,这表明两种蛋白质都是碱性的,其余蛋白质是酸性的。九种不同鱼类的所有 p53 蛋白质序列本质上是疏水性的。

多序列比对(MSA)可以深入了解几个物种的序列保守性,从而可以识别序列中对蛋白质功能最关键的部分(Jankun-Kelly et al., 2009)。此外,进行

表 2 蛋白质序列的理化性质

Table 2 Physico-chemical properties of protein sequences

S.No.	Accession no.	Length	Molecular weight	Theoretical pI	Total number	Total number	Extinction coefficients	Instability index:	Aliphatic index	GRAVY
1.	P79734	373	41899.1	6.37	54	52	30410	60.61	63.75	-0.785
2.	Q92143	342	37957.7	6.06	48	44	27305	50.64	67.84	-0.682
3.	O57538	342	37947.7	6.06	48	44	27305	50.08	67.84	-0.679
4.	P79820	352	39752.8	6.24	51	48	29255	57.98	66.36	-0.761
5.	O93379	376	41989.2	6.48	54	52	26525	65.53	63.96	-0.809
6.	P25035	396	43966.1	6.96	51	51	26525	61.75	73.33	-0.547
7.	O12946	366	40619.0	6.73	50	49	16305	56.32	70.03	-0.607
8.	Q9W679	367	41266.6	7.60	49	50	24910	51.65	65.91	-0.734
9.	Q9W678	369	41233.5	7.04	52	52	26400	54.36	67.59	-0.711

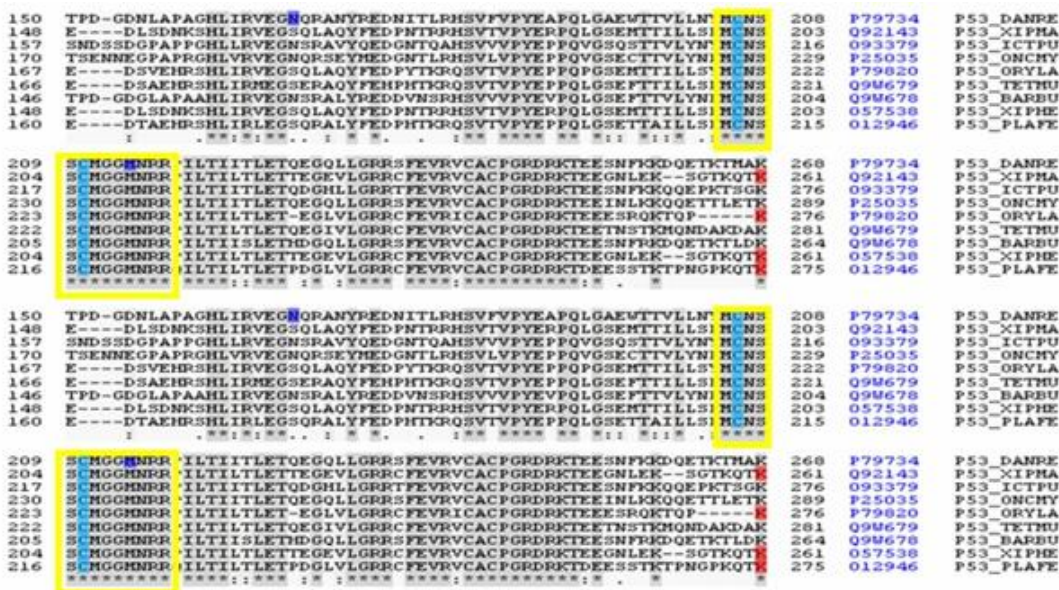


图 1 MSA 的 snapsort. 这里, "\*"表示比对中的所有序列相同; "."表示保守取代; "."表示半保守. 红色表示主题; 深灰色表示相似性; 浅蓝色表示金属结合; 紫色表示诱变. 所选择的保守区域由黄色框突出显示

Figure 1 The snapsort of MSA result. Here, "\*" indicates identical in all sequences in the alignment; "." indicates conserved substitutions; "." indicates semi-conserved. Red color indicates the motif; dark grey color indicates the similarity; light blue color indicates metal binding; purple color indicates mutagenesis. Selected conserved region is highlighted by yellow box

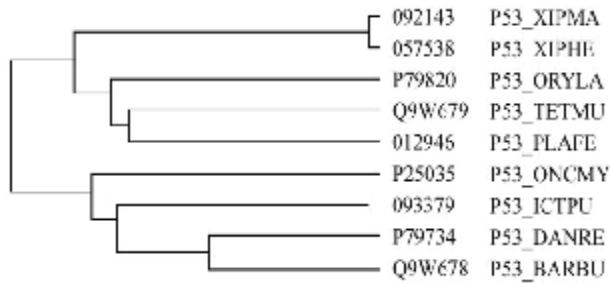


图 2 系统发育树显示通过分类图检索蛋白质序列的进化关系

Figure 2 Phylogenetic tree show the Evolutionary relationships of retrieved protein sequences by cladogram

MSA, 我们已经看到“MCNSSCMGGMNRR”是 p53 的所有九种不同蛋白质序列中的保守区(相同区域), 这表明该肽序列可以通过进化维持, 而不是形态(图 1)。我们对 p53 系统发育分析的研究揭示 Q92143(月光鱼)O57538(剑尾鱼)彼此更接近。我们通过使用 Scan Prosite 已经感知到“MCNSSCMGGMNRR”基序的总共 42 个命中数(表 3)(图 2)。

蛋白质-蛋白质相互作用的研究是一个广泛的用来了解蛋白质组组织的方法。功能网络蛋白研究将有助于药物发现, 理解代谢途径和预测或发展基因型-表型关联(Wang et al., 2009; Wang and Moul, 2001)。为了了解 p53 蛋白的网络, 我们使用 STRING 9.1 进行分析, 并揭示功能节点-CHEK1, BCL2, MDM4 在斑马鱼、青鳞和红木瓜狗头是常见的。mdm2 和 p53 的相互作用在斑马鱼中分值较高。蛋白质-蛋白质相互作用网络是系统水平上理解细胞过程的主要部分。我们已经通过逐个获得蛋白质研究了所有九个蛋白质序列-蛋白质相互作用网络。这里我们感兴趣的是知道哪些功能节点是 p53 网络中不同鱼类的共同特征。

我们已经揭示了蛋白质-蛋白质相互作用网络只有三种不同的鱼, 即斑马鱼、青鳞和红木瓜狗头(表 4,5 和 6)的 p53 和功能节点-CHEK1, BCL2, MDM2 是常见的 p53 蛋白网络以及高置信度得分。在 STRING 中, 通过使用置信分数来分析功能性相互作用。得分<0.3 的相互作用被认为是低置信度, 得分范围为 0.3~0.7 为中等置信度, 得分>0.7 为高置信度(Franceschini et al., 2013)。在斑马鱼中, p53 蛋

白网络显示与 10 个蛋白质的功能性关联, 并且它们是 Cdkn1a, Mdm2, atm, Chek1, bcl2, Mdm4, Wu: fa96e12, Chek2, LOC792573, Ep300a(图 3)。

在交互网络中, 在 mdm2 和 p53 之间没有黑线, 这表明没有共表达。我们推测原因是所有 10 个蛋白质在斑马鱼、青鳞和红木瓜狗头中是保守的或者没有, 并且还发现所有的节点都表示 100% 的序列保守性。4 表示斑马鱼的发生结果。Mdm4 和 p53 在斑马鱼、青鳞和红木瓜狗头中具有良好的高得分, 这表明它们之间的强关联。其功能是通过结合其转录激活域来抑制 p53 和 p73 介导的细胞周期停滞和细胞凋亡。我们已经划分了 p53 的最好的前十个蛋白质-蛋白质相互作用网络(Lu et al., 2009; Oren, 1999; Wang et al., 2004)。

使用 STRING 工具发现 Mdm2 蛋白与斑马鱼 p53 蛋白有强关联。因此, 为了研究结构层面的相互作用, 我们已经完成了对接。首先, 通过使用诸如 PDB ID 的同源结构进行同源性建模, 从 Swiss-Model 获得的斑马鱼的 p53 的 3D 结构; 3Q05\_A, 3Q01\_A, 3Q06\_A, 4MZR\_A 分别具有 58,57,58,57% 的相似性。所获得的 3D 结构用 SAVES 服务器验证(图 4)。使用 PatchDock 在 p53 和 Mdm2 之间进行分子对接, 随后使用 FireDock 细化结构。使用 Patch DockBoth 计算两个配合物的对接得分和原子接触能(ACE)。PDB 结构用于对接分析(图 4)。p53 和 Mdm2 之间的对接揭示它们分别需要全球能量 10.57 和 ACE 0.18。

### 3 结论

本研究是第一次对鱼类中肿瘤抑制抗原 p53 比较全面的研究。在本研究中, 我们已经研究了大多数理化性质在 Q92143(月光鱼)和 O57538(剑尾鱼)中几乎相同。在进行比对后, 我们已经看到“MCNSSCMGGMNRR”是存在于 p53 的所有 9 个蛋白质序列中的保守(相同)基序, 并且共预测到来自数据库的 42 命中数, 其指示了该区域的重要性。从蛋白质-蛋白质相互作用网络研究中我们已经看到功能节点-CHEK1, BCL2, MDM4 在斑马鱼、青鳞和红木瓜狗头三个物种 p53 蛋白网络中是常见的, 并且具有高置信分数。此外, 这种肿瘤抑制 p53 的蛋白质-蛋白质相互作用途径帮助我们了解各种细胞途径中的作用和相关的蛋白质。对接研究还证

表 3 使用“MCNSSCMGGMNR”预测的命中数

Table 3 No. of hits predicted by using “MCNSSCMGGMNR”

S.	Name of protein	Accession no.	Species
1.	Cellular tumor antigen p53	Q9W678	<i>Barbus barbus</i> (Barbel) ( <i>Cyprinus barbus</i> )
2.	Cellular tumor antigen p53	P67938	<i>Bos indicus</i> (Zebu)
3.	Cellular tumor antigen p53	P67939	<i>Bos taurus</i> (Bovine)
4.	Cellular tumor antigen p53	Q29537	<i>Canis familiaris</i> (Dog) ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
5.	Cellular tumor antigen p53	Q9WUR6	<i>Cavia porcellus</i> (Guinea pig)
6.	Cellular tumor antigen p53	P10360	<i>Gallus gallus</i> (Chicken)
7.	Cellular tumor antigen p53	P13481	<i>Chlorocebus aethiops</i> (Green monkey) ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
8.	Cellular tumor antigen p53	O09185	<i>Cricetulus griseus</i> (Chinese hamster) ( <i>Cricetulus barabensis</i> )
9.	Cellular tumor antigen p53	P79734	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish) ( <i>Brachydanio rerio</i> )
10.	Cellular tumor antigen p53	Q8SPZ3	<i>Delphinapterus leucas</i> (Beluga whale)
11.	Cellular tumor antigen p53	Q29480	<i>Equus asinus</i> (Donkey)
12.	Cellular tumor antigen p53	P41685	<i>Felis catus</i> (Cat) ( <i>Felis silvestris catus</i> )
13.	Cellular tumor antigen p53	P79892	<i>Equus caballus</i> (Horse)
14.	Cellular tumor antigen p53	P04637	<i>Homo sapiens</i> (Human)
15.	Isoform 2 of Cellular tumor antigen p53	P04637-2	<i>Homo sapiens</i> (Human)
16.	Isoform 3 of Cellular tumor antigen p53	P04637-3	<i>Homo sapiens</i> (Human)
17.	Isoform 4 of Cellular tumor antigen p53	P04637-4	<i>Homo sapiens</i> (Human)
18.	Isoform 5 of Cellular tumor antigen p53	P04637-5	<i>Homo sapiens</i> (Human)
19.	Isoform 6 of Cellular tumor antigen p53	P04637-6	<i>Homo sapiens</i> (Human)
20.	Isoform 7 of Cellular tumor antigen p53	P04637-7	<i>Homo sapiens</i> (Human)
21.	Isoform 8 of Cellular tumor antigen p53	P04637-8	<i>Homo sapiens</i> (Human)
22.	Isoform 9 of Cellular tumor antigen p53	P04637-9	<i>Homo sapiens</i> (Human)
23.	Cellular tumor antigen p53	O93379	<i>Ictalurus punctatus</i> (Channel catfish) ( <i>Silurus punctatus</i> )
24.	Cellular tumor antigen p53	P56423	<i>Macaca fascicularis</i> (Crab-eating macaque) ( <i>Cynomolgus</i> )
25.	Cellular tumor antigen p53	P61260	<i>Macaca fuscata fuscata</i> (Japanese macaque)
26.	Cellular tumor antigen p53	P56424	<i>Macaca mulatta</i> (Rhesus macaque)
27.	Cellular tumor antigen p53	O36006	<i>Marmota monax</i> (Woodchuck)
28.	Cellular tumor antigen p53	Q00366	<i>Mesocricetus auratus</i> (Golden hamster)
29.	Cellular tumor antigen p53	P02340	<i>Mus musculus</i> (Mouse)
30.	Cellular tumor antigen p53	P25035	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout) ( <i>Salmo gairdneri</i> )
31.	Cellular tumor antigen p53	P79820	<i>Oryzias latipes</i> (Medaka fish) (Japanese ricefish)
32.	Cellular tumor antigen p53	Q9TUB2	<i>Sus scrofa</i> (Pig)
33.	Cellular tumor antigen p53	O12946	<i>Platichthys flesus</i> (European flounder) ( <i>Pleuronectes flesus</i> )
34.	Cellular tumor antigen p53	Q95330	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)
35.	Cellular tumor antigen p53	P10361	<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
36.	Cellular tumor antigen p53	P51664	<i>Ovis aries</i> (Sheep)
37.	Cellular tumor antigen p53	Q64662	<i>Spermophilus beecheyi</i> (California ground squirrel)
38.	Cellular tumor antigen p53	Q9W679	<i>Tetraodon miurus</i> (Congo puffer)
39.	Cellular tumor antigen p53	Q9TTA1	<i>Tupaia belangeri</i> (Common tree shrew) ( <i>Tupaia glis</i> )
40.	Cellular tumor antigen p53	P07193	<i>Xenopus laevis</i> (African clawed frog)
41.	Cellular tumor antigen p53	O57538	<i>Xiphophorus helleri</i> (Green swordtail)
42.	Cellular tumor antigen p53	Q92143	<i>Xiphophorus maculatus</i> (Southern platyfish)

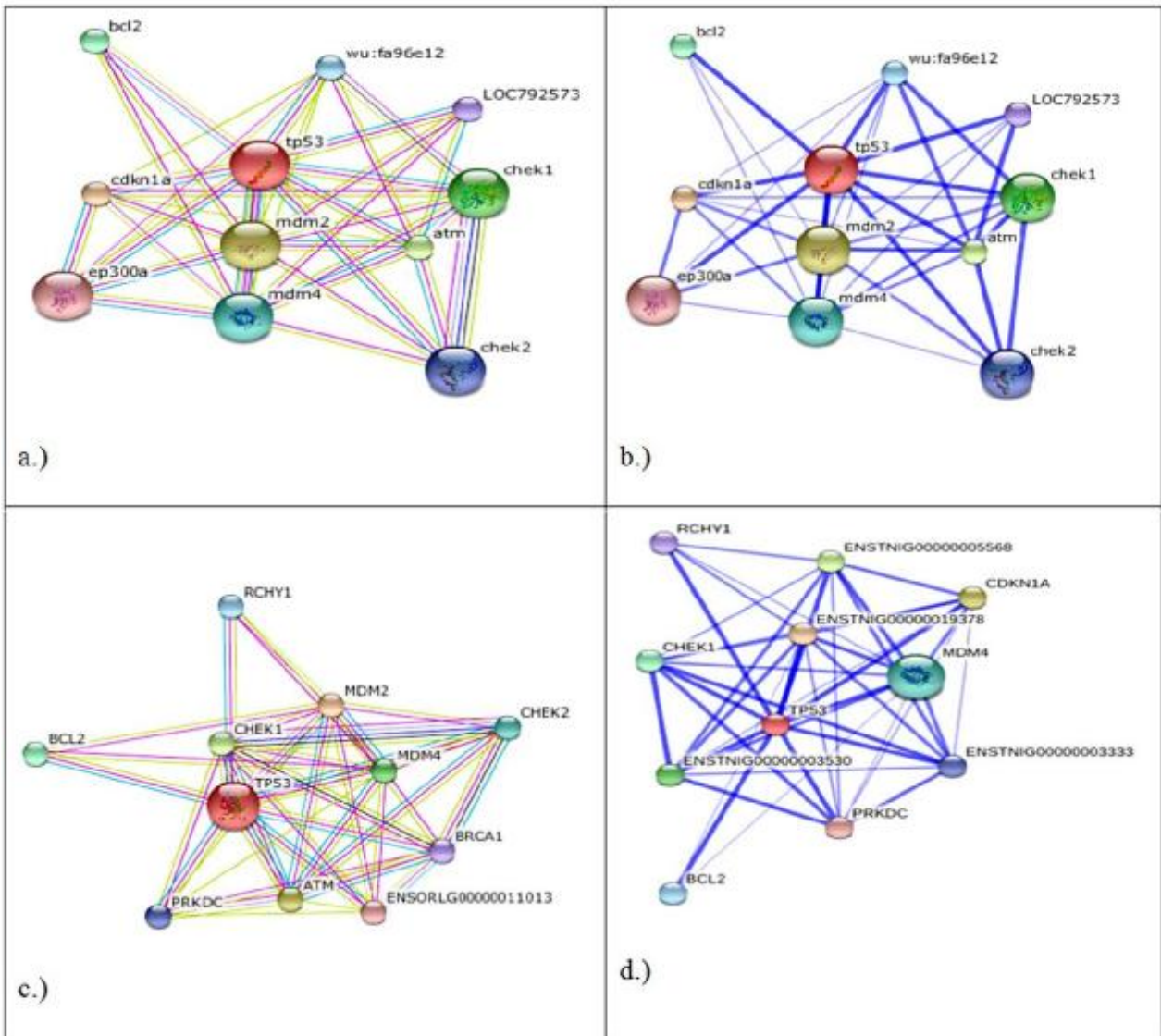


图 3 蛋白质相互作用网络. a) p53 蛋白网络的证据视图, 显示与 10 种蛋白质(斑马鱼)的功能性关联. 这里节点表示蛋白质; 边缘表示预测的功能关联. 不同的线颜色表示关联的证据类型. 红线表示存在融合证据; 黄线文本模拟证据; 浅蓝色线表示数据库证据; 黑线表示共表达证据. b.)p53 网络的信心视图(斑马鱼). 在该图中, 较强的关联由较粗的线表示. c.)p53 蛋白网络的证据视图显示与 10 种蛋白质(*Oryzias latipes*)的功能联系 d.)p53 网络(*Teraodan miurus*)的置信视图

Figure 3 Protein interaction network. a) Evidence view of p53 protein network showing functional association with 10 proteins (Zebra fish). Here, a node represents proteins; an edge represents the predicted functional associations. Different line colors represent the types of evidence for the association. Red line indicates the presence of fusion evidence; yellow line text miming evidence; Light blue line indicates database evidence; Black line indicates the co-expression evidence. b.) Confidence view of p53 network (Zebra fish). In this fig stronger associations are represented by thicker lines. c.) Evidence view of p53 protein network showing functional association with 10 proteins (*Oryzias latipes*) d.) Confidence view of p53 network (*Teraodanmiurus*)

表 4 p53(斑马鱼)与功能性节点的相互作用

Table 4 Interaction of p53 (zebra fish) with functional nodes

SI.No.	Functional node	Actions view	Score	Types of evidence for the
1.	Cdkn1a (Novel	Binding, activation,	0.997	Experiments, databases, text
2.	Mdm2 (E3	Binding, activation, post	0.996	Coexpression,
3.	Atm (Ataxia	Binding, catalysis, post	0.993	Experiments, databases, text
4.	Chek1(checkpoint	Binding, post translation	0.991	Experiments, databases, text
5.	bcl2 (Bcl2)	Binding, reaction	0.988	Experiments, databases, text
6.	Mdm4 (Protein Mdm4)	Binding, activation	0.987	Experiments, databases, text
7.	Wu:fa96e12	Binding, post translation	0.985	Experiments, databases, text
8.	Chek2 (CHK2	Binding, post translation	0.983	Experiments, databases, text
9.	LOC792573 (ring finger	Binding	0.980	Experiments, databases, text
10.	Ep300a (P300-A	Binding, post translation	0.980	Experiments, databases, text

表 5 p53(青鳉)与功能性节点的相互作用

Table 5 Interaction of p53 (*Oryzias latipes*) with functional nodes

SI.No.	Functional node	Actions view	Score	Types of evidence for the
1.	MDM2 (Mdm2 p53 binding	Activation, binding,	0.991	Coexpression,
2.	ATM (ataxia telangiectasia mutated)	Binding, catalysis,	0.982	Experiments, databases, text
3.	CHEK1 (CHK1 checkpoint homolog)	binding, translation	0.974	Experiments, databases, text
4.	MDM4 (Mdm4 p53 binding protein	Activation, binding	0.974	Experiments, databases, text
5.	BCL2 (B-cell	Binding, reaction,	0.970	Experiments, databases, text
6.	CHEK2 (CHK2 checkpoint homolog)	Activation,	0.968	Experiments, databases, text
7.	RCHY1 (ring finger and CHY zinc	Binding, expression	0.966	Experiments, databases, text
8.	PRKDC (protein kinase,	Binding,	0.961	Experiments, databases, text
9.	BRCA1 (breast cancer 1, early onset)	binding	0.959	Experiments, databases, text
10.	ENSORLG00000011013	Activation, binding,	0.954	Experiments, databases, text



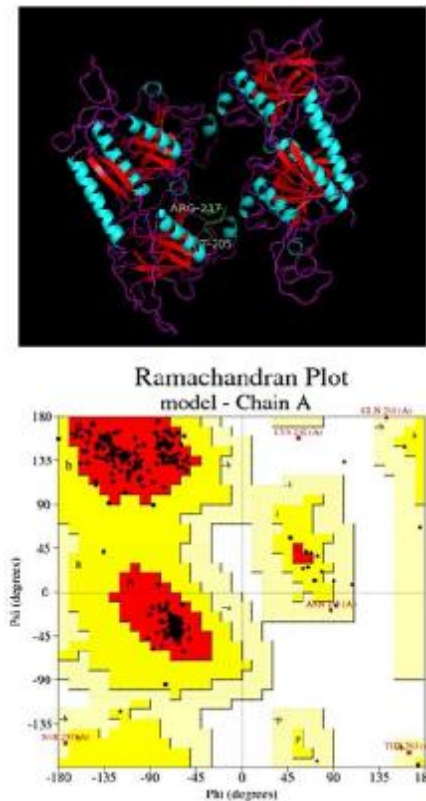


图 4 通过同源性建模获得的具有绿色保守区域的斑马鱼的 p53 模型。模型 p53 显示的 Ramachndran 图, 最优区域中的残基 91.9%, 额外允许区域中的残基 5.9%, 丰富的允许区域中的残基 1.7% 和不允许区域中的残基 0.4% 等

Figure 4 p53 model of zebrafish with conserved region in green color obtained through homology modeling. Ramachndran plot of model p53 showing, residues in most favoured regions 91.9%, Residues in additional allowed regions 5.9%, Residues in generously allowed regions 1.7% and Residues in disallowed regions 0.4% etc

实 p53 与具有全球能量的 mdm2 相互作用。因此, 目前的工作将了解不同物种包括鱼的 tp53 蛋白提供了更多的支持(图 5)。

### 作者贡献

SK 和 KDR 对研究计划和程序进行设计; SK, KDR, PJ, JKS 和 SN 分析数据并撰写初稿。所有作者都阅读并同意最终文本。

### 致谢

我们感谢印度新德里农业研究理事会对本研究的

支持。

### 参考文献

- Brooks C.L., and Gu W., 2003, Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation, *Curr Opin Cell Biol*, 15: 164-171  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00003-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00003-6)
- De Castro E., Sigrist C.J., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A., and Hulo N., 2006, ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins, *Nucleic Acids Res*, 34: W362-365  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- Fields S., and Jang S.K., 1990, Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein, *Science*, 249: 1046-1049  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.2144363>
- Franceschini A., Szklarczyk D., Frankild S., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Lin J., Minguez P., Bork P., Von Mering C., and Jensen L.J., 2013, STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration, *Nucleic Acids Res*, 41: D 808-815  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1094>
- Jankun-Kelly T.J., Lindeman A.D., and Bridges S.M., 2009, Exploratory visual analysis of conserved domains on multiple sequence alignments, *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 11: S7  
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-S11-S7>
- Kern S.E., Kinzler K.W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C., and Vogelstein B., 1991, Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein, *Science*, 252: 1708-1711  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.2047879>
- Kruse J.P., and Gu W., 2009, Modes of p53 regulation, *Cell*, 137: 609-622  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.050>
- Langheinrich U., Hennen E., Stott G., and Vacun G., 2002, Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling, *Curr Biol*, 12: 2023-2028

[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01319-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01319-2)

Lodish H.F., and Lim B., 2009, MicroRNA-125b is a

Le M.T., Teh C., Shyh-Chang N., Xie H., Zhou B., Korzh V.,

表 6 p53(红木瓜狗头)与功能性节点的相互作用

Table 6 Interaction of p53 (*Tetraodon miurus*) with functional nodes

SL.No.	Functional node	Actions view	Score	Types of evidence for the
1.	ENSTNIG00000019378 (Mdm2	Activation, binding,	0.986	Coexpression,
2.	CDKN1A (cyclin-dependent	Activation, binding,	0.983	Experiments, databases, text
3.	ENSTNIG00000005568 (Mdm2	Activation, binding,	0.982	Coexpression,
4.	ENSTNIG00000003530 (ataxia	binding, catalysis,	0.980	Experiments, databases, text
5.	CHEK1 (CHK1 checkpoint	Binding, translation	0.976	Experiments, databases, text
6.	MDM4 (Mdm4 p53 binding	Binding	0.975	Experiments, databases, text
7.	BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2)	Binding, reaction,	0.971	Experiments, databases, text
8.	ENSTNIG00000003333 (ataxia	Binding, reaction,	0.967	Experiments, databases, text
9.	RCHY1 (ring finger and CHY	Binding, expression	0.964	Experiments, databases, text
10.	PRKDC (protein kinase,	Binding, translation	0.963	Experiments, databases, text

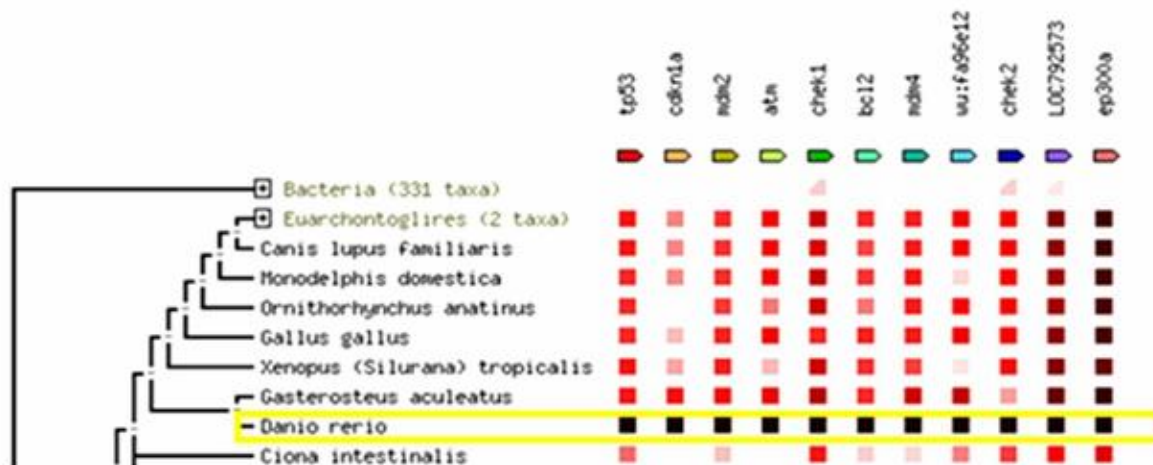


图 5 发生结果的快照。这里黑色表示斑马鱼中 100% 的序列保守性

Figure 5 Snapshot of occurrence result. Here black-color indicates the 100% sequence conservation in Zebra fish

novel negative regulator of p53, Genes Dev, 23: 862-876

<http://dx.doi.org/10.1101/gad.1767609>

Leng R.P., Lin Y., Ma W., Wu H., Lemmers B., Chung S., Parant J.M., Lozano G., Hakem R., and Benchimol S.,

2003, Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation, Cell, 112: 779-791

[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00193-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00193-4)

Lu W.J., Amatruda J.F., and Abrams J.M., 2009, p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens, Nat Rev Cancer, 9:

758-762

<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2732>

Lu X., Ma O., Nguyen T.A., Jones S.N., Oren M., and Donehower L.A., 2007, The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop, *Cancer Cell*, 12: 342-354

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.033>

Olive K.P., Tuveson D.A., Ruhe Z.C., Yin B., Willis N.A., Bronson R.T.,

Crowley D., and Jacks T., 2004, Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome, *Cell*, 119: 847-860

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.004>

Oren M., 1999, Regulation of the p53 tumor suppressor protein, *J Biol Chem*, 274: 36031-36034

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.51.36031>

Petitjean A., Achatz M.I., Borresen-Dale A.L., Hainaut P., and Olivier M., 2007, TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes, *Oncogene*, 26: 2157-2165

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210302>

Robu M.E., Larson J.D., Nasevicius A., Beiraghi S., Brenner C., Farber S.A., and Ekker S.C., 2007, p53 activation by knockdown technologies, *PLoS Genet*, 3: e78

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0030078>

Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Soding J., Thompson J.D., and Higgins D.G., 2011, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol Syst Biol*, 7: 539

<http://dx.doi.org/10.1038/msb.2011.75>

Storer N.Y., and Zon L.I., 2010, Zebrafish models of p53 functions, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2: a001123

<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001123>

Wang X., Taplick J., Geva N., and Oren M., 2004, Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation, *FEBS Lett*, 561: 195-201

[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00168-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00168-1)

Wang Z., Gerstein M., and Snyder M., 2009, RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nat Rev Genet*, 10: 57-63

<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>

Wang Z., and Moult J., 2001, SNPs, protein structure, and disease, *Hum Mutat*, 17: 263-270

<http://dx.doi.org/10.1002/humu.22>