

· 基础研究 ·

HEK 293T 细胞中 TRAF6 多聚泛素化修饰 KLF5 的方式及其修饰位点的鉴定

李 玉, 应 帅, 葛 文, 阮玉婷, 吴宁霞, 王伟民, 张 婧, 邱 文*, 王迎伟*

南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 研究人胚肾 293T (HEK 293T, 简称 293T) 细胞中外源性肿瘤坏死因子受体相关因子 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 与 Krüppel 样因子 5 (Krüppel-like factor 5, KLF5) 的结合及 TRAF6 多聚泛素化修饰 KLF5 的方式和修饰的位点。方法: 将构建的 Flag-TRAF6、HA-KLF5、泛素过表达质粒、shTRAF6 小干扰质粒和 TRAF6 C70A 位点突变质粒行不同组合转染 293T 细胞 48 h。用免疫沉淀 (immunoprecipitation, IP) 和免疫印迹 (immunoblotting, IB) 实验检查 TRAF6 与 KLF5 的结合以及 KLF5 K63 或 K48 多聚泛素化水平。此外, 构建 KLF5 全部赖氨酸突变的质粒, 分别与 TRAF6 质粒共转染 293T 细胞。用前述 IP/IB 检测 KLF5 K63 连接的多聚泛素化修饰, 并确定 KLF5 K63 泛素化修饰的位点。结果: 293T 细胞中 TRAF6 能与 KLF5 结合; TRAF6 过表达和基因沉默或 TRAF6 酶活性缺失能相应上调或下调 KLF5 K63 的多聚泛素化; KLF5 被 TRAF6 K63 多聚泛素化修饰的位点是其第 99 位和第 100 位的赖氨酸。结论: TRAF6 能与 KLF5 相互作用, 并对 KLF5-K99 和 K100 进行 K63 多聚泛素化修饰。

[关键词] 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; Krüppel 样因子 5; K63 连接的多聚泛素化修饰; HEK 293T 细胞

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)04-445-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20230401

The pattern and site identification of KLF5 polyubiquitination by TRAF6 in HEK 293T cells

LI Yu, YING Shuai, GE Wen, RUAN Yuting, WU Ningxia, WANG Weimin, ZHANG Jing, QIU Wen*, WANG Yingwei*

Department of Immunology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To study the binding of exogenous tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to Krüppel-like factors 5 (KLF5) as well as the pattern and site of KLF5 polyubiquitination by TRAF6 in HEK 293T (i.e. 293 T) cells. **Methods:** The 293T cells were co-transfected with Flag-TRAF6, HA-KLF5 and ubiquitin (Ub) expression plasmids, or shTRAF6 and TRAF6 C70A plasmids in different combinations for 48 h. Then, the binding of TRAF6 to KLF5 and KLF5 K48/K63-linked polyubiquitination by TRAF6 were detected using immunoprecipitation (IP) and immunoblotting (IB) assays. Moreover, the plasmids with all lysine mutation of KLF5 were constructed, and co-transfected with TRAF6 overexpression plasmids into 293T cells. Thereafter, the level of KLF5 K63-linked polyubiquitination and the lysine (site) of KLF5 K63-linked polyubiquitination were measured or identified by IP and IB. **Results:** TRAF6 and KLF5 in 293T cells could bind with each other. The overexpression of TRAF6 up-regulated while the knockdown or activity deficiency of TRAF6 down-regulated the level of KLF5 K63-linked polyubiquitination. The site of KLF5 K63-linked polyubiquitination was its K99 or K100 lysine. **Conclusion:** TRAF6 can interact with KLF5 and modify the K99 and K100 of KLF5 via K63-linked polyubiquitination.

[Key words] tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; Krüppel-like factors 5; K63-linked polyubiquitination; HEK 293T cell

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(04): 445-451]

[基金项目] 国家自然科学基金 (81971468, 82171740)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: qiuwen@njmu.edu.cn; wangyw1508@njmu.edu.cn

系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是人类发病率较高的肾小球疾病(如IgA型肾病),其病理特征是肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)的异常增生及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度分泌,患者可因肾功能衰竭而死亡^[1-2]。大鼠Thy-1肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N)是研究MsPGN的公认模型,其肾脏病变与MsPGN极为相似^[3]。已有研究发现,不论是人的MsPGN,还是大鼠的Thy-1N,其GMC表面均有补体C5b-9复合物的沉积,且此C5b-9多为亚溶解(sublytic)型^[3-5]。已有文献报道,sublytic C5b-9是诱发Thy-1N大鼠GMC病变的始动原,体外用sublytic C5b-9刺激GMC后能导致细胞的增生和ECM的分泌等^[6-7]。

众所周知,细胞受到刺激后能开启多条信号通路,激活或上调某些信号分子、转录因子和蛋白酶类等,调控相应靶基因的转录与表达,最终促使细胞生物学行为发生改变^[7-8]。就Thy-1N而言,本课题组以往的研究已证实,在Thy-1N大鼠发病的肾组织(体内)和受sublytic C5b-9刺激的GMC(体外)中,众多信号分子、转录因子和促增生分子显著上调^[5-8],其中肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)^[9]和Krüppel样因子5(Krüppel-like factor 5, KLF5)^[8]升高明显,且具有一定的促炎和促增生效应。

TRAF6是一个兼有E3泛素连接酶活性的多功能分子,能泛素化修饰多种因子进而调控疾病的过程^[10],其机制涉及TRAF6作用底物的方式,如泛素分子K63或K48连接的多聚泛素化修饰,前者能提高底物的活性,而后者则可降解底物蛋白^[10-11]。KLF5属于含锌指结构的转录因子,其表达升高可诱导靶基因的转录与表达^[12]。本课题前期验证性实验已确定,Thy-1N大鼠发病3 h的肾组织和用sublytic C5b-9刺激3 h的GMC中,TRAF6和KLF5的表达均显著升高(达到峰值)。该结果提示,同步上调的TRAF6和KLF5之间或许有着某种联系。

为了明确TRAF6与KLF5是否存在相互结合,以及TRAF6能否通过其相应的修饰方式(K63/K48)多聚泛素化修饰KLF5,本研究体外利用工具细胞HEK 293T(即293T)观察了TRAF6与KLF5的结合及KLF5被TRAF6多聚泛素化修饰的情况,并对TRAF6多聚泛素化修饰KLF5的位点进行了鉴定。本研究为今后进一步深入探讨TRAF6与KLF5的关系及TRAF6多聚泛素化修饰调控Thy-1N的作用和

机制奠定了重要的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肾293T(HEK 293T,简称293T)细胞由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。Lipofectamine 2000来源于美国赛默飞世尔科技公司;抗-HA tag抗体由武汉三鹰生物技术有限公司提供;抗-Ub(linkage-specific K63)抗体购于美国Abcam公司;抗-DDDDK tag(Binds to FLAG[®] tag sequence)抗体和抗-Ub(linkage-specific K48)抗体由武汉爱博泰克生物技术有限公司提供;小鼠 β -actin单克隆抗体及免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)和IP细胞裂解液来源于上海碧云天生物公司;羊抗兔、鼠IgG-HRP二抗购于合肥Biosharp公司;MG-132购自美国MedChemExpress公司;Nhe I酶、EcoR I酶、Sal I酶和BamH I酶由日本TaKaRa公司供应。HA-KLF5、Flag-TRAF6和HA-KLF5的所有赖氨酸位点突变质粒由安徽通用公司构建;shTRAF6、TRAF6 C70A和泛素(ubiquitin, Ub)质粒均由南京医科大学免疫学系邱文教授提供。

1.2 方法

1.2.1 293T细胞的培养

将293T细胞接种于DMEM完全培养液(含10%胎牛血清)中,置37℃、5% CO₂孵箱中培养48 h。当细胞融合度达到80%以上时,按1:4比例进行传代培养。

1.2.2 质粒测序鉴定与细胞转染

首先,将安徽通用公司构建的所有带有GFP标签的质粒进行酶切、琼脂糖电泳和DNA测序,测序结果行BLAST比对鉴定。在明确质粒构建成功后,先将培养的293T细胞接种到6孔板,待其融合度达80%以上时进行质粒的细胞转染,即用DMEM稀释Lipofectamine 2000和待转染的质粒,静置5 min后将两者混合,再静置15 min后加入293T细胞,置37℃、5% CO₂条件下继续培养48 h。用荧光显微镜观察质粒的转染效率。

1.2.3 IP实验

将HA-KLF5和Flag-TRAF6共转染293T细胞48 h后,加入IP裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解细胞30 min,12 000 r/min离心30 min后吸取上清,同时取少量全细胞裂解液作为Input,剩余裂解液中加入1 μ g抗-Flag tag抗体或抗-HA tag抗体和80 μ L protein A/G-beads(IgG为阴性对照),4℃摇晃孵育过夜。之后,4℃、3 000 r/min离心5 min,弃

去上清,将管底的 protein A/G-beads 用 1 mL 裂解缓冲液洗 3~4 次。最后加 50 μ L 的蛋白 Loading buffer,沸水煮 7 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 用于后续免疫印迹 (immunoblotting, IB) 实验。

1.2.4 IB 实验

取等量 (30 μ g/泳道) IP 得到的蛋白裂解物分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 2 h。用湿转法将蛋白转印到 PVDF 膜上 (0.3 A, 120 min)。之后,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 再加入相应的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 液漂洗 3 次 (每次 10 min) 后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, 用 ECL 化学发光检测。最后对比内参 β -actin, 行半定量分析。

1.2.5 多聚泛素化水平的检测

将 Flag-TRAF6, HA-KLF5 与 Ub 质粒或与 shTRAF6 或 TRAF6 C70A 质粒共转染 293T 细胞 36 h 后, 再用 10 μ mol/L MG132 处理 12 h。用含蛋白酶抑制剂的 IP 裂解缓冲液处理细胞, 裂解细胞后 30 min 行 12 000 r/min 离心 30 min, 其余 IP 和 IB 操作步骤同上 1.2.3 和 1.2.4 所述。最后以 HA tag 定量目的蛋白, 检测其多聚泛素化的修饰水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行统计统计学分析, 所有实验均独立重复 3 次, 所得定量数据以均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$, \bar{x}) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

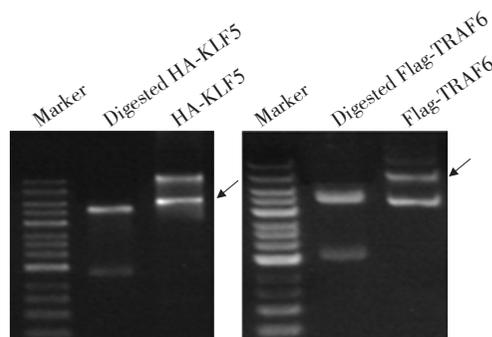
2 结果

2.1 293T 细胞中 TRAF6 与 KLF5 存在作用

2.1.1 Flag-TRAF6 和 HA-KLF5 质粒测序正确

将公司构建的 Flag-TRAF6 和 HA-KLF5 质粒进行酶切电泳和 DNA 测序, 经 BLAST 比对后证实, 目的 DNA 片段已正确插入 pIRES-EGFP 载体中。表明

Flag-TRAF6 和 HA-KLF5 质粒均构建成功 (图 1)。之后, 将 Flag-TRAF6 和 HA-KLF5 质粒共转染至 293T 细胞 48 h, 观察表达 GFP 的细胞占总 293T 细胞的百分比。结果显示, 质粒转染 GMC 48 h 后, 转染效率可达到 70% 以上。



HA-KLF5 或 Flag-TRAF6 质粒双酶切后琼脂糖凝胶电泳的条带。

图 1 HA-KLF5 和 Flag-TRAF6 质粒的鉴定

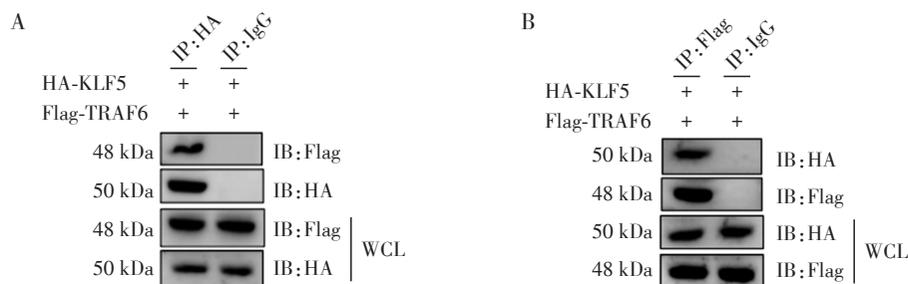
Figure 1 The identification of HA-KLF5 and Flag-TRAF6 plasmids

2.1.2 293T 细胞中 TRAF6 可与 KLF5 结合

为了检查 TRAF6 与 KLF5 能否结合, 我们将 Flag-TRAF6 与 HA-KLF5 表达质粒共转染至 293T 细胞后 48 h, 分别用抗 HA 抗体和抗 Flag 抗体进行 IP, 之后再行相应的 IB 实验。结果发现, TRAF6 与 KLF5 存在相互结合 (图 2)。

2.2 293T 细胞中过表达或沉默 TRAF6 对 KLF5 多聚泛素化修饰的影响

为了确定 TRAF6 是否对 KLF5 进行多聚泛素化修饰并明确其泛素化修饰的方式, 我们将 HA-KLF5 和 Ub 质粒与 Flag-TRAF6 质粒共转染 293T 细胞 48 h 进行检测。结果表明, 过表达 TRAF6 增加了 KLF5 K63 连接的泛素化水平, 但其对 KLF5 K48 连接的泛素化修饰无明显影响 (图 3)。此外, 将 HA-KLF5、Ub



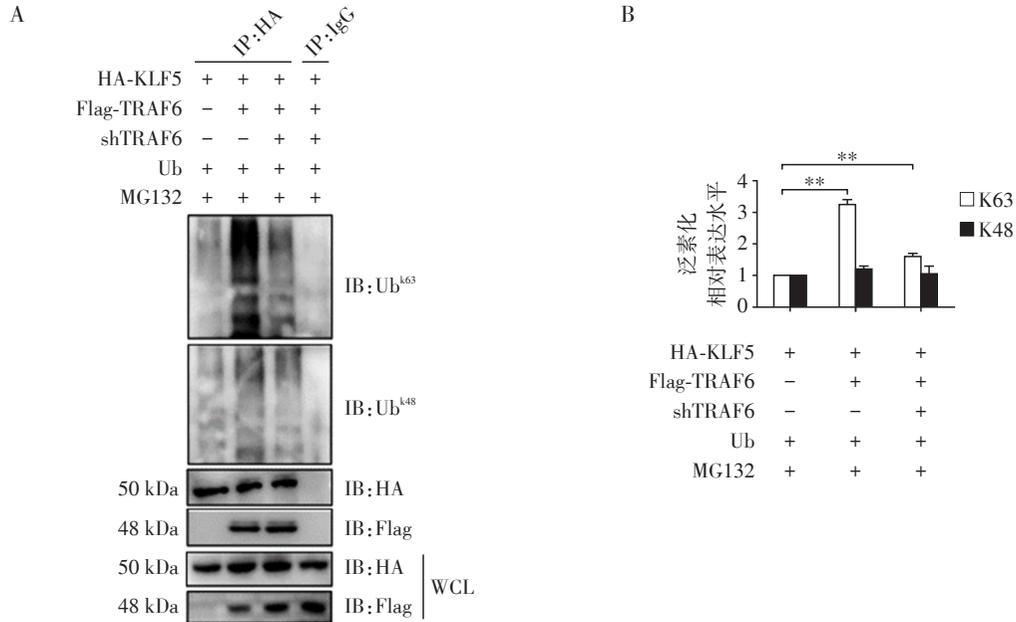
A: 用 HA 标签抗体行 IP/IB 检测显示, HA-KLF5 与 Flag-TRAF6 存在结合; B: 用 Flag 标签抗体行 IP/IB 检测发现, Flag-TRAF6 与 HA-KLF5 也存在结合。

图 2 293T 细胞中外源性 TRAF6 与 KLF5 相互结合的检测

Figure 2 The binding detection between exogenous TRAF6 and KLF5 in 293T cells

和Flag-TRAF6质粒与shTRAF6质粒共转染293T细胞48 h时发现,沉默TRAF6基因可明显降低KLF5

K63连接的泛素化水平,且对KLF5 K48连接的泛素化修饰无明显影响(图3)。



将Flag-TRAF6、shTRAF6、HA-KLF5及Ub质粒共转染293T细胞48 h,IP/IB检测KLF5 K63和K48连接的泛素化水平。A:IB条带;B:半定量分析,两组比较,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

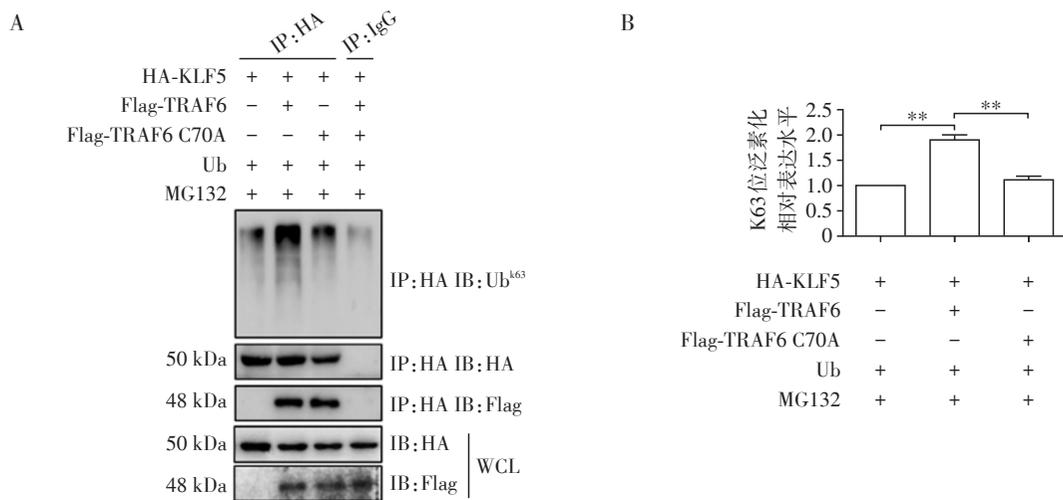
图3 过表达或沉默TRAF6对KLF5不同多聚泛素化修饰(K63和K48)的影响

Figure 3 The effect of TRAF6 overexpression or knockdown on KLF5 K63/K48-linked polyubiquitination level

2.3 TRAF6的E3泛素连接酶活性缺失可影响KLF5 K63位多聚泛素化修饰

为了确定KLF5 K63连接的多聚泛素化是否依赖于TRAF6 E3泛素连接酶活性,我们将HA-KLF5、Ub质粒与Flag-TRAF6野生型(WT)质粒或TRAF6

C70A突变体(即第70位半胱氨酸突变为丙氨酸)质粒共转染293T细胞48 h。IP/IB结果显示,TRAF6 WT可增加KLF5 K63连接的多聚泛素化,而酶催化活性缺失的TRAF6 C70A突变体对KLF5 K63连接的多聚泛素化修饰无明显影响(图4)。



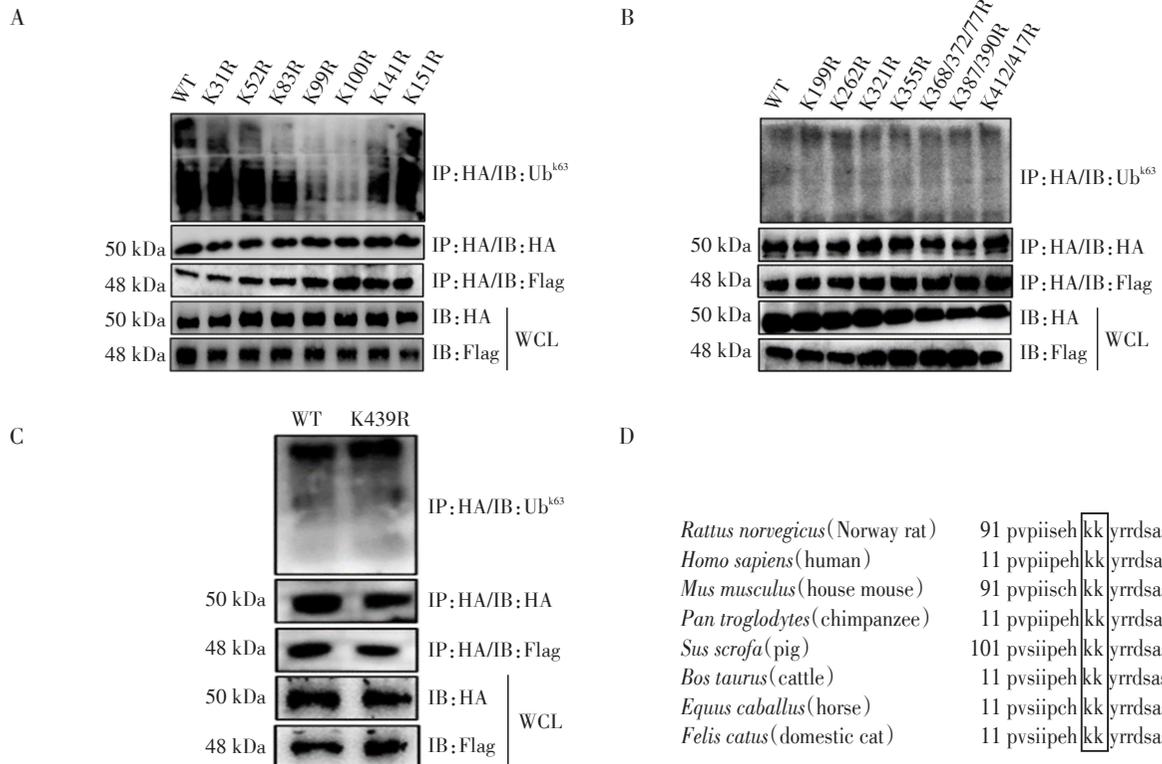
将Flag-TRAF6、Flag-TRAF6 C70A、HA-KLF5及Ub质粒共转染293T细胞48 h,然后进行IP/IB检测。A:IB条带;B:半定量分析,两组比较,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图4 TRAF6酶活性缺失对KLF5 K63连接的多聚泛素化修饰的影响

Figure 4 The effect of the TRAF6 enzyme activity deficiency on KLF5 K63-linked polyubiquitination

2.4 TRAF6经K63连接的多聚泛素化修饰KLF5相应的赖氨酸

为了鉴定TRAF6经K63连接的多聚泛素化修饰KLF5的相应赖氨酸位点,将KLF5赖氨酸位点突变质粒分别与TRAF6和Ub质粒共转染至293T细胞48 h。IP/IB实验发现,只有KLF5 K99和K100赖氨酸位点突变后,KLF5 K63连接的多聚泛素化水平显著降低(图5A~C)。此外,保守性分析结果显示,不同物种的KLF5氨基酸序列在K99和K100位点均呈高度保守状态(图5D)。以上结果提示,KLF5 K99和K100赖氨酸为KLF5的多聚泛素化修饰位点。



A~C:将Flag-TRAF6质粒和Ub质粒分别与不同KLF5赖氨酸位点突变质粒(A:KLF5赖氨酸位点K31~K151的突变;B:KLF5赖氨酸位点K199~K417的突变;C:KLF5赖氨酸位点K439的突变)共转染293T细胞48 h,然后进行IP/IB检测;D:不同物种KLF5氨基酸序列在K99和K100处高度保守。

图5 TRAF6介导的K63位多聚泛素化修饰KLF5赖氨酸(位点)的鉴定

Figure 5 The lysine (site) identification of KLF5 K63-linked polyubiquitination mediated by TRAF6

2.5 KLF5 K99或K100及K99/K100联合突变可下调KLF5 K63位多聚泛素化修饰

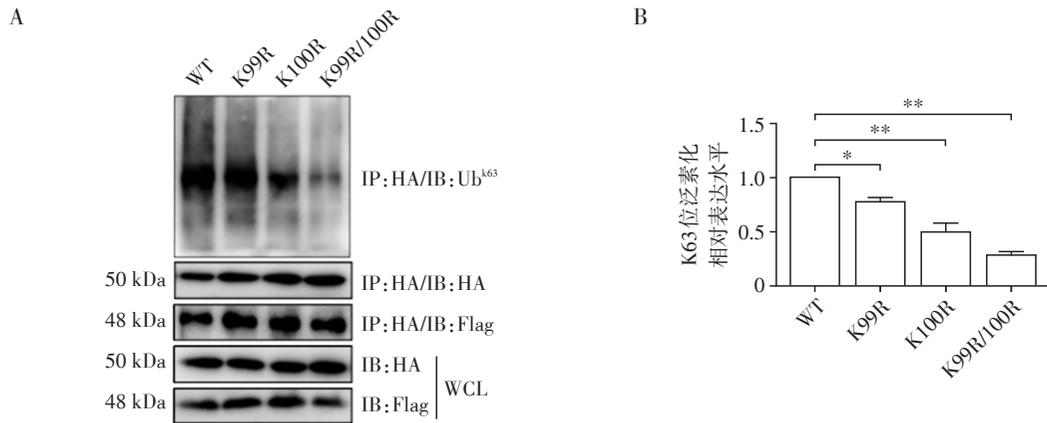
为了确证KLF5的K99或K100单个位点突变以及K99与K100联合突变能对KLF5 K63连接的多聚泛素化修饰产生影响,我们分别将KLF5 WT或K99、K100、K99/K100联合突变的质粒与TRAF6和Ub质粒共转染至293T细胞并进行IP/IB检测。结果发现,KLF5 K63连接的多聚泛素化水平均显著下降,但以转染KLF5的K99/K100联合突变质粒的细胞下降更为明显(图6)。

3 讨论

泛素化是蛋白质翻译后修饰(post-translational

modification, PTM)的一种形式,是由E1、E2和E3泛素酶活化、结合和连接三步级联反应将Ub分子连接到底物上的过程^[10],其中E3泛素连接酶能催化Ub,通过其C端甘氨酸与底物蛋白的赖氨酸残基之间形成异肽键和共价结合,并借此调控靶蛋白的功能或命运^[11]。

TRAF6是一种兼有E3连接酶活性的功能分子,能对多种蛋白进行不同类型的泛素化修饰,进而参与疾病的发生与发展^[11,13]。有文献报道,TRAF6可经K48或K63连接的方式多聚泛素化修饰转录因子,K48连接的多聚泛素化能使蛋白被招募到26S蛋白酶体进行降解,而K63连接的多聚泛素化则不降解蛋白,但可激活转录因子的活性^[13-15]。已知



将TRAF6过表达与Ub质粒及KLF5(WT)或K99(K99R)或K100(K100R)突变质粒或两者联合(K99/K100R)突变质粒分别共转染293T细胞,然后进行IP/IB检测。A:IB条带;B:半定量分析,两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图6 KLF5 K99, K100和K99/K100联合突变对KLF5 K63连接的多聚泛素化的影响

Figure 6 The effect of KLF5 K99, K100 mutant and K99/K100 united mutant on KLF5 K63-linked polyubiquitination

KLF5是一种转录因子,能通过其锌指结构上的DNA结合域与靶基因启动子上的GC框和CACCC元件结合,调控基因的转录^[12, 16]。有资料显示, KLF5能被E3连接酶进行泛素化修饰,进而诱导出不同的生物学效应^[16]。

本课题组多年来一直从事实验性MsPGN——大鼠Thy-1N基因表达调控的研究^[3, 5, 7, 9-10]。先前研究证实,无论是在Thy-1N大鼠的肾组织,还是用sublytic C5b-9刺激的GMC中,TRAF6和KLF5的表达均见升高^[8, 10]。鉴于TRAF6能多聚泛素化修饰转录因子已被证实^[10],因此,为了明确TRAF6和KLF5的关系,利用具有高转染性和易于培养的293T工具细胞^[17],检查了TRAF6与KLF5的结合及TRAF6多聚泛素化修饰KLF5的方式。结果发现,细胞转染TRAF6和KLF5表达质粒后,其表达的两种蛋白可相互结合,且TRAF6的表达与否还能相应增加或减少KLF5 K63连接的多聚泛素化,但对其K48相连的多聚泛素化修饰并无影响。此外,细胞共转染TRAF6活性位点突变(TRAF6 C70A)和KLF5质粒后,也未测到KLF5 K63的多聚泛素化修饰。

已知TRAF6泛素化修饰蛋白质上的氨基酸(位点)是其赖氨酸残基^[11, 13-14],而KLF5蛋白含有19个赖氨酸^[12, 16, 18]。为了确定KLF5被TRAF6 K63多聚泛素化修饰的位点,本研究将KLF5的全部赖氨酸进行单个突变或几处相近赖氨酸联合突变以构建相应的突变质粒,在酶切电泳和测序鉴定成功后,分别与TRAF6及Ub质粒共转染293T细胞并检测KLF5 K63连接的多聚泛素化水平。结果显示, KLF5 K99R或K100R以及K99R/K100R联合突变均

导致KLF5 K63连接的多聚泛素化明显下降,且以K99R/K100R联合突变转染的细胞更为显著。这一结果表明,TRAF6 K63多聚泛素化修饰KLF5的位点为K99和K100。

值得一提的是:293T细胞是一种被广泛用于PTM研究的工具细胞,其优点不仅在于其外源性质粒转染细胞效率高,而且在血清剥夺的情况下还能快速生长,并易于培养和进行体外实验以验证分子之间的相互作用等^[17]。鉴于本课题之前体内外研究Thy-1N时已经发现TRAF6和KLF5的表达均明显上调,加之有文献已报道了TRAF6与KLF5的作用及作用机制^[9-10, 12, 16],因此为了深入探讨大鼠Thy-1N发病过程中,升高的TRAF6与KLF5之间的关系和相关泛素化修饰的作用及其机制,先利用工具细胞293T观察了外源性TRAF6与KLF5之间的相互作用和TRAF6多聚泛素化修饰KLF5的方式及其位点,并取得了上述研究结果。不过,由于我们要研究的是大鼠Thy-1N,且体外培养的细胞是大鼠的GMC,故在293T细胞中得到的这一结果仅仅是给了一种提示。考虑到组织细胞本身比较复杂,影响因素颇多,后续是否会出现与前述293T细胞一致的研究结果还有待于今后在大鼠GMC和Thy-1N大鼠的肾组织中进一步的验证。

[参考文献]

[1] FLOEGE J, DAHA M R. IgA nephropathy: new insights into the role of complement[J]. *Kidney Int*, 2018, 94(1): 16-18

[2] TORTAJADA A, GUTIERREZ E, PICKERING M C, et al. The role of complement in IgA nephropathy [J]. *Mol*

- Immunol, 2019, 114: 123-132
- [3] ZHANG J, LI Y, SHAN K, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF- β 1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBP β acetylation[J]. FASEB J, 2014, 28(3): 1511-1525
- [4] WANG Z, XIE X, LI J, et al. Complement activation is associated with crescents in IgA nephropathy[J]. Front Immunol, 2021, 12: 676919
- [5] XIE M, WU Z, YING S, et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell proliferation via ERK1/2-dependent SOX9 phosphorylation and acetylation by enhancing Cyclin D1 in rat Thy-1 nephritis[J]. Exp Mol Med, 2021, 53(4): 572-590
- [6] MORGAN B P. The membrane attack complex as an inflammatory trigger[J]. Immunobiology, 2016, 221(6): 747-751
- [7] LIU L, GE W, ZHANG Z, et al. Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell proliferation via enhancing FGF1 and PDGF α gene transcription mediated by GCN5-dependent SOX9 acetylation in rat Thy-1 nephritis[J]. FASEB J, 2021, 35(7): e21751
- [8] 罗 灿, 王文博, 吴志皎, 等. 用sublytic C5b-9刺激上调的KLF5对大鼠肾小球系膜细胞合成IL-36 α 的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2020, 40(3): 367-373
- [9] QIU W, ZHANG Y, LIU X, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce proliferative changes of glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through TRAF6-mediated PI3K-dependent Akt1 activation[J]. J Pathol, 2012, 226(4): 619-632
- [10] YU T, WANG L, ZHAO C, et al. Sublytic C5b-9 induces proliferation of glomerular mesangial cells via ERK5/MZF1/RGC-32 axis activated by FBXO28-TRAF6 complex[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 5654-5671
- [11] WANG J, WU X, JIANG M, et al. Mechanism by which TRAF6 participates in the immune regulation of autoimmune diseases and cancer[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 4607197
- [12] LUO Y, CHEN C. The roles and regulation of the KLF5 transcription factor in cancers[J]. Cancer Sci, 2021, 112(6): 2097-2117
- [13] WANG Y T, LIU T Y, SHEN C H, et al. K48/K63-linked polyubiquitination of ATG9A by TRAF6 E3 ligase regulates oxidative stress-induced autophagy[J]. Cell Rep, 2022, 38(8): 110354
- [14] LIU M, YAN M, LV H, et al. Macrophage K63-linked ubiquitination of YAP promotes its nuclear localization and exacerbates atherosclerosis[J]. Cell Rep, 2020, 32(5): 107990
- [15] JANG J H, KIM H, JUNG I Y, et al. A20 inhibits LPS-induced inflammation by regulating TRAF6 polyubiquitination in rainbow trout[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9801
- [16] WANG X, QIU T, WU Y, et al. Arginine methyltransferase PRMT5 methylates and stabilizes KLF5 via decreasing its phosphorylation and ubiquitination to promote basal-like breast cancer[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(10): 2931-2945
- [17] TAN E, CHIN C S H, LIM Z F S, et al. HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 796991
- [18] KONG Y, REN W, FANG H, et al. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) promote KLF5 ubiquitination and degradation in basal-like breast cancer[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(5): 2104-2115

[收稿日期] 2022-10-06

(责任编辑: 蒋 莉)