

乙肝病毒与类风湿性关节炎关键基因的筛选 鉴定

赵娜¹, 张小钰², 王洪星¹, 张义^{1*}

¹山东大学齐鲁医院检验科, 山东 济南

²中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院检验科, 山东 济南

收稿日期: 2023年12月27日; 录用日期: 2024年1月21日; 发布日期: 2024年1月30日

摘要

目的: 探究乙肝病毒(HBV)与类风湿性关节炎(RA)的共同基因特性。方法: 在GEO综合数据库获得HBV和RA基因芯片数据。采用加权基因共表达网络分析(WGCNA)鉴定HBV和RA相关的共表达模块, 并利用GO进行富集信号通路分析。利用验证队列筛选差异基因。通过免疫组化(IHC)和免疫荧光(IF)的方法对HBV合并RA患者外周血单个核细胞样本中关键基因进行验证。结果: 利用WGCNA筛选出HBV患者和RA患者外周血中44个共享基因。通过GO分析发现, 共享基因富集在锌离子结合、I-kappaB激酶/NF-kappaB激酶、外源性细胞凋亡的正调控等信号通路。差异分析显示, DYNLT1、GRIPAP1、kiAA2013、MLF2和TRAFD1在HBV和RA组中均上调。IHC和IF结果显示, 与对照组相比, MLF2和TRAFD1表达显著上调, 差异有统计学意义($p < 0.05$)。结论: MLF2和TRAFD1可能是HBV与RA的关键基因, 这为HBV合并RA的发病机制、新型生物标志物和潜在靶点的研究提供了参考。

关键词

乙型肝炎病毒, 类风湿性关节炎, 生物信息学, MLF2, TRAFD1

Screening and Identification of Key Genes for HBV and RA

Na Zhao¹, Xiaoyu Zhang², Hongxing Wang¹, Yi Zhang^{1*}

¹Department of Clinical Laboratory, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan Shandong

²Department of Clinical Laboratory, The 960th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Jinan Shandong

Received: Dec. 27th, 2023; accepted: Jan. 21st, 2024; published: Jan. 30th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 赵娜, 张小钰, 王洪星, 张义. 乙肝病毒与类风湿性关节炎关键基因的筛选鉴定[J]. 临床医学进展, 2024, 14(1): 1898-1907. DOI: 10.12677/acm.2024.141268

Abstract

Objective: This study aims to identify common genetic characteristics between hepatitis B virus (HBV) and rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** HBV and RA gene chip data were obtained from the GEO comprehensive database. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was conducted to identify co-expression modules related to HBV and RA, and GO analysis was used for enrichment signaling pathway analysis. Differential gene screening was performed using a validation cohort. The key genes in peripheral blood mononuclear cell samples of patients with HBV and RA were verified using immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF). **Results:** WGCNA identified 44 shared genes in the peripheral blood of HBV patients and RA patients. GO analysis revealed that these shared genes were enriched in signaling pathways such as zinc ion binding, I-kappaB kinase/NF-kappaB kinase, and positive regulation of exogenous apoptosis. Differential analysis showed that DYNLT1, GRIPAP1, kiAA2013, MLF2, and TRAFD1 were up-regulated in both the HBV and RA groups. IHC and IF results demonstrated a significant up-regulation of MLF2 and TRAFD1 expression compared to the control group ($p < 0.05$). **Conclusion:** MLF2 and TRAFD1 may serve as key genes linking HBV and RA, providing valuable insights for studying the pathogenesis, identifying new biomarkers, and potential targets for HBV combined with RA.

Keywords

Hepatitis B Virus, Rheumatoid Arthritis, Bioinformatics, MLF2, TRAFD1

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个主要的全球健康问题。HBV 感染除了引起肝脏疾病,可能与其他自身免疫性疾病有关。多达 25%的慢性 HBV 感染患者报告有关节炎症状[1]。类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病,每年发病率为 25~50/100,000 人[2],其确切的发病原因尚不完全清楚,但遗传、环境和生活方式因素都可能与其发病有关[3] [4]。尽管已有研究表明 HBV 可能与 RA 有关,但它们之间的确切关系仍然不清楚。本研究收集 GEO 公共数据库中的基因芯片数据,使用验证队列筛选差异基因,通过免疫组化(IHC)和免疫荧光(IF)的方法对 HBV 合并 RA 患者外周血单个核细胞样本中关键基因进行验证,旨在明确调控 HBV 和 RA 的关键基因,更好地理解 HBV 和 RA 的关联,对于深入了解这两种疾病的发病机制、开发新型生物标志物和潜在治疗靶点都具有重要意义。

2. 材料和方法

2.1. 数据采集

在 GEO 数据库中使用“HBV”或“RA”为关键词,搜索与这两种疾病相关的基因芯片数据。筛选编号 GSE119322, GSE58208 为外周血单个核细胞 HBV 芯片,共包含 37 例 HBV 患者和 12 例健康对照。GSE68689, GSE110169 为外周血单个核细胞 RA 芯片,共包含 102 例 RA 患者和 80 例健康对照,HBV 和 RA 患者 GEO 数据集信息见表 1。为了使数据更适合后续的基因表达谱分析,对筛选出来的数据进行 log₂ 转换。为了得到每个基因的表达水平,根据相应平台的注释文档,将探针与其基因符号进行匹配。

数据输出以行名为样本名，以列名为基因符号的基因矩阵，将用于后续的分析。

2.2. 临床样本收集

收集 2022 年 10 月至 2023 年 5 月在山东大学齐鲁医院就诊健康体检志愿者($n = 5$)，HBV 患者($n = 5$)，乙肝患者($n = 5$)，HBV 合并乙肝患者($n = 5$)的外周血样本。所有样本获得患者书面知情同意。本研究获得山东大学齐鲁医院伦理委员会批准(KYLL-202210-069-1)。

2.3. 加权基因共表达网络分析(WGCNA)

使用 WGCNA 方法来获得 HBV 和 RA 相关的模块。使用 R 软件 4.0.3 中的“WGCNA”包进行 WGCNA 分析和软阈值选择。使用该软件包中的“Select Soft Threshold”功能选择了适当的软阈值 β (介于 1~20 之间)，以符合无尺度网络标准。利用 Pearson 相关性分析计算出所有基因对的软阈值 β ，并使用基因相关矩阵构建邻接矩阵(adjacency matrix)。计算公式为 $a_{ij} = |s_{ij}|^\beta$ (a_{ij} 为邻接矩阵，介于基因组之间的相关矩阵； s_{ij} 为相似矩阵，由所有基因对的 Pearson 相关系数 p 计算而来； β 为软阈值)。将拓扑重叠矩阵(TOM)和相应的不相似度矩阵(1-TOM)从邻接矩阵转换为拓扑重叠矩阵。构建系统聚类树图，将相似的基因表达划分为不同的模块。利用模块特征基因(ME)总结了各模块的表达谱，并计算了 ME 与临床特征之间的相关性。选择与临床特征高度相关的模块，从中选择后续分析所需的基因。在 HBV 的 WGCNA 分析中，软阈值 β 设为 2；而在 RA 的分析中，软阈值 β 设为 3。其他参数设置如下：networktype = “unsigned”，minmodulesize = 20，mergecutheight = 0.25 和 deepsplit = 2。

2.4. Glue Go 进行基因本体(GO)富集分析

利用 Glue Go 包中的“goana”函数对基因表达数据进行 GO 富集分析。选择显著性水平为 0.05，并根据需要进行多重比较校正。利用 Glue Go 包中的“gogplot”函数绘制 GO 富集分析结果的可视化图。

2.5. 差异基因分析

在 GEO 数据库中获得 HBV (GSE58208)和 RA (GSE15573)数据集，验证共享基因的差异表达，使用热图对结果进行可视化。截止值为 $|\log_2(\text{foldchange})| > 1$ ， $p < 0.05$ 。

2.6. 免疫组化(IHC)

外周血用 4%多聚甲醛固定，通过室温下 3%过氧化氢溶液孵育抑制内源性过氧化物酶活性。将抗原表位与 20%的正常山羊血清孵育 1 h，与一抗(DYNLT1、GRIPAP1、kiAA2013、MLF2 和 TRAFD1, Abcam)在 4℃下孵育 12 h。用水洗涤 3 次，将载玻片与 HRP 偶联的二抗在室温下孵育 1 h。使用 DAB 显色试剂观察切片，用苏木精进行复染。利用奥林巴斯荧光显微镜系统拍摄图像，每个视野至少包含 5 个随机重叠区域。

2.7. 免疫荧光(IF)

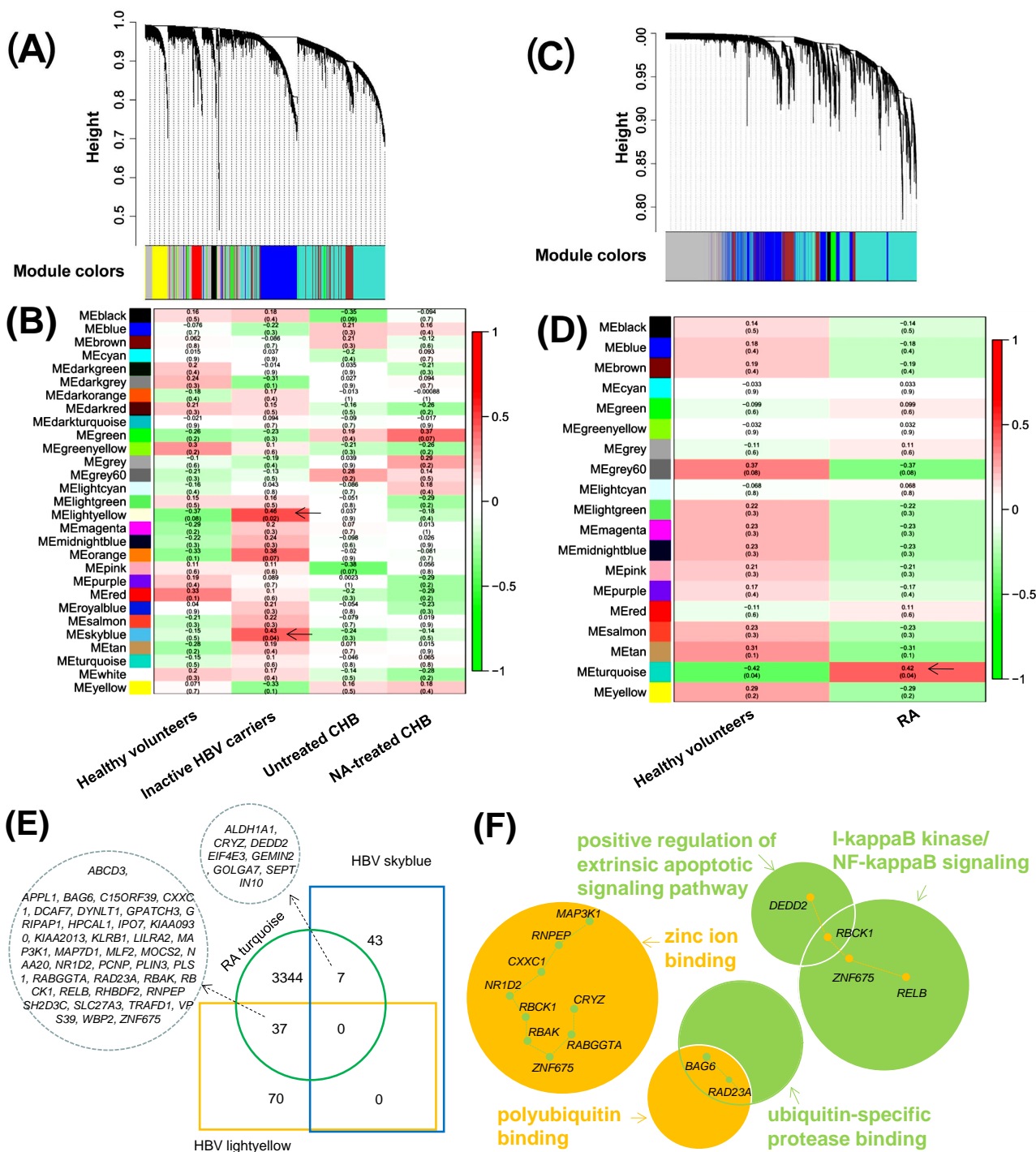
载玻片的制备方法与 IHC 相同。与 IHC 不同的是，使用了 Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 594 偶联的二抗(1:1000)来代替 HRP 偶联的二抗，并用 DAPI 染液对细胞核进行染色。不需要使用 DAB 显色试剂，直接用苏木精进行复染即可。

2.8. 统计学分析

利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件对数据进行统计。对计量资料进行正态性检验，符合正态分布的数据，运用 Student's t 检验评估两组之间的变量差异，Tukey 多重比较检验法比较多组之间的差异， $p < 0.05$ 作为统计学意义的判断标准。

3. 结果

3.1. HBV 和 RA 关键基因的筛选



(A) HBV 共表达基因的簇状树状图; (B) RA 中共表达基因的簇状树状图; (C) HBV 中的模块 - 性状关系; (D) RA 中的模块 - 性状关系; (E) HBV 的天蓝色和浅黄色模块与 RA 的绿松石模块重叠的共享基因; (F) Glue Go 进行基因本体(GO)富集分析

Figure 1. WGCNA and Clue GO enrichment analysis

图 1. WGCNA 和 Clue GO 富集分析

通过 WGCNA 分析在 GSE119322 和 GSE58208 数据集中确定 29 个模块,每个颜色代表不同的模块。如图 1(A),图 1(B)所示,根据 Spearman 相关系数绘制模块 - 性状关系热图,以评估各模块与疾病的相关性。两个模块“天蓝色”和“淡黄色”与 HBV 高度相关,被选为 HBV 相关模块(天蓝模块: $r = 0.43$, $p = 0.04$; 淡黄色模块: $r = 0.46$, $p = 0.02$)。天蓝色和淡黄色模块与 HBV 正相关,分别包含 98 和 97 个基因。如图 1(C),图 1(D)所示,在 GSE68689、GSE110169 中共鉴定出 19 个模块,只有模块“绿松石色”与 RA ($r = 0.42$, $p = 0.04$),包括 415 个基因。如图 1(E)所示,在 HBV 和 RA 的阳性相关模块中,有 44 个共享基因与 HBV、RA 相关。为了探索共享基因的潜在机制,我们用 Glue Go 进行了 GO 富集分析,与两个疾病相关的信号通路分别是锌离子结合信号通路、I- κ B 激酶/NF- κ B 信号通路、外源性凋亡的正调控信号通路、泛素特异性蛋白酶结合信号通路和聚泛素结合信号通路(见图 1(F))。这些结果有助于进一步了解 HBV 和 RA 的发病机制,为未来的研究提供有价值的线索。

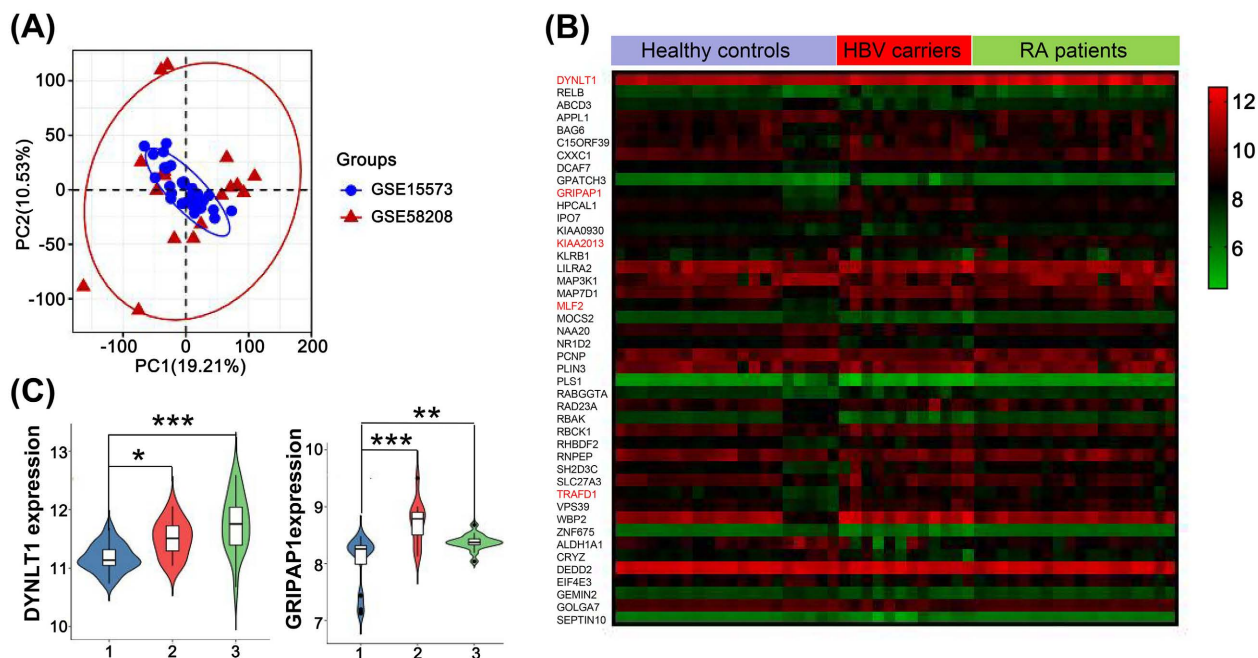
Table 1. HBV and RA patient GEO data set information

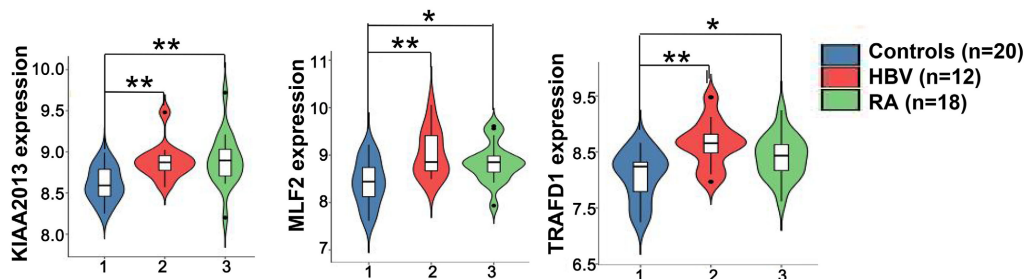
表 1. HBV 和 RA 患者 GEO 数据集信息

ID	GSE number	Platform	Samples	Source types	Disease	Group
1	GSE119322	GPL6102	32	25 patients and 7 controls	HBV	Discovery cohort
2	GSE58208	GPL570	17	12 patients and 5 controls	HBV	Discovery cohort
3	GSE68689	GPL20171	21	16 patients and 5 controls	RA	Discovery cohort
4	GSE110169	GPL13667	161	86 patients and 75 controls	RA	Discovery cohort
5	GSE15573	GPL6102	33	18 patients and 15 controls	RA	Validation cohort
6	GSE58208	GPL570	17	12 patients and 5 controls	HBV	Validation cohort

3.2. HBV 和 RA 关键基因的鉴定

为了消除数据中的冗余,提高数据的质量和效率,本研究对 HBV 的数据集 GSE58208 和 RA 数据集 GSE15573 进行 PCA 分析,如图 2(A)所示。差异分析显示,与对照组相比,HBV 和 RA 中 DYNLT1、GRIPAP1、kiAA2013、MLF2 和 TRAFD1 基因均显著上调,差异有统计学意义($p < 0.05$,图 2(B),图 2(C))。





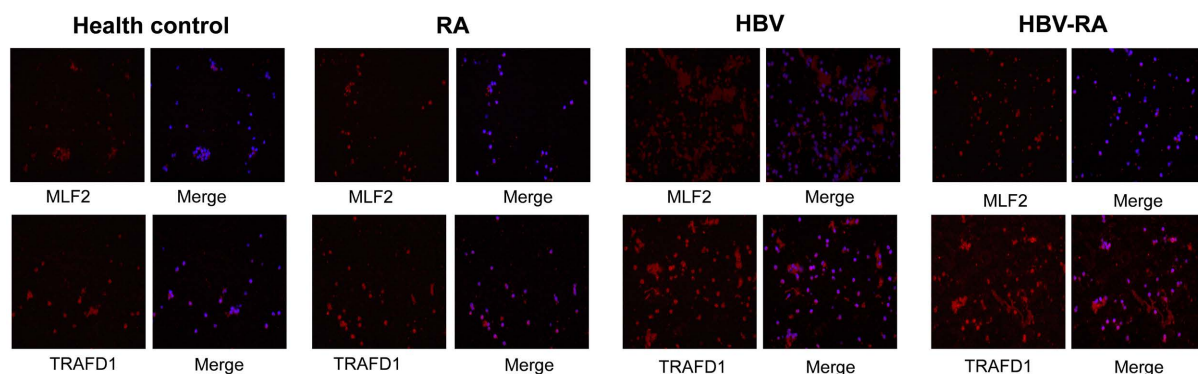
(A) PCA 分析 HBV 和 RA 的数据集; (B) 热图显示共享基因在健康对照组、HBV 组及 RA 组的表达; (C) 小提琴图展示 DYNLT1、GRIPAP1、kiAA2013、MLF2 和 TRAFD1 的表达

Figure 2. Differential analysis of key genes of HBV and RA

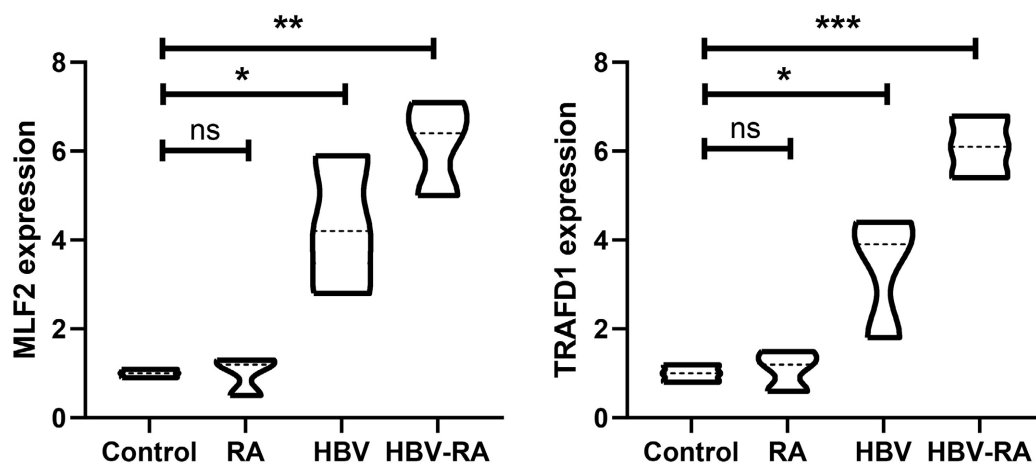
图 2. 差异分析 HBV 和 RA 关键基因

3.3. HBV 合并 RA 中关键基因的验证

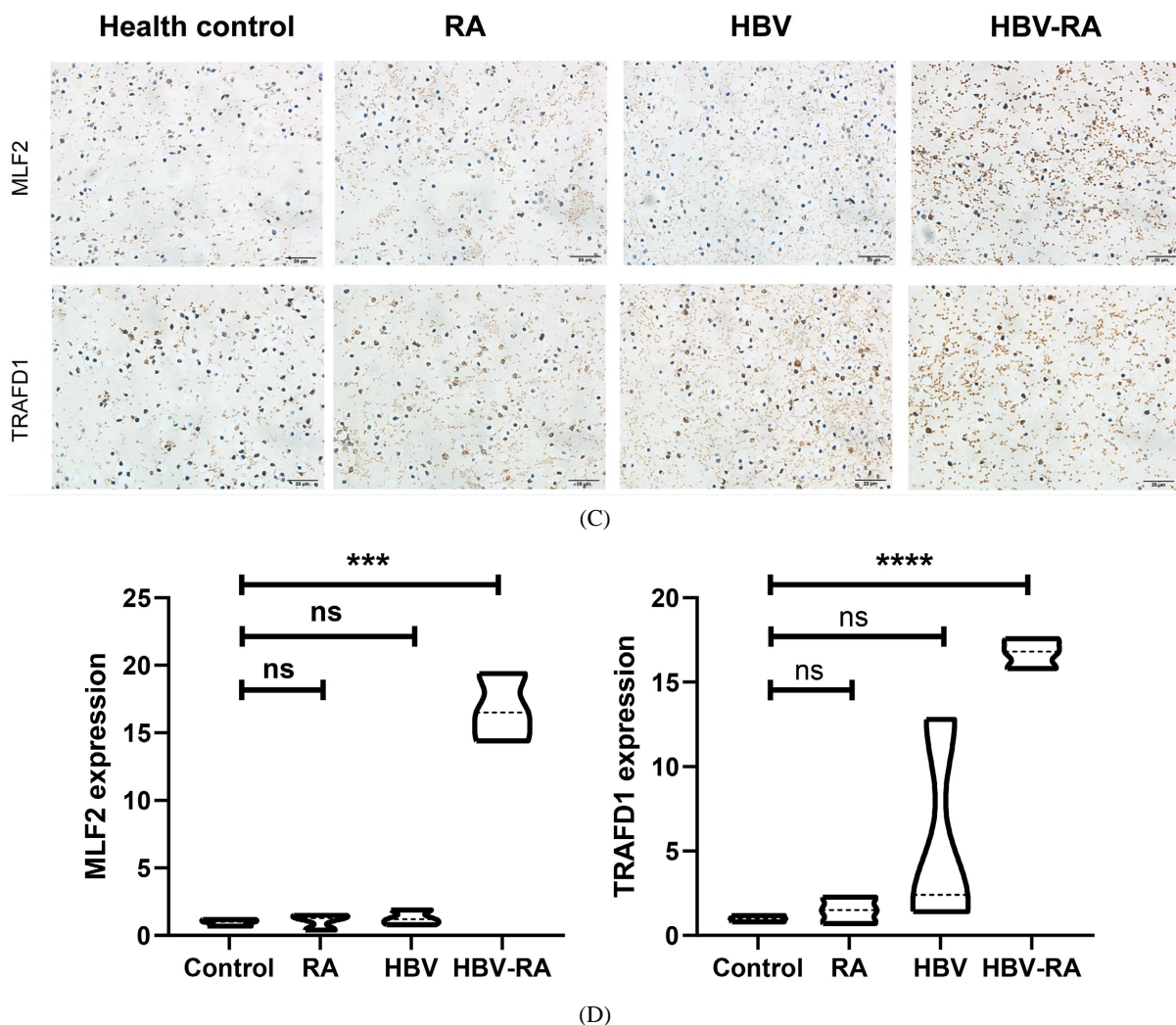
为了进一步验证 HBV 和 RA 中的关键基因, 我们收集健康查体志愿者($n=5$), HBV 患者($n=5$), 乙肝患者($n=5$), HBV 合并乙肝患者($n=5$)单个核细胞对 DYNLT1、GRIPAP1、kiAA2013、MLF2 和 TRAFD1 表达进行验证。IF 结果显示与健康对照组相比, HBV-RA 组中 MLF2 ($p=0.0011$)和 TRAFD1 ($p=0.0003$) 表达显著上调, 差异有统计学意义(图 3(A), 图 3(B))。IHC 显示与健康对照组相比, HBV-RA 组中 MLF2 ($p=0.0004$)和 TRAFD1 ($p<0.0001$)表达均增多, 差异有统计学意义(图 3(C), 图 3(D))。



(A)



(B)



(A) 免疫荧光检测健康对照组、RA 组、HBV 组及 HBV 合并 RA 患者外周血单个核细胞 MLF2 和 TRAFD1 的表达代表性图片和(B)统计图(C)免疫荧光检测健康对照组、RA 组、HBV 组及 HBV 合并 RA 患者外周血单个核细胞 MLF2 和 TRAFD1 的表达代表性图片和(D)统计图

Figure 3. Verification of key genes in HBV combined with RA in clinical specimens

图 3. HBV 合并 RA 中关键基因在临床标本中的验证

4. 讨论

RA 的发病机制尚不清楚, Trépo C.等研究表明 HBV 和 RA 之间存在病理联系, 提示 HBV 可能是诱发 RA 的重要因素[5]。然而, HBV 诱导 RA 的分子机制尚不清楚, 仍需深入研究。WGCNA 是一种强大的算法, 可以专门筛选与临床性状相关的基因, 并获得具有较高生物学意义的共表达模块。为了更深入地理解 RA 和 HBV 之间的内在联系, 我们首次利用 WGCNA 的方法探索了 HBV 和 RA 的共同基因和信号通路。

在本研究中, 通过 WGCNA 分析, 筛选出了 5 个与 HBV 和 RA 发生发展相关的关键基因: DYNLT1、GRIPAP1、KiAA2013、MLF2 和 TRAFD1。提示这些基因可能在 HBV 感染或 RA 的发病机制中起着重要的作用。例如, DYNLT1 是一种细胞质动力蛋白家族的成员, 负责物质沿微管运输[6]。它可调节初级纤毛的长度, 并与动力蛋白相互作用, 促进纤毛蛋白的转运[7]。DYNLT1 异常表达与男性不育密切相关

[8]。此外, DYNLT1 在体外促进乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和线粒体代谢, 在体内促进乳腺癌的发展[9]。GRIPAP1 属于 GRIP 相关蛋白, 为小 G 蛋白 Ras 家族(RasGEF)的鸟嘌呤核苷酸交换因子[10]。有报道显示其可以促进乳腺癌的转移[11] [12], 并且与去势抗性前列腺癌也有关[13]。KiAA2013 是一种分子量为 69157 Da 由 634 个氨基酸组成的膜蛋白[14], 其在疾病中的作用尚不清楚。尚未见文献报道这些基因在 HBV 或 RA 中的作用, 我们结果提示 DYNLT1、GRIPAP1、KiAA2013 等关键基因可能在 HBV 或 RA 的发病机制中发挥重要作用。

本研究通过 IHC 和 IF 检测了健康志愿者, HBV 患者, RA 患者, HBV 合并 RA 患者 5 个关键基因的表达, 最终确定了 MLF2 和 TRAFD1 在 HBV 相关 RA 中表达升高。髓系白血病因子 2 (MLF2)是髓系白血病因子家族的一个成员, 是核膜泡的腔内成分, 可以减少含苯丙氨酸-甘氨酸重复序列的核孔蛋白的积累, 在活细胞成像和功能表征方面具有广泛的用途[15] [16]。MLF2 已被证明与突变的杭丁顿蛋白 (HTT)相互作用, 并抑制 HTT 的聚集和毒性[17]。TRAFD1 (FLN29)是一种先前显示抑制单核细胞/巨噬细胞中的 Toll 样受体信号传导的蛋白质, 从而抑制对先天免疫的炎症反应[18]。它与 Plekhm1 相互作用并调节破骨细胞酸化和再吸收[19]。此外, MLF2 可能作为乳腺癌和慢性粒细胞性白血病的致病因子[20]。MLF2 通过抑制 USP7 与 p53 的结合, 拮抗 USP7 介导的 p53 去泛素化, 从而导致 p53 失稳促进结直肠癌的发生[21]。Bhuvanesh Dave 等研究发现由 HIF1 α 介导的缺氧增加了 iNOS 信号通路, 同时诱导了 MLF2 的表达。iNOS 的特异性抑制剂, 通过抑制 iNOS 以剂量依赖的方式降低 MLF2 的表达。此外, HIF1 α 同时减少, 表明 iNOS 和 HIF1 α 之间的串扰是受 MLF2 调节的。这些数据表明, MLF2 在 iNOS 和 HIF1 α 之间的串扰中起着关键作用, 可以促进一氧化氮合酶信号传导[22]。NO 的过量产生可诱导炎症细胞因子的产生和释放, 并作为自由基气体积累并引发氧化应激, NOS/NO 信号通路在 RA 的发病机制中起关键作用[23]。HBV 能够上调人肝细胞中 NOS2 基因的表达, 可能介导慢性病毒性肝炎的病程[24]。尚未见文献报道这些基因在 HBV 相关 RA 的作用, 我们结果显示 MLF2 和 TRAFD1 在 HBV 相关 RA 中表达升高, 提示其可能在发病机制中起着重要的作用, 可能成为未来研究的重要方向。

本研究进一步确定了与 HBV 与 RA 两个疾病相关的信号通路分别是锌离子结合信号通路、I- κ B 激酶/NF- κ B 信号通路、外源性凋亡的正调控信号通路、泛素特异性蛋白酶结合信号通路和聚泛素结合信号通路。例如, 锌离子引发乙型肝炎病毒衣壳蛋白的构象变化和寡聚化[25]。核因子- κ B (NF- κ B)激活级联反应在免疫反应、炎症和细胞凋亡中起着至关重要的作用。外部凋亡途径是由死亡配体触发的细胞表面死亡受体发出的信号启动的[26]。死亡配体的结合导致了死亡受体信号平台的形成和随后的凋亡启动[27]。泛素特异性蛋白酶(USP)是最大的 DUB 家族, 种类最强, 在调节免疫细胞功能、调节免疫应答以及参与肿瘤进展过程中的抗原加工和呈递方面发挥关键作用[28]。泛素特异性蛋白酶(USPs)是一种去泛素化的酶, 多聚泛素结合可以与 ABIN1 相互作用抑制 TLR-MyD88 下游信号对预防自身免疫至关重要[29]。例如, Xiaobo Luo 等研究发现[30], 与骨关节炎相比, RA-FLS 中 USP5 的表达上调, 并且 USP5 过表达显著加剧促炎细胞因子的产生和相关的核因子 κ B (NF- κ B)信号转导激活。此外, 发现 USP5 与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)相互作用并去除其 K48 连接的多泛素化链, 从而稳定 TRAF6。这些研究显示, USP5 阳性细胞调节 RA-FLS 的炎症过程。这提示以上信号通路可能在 HBV 和 RA 的发病机制中发挥重要作用。

5. 总结

综上所述, 本研究鉴定了参与 HBV 和 RA 发病机制的关键基因和相关信号通路。这些基因和通路是否能够成为 HBV 合并 RA 新的生物标志物和潜在的靶点, 仍需进一步研究。这不仅有利于 HBV 合并 RA 分子机制的研究, 也为临床更准确地诊断和治疗提供参考。

基金项目

国家自然科学基金项目(项目编号: 82272410, 81972005)。

参考文献

- [1] Mak, L.Y., *et al.* (2021) HBV RNA Profiles in Patients with Chronic Hepatitis B under Different Disease Phases and Antiviral Therapy. *Hepatology*, **73**, 2167-2179. <https://doi.org/10.1002/hep.31616>
- [2] Petri, M., *et al.* (2021) Comparison of the 2019 European Alliance of Associations for Rheumatology/American College of Rheumatology Systemic Lupus Erythematosus Classification Criteria with Two Sets of Earlier Systemic Lupus Erythematosus Classification Criteria. *Arthritis Care & Research*, **73**, 1231-1235. <https://doi.org/10.1002/acr.24263>
- [3] Smith, M.H. and Berman, J.R. (2022) What Is Rheumatoid Arthritis? *JAMA*, **327**, 1194. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.0786>
- [4] Gravallese, E.M. and Firestein, G.S. (2023) Rheumatoid Arthritis—Common Origins, Divergent Mechanisms. *The New England Journal of Medicine*, **388**, 529-542. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2103726>
- [5] Trépo, C., Chan, H.L. and Lok, A. (2014) Hepatitis B Virus Infection. *Lancet*, **384**, 2053-2063. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60220-8)
- [6] Saito, M., *et al.* (2021) Tctex-1 Augments G Protein-Coupled Receptor-Mediated G(s) Signaling by Activating Adenylyl Cyclase. *Journal of Pharmacological Sciences*, **145**, 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.jpsh.2020.11.011>
- [7] Miao, S., *et al.* (2023) Identification of DYNLT1 Associated with Proliferation, Relapse, and Metastasis in Breast Cancer. *Frontiers in Medicine*, **10**, Article 1167676. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1167676>
- [8] Li, D.Y., *et al.* (2022) Sperm flagellar 2 (SPEF2) Is Essential for Sperm Flagellar Assembly in Humans. *Asian Journal of Andrology*, **24**, 359-366. <https://doi.org/10.4103/aja202154>
- [9] Huang, L., Wei, B., Zhao, Y., Gong, X. and Chen, L. (2023) DYNLT1 Promotes Mitochondrial Metabolism to Fuel Breast Cancer Development by Inhibiting Ubiquitination Degradation of VDAC1. *Molecular Medicine*, **29**, Article No. 72. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00663-0>
- [10] Williamson, S.R., *et al.* (2020) Report from the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers: III: Molecular Pathology of Kidney Cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*, **44**, e47-e65. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001476>
- [11] Goodarzi, H., *et al.* (2016) Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression. *Cell*, **165**, 1416-1427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.046>
- [12] Bai, M., Che, Y., Lu, K. and Fu, L. (2020) Analysis of Deubiquitinase OTUD5 as a Biomarker and Therapeutic Target for Cervical Cancer by Bioinformatic Analysis. *PeerJ*, **8**, e9146. <https://doi.org/10.7717/peerj.9146>
- [13] Adler, D., *et al.* (2014) MED15, Encoding a Subunit of the Mediator Complex, Is Overexpressed at High Frequency in Castration-Resistant Prostate Cancer. *International Journal of Cancer*, **135**, 19-26. <https://doi.org/10.1002/ijc.28647>
- [14] Zhang, M., Yang, L., Chen, D. and Heisterkamp, N. (2023) Drug-Tolerant Persister B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.28.530540>
- [15] Rampello, A.J., *et al.* (2020) Torsin ATPase Deficiency Leads to Defects in Nuclear Pore Biogenesis and Sequestration of MLF2. *Journal of Cell Biology*, **219**, e201910185. <https://doi.org/10.1083/jcb.201910185>
- [16] Prophet, S.M., *et al.* (2022) Atypical Nuclear Envelope Condensates Linked to Neurological Disorders Reveal Nucleoporin-Directed Chaperone Activities. *Nature Cell Biology*, **24**, 1630-1641. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-01001-y>
- [17] Banerjee, M., Datta, M. and Bhattacharyya, N.P. (2017) Modulation of Mutant Huntingtin Aggregates and Toxicity by Human Myeloid Leukemia Factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **82**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.11.008>
- [18] Yan, J., *et al.* (2020) Black Carp TRAFD1 Restrains MAVS-Mediated Antiviral Signaling during the Innate Immune Activation. *Fish & Shellfish Immunology*, **103**, 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.045>
- [19] Witwicka, H., *et al.* (2015) TRAFD1 (FLN29) Interacts with Plekhm1 and Regulates Osteoclast Acidification and Resorption. *PLOS ONE*, **10**, e0127537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127537>
- [20] Yang, J., *et al.* (2020) The Role of Phosphorylation of MLF2 at Serine 24 in BCR-ABL Leukemogenesis. *Cancer Gene Therapy*, **27**, 98-107. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0152-4>
- [21] Fang, D., *et al.* (2023) MLF2 Negatively Regulates P53 and Promotes Colorectal Carcinogenesis. *Advanced Science*, **10**, e2303336. <https://doi.org/10.1002/advs.202303336>

-
- [22] Dave, B., *et al.* (2014) Targeting RPL39 and MLF2 Reduces Tumor Initiation and Metastasis in Breast Cancer by Inhibiting Nitric Oxide Synthase Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 8838-8843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320769111>
- [23] Huang, J.B., Chen, Z.R., Yang, S.L. and Hong, F.F. (2023) Nitric Oxide Synthases in Rheumatoid Arthritis. *Molecules*, **28**, Article 4414. <https://doi.org/10.3390/molecules28114414>
- [24] Guidotti, L.G., McClary, H., Loudis, J.M. and Chisari, F.V. (2000) Nitric Oxide Inhibits Hepatitis B Virus Replication in the Livers of Transgenic Mice. *Journal of Experimental Medicine*, **191**, 1247-1252. <https://doi.org/10.1084/jem.191.7.1247>
- [25] Hsu, J.L., *et al.* (2013) Zinc-Dependent Interaction between JAB1 and Pre-S2 Mutant Large Surface Antigen of Hepatitis B Virus and Its Implications for Viral Hepatocarcinogenesis. *Journal of Virology*, **87**, 12675-12684. <https://doi.org/10.1128/JVI.01497-13>
- [26] Nováková, J., Talacko, P., Novák, P. and Vališ, K. (2019) The MEK-ERK-MST1 Axis Potentiates the Activation of the Extrinsic Apoptotic Pathway during GDC-0941 Treatment in Jurkat T Cells. *Cells*, **8**, Article 191. <https://doi.org/10.3390/cells8020191>
- [27] Oh, Y.T. and Sun, S.Y. (2021) Regulation of Cancer Metastasis by TRAIL/Death Receptor Signaling. *Biomolecules*, **11**, Article 499. <https://doi.org/10.3390/biom11040499>
- [28] Gao, H., *et al.* (2023) Targeting Ubiquitin Specific Proteases (USPs) in Cancer Immunotherapy: From Basic Research to Preclinical Application. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **42**, Article No. 225. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02805-y>
- [29] Nanda, S.K., *et al.* (2011) Polyubiquitin Binding to ABIN1 Is Required to Prevent Autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, **208**, 1215-1228. <https://doi.org/10.1084/jem.20102177>
- [30] Luo, X.B., *et al.* (2020) Proinflammatory Effects of Ubiquitin-Specific Protease 5 (USP5) in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes. *Mediators of Inflammation*, **2020**, Article ID: 8295149. <https://doi.org/10.1155/2020/8295149>