DOI:10.16016/j.1000-5404.201512137

树突状细胞中 Rab40b/c 相互作用蛋白质的鉴定研究

张立群,李园园,万 瑛 (400038 重庆,第三军医大学科研部生物医学分析测试中心)

[摘要] **目的** 改进串联亲和纯化质谱(TAP-MS)技术,鉴定并验证 Rab40b 和 Rab40c 在树突状细胞中的相互作用蛋白质。**方法** 用分子克隆技术构建融合蛋白基因 eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6×His-EYFP-Rab40c 的表达载体,采用慢病毒感染建立融合蛋白 eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6×His-EYFP-Rab40c 稳定表达的树突状细胞系。改进串联亲和纯化技术,通过 eXact-6×His 标签进行新型串联亲和纯化和 qTOF 液质检测,运用 CompPASS 算法过滤和 GO 富集分析,鉴定 Rab40b 和 Rab40c 的相互作用蛋白,并采用免疫共沉淀验证。**结果** 成功构建 eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6×His-EYFP-Rab40c 融合蛋白稳定表达的树突状细胞系。采用新型串联亲和纯化方法,鉴定获得 26 个 Rab40b 高可信相互作用蛋白和 16 个 Rab40c 高可信相互作用蛋白。Rab40b、Rab40c 分别与 ElonginB、ElonginC、Cullin5 具有相互作用。**结论** 成功建立新型串联亲和纯化方法。ElonginB、ElonginC、Cullin5 是 Rab40b、Rab40c 的相互作用蛋白。

[关键词] 树突细胞;Rab40b/c;Cullin5;串联亲和纯化;泛素化连接酶复合物
[中图法分类号] R392-33;R392.12 [文献标志码] A

Identification of Rab40b and Rab40c interacting proteins in dendritic cells

Zhang Liqun, Li Yuanyuan, Wan Ying (Biomedical Analysis Center, Department of Scientific Research Affairs, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify Rab40b and Rab40c interacting proteins in dendritic cells with improved tandem affinity purification strategy. **Method** Vectors expressing eXact-6×His-EYFP-Rab40b or eXact-6×His-EYFP-Rab40c were constructed by molecular cloning techniques. Stable dendritic cell lines (DC2.4) expressing eXact-6×His-EYFP-Rab40b protein and eXact-6×His-EYFP-Rab40c protein were constructed by high-titer lentiviral transduction. Tandem affinity purification strategy was improved to use eXact-6×His tag to perform tandem purification and qTOF liquid mass spectrometry. Rab40b and Rab40c interacting proteins were screened by unbiased comparative metrics-based algorithm (CompPASS) and gene ontology enrichment analysis. The interacting proteins were identified by eXact pull-down and co-immunoprecipitation. **Results** Stable dendritic cell lines (DC2.4) expressing eXact-6×His-Rab40b protein and eXact-6×His-Rab40c protein were constructed respectively. Twenty-six high-confidence Rab40b interacting proteins and 16 high-confidence Rab40c interacting proteins were identified by improved tandem affinity purification. Rab40b and Rab40c interacted with ElonginB, ElonginC and Cullin5. **Conclusion** The tandem affinity purification strategy is improved successfully. ElonginB, ElonginC and Cullin5 are interacting proteins of Rab40b and Rab40c.

[**Key words**] Rab40b/c; Cullin5; tandem affinity purification; ubiquitin ligase complex

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan (973 Program, 2010CB534908). Corresponding author: Wan Ying, E-mail:wanying.cn@gmail.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2010CB534908)
[通信作者] 万 瑛,E-mail:wanying.cn@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160304.1011.007.html(2016-03-04)

树突状细胞(dendritic cell,DC)作为主要的专职抗原递呈细胞,是免疫反应中的信息交换中心。在处理入侵病原体和触发适应性免疫的过程中,树突状细胞组织复杂的膜转运事件[1-2]。细胞内膜的动态转运

包括囊泡出芽、运动、对接、融合等过程[3]。系统性整合这些过程的主要调节蛋白就是 Rab GTP 酶[4]。Rab GTP 酶属于小 GTP 酶 Ras 超家族,现已知人类至少有 60 种 Rab 蛋白,定位于特殊的亚细胞囊泡区域参与特定的囊泡转运途径。

根据 Rab GTP 酶的序列和功能,可以将其分为 10 个亚家族,分别为 Rab1、Rab3、Rab4、Rab5、Rab6、Rab8、Rab11、Rab22、Rab27、Rab40[5]。Rab40 家族中的成员在结构上与其他 Rab 分子有着显著的不同,其中就包括 C 末端含有的 SOCS 结构域[6]。有研究报道非洲爪蟾 XRab40 通过调节非经典 Wnt 通路影响胚胎发育[7]。Wnt 信号通路对细胞命运、细胞迁移和细胞极性起到重要的调控作用[8],包括经典的 Wnt/β-catenin 依赖通路和非经典通路[9]。Wnt 家族中的 Wnt5a 的过表达可以抑制浆细胞样树突状细胞(pDC)和经典树突状细胞(cDC)的分化,非经典 Wnt 通路对树突状细胞的分化进行负调节[10]。Notch 通路可激活经典 Wnt 通路进而上调经典树突状细胞(cDC)的分化[11]。经典 Wnt 通路和非经典 Wnt 通路均对树突状细胞的分化有着重要的影响[10-11]。因此,本研究拟通过在树突状细胞鉴定 Rab40 的相互作用蛋白,为阐述树突状细胞分化过程中 Wnt 通路的调控机制奠定基础。

串联亲和纯化是研究蛋白质相互作用的重要方法之一,传统的串联亲和纯化方法由于存在高的抗体蛋白背景以及纯化产物中会混入标签蛋白,会影响对纯化的蛋白质的质谱分析[12]。因而本研究建立基于 eXact 和 6×His 标签的新型串联亲和纯化方法,提高纯化效率及纯度。本研究在改进的串联亲和纯化技术的基础上,分析鉴定了树突状细胞中 Rab40b 和 Rab40c 的相互作用蛋白质,并通过免疫共沉淀验证了其相互作用,为进一步阐述 Rab40 在树突状细胞中的生物学功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

FUGW-eXact-6×His 质粒由本实验室保存,小鼠 Rab40b 和 Rab40c 的 cDNA 购自美国 Openbiosystem 公司;T_4 DNA 连接酶购自 Promega 公司,限制性内切酶(*Bam*HⅠ、*Bsr*GⅠ、*Eco*RⅠ)均购自 New England Biolabs 公司;psPAX2 和 pMD2.G 质粒由瑞士 Trono 实验室惠赠,DC2.4 细胞由美国 Dana Farber 肿瘤研究所提供,胎牛血清、DMEM 高糖培养基和 RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,DMSO 购自 Sigma 公司;NP40 购自 Sigma 公司,蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司;蛋白裂解液和蛋白定量 BCA 试剂盒购自碧云天生物技术研究所,4%~12%预制凝胶购自 Invitrogen 公司,ElonginB、ElonginC 和 Cullin5 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记的驴抗山羊 IgG,分别购自 Cell Signaling 和碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 构建融合蛋白基因 eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6×His-EYFP-Rab40c 的表达载体

上游引物 5′-TATATATGTACATGAGCTCCCTGGGCAGCC-3′,下游引物 5′-CGGCGAATTCCTAAGAAATTTTGCAGCTGTTC-3′,扩增带有 *Bsr*GⅠ和 *Eco*RⅠ酶切位点的 Rab40b;上游引物 5′-TATATGTACATGGGCACCCAGGGCAGACCAG-3′,下游引物 5′-CGGCGAATTCCTAGGAGATCTTGCAGGGTCTC-3′,扩增带有 *Bsr*GⅠ/*Eco*RⅠ酶切位点的 Rab40c 酶切后与 FUeXact-6×His-EYFP 质粒连接,获得 FUGW-eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 FUGW-eXact-6×His-EYFP-Rab40c 慢病毒表达载体。上游引物 5′-GGATCCATGGTGTCTAAGGGCGAAGA-3′,下游引物 5′-GGTACCCTCGAGATCTGAGTCCGGAATT-3′,扩增带有 *Bam*HⅠ和 Acc65Ⅰ酶切位点的 TagRFP 片段,酶切后与 FUGW-eXact-6×His-EYFP-Rab40b 连接,获得 FUGW-eXact-6×His-RFP-Rab40b。

1.2.2 构建融合蛋白 eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6×His-EYFP-Rab40 稳定表达的树突状细胞系

通过磷酸钙沉淀转染 293FT 细胞的方法包装 FUGW-eXact-6×His-EYFP-Rab40b、FUGW-eXact-6×His-EYFP-Rab40c 和 FUGW-eXact-6×His-RFP-Rab40b 慢病毒。病毒感染 DC2.4 细胞,经流式细胞仪分选获得稳定表达 eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6×His-EYFP-Rab40c 融合蛋白的细胞系。FUGW-eXact-6×His-RFP-Rab40b 和 FUGW-eXact-6×His-EYFP-Rab40c 共转染 DC2.4 细胞系,获得共表达 RFP-Rab40b 和 EYFP-Rab40c 融合蛋白的 DC2.4 细胞系。共聚焦显微镜观察 Rab40b 和 Rab40c 的共定位。

1.2.3 串联亲和纯化质谱鉴定 Rab40b 和 Rab40c 的相互作用蛋白复合物

eXact-6×His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6×His-EYFP-Rab40c 稳定表达的 DC2.4 细胞(3×10^7)经反复冻融裂解,10 000×*g* 离心 15 min,收集上清,经 eXact 柱纯化,洗脱上清加入 Ni-NTA 柱纯化,将结合的 Rab40b/c 相互作用蛋白复合物酶解后,经纳米级液相色谱-串联质谱仪检测,质谱设定为:1 800 V 毛细管电压,MS/MS 扫描模式,50~1 500 m/z 范围内用 4 Hz 速率扫描。采用 MASCOT 2.0 软件鉴定蛋白,采用无偏比较指标算法(CompPASS)分析 Rab40b/c 的相互作用蛋白,并进行权重打分[13-14]。经过统计学分析,设定高可信蛋白阈值为 56.02,蛋白

权重分值与高可信蛋白阈值的比值(DN-Score)≥1 的蛋白被认定为高可信的相互作用蛋白。

1.2.4 免疫共沉淀验证蛋白质相互作用 提取 eXact-6 × His-EYFP-Rab40b、eXact-6 × His-EYFP-Rab40c 和 eXact-6 × His-EYFP 的 DC2.4 细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 SDS 上样缓冲液,95 ℃ 5 min 加热变性处理。取 30 μg/孔蛋白样品上样,经 4% ~12% 梯度预制凝胶电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,与 ElonginB、ElonginC、Cullin5 抗体 4 ℃ 摇床孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 15 min,室温孵育 HRP 标记的抗体 1 h,TBST 洗 3 次,每次 15 min,ECL 化学发光显影。

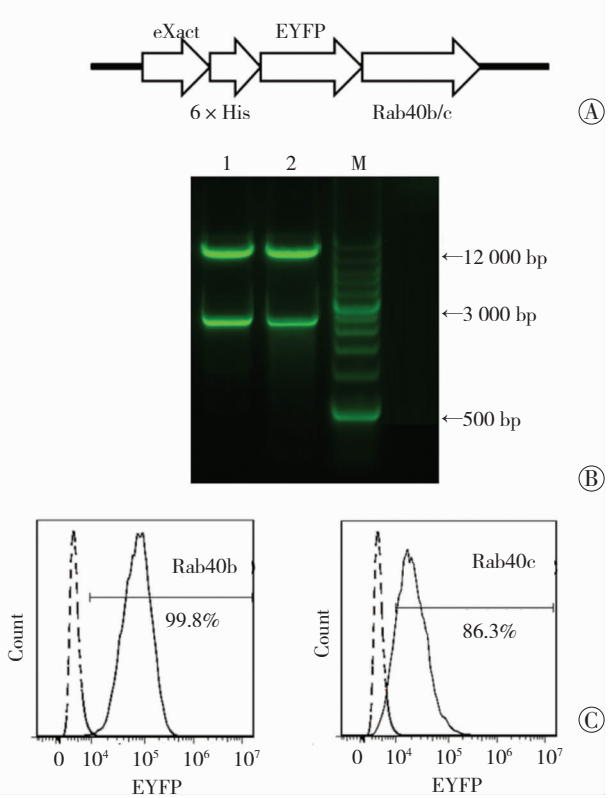
2 结果

2.1 融合蛋白 eXact-6 × His-EYFP-Rab40b 和 eXact-6 × His-EYFP-Rab40c 稳定表达的树突状细胞系的构建

构建的 FUGW-eXact-6 × His-EYFP-Rab40b 和 FUGW-eXact-6 × His-EYFP-Rab40c 质粒中,融合蛋白表达框如图 1A 所示,经 Acc65 Ⅰ 酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳显示质粒被切割成 2kb 和 9kb 两个片段(图 1B)。FUGW-eXact-6 × His-EYFP-Rab40b/c 质粒和 psPAX2 和 pMD2.G 质粒经 $CaCl_2$ 转染 293FT 细胞得到慢病毒,转染 DC2.4 细胞系,获得 eXact-6 × His 标签分别和 Rab40b、Rab40c 融合蛋白稳定表达的树突状细胞系。以 DC2.4 细胞作为对照,检测分选后 Rab40b 和 Rab40c 表达的细胞系阳性率分别为 99.8% 和 86.3%(图 1C)。

2.2 串联亲和纯化质谱鉴定 Rab40b/c 在树突状细胞中的蛋白复合物

串联亲和纯化(图 2A)有 20% 的相互作用蛋白被捕获,经 MASCOT 2.0 软件分析和 CompPASS 打分筛选后,获得 26 个 Rab40b 高可信相互作用蛋白和 16 个 Rab40c 高可信相互作用蛋。采用 DAVID 在线分析系统进行基因注释(Gene Ontology,GO)分析,根据生物学途径注释聚类分析显示 Rab40b 和 Rab40c 高可信相互作用蛋白富集在蛋白质和大分子降解代谢过程(富集打分 3.23,图 2B)。



A:融合蛋白表达框;B:质粒酶切鉴定电泳结果 1:Rab40b;2:Rab40c;M:标准;C:流式细胞仪鉴定 Rab40b(左)和 Rab40c(右)表达

图 1 稳定表达 Rab40b/c 标签的树突状细胞系的构建

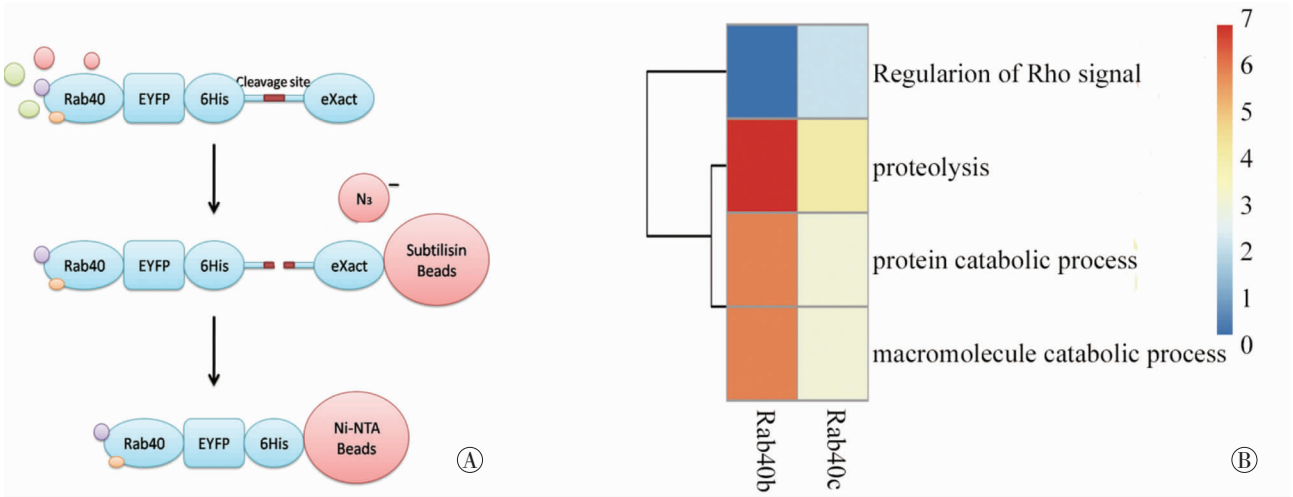


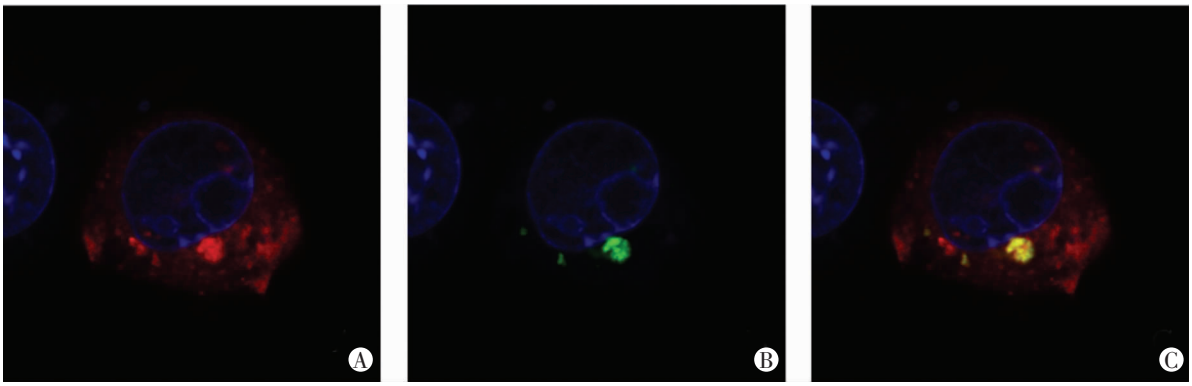
图 2 新型串联亲和纯化方案(A)及相互作用蛋白功能注释聚类(B)

2.3　Rab40b/c 与蛋白复合体相互作用验证

串联亲和质谱分析结果显示以 Rab40b 为诱饵蛋白时找到的相互作用蛋白中包括 Rab40c(表 1),稳定共表达 RFP-Rab40b 和 EYFP-Rab40c 融合蛋白,共聚焦显微镜观察发现 Rab40b 在细胞质内呈现广泛分布,而 Rab40c 聚集分布并与 Rab40b 显著共聚(图 3)。免疫共沉淀结果显示 Rab40b 和 Rab40c 均与 ElonginB、ElonginC、Cullin5 存在相互作用(图 4)。

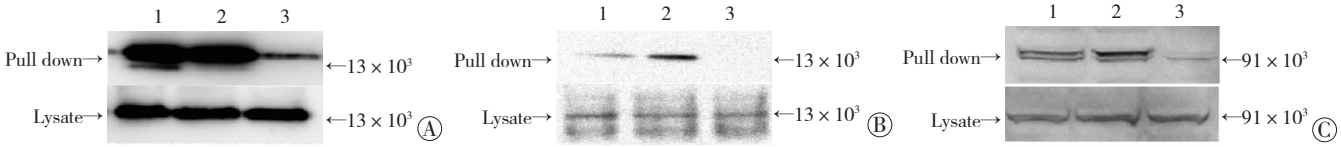
表 1　Rab40b 和 Rab40 c 的高可信相互作用蛋白

诱饵蛋白	相互作用蛋白	全称	权重打分(WD Score)	权重打分与高可信蛋白阈值比值(DN-Score)
Rab40b	FBX4	F-box protein 4	22179	395
Rab40b	ELOB	transcription elongation factor B(SIII),polypeptide 2;ElonginB	8205	146
Rab40b	RB40C	Rab40c, member RAS oncogene family	6114	109
Rab40b	DPOG1	polymerase (DNA directed), gamma	2867	51
Rab40b	CRYAB	crystallin, alpha B	2296	40
Rab40b	K0913	RIKEN cDNA 2310021P13 gene	2160	38
Rab40b	SPAG5	sperm associated antigen 5	2093	37
Rab40b	ZZEF1	zinc finger, ZZ-type with EF hand domain 1	1446	25
Rab40b	SYAC	alanyl-tRNA synthetase	1327	23
Rab40b	ELOC	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1;ElonginC	1082	19
Rab40b	KCNB1	potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 1	1060	18
Rab40b	FGD5	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5	918	16
Rab40c	ABCB8	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8	17786	317
Rab40c	BICD1	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	13910	248
Rab40c	RPAB2	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	11864	211
Rab40c	ELOB	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2;ElonginB	7200	128
Rab40c	OSR2	odd-skipped related 2	1371	24
Rab40c	DPYL5	dihydropyrimidinase-like 5	928	16
Rab40c	CUL5	cullin 5	810	14



A:Rab40b 在树突状细胞内的表达;B:Rab40c 在树突状细胞内的表达;C:Rab40b 和 Rab40c 在树突状细胞内的共表达

图 3　激光共聚焦显微镜镜观察 Rab40b 和 Rab40c 在树突状细胞内的分布　(×100)



1:Rab40b; 2:Rab40c; 3:eXact

图 4　免疫共沉淀鉴定 Rab40b/c 与 ElonginB(A)、ElonginC(B)、Cullin5(C)相互作用

3 讨论

蛋白质通常形成蛋白质复合物执行其生物学功能,研究蛋白质相互作用研究对了解疾病发生、发展尤为重要[15]。基于串联亲和纯化质谱蛋白组学工具可在生理条件下鉴定蛋白相互作用复合物[16]。传统的串联亲和纯化标签由葡萄球菌蛋白 A(ProtA)和钙调蛋白结合肽(CBP)组成,通过两步纯化获得蛋白质复合物[17-18]。由于该方法存在效率较低的问题,本实验采用基于 eXact 和 6×His 标签的串联亲和纯化构建方法,首先在 eXact 标签纯化时加入叠氮化钠激活枯草杆菌蛋白酶精准切割融合蛋白的 eXact 标签,高效温和洗脱诱饵蛋白结合复合体,该方法有 20% 的相互作用蛋白被捕获,相较传统串联亲和纯化方法提高了纯化效率。

通过此串联亲和纯化方法,MASCOT 2.0 软件鉴定获得 Rab40b 和 Rab40c 的相互作用蛋白分别为 184 个和 163 个,数据经过 CompPASS 打分筛选后,获得 26 个 Rab40b 高可信相互作用蛋白和 16 个 Rab40c 高可信相互作用蛋。Rab40b 的 26 个高可信相互作用蛋白质中包含 Rab40c,共聚焦结果显示 Rab40b 在细胞内广泛分布,Rab40c 聚集分布且与 Rab40b 在空间上共定位。人少突胶质细胞系(HOG 细胞)和人子宫颈癌细胞系(HeLa 细胞)内 Rab40c 定位于靠近细胞核的囊泡结构,参与囊泡转运过程[19]。空间位置上的共定位及质谱鉴定二者具有相互作用提示了 Rab40c 在树突状细胞中通过与 Rab40b 形成复合物参与囊泡转运相关的过程。根据生物学途径进行 DAVID 在线聚类分析发现 Rab40b 和 Rab40c 相互作用蛋白主要参与蛋白质降解相关过程[20-21],FBX4、RB40C、ASB2、CAND1、ELOB 和 ELOC 这些 Rab40 的相互作用蛋白和 CUL5、ELOB、UBE2O 这些 Rab40c 的相互作用蛋白共同参与大分子和蛋白代谢过程等 GO 分类的生物学途径。其中与泛素化相关的蛋白质包括 FBX4、ELOB、CUL5、CAND1、ELOC、UBE2O 和 ASB2。ElonginB/C-Cullin5-SOCS-box 蛋白是已知的 E3 泛素化连接酶,并且在鉴定的 Rab40b 和 Rab40c 高可信相互作用蛋白中,文献[22]报道 ASB2 是此 E3 泛素化连接酶的亚单位,参与调控树突状细胞迁移。而 UBE2O 被报道是 E2 泛素化连接酶,抑制 TRAF6 聚泛素化,阻止 NF-κB 通路激活,参与调节溶酶体蛋白运输过程[23]。FBX4 和 CAND1 是 Skp1-Cullins-F-box 蛋白复合物 E3 连接酶的组成成分[24]。这些 Rab40b/c 相互作用蛋白功能分析提示 Rab40b/c 在树突状细胞胞质中参与 Cullin5 依赖的泛素化过程。

泛素化过程由 E1-E2-E3 酶激活,通过传递泛素分子至底物进行泛素化降解[25]。Cullin 是 E3 泛素化连接酶的重要组成成分,Cullin 分子可以作为脚手架分别在其 N 末端和 C 末端募集底物结合蛋白和环指蛋白,具有 SOCS 结构域的蛋白可以形成 ElonginB/C-Cullin5-SOCS 泛素化连接酶复合物[26]。泛素化系统可调控 Wnt 通路,β-catenin 是重要的泛素化底物。7 次跨膜 G 蛋白 the Frizzled(Fz)受体是重要的 Wnt 通路膜受体。胞浆 Dishevelled(Dsh)蛋白是经典 Wnt 通路和非经典 Wnt 通路的共同关键作用因子[27]。研究验证一些泛素化连接酶在泛素化和蛋白降解过程中作用于 Dishevelled(Dsh)蛋白[28]。泛素化连接酶复合物是 Wnt 通路信号转导的重要调控因子。非洲爪蟾 Rab40 可以与 ElonginB/C 和 Cullin5 形成泛素化连接酶复合物通过作用定位于膜上的 Dsh 蛋白调节非经典 Wnt 通路[7]。本研究数据证实 Rab40b/c 与 ElonginB、ElonginC、Cullin5 形成蛋白复合物,提示 Rab40b/c 与 Cullin5-ElonginB-ElonginC 泛素化 E3 连接酶形成蛋白复合物,从而区域化此泛素化 E3 连接酶功能并且 Rab40b/c 可能参与 Wnt 信号通路。

本研究通过改良后的串联亲和纯化质谱获得小鼠树突状细胞 Rab40b/c 的相互作用蛋白质,再经过基于无偏见的比较指标算法 CompPASS 进行权重打分,获得大量高可信相互作用蛋白。随后通过免疫共沉淀实验验证 Rab40b/c 与 ElonginB/C、Cullin5 的相互作用。本实验提示 Rab40b/c 通过形成泛素化连接酶复合物参与细胞内的泛素化过程,但对于 Rab40b/c 如何参与泛素化过程及是否参与 Wnt 通路或其他信号通路等问题未能阐述的更加深入和清楚,因此 Rab40b/c 通过参与泛素化过程影响树突状细胞生物学功能的机制还需进一步研究。

参考文献:

[1] Garrett W S, Chen L M, Kroschewski R, *et al*. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42[J]. Cell, 2000, 102(3): 325-334.

[2] Reis-e-Sousa C. Dendritic cells in a mature age[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(6): 476-483. DOI: 10.1038/nri1845

[3] Stow J L. Nobel Prize discovery paves the way for immunological traffic[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(12): 839-841. DOI: 10.1038/nri3564

[4] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(2): 107-117. DOI: 10.1038/35052055

[5] Stenmark H, Olkkonen V M. The Rab GTPase family[J]. Genome Biol, 2001, 2(5): REVIEWS3007.

[6] Yatsu A, Shimada H, Ohbayashi N, *et al*. Rab40c is a novel Varp-binding protein that promotes proteasomal degradation of Varp in melanocytes[J]. Biol Open, 2015, 4(3): 267 - 275. DOI: 10.1242/bio.201411114

[7] Lee R H, Iioka H, Ohashi M, *et al*. XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway[J]. EMBO J, 2007, 26(15): 3592 - 3606. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601781

[8] Staal F J, Luis T C, Tiemessen M M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(8): 581 - 593. DOI: 10.1038/nri2360

[9] Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 781 - 810. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126

[10] Xiao J, Zhou H, Wu N, *et al*. The non-canonical Wnt pathway negatively regulates dendritic cell differentiation by inhibiting the expansion of Flt3(+) lymphocyte-primed multipotent precursors[J]. Cell Mol Immunol, 2015. DOI: 10.1038/cmi.2015.39 [Epub ahead of print]

[11] Zhou J, Cheng P, Youn J I, *et al*. Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation [J]. Immunity, 2009, 30(6): 845 - 859. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.03.021

[12] Maine G N, Li H, Zaidi I W, *et al*. A bimolecular affinity purification method under denaturing conditions for rapid isolation of a ubiquitinated protein for mass spectrometry analysis[J]. Nat Protoc, 2010, 5(8): 1447 - 1459. DOI: 10.1038/nprot.2010.109

[13] Behrends C, Sowa M E, Gygi S P, *et al*. Network organization of the human autophagy system[J]. Nature, 2010, 466 (7302): 68 - 76. DOI: 10.1038/nature09204

[14] Sowa M E, Bennett E J, Gygi S P, *et al*. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape [J]. Cell, 2009, 138(2): 389 - 403. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.042

[15] Burckstummer T, Bennett K L, Preradovic A, *et al*. An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells[J]. Nat Methods, 2006, 3 (12): 1013 - 1019. DOI: 10.1038/nmeth968

[16] Puig O, Caspary F, Rigaut G, *et al*. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification[J]. Methods, 2001, 24(3): 218 - 229. DOI: 10.1006/meth.2001.1183

[17] Gavin A C, Bosche M, Krause R, *et al*. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes[J]. Nature, 2002, 415(6868): 141 - 147. DOI: 10.1038/415141a

[18] Knuesel M, Wan Y, Xiao Z, *et al*. Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system[J]. Mol Cell Proteomics, 2003, 2(11): 1225 - 1233. DOI: 10.1074/mcp.T300007-MCP200

[19] Rodriguez-Gabin A G, Almazan G, Larocca J N. Vesicle transport in oligodendrocytes: probable role of Rab40c protein[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(6): 758 - 770. DOI: 10.1002/jnr.20121

[20] Huang-da W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 44 - 57. DOI: 10.1038/nprot.2008.211

[21] Huang-da W, Sherman B T, Lempicki R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(1): 1 - 13. DOI: 10.1093/nar/gkn923

[22] Lamsoul I, Metais A, Gouot E, *et al*. ASB2α regulates migration of immature dendritic cells[J]. Blood, 2013, 122 (4): 533 - 541. DOI: 10.1182/blood-2012-11-466649

[23] Hao Y H, Doyle J M, Ramanathan S, *et al*. Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination[J]. Cell, 2013, 152(5): 1051 - 1064. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.051

[24] Flick K, Kaiser P. Set them free: F-box protein exchange by Cand1[J]. Cell Res, 2013, 23(7): 870 - 871. DOI: 10.1038/cr.2013.55

[25] Hochstrasser M. Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly[J]. Cell, 2006, 124(1): 27 - 34. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.025

[26] Petroski M D, Deshaies R J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(1): 9 - 20. DOI: 10.1038/nrm1547

[27] Wharton K A Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction[J]. Dev Biol, 2003, 253(1): 1 - 17.

[28] Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, *et al*. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (12): 11327 - 11335. DOI: 10.1074/jbc.M312389200

(收稿:2015-12-23;修回:2016-01-21)

(编辑 吴培红)