

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00712

SH2D4A 互作蛋白的筛选及初步鉴定

李伟, 李婷婷, 刘洪, 赵彦艳

中国医科大学医学遗传学教研室, 沈阳 110001

摘要: SH2D4A 是 SH2 蛋白家族成员之一, 可能参与酪氨酸蛋白激酶相关受体介导的信号转导, 调节细胞的生长、增殖和分化, 进而影响人类疾病的发生。文章运用酵母双杂交技术筛选 SH2D4A 相互作用蛋白, 并利用酵母交配(mating)实验和 GST pull-down 实验进行了初步鉴定。首先成功构建了酵母诱饵蛋白重组表达载体 pGBKT7-SH2D4A; 利用该重组体对人肾脏 cDNA 文库进行逐级筛选, 共得到 46 个阳性克隆; 经目的基因的分离、DNA 测序及 BLAST 软件对序列进行比对分析, 发现 5 种可能的 SH2D4A 互作蛋白(AZGP1、DAD1、HSD17B10、KAT5 和 PKM2); NetPhos 2.0 Server 软件预测结果显示除 HSD17B10 外其他 4 种蛋白均含有磷酸化酪氨酸; 进一步以 KAT5 和 HSD17B10 作为代表进行了酵母交配和 GST pull-down, 证实两者均可直接结合 SH2D4A。

关键词: SH2D4A; 酵母双杂交技术; GST pull-down; 蛋白质相互作用; SH2 结构域

Screening and identification of interactive proteins of SH2D4A

LI Wei, LI Ting-Ting, LIU Hong, ZHAO Yan-Yan

Department of Medical genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: SH2D4A is a member of SH2 signaling protein family, which is involved in the signal transduction mediated by protein tyrosine kinase-related receptor, cell growth, proliferation, differentiation, and thereby affects the development of human disorders. To determine the role of SH2D4A in the cell signal transduction pathway, SH2D4A interactive proteins were screened using yeast two-hybrid system, and yeast mating and GST pull-down assays were carried out to further confirm the interaction. We successfully generated a bait protein expression construct-pGBKT7-SH2D4A, screened the human kidney cDNA library, and obtained 46 positive yeast clones. After isolation of positive colonies, DNA sequencing, and sequence alignment analysis with BLAST software, we obtained 5 potential SH2D4A interactive proteins, AZGP1, DAD1, HSD17B10, KAT5, and PKM2, which were predicted by NetPhos 2.0 Server software and were all shown to be phosphorylated tyrosine (pY)-containing proteins except for HSD17B10. KAT5 and HSD17B10 were selected to perform yeast mating and GST pull-down experiments, indicating their direct binding to SH2D4A.

Keywords: SH2D4A; yeast two-hybrid system; GST pull-down; protein interaction; SH2 domain

人类基因组计划完成后, 疾病基因定位克隆及其蛋白质功能鉴定成为遗传研究的重要内容。我们前期通过外显子捕获及拼接技术, 在富含疾病基因

的人染色体 8p22 区克隆了一段仅具有 1 个 Src 同源域 2(Src homology 2, SH2)结构域的 DNA 序列 (GenBank 登录号: AY190323)^[1], 该序列与 Sugano 等

收稿日期: 2009-10-02; 修回日期: 2010-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30370785)资助

作者简介: 李伟(1980-), 女, 博士研究生, 研究方向: 心血管疾病的分子遗传学。Tel: 024-23281589; E-mail: weil19801130@hotmail.com

通讯作者: 赵彦艳(1960-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管疾病的分子遗传学。Tel: 024-23257322; E-mail: yzhaoy@mail.cmu.edu.cn

学者提交的序列(AK024799)一致,后统一命名为 SH2D4A 基因(SH2 domain containing 4A)。

SH2D4A 是 SH2 蛋白家族成员之一,且仅含有一个 SH2 结构域。SH2 结构域是由大约 100 个氨基酸残基组成的保守序列,其特异性识别磷酸化酪氨酸(pY)^[2],主要参与酪氨酸蛋白激酶相关受体介导的信号转导,是上游与下游信号分子联系的基础,调节细胞的生长、增殖和分化等过程,与多种疾病的发生密切相关^[3, 4]。SH2 信号蛋白家族依其结构不同可分为三类:第一类是除 SH2 结构域外还有催化结构域的蛋白;第二类是除 SH2 外还含有 SH3 和 PH 等结构域但无催化活性的蛋白质;第三类是仅含有一个 SH2 结构域且无催化活性的接头蛋白。根据 SMART 软件分析 SH2D4A 的结构,推测其可能是一种无催化活性的接头蛋白。Rual 等^[5]利用高通量的酵母双杂交技术筛选 8 100 个开放读码框编码产物,发现 SH2D4A 与 DBNL、HCLS1、MAGEA11 及 SH3GL1 存在相互作用;Ewing 等^[6]结合免疫沉淀和高通量的质谱分析技术发现了 PPP1CB 与 SH2D4A 的相互作用;迄今与 SH2D4A 交互作用的蛋白质尚未进一步鉴定,所以 SH2D4A 确切的生物学功能仍不十分清楚。

我们前期工作利用 Northern 印迹检测了 SH2D4A 在各组织中的表达^[1];通过构建 SH2D4A 真核表达载体 pEGFP-SH2A 转染细胞,鉴定其亚细胞定位于胞质^[7];此外,还构建 SH2D4A 真核表达载体 pcDNA3.1-SH2D4A 并转染细胞,发现 SH2D4A 通过阻断蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)信号转导通路抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[8]。鉴于 SH2D4A 对细胞信号转导的重要作用,本研究采用酵母双杂交技术结合 GST pull-down 实验,筛选人肾脏 cDNA 文库,旨在发现新的 SH2D4A 相互作用蛋白,为进一步明确 SH2D4A 在细胞信号转导及疾病发生中的作用提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

酵母双杂交系统(Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3)购自 Clontech 公司,包括:人肾脏 cDNA 文库、相关载体(pGBKT7 和 pGADT7)、菌株和酵

母菌培养基等。大肠杆菌 DH5 α 和 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司。质粒制备和胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。酵母菌裂解酶购自 Sigma 公司。GST pull-down 相关试剂:体外转录翻译试剂盒(TNT coupled Transcription/Translation Systems)购自 Promega 公司, GST beads(Glutathione-Sepharose 4B beads)购自 GE Healthcare 公司,³⁵S 购自北京福瑞生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 构建诱饵蛋白重组表达载体

以前期构建的 pcDNA3.1-SH2D4A 质粒为模板,设计含有 *Sfi* 和 *Sal* 限制酶识别序列的引物,PCR 扩增 SH2D4A 结构域(上游引物:5'-ATATGGCCATGGAGGCCATGTTGGCAGATT-3',下游引物:5'-CTAGTGTCGACTTGGAGGCTGTAGGATGACC-3')。扩增产物经 *Sfi* 和 *Sal* 酶切后克隆到 pGBKT7 中,构建酵母诱饵蛋白重组表达载体 pGBKT7-SH2D4A, DNA 测序确保插入片段序列和方向的准确性。

1.2.2 酵母菌共转化与筛选

根据 Clontech 公司酵母双杂交系统说明书扩增人肾脏 cDNA 文库并提取文库质粒,制备酵母菌 AH109 感受态,醋酸锂法共转化文库质粒和诱饵蛋白重组质粒,铺于 SD/-Leu(亮氨酸)/-Trp(色氨酸)缺陷型培养基,30 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d;刮下菌落铺于 SD/-His(组氨酸)/-Leu/-Trp 缺陷型培养基,30 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d;进一步将菌落铺于 SD/-Ade(腺苷酸)/-His/-Leu/-Trp 缺陷型培养基,30 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d;选择直径>2 mm 的菌落,点于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp /X- α -Gal(X- α -半乳糖)培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 1 d,蓝色的菌落即为阳性克隆。

1.2.3 阳性克隆质粒分离

提取酵母菌阳性克隆的质粒,转化大肠杆菌 DH5 α ,由于文库质粒具有氨苄青霉素抗性,而诱饵蛋白重组质粒仅具有卡那霉素抗性,故使用含氨苄青霉素的 LB 培养基分离目的文库质粒,*Xho* 和 *EcoR* 酶切检测插入片段。

1.2.4 目的质粒的测序与分析

将目的质粒送上海基康生物有限公司测序,利用 BLAST 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

进行 DNA 序列比对分析, 利用 NetPhos 2.0 Server 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测蛋白磷酸化位点。

1.2.5 酵母交配(mating)实验

将得到的目的 DNA(HSD17B10 和 KAT5)克隆入 pGADT7 中构建 pGADT7-HSD17B10 和 pGADT7-KAT5 重组质粒, 分别将它们和 pGADT7 空质粒分别转化酵母 Y187; 将上述 pGBKT7-SH2D4A 重组质粒和 pGBKT7 空质粒分别转化酵母 AH109。转化的酵母 Y187 和 AH109 在 2×YPDA 酵母培养基共培养杂交, 30 缓慢振荡孵育 24 h 后, 将杂交菌液涂于 SD/-Trp/-Leu 培养皿上, 然后生长的转化子涂于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 缺陷培养基上, 30 培养 3~6 d。

1.2.6 GST pull-down 实验

提取酵母双杂交筛选得到的 KAT5 和 HSD17B10 文库质粒, 经 *EcoR* 和 *Xho* 限制酶酶切后克隆到含有 GST 标签的 pGEX4T2 载体中, 构建 GST-HSD17B10 和 GST-KAT5, DNA 测序确保插入片段序列和方向的准确性; 将 GST 重组体转化大肠杆菌 BL21, 0.5 mmol/L IPTG(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside)诱导 3 h, 并利用 GST beads 纯化 GST 重组蛋白。以 pcDNA3.1-SH2D4A 质粒为模板, 使用体外转录/翻译试剂盒合成带有 ³⁵S 标记的 SH2D4A 蛋白。将纯化的 GST 重组蛋白与体外翻译的 SH2D4A 蛋白 4 孵育 2 h, 以 GST 标签蛋白为阴性对照, 经 GST beads 沉淀后进行 SDS-PAGE 电泳及放射自显影检测。

2 结果与分析

2.1 诱饵蛋白重组表达载体 pGBKT7-SH2D4A 的构建

以 pcDNA3.1-SH2D4A 为模板扩增 SH2D4A 结构域(片段长度 870 bp), 酶切后定向克隆入 pGBKT7, 构建诱饵蛋白重组表达载体 pGBKT7-SH2D4A。经 *Sfi* 和 *Sal* 酶切检测阳性克隆, 酶切后产生 870 bp 片段, 双向 DNA 测序证实无移码突变及碱基错配。

2.2 SH2D4A 相互作用蛋白的筛选

扩增后的人肾脏 cDNA 文库与 pGBKT7-SH2D4A 共转化酵母菌感受态 AH109, 经营养缺陷型培养基

逐级筛选, 选择直径>2 mm 的菌落, 点于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp /X- α -Gal 培养基上, 30 培养 1 d, 变为蓝色的菌落为阳性克隆, 如图 1A 所示。最后将得到的 46 个阳性克隆提取 DNA, 转化大肠杆菌 DH5 α , 分离目的文库质粒, 酶切检测插入片段(图 1B), 然后进行 DNA 测序, 得到 35 个测序结果, 另 11 个克隆无测序峰。利用 BLAST 软件对这些测序结果进行序列比对和分析, 获得 5 种蛋白质编码序列(图 2)和 2 种非编码序列。这 5 种序列编码的蛋白质为: 锌 α 2 糖蛋白 1(Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding, AZGP1)、赖氨酸乙酰转移酶 5(K(lysine) acetyltransferase 5, KAT5)、丙酮酸激酶肌型(Pyruvate kinase, muscle, PKM2)、17 β -羟基类固醇脱氢酶 X 型(17-beta-hydroxys-teroid dehydrogenase type 10, HSD17B10)和细胞死亡防御因子 1(Defender against cell death 1, DAD1)。

2.3 SH2D4A 互作蛋白磷酸化位点的预测分析

磷酸化的酪氨酸(pY)是 SH2 结构域特异性识别的关键位点, 因此应用 NetPhos 2.0 Server 软件对以上 5 种蛋白质序列进行 pY 预测。HSD17B10 未预测到 pY, DAD1 仅含有 1 个 pY, 而 AZGP1、KAT5 和 PKM2 这 3 种蛋白质均含有多个 pY。对预测结果进一步分析, 发现 AZGP1 第 144 位 pY、KAT5 第 80 位 pY 和 PKM2 第 161 位 pY 的 C 端 3 个氨基酸符合与 SH2 结构域特异性结合的序列特点^[2], 提示这 3 种蛋白质可能被 SH2 结构域识别而与 SH2D4A 相互作用。

2.4 酵母交配验证 HSD17B10 和 KAT5 与 SH2D4A 相互作用

AH109 和 Y187 是两个不同类型的酵母菌株, 可以在高营养状态下进行有性生殖。将转化了 pGADT7-HSD17B10 或 pGADT7-KAT5 质粒的 Y187 酵母菌, 分别与转化了 pGBKT7-SH2D4A 的 AH109 酵母菌进行杂交实验, 同时以 pGADT7 和 pGBKT7 空质粒为对照。结果显示, 所有的转化子在 SD/-Leu/-Trp 缺陷培养基上均能生长, 而只有 pGADT7-HSD17B10 和 pGBKT7-SH2D4A 杂交的转化子(图 3 中的 1), 或者 pGADT7-KAT5 和 pGBKT7-SH2D4A 杂交的转化子才能在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培养基上的生长(图 3 中的 5), 提示 SH2D4A 和 KAT5 能与 SH2D4A 相互作用, 进一步验证了上述酵母双杂交的结果。

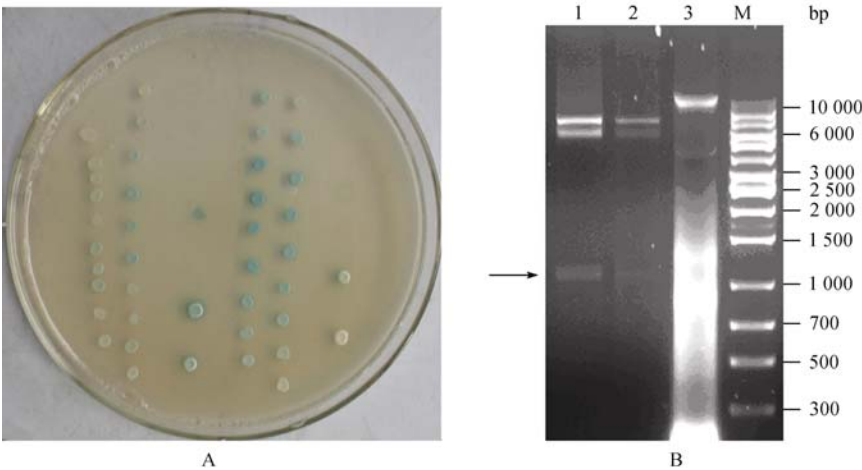


图 1 阳性克隆筛选及酶切鉴定
A: X- α -Gal 营养缺陷型培养基筛选实验的部分结果, 蓝色菌落为阳性克隆; B: 目的文库质粒酶切检测。M: 1 kb Ladder DNA marker; 1、2: 目的文库质粒经 *Xho* 和 *EcoR* 酶切(箭头所示为插入片段); 3: 目的文库质粒。

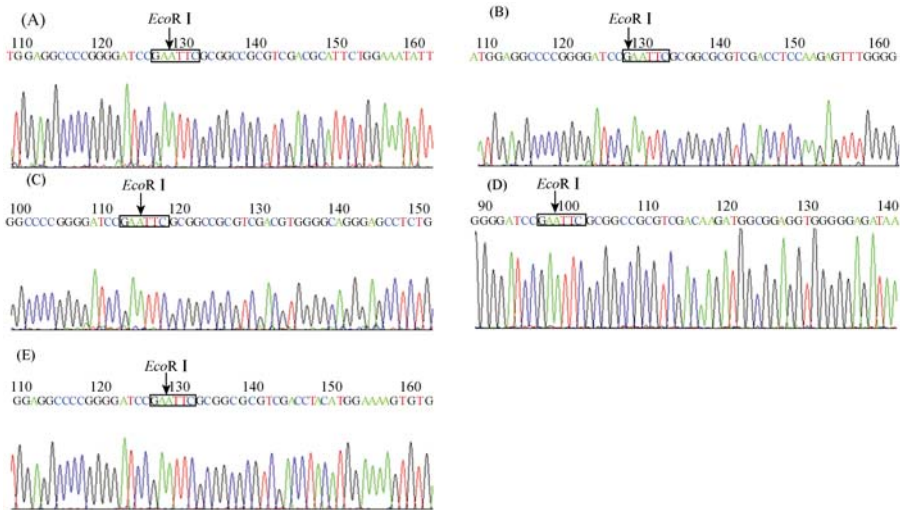


图 2 5 种蛋白质编码序列测序图的部分序列
A: *AZGP1*; B: *DAD1*; C: *HSD17B10*; D: *KAT5*; E: *PKM2*。

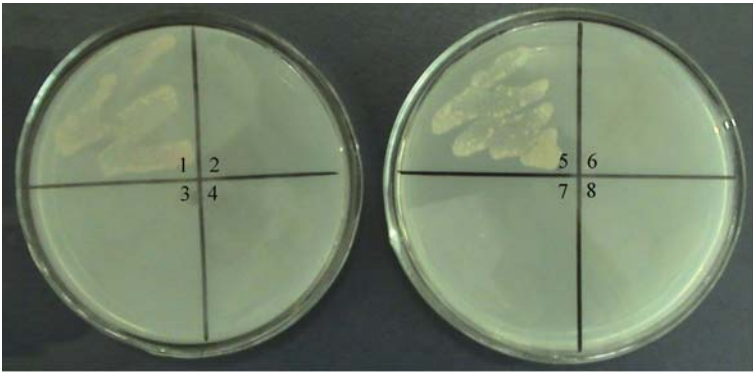


图 3 各转化子在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培养基生长情况
1: 为含有 pGADT7-HSD17B10 和 pGBKT7-SH2D4A 的转化子; 2: 为含有 pGADT7-HSD17B17 和 pGBKT7 空质粒的转化子; 3: 为含有 pGADT7 空质粒和 pGBKT7-SH2D4A 的转化子; 4: 为含有 pGADT7 空质粒和 pGBKT7 空质粒的转化子; 5: 为含有 pGADT7-KAT5 和 pGBKT7-SH2D4A 的转化子; 6: 为含有 pGADT7-KAT5 和 pGBKT7 空质粒的转化子; 7 和 8 同 3 和 4。

2.5 GST 重组蛋白诱导纯化

提取 HSD17B10 和 KAT5 文库质粒, 酶切后克隆入 pGEX4T2 载体, 成功构建 GST 重组蛋白表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 后经 IPTG 诱导, 并利用 GST beads 纯化了目的蛋白。如图 4 所示, GST-HSD17B10 分子量约为 53 kDa, GST-KAT5 分子量约为 86 kDa。

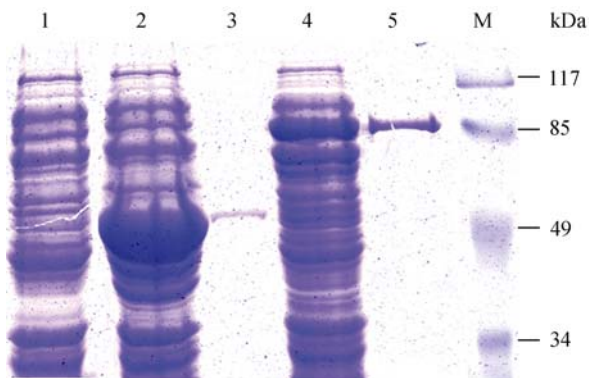


图 4 GST 重组蛋白诱导纯化电泳图

1: 未诱导 BL21 菌液蛋白; 2: 转化 GST-HSD17B10 后经 IPTG 诱导的 BL21 菌液蛋白; 3: GST-HSD17B10 纯化蛋白; 4: 转化 GST-KAT5 后经 IPTG 诱导的 BL21 菌液蛋白; 5: GST-KAT5 纯化蛋白; M: 蛋白 Marker。

2.6 SH2D4A 相互作用蛋白的验证

将体外翻译且 ^{35}S 标记的 SH2D4A 蛋白与纯化的 GST 重组蛋白孵育, 经 GST beads 沉淀后进行 SDS-PAGE 电泳及放射自显影检测, 结果显示 GST-HSD17B10 和 GST-KAT5 都能将 SH2D4A 沉淀下来, PAGE 电泳及放射自显影显示与 SH2D4A- ^{35}S input 位置基本一致, 而 GST 标签蛋白不能将其沉淀(图 5), 提示 HSD17B10 和 KAT5 均可与 SH2D4A 相互结合。该 GST pull-down 结果初步证实了酵母双杂交筛选得到的 HSD17B10 和 KAT5 是 SH2D4A 的互作蛋白。

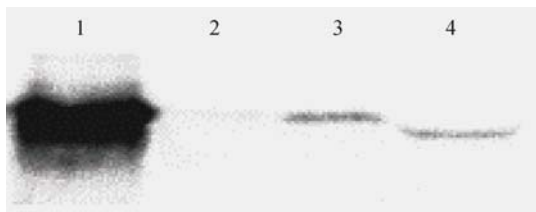


图 5 GST pull-down 放射自显影检测

1: SH2D4A- ^{35}S input 阳性对照; 2: 以纯化的 GST 标签蛋白进行沉淀反应; 3、4: 分别为以纯化的 GST-HSD17B10 和 GST-KAT5 重组蛋白进行沉淀反应。

3 讨论

SH2D4A 是我们前期于人染色体 8p22 区克隆的基因^[1]。研究显示 8p22 区域具有多个与人类疾病相关的重要基因。Fujiwara 等^[9]发现该区域片段缺失常见于肝癌、结肠癌和非小细胞肺癌; 而 Hughes 等^[10]报道该区域的扩增可能参与食管癌发生。此外, 位于 8p22 区域的 *TUSC3* 基因与常染色体隐性智力障碍相关^[11]; 而另一新的常染色体隐性无症状性失聪致病位点也位于该区域^[12]。因此, SH2D4A 很可能也是存在于该区域内的人类疾病易感基因之一。

为了鉴定 SH2D4A 的功能及其在人类疾病中的作用, 本研究利用酵母双杂交技术结合 GST pull-down 实验对 SH2D4A 相互作用蛋白质进行了筛选及初步鉴定。首先成功构建了 pGBKT7-SH2D4A 诱饵蛋白重组体; 利用该重组体对人肾脏 cDNA 文库进行逐级筛选, 共得到 46 个阳性克隆; 经目的基因分离、DNA 测序及 BLAST 软件序列比对分析发现 5 种蛋白质编码序列(AZGP1、DAD1、HSD17B10、KAT5 和 PKM2)。由于 pY 是 SH2 结构域识别的关键位点^[3, 4], 因此我们用 NetPhos 2.0 Server 软件进行了 pY 位点预测, 结果显示 HSD17B10 不含有 pY, DAD1 仅含有 1 个 pY, 而 AZGP1、KAT5 和 PKM2 均含有多个 pY。另外, pY 的 C 端 3 个氨基酸序列决定了 SH2 结构域与蛋白质结合的特异性^[2], 根据其序列特点分析发现 AZGP1、KAT5 和 PKM2 均含有 1 个可被 SH2 结构域特异识别的 pY(pY144、pY80 和 pY161), 进一步提示这 3 种蛋白质可能与 SH2D4A 相互作用。另一方面, Poy 等^[13]发现 SH2D1A 对于非磷酸化的酪氨酸也具有很高的亲和力, 我们推测 SH2D4A 与不含有 pY 的 HSD17B10 也可能存在相互作用。因此, 我们对 HSD17B10 和 KAT5 又进行了酵母交配的验证, 只有 pGADT7-HSD17B10 和 pGBKT7-SH2D4A, 或者 pGADT7-KAT5 和 pGBKT7-SH2D4A 的转化子才能在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培养基上的生长。我们进一步以 KAT5 和 HSD17B10 为代表进行 GST pull-down 实验, 发现两者均可与 SH2D4A 相互结合。此外, 这一结果还提示 SH2D4A 与其互作蛋白的识别存在 pY 和非 pY 两种模式。

本研究筛查并初步鉴定的 SH2D4A 互作蛋白 KAT5 和 HSD17B10 具有多种生物学功能, 并广泛参

与多种疾病的发生。KAT5 是 MYST 家族成员之一, 具有乙酰转移酶活性, 调节基因转录并参与 DNA 损伤修复的起始和终止^[14]。KAT5 通过影响肿瘤相关基因从而间接参与多种肿瘤的发生和发展^[15], 例如 KAT5 通过影响抑癌基因 P53 的乙酰化水平, 调节细胞周期和凋亡, 参与结肠癌和肺癌的发生^[16]。Bararia 等^[17]发现 KAT5 可与 C/EBP α 协同参与白血病的发生。此外, KAT5 还与 HIV 感染、Fanconi 贫血和阿尔茨海默病等相关^[18~20]。HSD17B10 是线粒体内短链氧化还原酶超家族的成员之一, 催化多种脂肪酸、醇类和类固醇的氧化反应。HSD17B10 可与细胞内 β -淀粉样蛋白直接作用^[21], 或通过调节雌激素水平而影响阿尔茨海默病的发生^[22]。Yang 等^[23, 24]研究发现, HSD17B10 还可通过参与神经类固醇和异亮氨酸代谢影响认知能力, 进而引起智力障碍。此外, *HSD17B10* 基因异常还与帕金森和 X-连锁智力障碍等相关^[25, 26]。由于 *SH2D4A* 基因所在的染色体 8p22 区存在多个癌症和神经系统疾病相关基因, 且 *SH2D4A* 互作蛋白 KAT5 和 HSD17B10 分别在肿瘤和神经退行性病变中发挥重要作用, 因此我们推测 *SH2D4A* 的深入研究将为揭示这两类疾病的致病机理提供重要线索。

本研究通过酵母双杂交技术成功的筛选 *SH2D4A* 互作蛋白, 并运用 GST pull-down 初步验证了 *SH2D4A* 与 KAT5 和 HSD17B10 的结合。*SH2D4A* 与这两种蛋白的相互作用产生的生物学效应及其在疾病发生发展中的作用还有待于进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 戴书萍, 赵彦艳, 丁茜. SH2 信号蛋白家族新成员-SH2A 基因的克隆及其特性分析. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(6): 458-462.
- [2] Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 1993, 72(5): 767-778.
- [3] Moran MF, Koch CA, Anderson D, Ellis C, England L, Martin GS, Pawson T. Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(21): 8622-8626.
- [4] Machida K, Mayer BJ. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1747(1): 1-25.
- [5] Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamosas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, 2005, 437(7062): 1173-1178.
- [6] Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol*, 2007, 3: 89.
- [7] 丁茜, 赵彦艳, 孙志军, 于大海. SH2A 基因对细胞信号转导的影响及其亚细胞定位. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20(6): 499-503.
- [8] Li T, Li W, Lu J, Liu H, Li Y, Zhao Y. SH2D4A regulates cell proliferation via the ERalpha/PLC-gamma/PKC pathway. *BMB Rep*, 2009, 42(8): 516-522.
- [9] Fujiwara Y, Ohata H, Emi M, Okui K, Koyama K, Tsuchiya E, Nakajima T, Monden M, Mori T, Kurimasa A. A 3-Mb physical map of the chromosome region 8p21.3-p22, including a 600-kb region commonly deleted in human hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and non-small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994, 10(1): 7-14.
- [10] Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX, Kuick R, Thoraval D, Orringer MB, Beer DG, Hanash S. A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95(21): 12410-12415.
- [11] Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F, Tzschach A, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(5): 1158-1164.
- [12] Chishti MS, Lee K, McDonald ML, Hassan MJ, Ansar M, Ahmad W, Leal SM. Novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB71) maps to

- chromosome 8p22-21.3. *Hum Genet*, 2009, 54(3): 141–144.
- [13] Poy F, Yaffe MB, Sayos J, Saxena K, Morra M, Sumegi J, Cantley LC, Terhorst C, Eck MJ. Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine independent sequence recognition. *Mol Cell*, 1999, 4(4): 555–561.
- [14] Sapountzi V, Logan IR, Robson CN. Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(9): 1496–1509.
- [15] Avvakumov N, Côté J. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5395–5407.
- [16] Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*, 2006, 24(6): 827–839.
- [17] Bararia D, Trivedi AK, Zada AA, Greif PA, Mulaw MA, Christopheit M, Hiddemann W, Bohlander SK, Behre G. Proteomic identification of the MYST domain histone acetyltransferase TIP60 (HTATIP) as a co-activator of the myeloid transcription factor C/EBPalpha. *Leukemia*, 2008, 22(4): 800–807.
- [18] Col E, Caron C, Chable-Bessia C, Legube G, Gazzeri S, Komatsu Y, Yoshida M, Benkirane M, Trouche D, Khochbin S. HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *EMBO J*, 2005, 24(14): 2634–2645.
- [19] Heller RC, Mariani KJ. Tip60 is required for DNA inter-strand cross-link repair in the Fanconi anemia pathway. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9844–9851.
- [20] Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 2001, 293(5527): 115–120.
- [21] Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H. ABAD directly links A-beta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*, 2004, 304(5669): 448–452.
- [22] He XY, Merz G, Mehta P, Schulz H, Yang SY. Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme: characterization of a novel 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1999, 274(21): 15014–15019.
- [23] Yang SY, He XY, Miller D. HSD17B10: a gene involved in cognitive function through metabolism of isoleucine and neuroactive steroids. *Mol Genet Metab*, 2007, 92(1–2): 36–42.
- [24] Yanga SY, Hea XY, Olpinb SE, Suttonec VR, McMenamind J, Philippe M, Denmanf RB, Malika M. Mental retardation linked to mutations in the HSD17B10 gene interfering with neurosteroid and isoleucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(35): 14820–14824.
- [25] Lenski C, Kooy RF, Reyniers E, Loessner D, Wanders RJ, Winnepenninckx B, Hellebrand H, Engert S, Schwartz CE, Meindl A, Ramser J. The reduced expression of the HADH2 protein causes X-linked mental retardation, choreoathetosis, and abnormal behavior. *Am J Hum Genet*, 2007, 80(2): 372–377.
- [26] Yang SY, He XY, Schulz H. 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. *Febs J*, 2005, 272(19): 4874–4883.