

KCTD5对人急性单核细胞白血病 U937细胞增殖的影响

马兰 王思恒 吴琼 徐甜 贺立彩 吕建新*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325035)

摘要 KCTD5是钾离子通道四聚体结构域(KCTD)蛋白家族的一员。KCTD5可作为Cullin3的接头蛋白发挥生物学功能, 但是其与急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)的关系尚不清楚。通过对癌症与肿瘤基因组图谱(the Cancer of Genome Atlas, TCGA)数据库的分析, 发现KCTD5 mRNA表达水平与AML病人生存期呈显著负相关。免疫印迹(Western blot)结果显示AML细胞株中KCTD5蛋白表达量显著高于正常对照细胞。该文通过shRNA干扰技术, 敲低U937细胞中KCTD5的表达, 研究了KCTD5对人急性单核细胞白血病U937细胞增殖的影响。采用CCK8实验、锥虫蓝拒染实验、瑞氏染色、PI单染及Western blot技术, 检测干扰KCTD5对U937细胞生长、活力、细胞形态、细胞周期分布及周期相关蛋白表达的影响。结果显示, 干扰KCTD5的表达可以显著抑制U937细胞的增殖能力, 但对细胞活力没有明显影响; 形态学检查显示, 干扰KCTD5后, U937细胞体积明显增大, 染色质凝集及多核细胞比例增加; 流式结果显示, 干扰KCTD5的表达使G₂/M期细胞比例明显增加; Western blot结果显示, 干扰KCTD5后, Cdk1^{Tyr15}磷酸化水平下降, 而Cyclin B1表达量升高。以上结果表明, 干扰KCTD5可以抑制人急性单核细胞白血病U937细胞增殖, 其机制可能是由于干扰KCTD5通过使Cdk1^{Tyr15}发生去磷酸化, 从而诱导U937细胞发生了G₂/M期阻滞。

关键词 人急性单核细胞白血病; KCTD5; 细胞增殖; G₂/M期阻滞

The Effect of KCTD5 on the Proliferation of Human Acute Monocytic Leukemia U937 cells

Ma Lan, Wang Siheng, Wu Qiong, Xu Tian, He Licai, Lü Jianxin*

(School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract KCTD5 is a member of the potassium ion channel tetramer domain (KCTD) protein family. It is reported that KCTD5 may act as an adaptor of Cullin3, while the mechanism in acute myeloid leukemia (AML) remains unknown. The mRNA levels of KCTD5 were negatively correlated with the survival of AML patients by analyzing the data in The Cancer Of Genome Atlas (TCGA) database. The protein levels of KCTD5 in AML cell lines were significantly higher than that in normal peripheral blood mononuclear cells by Western blot. KCTD5 was knocked down by shRNA interference technology and the effect of KCTD5 on the proliferation of human acute monocytic leukemia U937 cells was studied in this paper. The effects of KCTD5 on the growth and viability, cell morphology, cell cycle distribution and cycle-related protein expressions of U937

收稿日期: 2019-02-28 接受日期: 2019-05-16

浙江省自然科学基金(批准号: LY18H080003)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

Received: February 28, 2019

Accepted: May 16, 2019

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Provinces (Grant No. LY18H080003)

*Corresponding author: Tel: +86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2019-06-13 16:27:35

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1627.008.html>

cells were detected by CCK8 assay, trypan blue exclusion assay, Wright's staining, PI staining and Western blot, respectively. Our results showed that knockdown of KCTD5 could significantly inhibit the growth of U937 cells, while cell viability did not change obviously. Microscopic examination revealed that knockdown of KCTD5 significantly increased the volume of U937 cells, and the ratio of chromatin condensation and multinuclear cell also increased. Knockdown KCTD5 could increase the proportion of cells in G₂/M phase by flow cytometry. The phosphorylation level of Cdk1^{Tyr15} was decreased and the expression of Cyclin B1 was increased by KCTD5 knockdown. Our results indicated that knockdown of KCTD5 could inhibit the proliferation of human acute monocytic leukemia U937 cells and induce cell cycle arrest at G₂/M phase in U937 cells by dephosphorylation of Cdk1^{Tyr15}.

Keywords acute monocytic leukemia; KCTD5; cell proliferation; G₂/M phase arrest

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人白血病最常见的类型之一,其存活率在所有白血病患者中最低^[1]。急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia)是AML中M5亚型^[2],占我国AML发病率第二位^[3]。目前,针对急性单核细胞白血病,临床上主要采用阿糖胞苷联合柔红霉素的药物化疗方案^[4]或造血干细胞移植^[5],常规治疗缓解率低且易发生耐药而导致复发,因此患者总体生存率仍然较低^[6]。研究急性单核细胞白血病细胞增殖和浸润的分子机制,可以有针对性地设计分子靶向药物,从而抑制急性单核细胞白血病的进展,对延长患者的生存期和提高生存质量具有重要意义。通过对TCGA数据库的数据分析,发现人类钾离子通道四聚体结构域蛋白5(KCTD5)的mRNA表达水平与AML病人生存期呈显著负相关,且Western blot结果显示,AML患者KCTD5蛋白表达量显著高于正常对照细胞,提示KCTD5可能参与了AML的进展。

KCTD5是KCTD蛋白家族26个成员之一,它含有特征性的BTB/POZ结构域^[7]。文献报道,含有BTB结构域的蛋白常作为与Cullin3存在特异性相互作用的接头蛋白发挥生物学功能^[8-9]。与KCTD5在生物进化树上最为接近的KCTD2蛋白^[7,10],可作为Cullin3 E3泛素连接酶的接头蛋白,介导c-Myc的泛素-蛋白酶体途径降解,从而抑制胶质瘤的发生发展^[11]。但是,目前关于KCTD5与人类相关的生物学功能以及与疾病之间的联系研究较少。本研究通过shRNA干扰技术,敲低U937细胞中KCTD5表达,初步揭示了干扰KCTD5对人急性单核细胞白血病U937细胞的生长抑制机理,为进一步研究KCTD5蛋白在急性单核细胞白血病中的生物学意义提供了一定的科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人急性单核细胞白血病细胞株U937、THP-1,人急性早幼粒细胞白血病细胞株HL-60购自ATCC细胞库。人急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4和NB4-LR2(NB4的ATRA耐药细胞株)由上海交通大学吴英理教授赠送。293T17细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。正常人外周血采自学生志愿者,使用Ficoll分离液抽提得到外周血单个核细胞(PBMC)。PLKO.1-NC质粒及PLKO.1-vector空载体购自Sigma公司。包装质粒VSVG和Deltar 8.9由本实验室保存。实验所用shKCTD5对应的DNA序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成,序列见表1。

1.2 试剂及仪器

RPMI-1640培养基、DMEM培养基、锥虫蓝染液、胰蛋白酶(trypsin)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco公司;Ficoll淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物科技有限公司;CCK8试剂盒购自Dojindo公司;瑞氏染液购自南京建成有限公司;细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;周期依赖性激酶1(Cyclin-dependent kinase 1, Cdk1)、Cyclin B1(Ser126)抗体、HRP标记的鼠二抗、兔二抗均购自CST公司; β -tubulin鼠源单克隆抗体购自Sigma公司;SDS、Tris、甘氨酸和聚丙烯酰胺购自上海生物工程股份有限公司;EcoR I和Age I酶购自NEB Cutter公司;T4 DNA连接酶购自TaKaRa公司;质粒抽提试剂盒购自Omega公司。

美国Thermo Scientific CO₂细胞培养箱、德国Eppendorf低温离心机、美国Thermo Scientific酶标仪、日本Nikon倒置显微镜、美国BD流式细胞仪、美国Bio-Rad Western blot装置。

表1 合成shKCTD5对应的DNA序列
Table 1 Synthesized DNA sequence correlated to shKCTD5

序号 No.	shRNA名称 shRNA name	shRNA序列(5'-3') shRNA sequence (5'-3')
1	sh256-F	CCG GAT CCT TCC TGT ACC GCT TAT GCT CGA GCA TAA GCG GTA CAG GAA GGA TTT TTT G
2	sh256-R	AAT TCA AAA AAT CCT TCC TGT ACC GCT TAT GCT CGA GCA TAA GCG GTA CAG GAA GGA T
3	sh612-F	CCG GGC ATC GGC TCC TCT TAC AAC TCT CGA GAG TTG TAA GAG GAG CCG ATG CTT TTT G
4	sh612-R	AAT TCA AAA AGC ATC GGC TCC TCT TAC AAC TCT CGA GAG TTG TAA GAG GAG CCG ATG C

1.3 细胞培养

U937、THP-1、HL-60、NB4和NB4-LR2细胞采用含10% FBS的RPMI-1640培养基, PBMC在上述基础上补加IL-2(终浓度100 U/mL), 293T17细胞采用含10% FBS的DMEM培养基, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中常规培养。所用细胞在实验期间, 经锥虫蓝染色分析, 细胞活力保持在95%以上。

1.4 KCTD5干扰载体的构建

将PLKO.1空载体用EcoR I和Age I进行双酶切, 将退火的DNA序列克隆进经胶回收纯化后的PLKO.1慢病毒载体上, 分别获得PLKO.1-sh256和PLKO.1-sh612, 通过测序证实后转化到大肠杆菌DH5α中, 长出的克隆经质粒抽提后备用转染细胞。

1.5 KCTD5干扰细胞株的构建

使用PEI转染试剂, 按照说明书提供的步骤, 将PLKO.1-NC、PLKO.1-sh256或PLKO.1-sh612载体和包装质粒VSVG和Deltar 8.9共同转染293T细胞。转染72 h后收集病毒上清并用0.45 μm滤膜过滤, 用病毒上清感染U937细胞, 并加入终浓度为8 μg/mL的polybrene转染试剂。常规培养36 h后, 离心更换新的培养基并加入终浓度为1 μg/mL的puromycin进行筛选, 并通过Western blot验证干扰效果。

1.6 CCK8及锥虫蓝拒染法检测干扰KCTD5对细胞生长及活力的影响

取对数生长期的对照及干扰KCTD5的U937细胞分别接种于96孔板, 每孔1×10⁴个细胞, 设3复孔, 分别培养0、1、2和3天, 每孔加入10 μL的CCK8溶液, 37 °C下继续孵育2 h后, 终止培养, 450 nm处测定吸光度值, 绘制生长曲线。实验重复3次。

取对数生长期的对照及干扰KCTD5的U937细胞分别接种于24孔板, 每孔1×10⁵个细胞, 设3复孔,

分别于培养的第1、2和3天, 将细胞吹打混匀后, 取30 μL细胞悬液加入等体积锥虫蓝染液染色2 min。取10 μL细胞悬液分别计数活细胞和死细胞, 总共200个, 计算活细胞比例。实验重复3次。

1.7 瑞氏染色检测干扰KCTD5对细胞形态的影响

细胞离心涂片机离心制片, 滴加配制好的瑞氏染色液(A液和B液按1:1混匀后静置0.5 h), 室温染色5 min, 在显微镜下观察并拍照。实验重复3次。

1.8 流式细胞术检测干扰KCTD5对细胞周期分布的影响

收集1×10⁶个处于对数生长期的对照及干扰KCTD5的U937细胞, 用预冷的PBS洗2次, 加入70%乙醇溶液于-20 °C固定过夜。第2天, 离心弃乙醇, 并用预冷的PBS洗2遍, 细胞用PI染色后, 流式细胞仪检测细胞的DNA含量, 用FlowJo软件分析细胞周期。实验重复3次。

1.9 Western blot检测干扰KCTD5对细胞周期相关蛋白的影响

收集2×10⁶个处于对数生长期的对照及干扰KCTD5的U937细胞, 细胞裂解液提取总蛋白后, 行SDS-PAGE电泳, 电泳结束后, 将凝胶电转移到PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST封闭1.5 h。分别加入相应一抗, 4 °C摇床孵育过夜。第2天, 将膜用TBST洗3次, 每次10 min。加入HRP标记的相应二抗, 室温孵育1.5 h, TBST洗3次, 每次10 min。将PVDF膜置于ECL试剂中反应1~2 min, 经Image Lab化学发光成像分析仪扫描得到目的条带。实验重复3次。

1.10 统计分析

用Graphpade Prism 7统计软件进行统计学分析。其中, 数据均采用均数±标准差(mean±S.D.)表示,

3组数据的定量资料之间的差异分析采用单因素方差分析(One Way ANOVA), 与对照组相比, ns代表无统计学意义, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

2 结果

2.1 *KCTD5*的mRNA表达水平与AML病人生存期呈负相关

通过对160例TCGA数据库AML患者的*KCTD5* mRNA表达水平进行统计学分析, AML病人标本*KCTD5* mRNA表达量的中位值为8.75, mRNA表达量高于8.75则为高表达组(有生存期资料的83例), 低于8.75则为低表达组(有生存期资料的77例), 发现*KCTD5* mRNA表达水平与AML病人生存期呈负相关($P<0.05$, 图1), 这提示*KCTD5*可能参与了AML的进展。

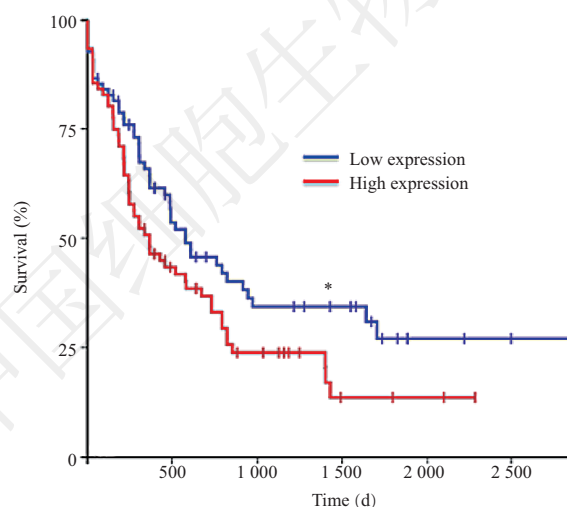
2.2 *KCTD5*在AML细胞系中高表达

为了检测*KCTD5*在AML细胞中表达情况, 提取正常人外周血单个核细胞(PBMC)及多株髓系白血

病细胞系NB4、NB4-LR2、HL-60、U937和THP-1细胞的蛋白。Western blot结果显示, 在细胞系中, 与正常人外周血单个核细胞相比, *KCTD5*在AML细胞系表达量显著高于正常人外周血单个核细胞(图2)。

2.3 干扰*KCTD5*表达抑制U937细胞的增殖能力

为了探讨干扰*KCTD5*对U937细胞生长的影响, 通过慢病毒感染U937细胞, 建立了对照(NC)及干扰*KCTD5*的U937细胞系(sh256, sh612), 并利用Western blot实验验证干扰效果(图3A)。利用CCK8实验验证干扰*KCTD5*的表达对U937细胞生长的影响。结果显示, 干扰*KCTD5*表达后, U937细胞生长受到明显抑制(图3B)。为了进一步探讨干扰*KCTD5*是通过影响U937细胞的哪一种生物学行为(细胞发生凋亡、周期阻滞或分化)而发挥对U937细胞的生长抑制作用, 分别取对照及干扰*KCTD5*的U937细胞进行锥虫蓝拒染实验, 连续计数4天。细胞计数结果显示, 干扰*KCTD5*后细胞数目的增加明显减慢(图3C), 而细胞活力无明显改变(图3D), 说明干扰*KCTD5*只影响



* $P<0.05$, 高表达组与低表达组比较。

* $P<0.05$ high expression group vs low expression group.

图1 *KCTD5* mRNA表达水平与AML病人生存期的关系

Fig.1 The relationship between the mRNA level of *KCTD5* and the survival of AML patients

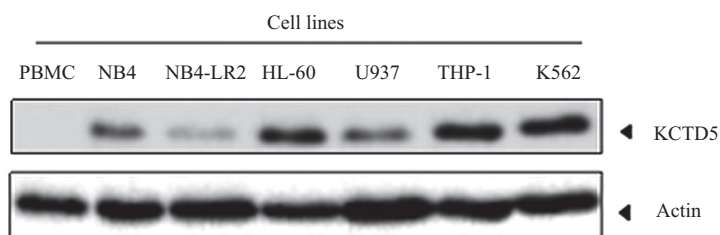
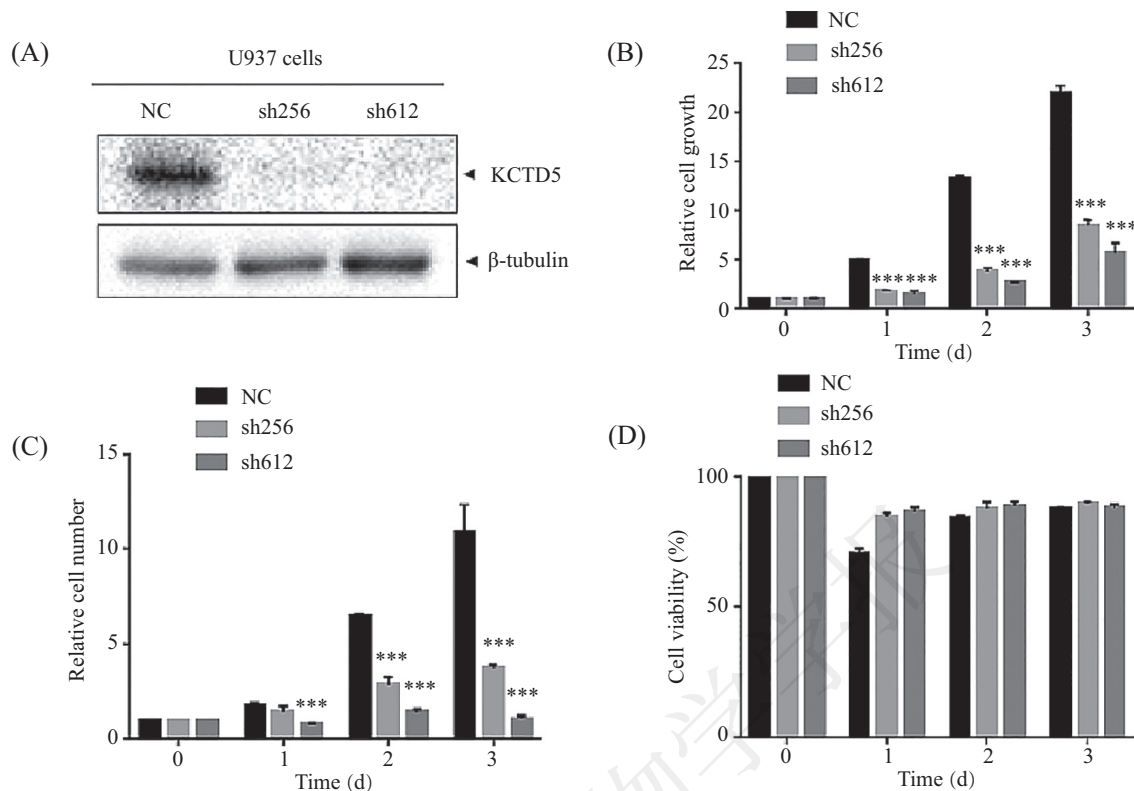


图2 *KCTD5*在AML细胞中蛋白表达量

Fig.2 The protein expression of *KCTD5* in AML cell lines



A: Western blot实验验证U937细胞KCTD5干扰效果, 以 β -tubulin作为内参; B: CCK8实验检测干扰KCTD5以后U937细胞连续4天的相对生长情况。实验独立重复3次, 数据以mean $\pm$ S.D.形式表示。*** P <0.001, 与对照组相比。C: 锥虫蓝拒染实验检测干扰KCTD5后, U937细胞数目的改变; D: 细胞活力变化。实验独立重复3次, 数据以mean $\pm$ S.D.形式表示。*** P <0.001, 与对照组相比。

A: examine interference effect of KCTD5 by Western blot, β -tubulin served as an internal control; B: the relative cell growth was calculated by CCK8 assay for 4 days. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. *** P <0.001 vs control group. C: KCTD5 were knocked down in U937 cells, the cell growth were determined by trypan-blue exclusion assay for 4 days; D: the cell viability was calculated in the same condition. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments independent. *** P <0.001 vs control group.

图3 干扰KCTD5抑制U937细胞增殖能力

Fig.3 Interference of KCTD5 inhibited the proliferation of U937 cells

了细胞增殖而不影响细胞活力。提示KCTD5可能影响了U937细胞的细胞周期。

2.4 干扰KCTD5对U937细胞形态的影响

取对照及干扰KCTD5的U937细胞进行瑞氏染色, 检测细胞形态学的改变。结果显示, 与对照组相比, 干扰KCTD5的U937细胞体积明显增大, 染色质凝集及多核细胞比例增加, 提示干扰KCTD5可能使U937细胞发生了G₂/M期阻滞(图4)。

2.5 干扰KCTD5诱导U937细胞发生G₂/M期阻滞

流式检测细胞周期分布结果显示, U937细胞的KCTD5干扰组较对照组G₂/M期细胞所占的比例明显增加, P <0.01, 说明干扰KCTD5诱导U937细胞发生了G₂/M期阻滞(图5)。

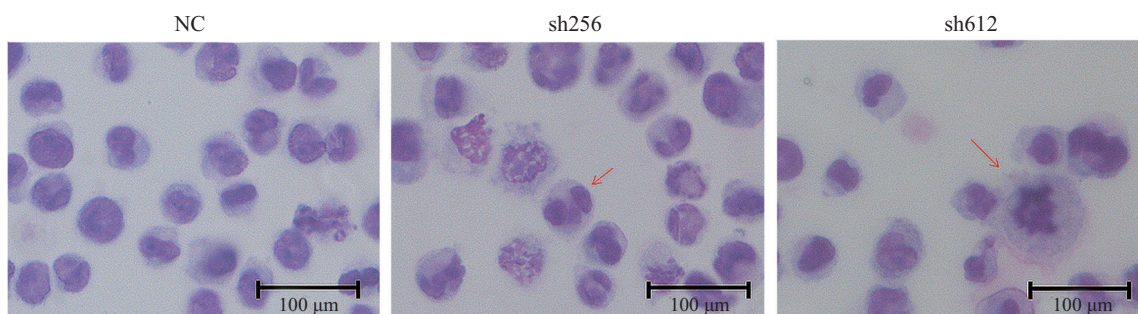
2.6 KCTD5对细胞周期相关信号通路的调控

Western blot结果显示, U937细胞干扰组较对照组Cyclin B1的表达水明显增加, 进一步证实了干扰

KCTD5使U937细胞发生了G₂/M期阻滞。Cdk1^{Tyr15}发生去磷酸化能够激活Cyclin B1/Cdk1, 促进细胞从G₂期进入M期。U937细胞中KCTD5干扰组较对照组Cdk1^{Tyr15}磷酸化水平减少, 说明干扰KCTD5通过使Cdk1^{Tyr15}发生去磷酸化而导致U937细胞发生了G₂/M期阻滞(图6)。

3 讨论

KCTD蛋白由于其含有与电压门控钾离子(K⁺)相似的结构域而得名^[12-13]。KCTD蛋白的功能包括转录抑制、细胞骨架调节、离子通道门控以及作为Cullin3 E3泛素连接酶的接头蛋白等^[7]。文献报道KCTD5由于其BTB结构域而常作为Cullin3 E3连接酶和其底物的接头蛋白^[14], 也有文献报道KCTD5过表达可以增加锌指蛋白ZNF711的稳定性^[15]。由于KCTD5发现较晚, 故对于其与人类相关的生物学

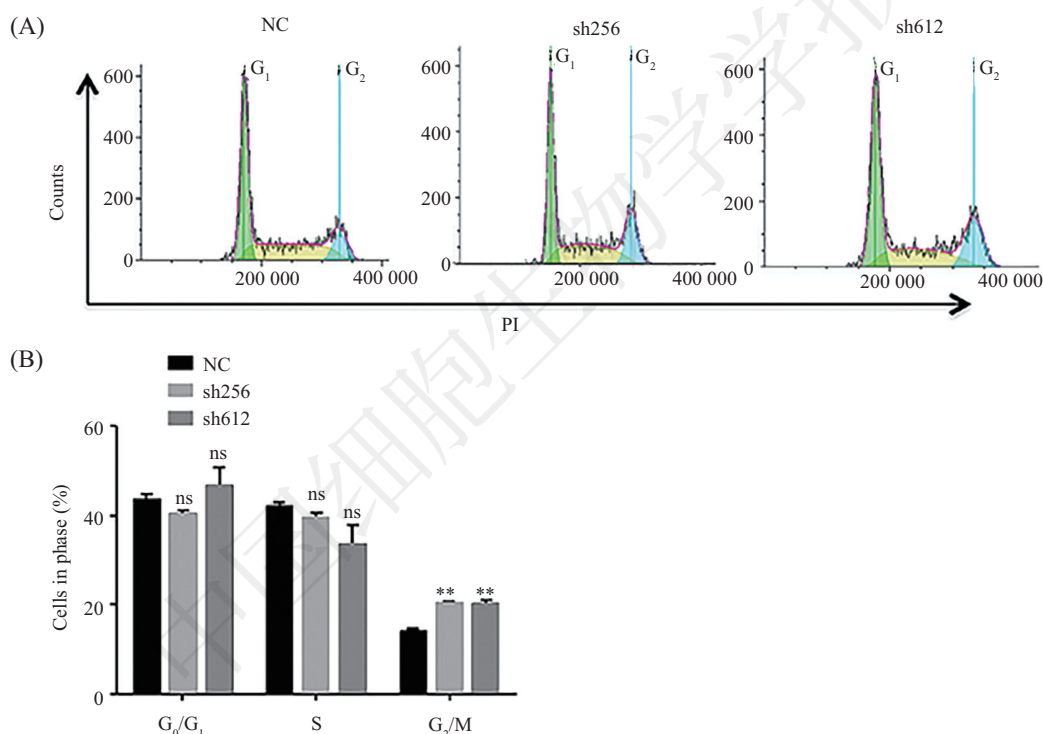


U937细胞NC、sh256和sh612的瑞氏染色结果,均为油镜下拍照结果,红色箭头指示多核细胞及染色质凝集现象。

Wright's staining results of U937 NC, sh256 and sh612 cells. They were taken under the oil microscope. Red arrows indicate multinucleated cells and chromatin condensation phenomenon.

图4 干扰KCTD5后U937细胞细胞形态的改变

Fig.4 Interference of KCTD5 changed the morphology of U937 cells



A: 干扰KCTD5, 利用流式细胞仪对细胞DNA的周期分布进行检测; B: 流式结果的统计分析。实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。 ** $P < 0.01$, 与对照组相比, ns代表与对照组相比, 差异无统计学意义。

A: after KCTD5 interference in U937 cells, DNA content of the cells were analyzed by flow cytometry; B: analysis the results of flow cytometry. Each point represents the mean±S.D. of 3 independent experiments. ** $P < 0.01$ vs control group. ns means no sense vs control group.

图5 干扰KCTD5诱导U937细胞发生G₂/M期阻滞

Fig.5 Interference of KCTD5 induces cell cycle arrested at G₂/M phase

功能以及与疾病之间的关系研究得较少。但有文献报道, 在幽门螺旋杆菌侵袭宿主细胞过程中, 干扰KCTD5的表达能够增强幽门螺旋杆菌对宿主黏附作用^[16]。此外, KCTD5对于维持果蝇的睡眠稳态具有关键作用^[17]。

本研究分析TCGA数据库相关数据, 发现KCTD5

的mRNA表达水平与AML病人生存期呈显著负相关, 且AML细胞KCTD5蛋白表达量显著高于正常对照细胞, 这提示KCTD5可能参与了AML的进展。采用shRNA干扰技术敲低人急性单核细胞白血病U937细胞株KCTD5的表达。首先, 通过CCK8及锥虫蓝拒染实验证实, 干扰KCTD5显著抑制了U937

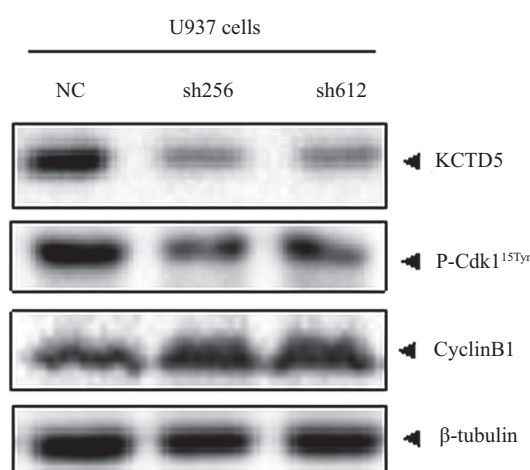


图6 KCTD5 对细胞周期相关信号通路的调控
Fig.6 Regulation of KCTD5 on cell cycle-related proteins

细胞的生长而对细胞活力无明显影响,提示干扰KCTD5对细胞生长的影响主要是通过抑制细胞增殖能力。接下来的形态学和流式实验结果显示干扰KCTD5使U937细胞发生G₂/M期阻滞。

G₂/M期检测点能防止受损的DNA和未完成复制的DNA进入有丝分裂期,在肿瘤发生发展及靶向治疗中起重要作用^[18]。有丝分裂期的关键调控因子是促分裂因子(mitosis-promoting factor, MPF),该因子由Cyclin B1和Cdk1组成,在有丝分裂G₂/M期转变中起关键作用^[19]。Cdk1^{Tyr15}发生去磷酸化能够激活Cyclin B1/Cdk1促进细胞从G₂期进入M期^[20-21]。本研究结果显示,干扰KCTD5能够使U937细胞Cdk1^{Tyr15}发生去磷酸化。

综上,本研究证实干扰KCTD5能够使U937细胞的Cdk1^{Tyr15}发生去磷酸化诱导细胞发生G₂/M期阻滞,从而发挥对U937细胞的生长抑制作用,其具体机制尚需进一步的深入研究。本研究初步揭示了干扰KCTD5对U937细胞的生长抑制机理,为进一步研究KCTD5蛋白在AML中的生物学意义提供了一定的科学理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64(1): 9-29.
- 2 Guo H, Lin S, Ren W, Lei Q, Chen Z, Zhang L, *et al.* Enhanced response of acute monocytic leukemia cells to low-dose cytarabine by 1,2,5-dihydroxyvitamin D₃. *Curr Med Sci* 2018; 38(1): 35-42.
- 3 宋善俊, 陆道培, 郝玉书. 白血病. 武汉: 湖北科学技术出版社,

- 2004, 152-3.
- 4 Minakata D, Fujiwara S, Ito S, Mashima K, Umino K, Nakano H, *et al.* A low-dose cytarabine, aclarubicin and granulocyte colony-stimulating factor priming regimen versus a daunorubicin plus cytarabine regimen as induction therapy for older patients with acute myeloid leukemia: A propensity score analysis. *Leuk Res* 2016; 42: 82-7.
- 5 Loh ML. Recent advances in the pathogenesis and treatment of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2011; 152(6): 677-87.
- 6 Khaled S, Malki MA, Marcucci G. Acute myeloid leukemia: biologic, prognostic, and therapeutic insights. *Oncology* 2016; 30(4): 318-29.
- 7 Liu Z, Xiang Y, Sun G. The KCTD family of proteins: structure, function, disease relevance. *Cell Biosci* 2013; 3(1): 45.
- 8 Pirone L, Esposito C, Correale S, Graziano G, Di Gaetano S, Vitagliano L, *et al.* Thermal and chemical stability of two homologous POZ/BTB domains of KCTD proteins characterized by a different oligomeric. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 162674.
- 9 Stogios P. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 2005; 6(10): R82.
- 10 Skoblov M, Marakhonov A, Marakasova E, Guskova A, Chandhoke V, Biredinc A, *et al.* Protein partners of KCTD proteins provide insights about their functional roles in cell differentiation and vertebrate development. *Bioassays* 2013; 35(7): 586-96.
- 11 Kim E J, Kim S H, Jin X, Jin X, Kim H. KCTD2, an adaptor of Cullin3 E3 ubiquitin ligase, suppresses gliomagenesis by destabilizing c-Myc. *Cell Death Differ* 2017; 24(4): 649-59.
- 12 Takahashi C, Suzuki T, Nishida E, Kusakabe M. Identification and characterization of *Xenopus* kctd15, an ectodermal gene repressed by the FGF pathway. *Int J Dev Biol* 2012; 56(5): 393-402.
- 13 Mei F, Xiang J, Han S, He Y, Sun G. Expression, purification, and secondary structure characterization of recombinant KCTD1. *Biochemistry* 2012; 77(8): 941-5.
- 14 Bayón, Yolanda, Trinidad AG, de la Puerta, María L, del Carmen

- Rodríguez, *et al.* KCTD5, a putative substrate adaptor for cullin3 ubiquitin ligases. *FEBS J* 2010; 275(15): 3900-10.
- 15 Rutz N, Heilbronn R, Weger S. Interactions of cullin3/KCTD5 complexes with both cytoplasmic and nuclear proteins: Evidence for a role in protein stabilization. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 464(3): 922-8.
- 16 Álvarez A, Felipe U, Jimena C, Romero C, Andrea S, Pena María A, *et al.* KCTD5 and ubiquitin proteasome signaling are required for helicobacter pylori adherence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 450.
- 17 Li Q, Kellner DA, Hatch HAM, Tomohiro Y, Sandrine S, Machold RP, *et al.* Conserved properties of *Drosophila* *Insomniac* link sleep regulation and synaptic function. *PLoS Genet* 2017; 13(5): e1006815.
- 18 Bucher N, Britten CD. G₂ checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Brit J Cancer* 2008; 98(3): 523-8.
- 19 王宏伟, 龚兴国. TBP-like Protein (TLP)通过G₂/M期阻滞抑制Hela细胞的增殖. *中国细胞生物学学报* (Wang Hongwei, Gong Xingguo. The TBP-like Protein (TLP) inhibits the proliferation of Hela cells through G₂/M phase arrest. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(4): 421-9.
- 20 Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr opin cell biol* 1999; 11(2): 267-73.
- 21 Perdiguerro E, Nebreda AR. Regulation of Cdc25C activity during the meiotic G₂/M transition. *Cell Cycle* 2004; 3(6): 731-5.