

MOLE-211 Bioinformatiikka 2021
Harjoitustyö
Elissa Peltola

OXTR

TIIVISTELMÄ

Ihmisen *OXTR*-geeni koodaa oksitosiinireseptoria, joka toimii rakkaushormoninakin tunnetun oksitosiinin reseptorina. Oksitosiini-oksitosiinireseptorijärjestelmän laajat vaikutukset elimistössä esimerkiksi käytökseen liittyen ovat olleet tutkimuksen kohteena lähivuosina. Tässä työssä karakterisoin ihmisen *OXTR*-geenin ja sen geenituotteen, sekä tarkastelin geenin esiintymistä eri selkärangaisryhmissä. Muodostin yhdeksän selkärangaislajin mRNA-ortologeista fylogeneettisen puun suurimman uskottavuuden menetelmällä. Tämän analyysin pohjalta voisi karkeasti arvioida *OXTR*-geenin noudattavan aikaisempia analyysijä selkärankaisten lajiutumista.

TAUSTAA

Ihmisen (*Homo sapiens*) oksitosiinireseptorin primaarinen aminohappojärjestys ja sitä koodaavan mRNA:n emäsjärjestys määritettiin ensimmäisen kerran 1990-luvun alkupuolella komplementaarisella DNA-tekniikalla (Kimura ym. 1992). Oksitosiinireseptoria koodaavan *OXTR*-geenin rakenne sen sijaan karakterisoitiin vasta muutama vuosi myöhemmin (Inoue ym. 1994). *OXTR*-geenin tuote, oksitosiinireseptori, on G-proteiinivälitteisesti aktivoituva transmembraaniproteiini, joka toimii nimensä mukaisesti hormoni ja välittäjäaine oksitosiinin reseptorina (Gimpl & Fahrenholz, 2001).

Jo 1970-luvun loppupuolella oksitosiinireseptorien arveltiin assosioituvan synnytykseen liittyvään kohdun lihasten supisteluun sekä maidon erittymiseen rintarauhasesta (Soloff ym. 1979). Myöhemminä vuosina on kuitenkin toteutettu tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat *OXTR*-geenin ekspressoituvan kohdun ja rintarauhasen lisäksi useissa muissa kudoksissa, kuten aivoissa, munuaisissa, sydämessä, haimassa, luustossa ja verisuonistossa (Gimpl & Fahrenholz, 2001; Zingg & Laporte, 2003). Geneettiset polyformiat *OXTR*-geenissä on yhdistetty muun muassa autismikirjon häiriöihin, kuten Aspergerin oireyhtymään (Liu ym. 2015; Di Napoli ym. 2014), sensitiiviseen vanhemmuuteen (Bakermans-Kranenburg & Ijzendoorn, 2008) sekä niiden on arveltu liittyvän myös aggressiiviseen käytökseen sekä miehillä, että naisilla (Malik ym. 2012).

Tässä työssä tavoitteena on karakterisoida ihmisen *OXTR*-geeni ja sen proteiinituote usean eri tietokannan avulla. Lisäksi geenille valitaan ihmisen lisäksi kahdeksan ortologia eri selkärangaislajeista, ja lajien mRNA:ista muodostetaan fylogeneettinen puu. Fylogeneettinen analyysi toteutetaan suurimman uskottavuuden menetelmää hyödyntävällä ohjelmistolla ja työn lopussa arvioidaan analyysin tuloksia, niiden luotettavuutta ja käydään läpi mahdollisia virhelähteitä.

MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Hain ihmisen *OXTR*-geenin tiedot NCBI-tietokannasta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 11.3.2021) ja valitsin monilinjaukseen 1. transkriptivariantin. Lisäksi käytin geeniin liittyvän tiedon lähteenä Ensembl-tietokantaa (<http://m.ensembl.org/index.html> 11.3.2021) ja UCSC-genomiselainta (<https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> 11.3.2021). Geenin translaatiotuotteen tiedot hain puolestaan Uniprot-tietokannasta (Uniprot-ID: P30559; <http://www.uniprot.org/> 10.3.2021). Geeniin yhdistetyt ontologialuokat etsin QuickGO-tietokannasta (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/> 10.3.2021) ja käytin tietokantaa myös ontologiapuiden piirtämiseen.

Valitsin monilinjaukseen ihmisen *OXTR*-geenin transkriptille ortologisekvenssit kahdeksasta eri lajista Ensembl- ja NCBI-tietokantoja hyödyntämällä sekä hain sekvenssit NCBI:n alaisesta GenBank -tietokannasta (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> 9.3.2021). Valitut lajit olivat simpanssi (*Pan troglodytes*), reesusmakaki (*Macaca mulatta*), kotihiiri (*Mus musculus*), lammas (*Ovis aries*), kana (*Gallus gallus*), tropiikkikynsisammakko (*Xenopus tropicalis*), koala (*Phascolarctos cinereus*) ja seeprakala (*Danio rerio*). Ortologien GenBank:n Accession -numerot on esitetty taulukossa 1 yhdessä Ensembl -tietokannan geenitunnusten ja proteiinituotteiden kokojen kanssa.

Taulukko 1. *OXTR*-ortologien Ensembl-geenitunnukset, GenBank transkriptitunnukset sekä geenien koodaaman proteiinin koko.

Eliö	Ensemble – geeni - ID	Transkriptisekvenssien GenBank Accession - ID	Proteiinin koko (aminohappoa)
Ihminen	ENSG00000180914	NM_000916	389
Simpanssi	ENSPTRG00000014582	XM_001144020	389
Reesusmakaki	ENSMMUG00000009703	NM_001044732	389
Kotihiiri	ENSMUSG00000049112	NM_001081147	388
Lammas	ENSOARG00000007492	NM_001009752	391
Kana	ENSGALG00000003138	NM_001031569	391
Tropiikkikynsisammakko	ENSXETG00000020140	XM_002936251	390
Koala	ENSPCIG00000006580	XM_020973794	395
Seeprakala	ENSDARG00000033956	NM_001199370	388

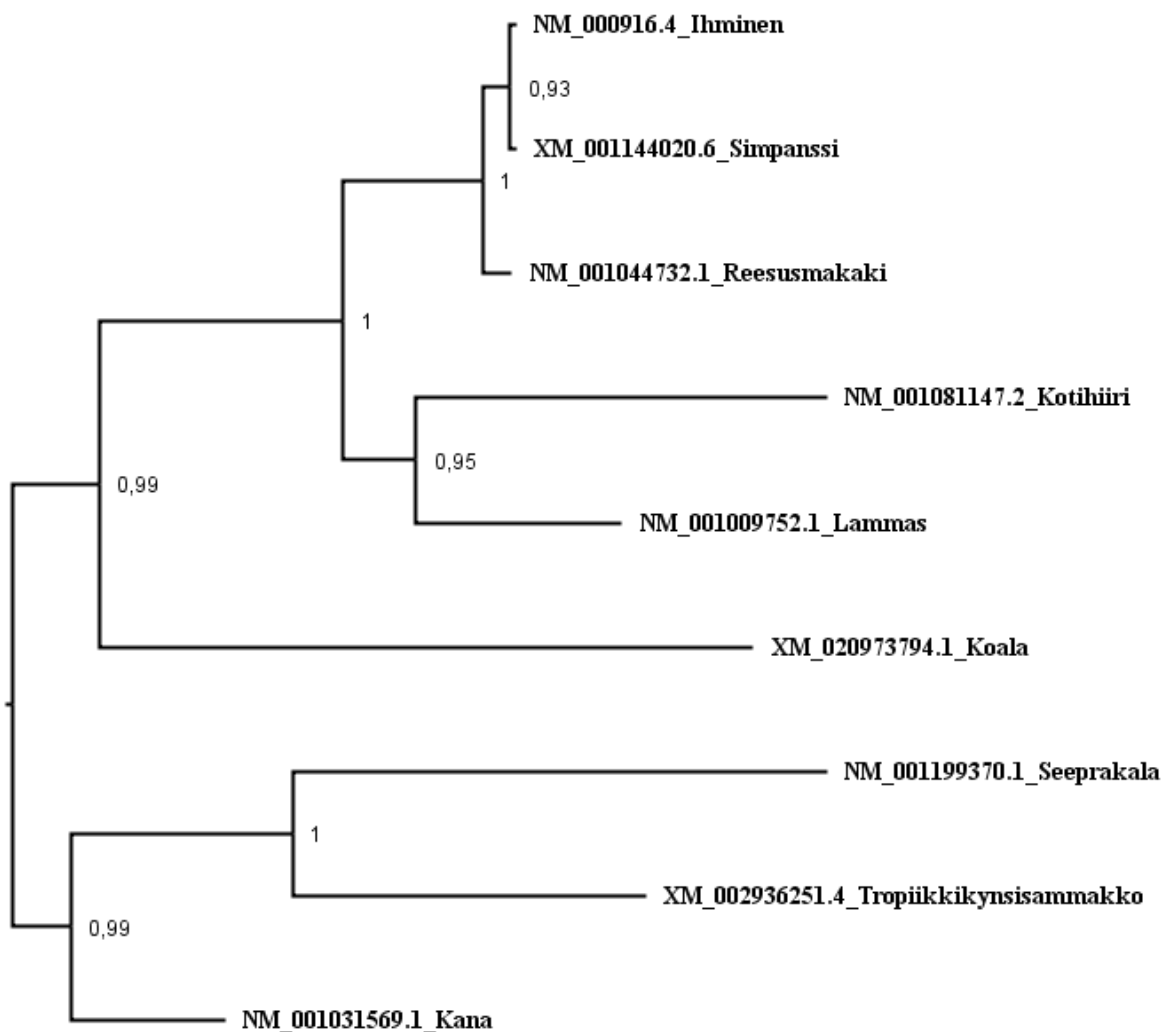
Tein sekvenssien monilinjauksen Puhti-supertietokoneella (<http://research.csc.fi/-/puhti> 11.3.2021) ohjelmistolla MUSCLE v3.8.31 (Edgar 2004) ja tarkastelin linjauksen onnistumista Wasabi:lla (<http://www.wasabiapp.org/> 9.3.2021). Toteutin fylogeneettisen analyysin suurimman uskottavuuden menetelmää hyödyntävällä PhyML-ohjelmistolla (<http://www.phylogeny.fr/alacarte.cgi> 9.3.2021). Jätin monisekvenssilinjauksen ja linjauksen kuratoinnin tekemättä ja hoidin fylogeneettisen analyysin edellä mainitulla ohjelmistolla. Lisäksi visualisoin puun alustavasti ohjelmistolla TreeDyn. Suoritin juurten tukiarvojen testit aproksimaattisella uskottavuusosamäärätestillä (Approximate Likelihood-Ratio Test, aLRT) ja käytin ajossa oletusarvoparametreja. Toteutin fylogeneettisen puun lopullisen visualisoinnin ohjelmistolla FigTree v1.4.4. (Rambaut 2018).

TULOKSET

Ihmisen *OXTR*-geeni on 19 233 emäsparia pitkä ja se sisältää 6 eksonia. Geeni on lokalisoitu kromosomin 3 p-käsivarteen. *OXTR*-geeni koodaa yhteensä viittä transkriptivarianttia ja neljää silmukointivarianttia, joista kolmen tiedetään koodaavan proteiinin eri isoformeja. Pisin koodaava silmukointivariantti (*OXTR*-201: 4387 emäsparia, 389 aminohappoa) sisältää 4 eksonia, joista kaksi on koodaavia. Tämän variantin tiedetään toimivan oksitosiinireseptorina. Lyhyemmistä koodaavista varianteista ensimmäinen (*OXTR*-202: 743 emäsparia, 43 aminohappoa) sisältää 3 eksonia, joista yksi on koodaava, ja toinen (*OXTR*-203: 600 emäsparia, 92 aminohappoa) puolestaan 2 eksonia, joista yksi on koodaava. Näiden jälkimmäisten isoformien rakenteita ja funktioita ei tunneta tarkasti. Proteiinia koodaamaton silmukointivariantti on 532 emäsparia pitkä ja se sisältää 2 eksonia. *OXTR*-geeni ilmenee kymmenissä eri kudoksissa, joista merkittäviin geeni ilmenee muun muassa kohdussa, rintarauhasessa, kohdun limakalvolla, aivoissa, keuhkoissa, eturauhasessa ja verisuonissa.

Pisimmän transkriptivariantin tuote, 389 aminohapon pituinen oksitosiinireseptori on G-proteiinivälitteinen transmembraaniproteiini. Proteiini toimii fosfatidyli-inositoli-kalsium välitteisen toisiolähettiketjun kautta, jonka aktivoijana toimivat G-proteiinit. Oksitosiinireseptori ja sitä koodaava *OXTR* on liitetty eri ontologialuokkiin, joista merkittävimpänä ryhmänä on biologiset prosessit. Nämä prosessit liittyvät muun muassa verenpaineen säätelyyn, synnytykseen, maidon eritykseen, isoajvojen ja sydämen kehitykseen sekä erektioon ja sosiaaliseen käyttäytymiseen. Molekulaarisista funktioista geeniin on liitetty G-proteiinivälitteinen reseptoriaktivaatio, peptidihormonien sitominen sekä antidiureettiseen hormoniin liittyvä reseptoriaktiivisuus. Solukomponenteista geeni puolestaan yhdistetään yleisesti solukalvoon. Ontologialuokista muodostetut puut löytyvät liitteestä 1. Kuva L1 käsittää solukomponentit, kuva L2 kertoo lisääntymiseen liittyvistä biologisista prosesseista ja kuva L3 puolestaan yhdistää biologisia prosesseja ja molekulaarisia funktioita G-proteiinivälitteisyyteen liittyen.

OXTR-geenille löytyy ihmisen lisäksi ortologit 256 selkärangaislajista, joista fylogeneettiseen analyysiin valittiin kahdeksan. Fylogeneettisessa analyysissä mRNA-ortologien perusteella muodostetun puun (kuva 1) kaikki haarat saivat hyvää tukea (posterior-arvo > 0.9). Puun topologia noudattaa suurilta osin aikaisemmin esitettyjä arvioita selkärankaisten lajiutumuksesta. Simpanssi on ihmisen lähin sukulainen ja reesusmakaki on puussa lähimpänä ihmistä ja simpanssia. Puun perusteella hiiri ja lammas ovat ihmiselle läheisempiä sukulaisia kuin koala. Ihmisen kaukaisemmiksi sukulaisiksi jäävät puun perusteella kana, tropiikkikynsisammakko ja seeprakala, jotka ovat nisäkässelkärangaisiin suhteutettuna keskenään verrattain läheisiä sukulaisia, vaikka niidenkin välillä on eroa.



Kuva 1. *Fylogeneettisen analyysin pohjalta muodostettu puu OXTR-geenin lajiutumisesta yhdeksässä selkärangaislajissa. Posterior-tukiarvot on merkitty oksien haarautumiskohtiin.*

TULOSTEN TARKASTELU

OXTR-geeni on ortologien perusteella huomattavan konservoitunut selkärangaisissa lajeissa. Oksitosiinireseptorin sitoman oksitosiinin kaltainen hormoni, mesotosiini, on löydetty suurimmasta osasta maalla eläviä selkärangaisia ja toisaalta kaloilta on löydetty oksitosiinin homologi, isotosiini (Gimpl & Fahrenholz, 2001). Tämä saattaa olla syy sille, miksi oksitosiinireseptoreja löytyy kaikista selkärangaisryhmistä. Nisäkkäiden oksitosiinireseptorien ja sammakkojen mesotosiinireseptorien sekä luukalojen isotosiinireseptorien välillä on löydetty samankaltaisuuksia (Gimpl & Fahrenholz, 2001), minkä vuoksi oksitosiinireseptori saattaa toimia myös oksitosiinin kaltaisten hormonien reseptorina. Oksitosiinireseptorin ilmeneminen kudoksissa vaihtelee kuitenkin huomattavasti lajien välillä (Gimpl & Fahrenholz, 2001), mikä voi johtua oksitosiinin laajalle ulottuvista vaikutuksista elimistössä. Esimerkiksi siinä missä rotilla hippokampuksen ventraalisessa subikulumissa havaittiin paljon oksitosiinireseptoreita, jänikseltä, hamsterilta, marsulta ja marmosetilta ei havaittu näitä reseptoreja tältä alueelta lainkaan.

Työssä muodostetun fylogeneettisen puun haarautumiskohdat ovat suurilta osin konsensusessa aikaisempien arvioiden kanssa selkärankaisten lajiutumisen kanssa. Puussa kuitenkin esimerkiksi kanan, seeprakalan ja tropiikkikynsisammakon asennoituminen ei vaikuttaisi olevan täysin linjassa niiden lajiutumishistorian kanssa. Puun posterior-arvojen mukaan se on suhteellisen luotettava, mutta arvoissakin olisi vielä parannettavaa. Omalta osaltaan puun rakenteen luotettavuuteen saattaa vaikuttaa se, että osa valituista sekvensseistä (ortologit simpanssilta, tropiikkikynsisammakolta ja koalalta) ei ollut manuaalisesti annotoituja, vaan tietokoneen laskelmaohjelmien ennustamia. Mutta vaikka sekvenssit vastaisivat hyvin todellisuutta, fylogeneettisessä analyysissä käytetty suurimman uskottavuuden menetelmä ja ohjelman PhyML oletusarvoparametrit ovat voineet olla aineistolle epäsopivia.

KIRJALLISUUSLUETTELO

Bakermans-Kranenburg M. J., & van Ijzendoorn M. H. (2008). Oxytocin receptor (OXTR) and serotonin transporter (5-HTT) genes associated with observed parenting. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 3(2):128-134.

Di Napoli A., Warrier V., Baron-Cohen S., & Chakrabarti B. (2014). Genetic variation in the oxytocin receptor (OXTR) gene in associated with Asperger Syndrome. *Molecular Autism*. 5(48). <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-48>

Edgar R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797. Saatavilla <http://www.drive5.com/muscle/downloads.htm>

Gimpl G., & Fahrenholz F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*. 81(2):629-683.

Inoue T., Kimura T., Azuma C., Inazawa J., Takemura M., Kikuchi T., Kubota Y., Ogita K., & Saji F. (1994). Structural organization of the human oxytocin receptor gene. *J. Biol. Chem.* 269(51):32451-6.

Kimura T., Tanizawa O., Mori K., Brownstein M. J., & Okayama H. (1992). Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 356:526-529.

Liu X., Kawashima M., Miyagawa T., & ym. (2015). Novel rare variations of the oxytocin receptor (OXTR) gene in autism spectrum disorder individuals. *Hum. Genome Var.* 2:15024.

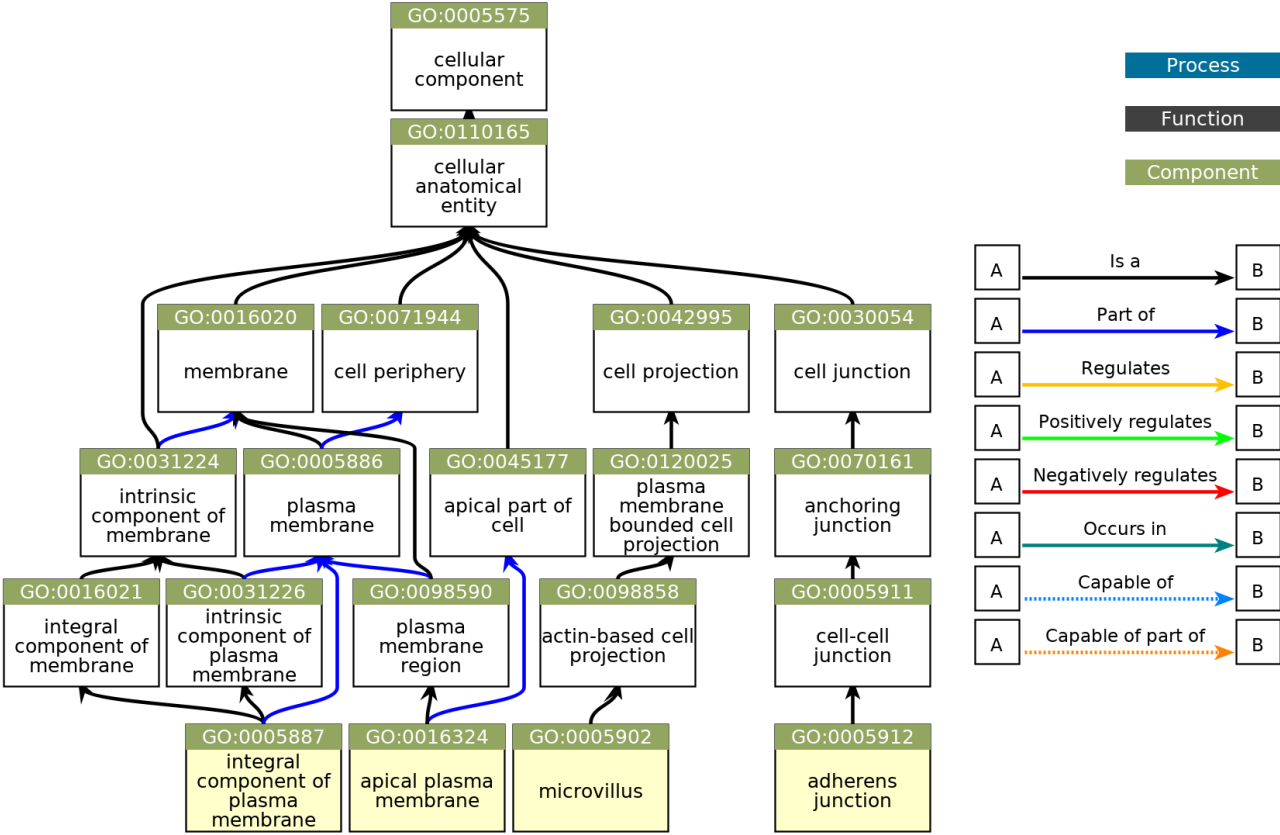
Malik A. I., Zai C. C., Abu Z., Nowrouzi B., & Beitchman J. H. (2012). The role of oxytocin and oxytocin receptor gene variants in childhood-onset aggression. *Genes, Brain and Behaviour*. 11(5):545-551.

Rambaut A. (2018). FigTree v1.4.4. Saatavilla <http://github.com/rambaut/figtree/releases>

Soloff M. S., Alexandrova M., & Fernstrom M. J. (1979). Oxytocin receptors: Triggers for Parturition and Lactation?. *Science*. 204:1313-1315.

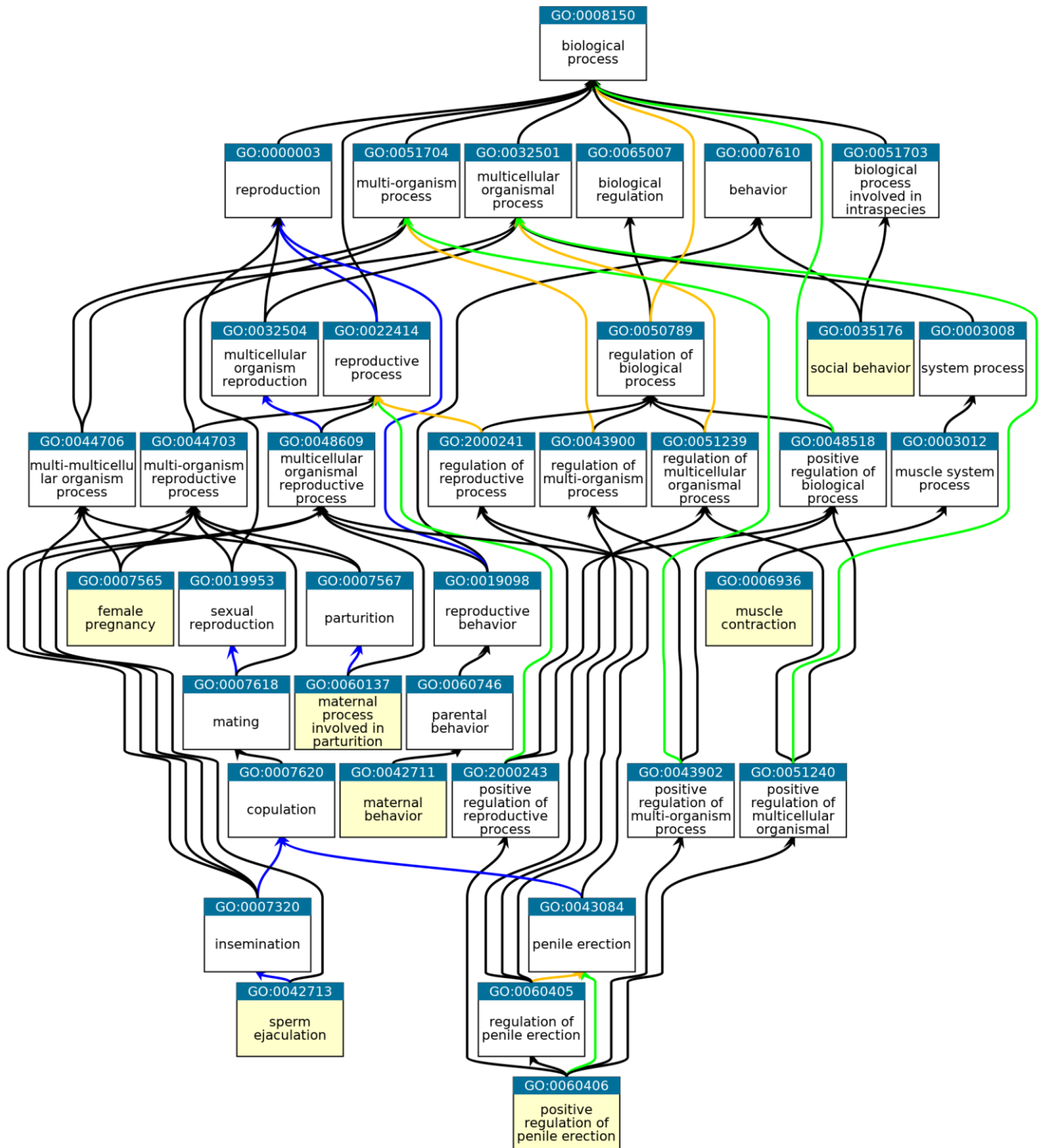
Zingg H. H., & Laporte S. A. (2003). The oxytocin receptor. *Trends in endocrinology and metabolism*. 14(5):222-227.

LIITE 1



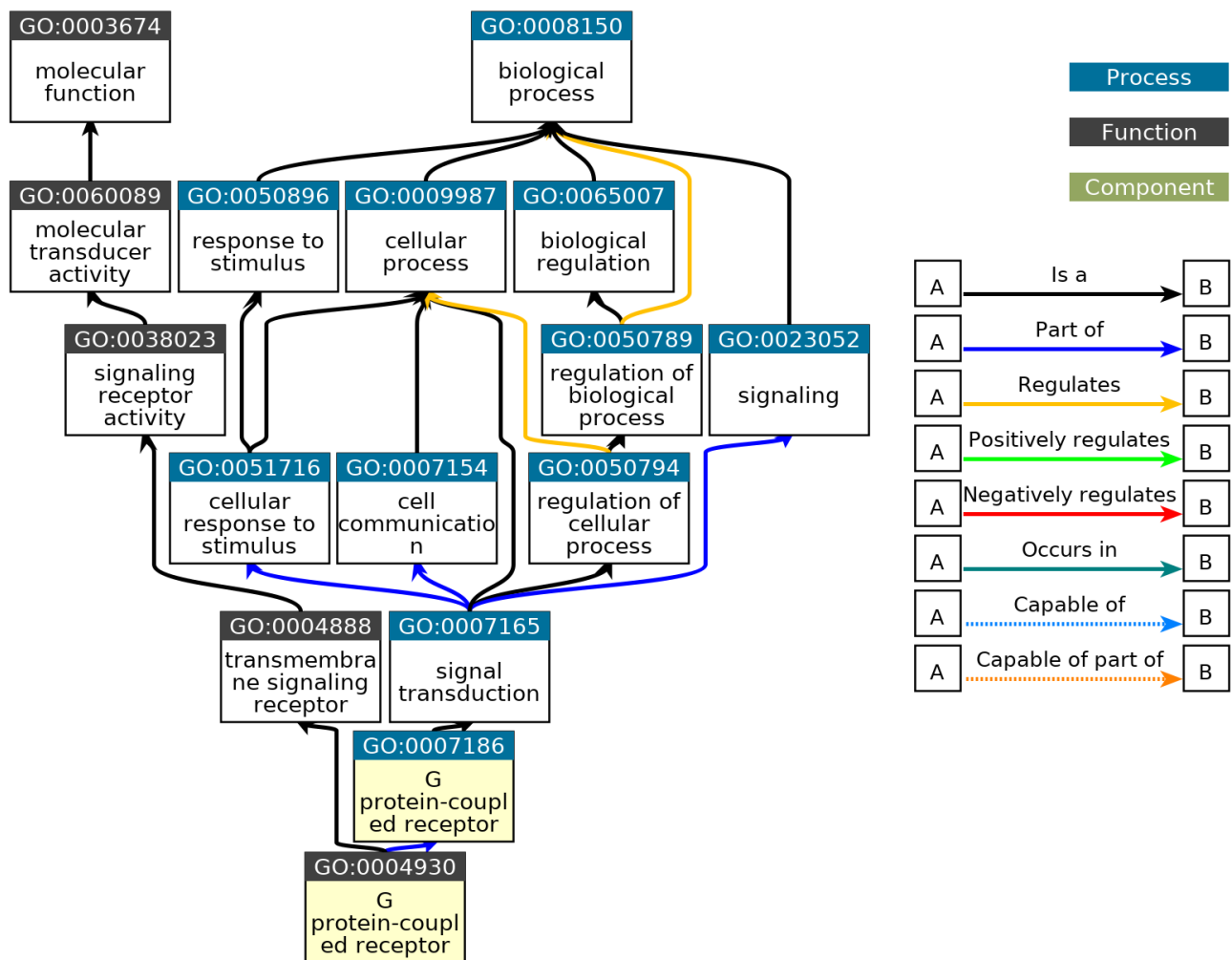
QuickGO - <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

L1. *Geeniontologiapuu OXTR-geeniin liittyvistä solukomponenteista.*



QuickGO - <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

L2. *Geeniontologiapuu OXTR-geenin lisääntymiseen liittyvistä biologisista prosesseista.*



QuickGO - <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

L3. *Geeniontologiapuu OXTR-geenin G-proteiinivälitteisyyteen liittyvien biologisten prosessien ja molekulaaristen funktioiden yhteyksistä.*