

p. G38R 和 p. D40G 突变通过改变 ANXA11 蛋白亚细胞定位引发肌萎缩侧索硬化症

廖迪¹, 胡乾², 廖巧¹, 黄操³, 刘卫平¹, 毕方方¹

1. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008
2. 中南大学医学遗传学研究中心, 湖南省长沙市 410008
3. 托马斯杰佛逊大学病理、解剖和细胞生物化学系, 宾夕法尼亚州费城 19107

摘要:目的 本研究旨在研究 Annexin A11 蛋白 (ANXA11) N 端突变 p. G38R 和 p. D40G 对该蛋白亚细胞定位的影响, 探索其引起肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 的机制。**方法** 构建表达 ANXA11 野生型蛋白 (wt) 及 p. G38R 和 p. D40G 突变蛋白的真核表达载体, 采用激光共聚焦显微镜检测 3 种蛋白在 HEK293 细胞中的亚定位。**结果** ANXA11 wt、p. G38R 及 p. D40G 蛋白均可在 HEK 293 细胞中形成囊泡状结构, 其中 p. G38R 组囊泡面积大于 wt 组 ($P=0.002$) 和 p. D40G 组 ($P=0.006$), 后两组间无明显差异 ($P=0.791$)。在单个细胞中, ANXA11 wt 形成的囊泡数目大于 p. G38R 组 ($P=0.002$) 和 p. D40G 组 ($P<0.001$), 而 p. G38R 组和 p. D40G 组差异不明显 ($P=0.516$)。与 ANXA11 wt 相比, p. G38R 蛋白 ($P<0.001$) 和 p. D40G 蛋白 ($P<0.001$) 在细胞核内的分布显著减少, 后者两者间无明显差异 ($P=0.519$)。**结论** p. G38R 和 p. D40G 突变减少了 ANXA11 蛋白相关囊泡状结构的数目和 ANXA11 蛋白在细胞核的分布, 这可能是引起 ALS 发病的机制之一。

关键词: 肌萎缩侧索硬化症; ANXA11; 亚细胞定位

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.03.015

Mutations p. G38R and p. D40G induce amyotrophic lateral sclerosis by changing the subcellular localization of Annexin A11 protein

LIAO Di, HU Qian, LIAO Qiao, HUANG Cao, LIU Wei-Ping, BI Fang-Fang. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: BI Fang-Fang, E-mail: 119072898@qq.com

Abstract: Objective To investigate the influence of the N-terminal mutations of Annexin A11 (ANXA11) protein, p. G38R and p. D40G, on the subcellular localization of this protein and their mechanism of action in inducing amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Methods Eukaryotic expression vectors which expressed ANXA11 wild-type protein, ANXA11 p. G38R protein, or ANXA11 p. D40G protein were constructed, and a laser scanning confocal microscope was used to investigate the subcellular localization of these three proteins in HEK293 cells. **Results** ANXA11 wild-type protein, ANXA11 p. G38R protein, and ANXA11 p. D40G protein formed a vesicular structure in HEK293 cells, and the p. G38R group had significantly larger vesicles than the ANXA11 wild-type group ($P=0.002$) and the p. D40G group ($P=0.006$), while there was no significant difference between the latter two groups ($P=0.791$). In a single cell, the ANXA11 wild-type group had significantly more vesicles than the p. G38R group ($P=0.002$) and the p. D40G group ($P<0.001$), and there was no significant difference between the p. G38R group and the p. D40G group ($P=0.516$). Compared with ANXA11 wild-type protein, p. G38R protein and p. D40G protein had significantly reduced distribution in the nucleus (both $P<0.001$), and there was no significant difference between p. G38R protein and p. D40G protein ($P=0.519$). **Conclusions** The p.

收稿日期: 2018-02-14; 修回日期: 2018-05-21

作者简介: 廖迪 (1992-), 女, 在读硕士, 主要从事肌萎缩侧索硬化症的研究。

通信作者: 毕方方 (1977-), 男, 博士学位, 副教授, 副主任医师, 主要从事肌萎缩侧索硬化症的研究。E-mail: 119072898@qq.com。

G38R and p. D40G mutations reduce the number of vesicles of ANXA11 protein and the distribution of ANXA11 protein in the nucleus, which may be one of the mechanism of ALS.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis; annexin A11; subcellular localization

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是上、下运动神经元均受累特征性表现出进行性肌无力、肌萎缩、延髓麻痹及锥体束征的致死性神经退行性疾病。全世界 ALS 年发病率约为 1 ~ 3 / 10 万人, 多为散发性, 约有 5% ~ 10% 的患者有阳性家族史^[1,2]。ALS 确切的致病机制尚未明确, 目前认为遗传因素在发病中起主要作用, 其可引起多种细胞功能失调, 包括 RNA 代谢紊乱、蛋白质稳态破坏、核质运输受阻、内质网压力增大和核蛋白动力学障碍等, 最终损害了运动神经元^[3,4]。

近年来, 随着全基因组测序和全外显子组测序等大规模平行测序的开展, ALS 相关基因的发现出现了新浪潮。2017 年, Smith 等^[5] 通过全外显子测序技术筛查了 751 例家族性 ALS 患者和 180 例散发性 ALS 患者, 发现了一个新的 ALS 致病基因 annexin A11 (ANXA11)。这些患者的发病年龄在 50 ~ 83 岁之间, 平均 67 岁, 表现为肢体和延髓均受累, 未合并额颞叶痴呆。这次研究一共发现了 ANXA11 的 6 个错义突变, 分别为位于其蛋白质 N 端的 p. G38R、p. D40G、p. G175R 和 p. G189E 及位于 C 端的 p. R235Q 和 p. R346C。本研究选取位于 ANXA11 蛋白 N 端与钙周期蛋白 (S100A6) 蛋白结合位点 (50 ~ 62 位氨基酸残基) 附近的点突变 p. G38R 和 p. D40G 作为研究对象, 比较这两个位点发生突变后对 ANXA11 蛋白亚细胞定位的影响, 探索其引起 ALS 的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾细胞系 HEK293 细胞由中南大学遗传实验室提供。胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司。脂质体 Lipofectamine 2000[®] 购自 Life-Tech 公司。编码人 ANXA11 蛋白 cDNA 序列的质粒 pANXA11-Flag 购自 Genscript 公司。限制性核酸内切酶 Nhe1、Msc1 以及 Quick Ligation 试剂盒购自 NEB 公司。鼠抗 GAPDH 单克隆抗体和鼠抗 Flag 单克隆抗体购自 Sigma 公司。山羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Abcam 公司。DyLight 488 山羊抗鼠抗体购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 将质粒 pANXA11-Flag 用限制性核酸内切酶 Nhe1 和 Msc1 双酶切, 胶回收纯化约 6.8 Kb 的条带作为骨架。分别使用 Primer1&2 和 Primer1&3 (表 1) 以质粒 pANXA11-Flag 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物用 Nhe1 和 Msc1 双酶切, 酶切产物作为插入片段用 Quick Ligation 连接酶分别连入骨架。室温连接 10 min 后转化 DH5 α 感受态, 次日挑取细菌单克隆, 使用 Primer4 进行 Sanger 测序鉴定。所构建的质粒分别命名为 pANXA11-G38R-Flag 和 pANXA11-D40G-Flag。

表 1 引物序列

引物名称	序列
Primer1	5'-GGCCGCTAGCCACCATGAGCTACCCCTGGCTATC-3'
Primer2	5'-TAGGTGGCCACGTTATCCAGCCTGATGGGGGGCATGCTGGG-3'
Primer3	5'-TAGGTGGCCACGTTACCCAGCCCGATGGGGGGCA-3'
Primer4	5'-CTGGCTAAGTAGAGAACCCTACT-3'

1.2.2 细胞培养与转染 将 HEK293 细胞按合适的密度接种至 6 孔板, 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。次日用 Lipofectamine 2000 进行质粒转染, 每孔转染 3 μ g 质粒。转染 24 h 后收集细胞行 Western 印迹实验。

1.2.3 Western 印迹实验 用 RIPA 裂解液冰上裂解上述转染后细胞, 超声处理后行 BCA 蛋白定量。按 10 μ g/孔的上样量于 5% ~ 10% SDS-PAGE 胶电泳分离, 电泳结束后以 250 mA 恒流湿法转膜至 0.45 μ m 孔径的 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别用鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 (1:5000) 和鼠抗 Flag 单克隆抗体 (1:1000) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 0.05% TBS-T 洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。随后加入山羊抗鼠 IgG-HRP (1:10000) 室温孵育 1 h。使用上述方法洗膜。洗膜结束后进行 ECL 化学发光显色拍照。

1.2.4 免疫荧光 将状态良好的 HEK293 细胞接种至铺有 matrigel 的爬片上, 次日进行转染, 24 h 后进行免疫荧光检测。吸净培养基并用 DPBS 漂洗 2 次, 分别用 4% 多聚甲醛固定及 PBST 透化各 15 min, 漂洗后用 5% BSA 封闭 30 min。用封闭液稀释鼠抗 Flag 单克隆抗体 (1:300) 室温孵育 1 h,

漂洗后再次用5% BSA 封闭30 min。用封闭液稀释 DyLight 488 山羊抗鼠抗体(1:600)室温避光孵育1 h,漂洗后用 DAPI 染核6 min。漂洗后用90%甘油封片,指甲油封边,立即在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。图片使用 Image J 软件分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行统计分析。计量资料及计数资料均采用中位数(Q1~Q3)表示。囊泡状结构面积大小及单个细胞中囊泡个数比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 Dunn-Bonferro-ni 检验。囊泡核内分布率的比较采用卡方(χ^2)检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒的构建

构建编码 ANXA11 蛋白 N 端突变体 p. G38R 和 p. D40G 的真核表达载体,分别标记为 pANXA11-G38R-Flag 和 pANXA11-D40G-Flag。见图 1。

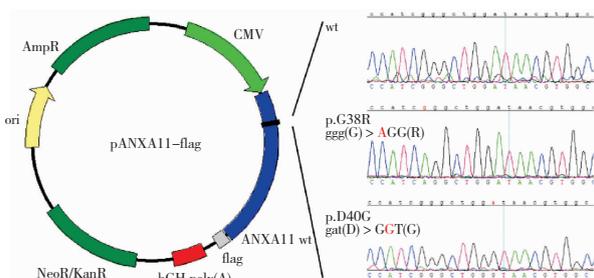


图 1 质粒 pANXA11-Flag、pANXA11-G38R-Flag 和 pANXA11-D40G-Flag 的结构示意及 Sanger 测序部分序列结果图

2.2 ANXA11 蛋白及突变蛋白在 HEK293 细胞中过表达

将质粒 pANXA11-Flag、pANXA11-G38R-Flag 和 pANXA11-D40G-Flag 分别转染至 HEK293 细胞后行 Western 印迹检测,验证 ANXA11 wt、p. G38R 蛋白及 p. D40G 蛋白在细胞中过表达。见图 2。

2.3 p. G38R 及 p. D40G 突变改变 ANXA11 蛋白亚细胞定位

2.3.1 ANXA11 wt、p. G38R 蛋白及 p. D40G 蛋白在细胞内的亚定位 将质粒 pANXA11-Flag、

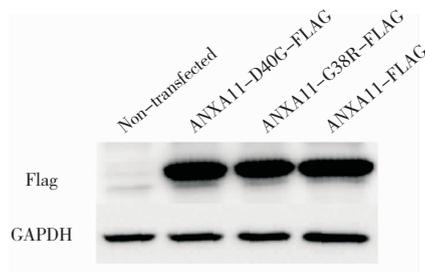


图 2 ANXA11 wt、p. G38R 和 p. D40G 蛋白在 HEK293 细胞中过表达

pANXA11-G38R-Flag 和 pANXA11-D40G-Flag 分别转染至 HEK293 细胞后,通过细胞免疫荧光研究上述蛋白在细胞内的亚定位。在激光共聚焦显微镜下观察可见,ANXA11 wt、p. G38R 蛋白及 p. D40G 蛋白均可在 HEK293 细胞中形成点状或团块状的大量囊泡状结构,细胞核内外均可见其表达(图 3)。ANXA11 wt 在细胞内形成小而密的囊泡状结构,在胞质中均匀分布,并在细胞核内外分布均匀;p. G38R 蛋白在细胞内形成团块状囊泡,囊泡面积较大,呈现紧贴胞膜的分布状态,细胞核内少有分布;p. D40G 蛋白在细胞内也可以形成小囊泡,但较为稀疏,胞质内分布较为均匀,细胞核内囊泡数较少。

2.3.2 ANXA11 wt 组、p. G38R 组及 p. D40G 组的囊泡面积 采用 Image J 软件进行囊泡状结构的截面积(下称囊泡面积)。我们首先收集 ANXA11 wt 组、p. G38R 组及 p. D40G 组囊泡面积数值,选取面积 $> 0.09 \mu\text{m}^2$ 的囊泡状结构进行分析(图 4)。实验发现,ANXA11 wt 组囊泡面积中位数为 $0.3250 \mu\text{m}^2$ ($0.1430 \mu\text{m}^2 \sim 1.137 \mu\text{m}^2$), p. G38R 组为 $0.8590 \mu\text{m}^2$ ($0.2060 \mu\text{m}^2 \sim 2.107 \mu\text{m}^2$), p. D40G 组为 $0.2900 \mu\text{m}^2$ ($0.1520 \mu\text{m}^2 \sim 1.212 \mu\text{m}^2$)。Kruskal-Wallis H 检验发现 3 组囊泡面积大小存在差异。其中 p. G38R 组囊泡面积大于 ANXA11 wt 蛋白组 ($P = 0.002$) 和 p. D40G 蛋白组 ($P = 0.006$),而 ANXA11 wt 组和 p. D40G 蛋白组之间的囊泡面积大小无明显差异 ($P = 0.791$)。

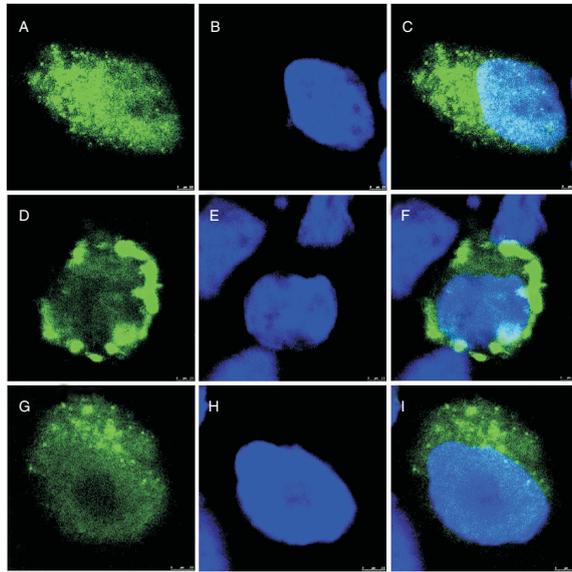


图3 ANXA11 wt、p. G38R 蛋白及 p. D40G 蛋白免疫荧光结果

注：A、D、G：ANXA11 wt、p. G38R 及 p. D40G 蛋白染色；B、E、H：对应细胞的 DAPI 染色；C、F、I：ANXA11 wt、p. G38R 及 p. D40G 蛋白染色和 DAPI 染色的 Merge 结果。A-I 比例尺为 2.5 μm。

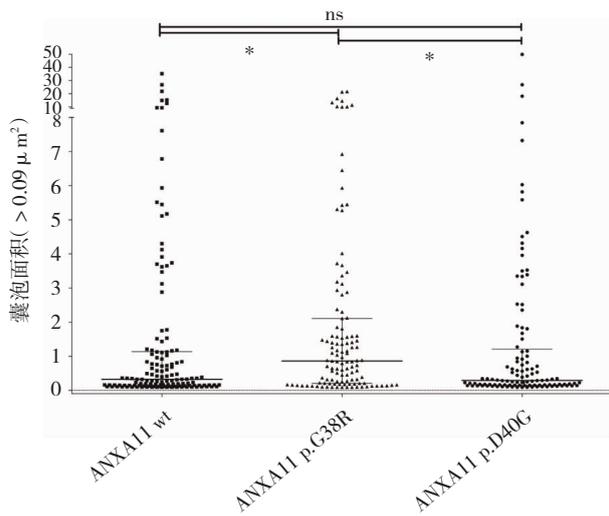


图4 ANXA11 wt、p. G38R 蛋白及 p. D40G 蛋白囊泡面积分布示意图

注：* 代表差异有统计学意义, $P < 0.05$; ns 代表差异无统计学意义。

2.3.3 ANXA11 wt 组、p. G38R 组及 p. D40G 组的囊泡数目 随后,我们对 ANXA11 wt、p. G38R 及 p. D40G 蛋白在单个细胞中形成的囊泡数目进行统计分析(图5),ANXA11 wt 组囊泡数目中位数为 16 个(15 ~ 21),p. G38R 组为 12 个(10 ~ 13),p. D40G 蛋白组为 11 个(8 ~ 13)。Kruskal-Wallis H 检验发现 3 组间的单个细胞中囊泡中位数

存在差异($P < 0.001$),ANXA11 wt 组的囊泡数目大于 p. G38R 组($P = 0.002$)和 p. D40G 组($P < 0.001$),而后两者囊泡数目差异不明显($P = 0.516$)。

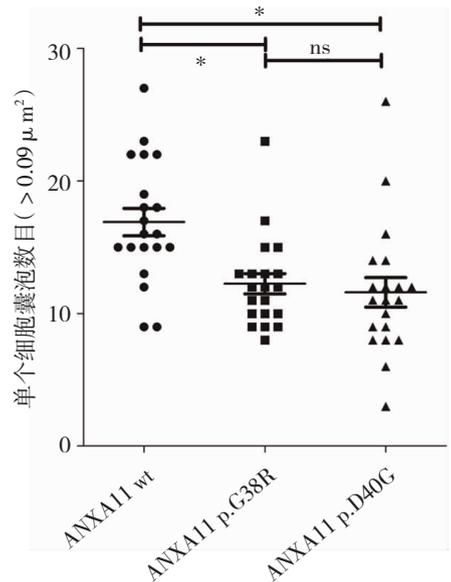


图5 ANXA11 wt、p. G38R 蛋白及 p. D40G 蛋白在单个细胞内形成囊泡数目示意图

注：* 代表差异有统计学意义, $P < 0.05$; ns 代表差异无统计学意义。

2.3.4 p. G38R, p. D40G 和 ANXA11 野生型蛋白在细胞核内的分布情况 本实验分析了 p. G38R、p. D40G 和 ANXA11 野生型蛋白在细胞核内的分布情况(图6)。卡方(χ^2)检验发现3种蛋白的细胞核内分布存在显著差异($P < 0.001$),与 ANXA11wt 相比, p. G38R 组($P < 0.001$)和 p. D40G 组($P < 0.001$)在细胞核内的分布比率显著减少,而 p. G38R 组及 p. D40G 组在核内的分布无明显差异($P = 0.519$)。

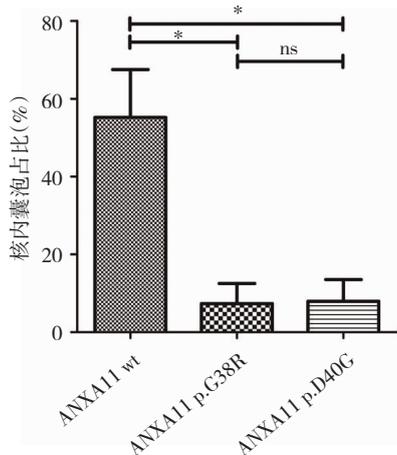


图6 ANXA11wt、p. G38R 蛋白及 p. D40G 蛋白囊泡细胞核内分布比率示意图;注: * 代表差异有统计学意义, $P < 0.05$; ns 代表差异无统计学意义。

3 讨论

ANXA11 蛋白属于 annexin A 家族,该家族是一系列 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白,包括 12 个家族成员(annexin A1-A11, A13)^[6]。annexin A 蛋白拥有两个功能结构域,分别为一个位于 C 端的核心结构域和一个位于 N 端的结构域。C 端的结构域位于 annexin A 蛋白的凸面,大部分 annexin A 成员的 C 端由四个高度相似的“annexin 重复序列”组成,每个“annexin 重复序列”大约有 70 个氨基酸残基,具有 Ca^{2+} 和磷脂亲和力^[7]。N 端的结构域位于 annexin A 蛋白的凹面,是一段氨基酸组成多变且具有疏水特征的结构域。人 annexin A11 (ANXA11) 基因位于 10q22-q23,编码的 ANXA11 蛋白由 505 个氨基酸组成,具有 annexin A 家族中最长的 N 端结构域,含 196 个氨基酸残基,对 ANXA11 蛋白的细胞核定位起重要作用^[8]。ANXA11 蛋白 N 端结构域中还含有与 S100A6 和凋亡连接基因 2 蛋白

(ALG-2) 结合的结合位点^[9,10]。

研究表明,ANXA11 可以通过其 N 端结构域结合 ALG-2 蛋白来稳定外壳蛋白复合物 II (COPII) 的组分之一 Sec31A 蛋白,参与货物蛋白从内质网转运到高尔基体 (ER-to-Golgi) 的囊泡运输过程^[11]。2017 年 Smith 等^[5]将 HA 标记的 p. G38R 和 p. D40G 突变型和野生型 ANXA11 过表达于小鼠的原代运动神经元中,发现这三种蛋白均在胞质中形成囊泡状结构,并通过免疫共沉淀实验证实 ANXA11 蛋白 N 端的 p. G38R 和 p. D40G 突变并不会改变其与 ALG-2 的结合能力,提示这两种突变可能通过其他方式影响囊泡运输。本研究中,我们使用 Flag 标记的 p. G38R 和 p. D40G 突变型和野生型 ANXA11 在 HEK293 中过表达,也观察到这 3 种蛋白都能形成类似的囊泡状结构。我们参照 Smith 等^[5]对囊泡大小的统计分析,选取截面积大于 $0.09 \mu m^2$ 的囊泡进行统计学分析,发现在 HEK293 细胞中 p. G38R 和 p. D40G 突变都减少了 ANXA11 蛋白囊泡状结构的数目。这表明 p. G38R、p. D40G 突变可能会降低 ANXA11 蛋白参与的 ER-to-Golgi 运输效率,从而影响细胞在合成加工新蛋白质的效率,对细胞正常生理活动造成影响,例如能量供应、代谢废物的清除和信号分子的传导等等,这可能是 p. G38R 和 p. D40G 突变引发 ALS 的机制之一。

另外,本研究还观察到 p. G38R 蛋白可以形成相对野生型蛋白和 p. D40G 蛋白较大的囊泡,这让我们思考 ANXA11 蛋白参与形成的囊泡是什么,有何功能。有意思的是,最近 Bethan 等^[12]在研究 Stat3 信号通路对溶酶体膜蛋白质组学的影响时,发现在 Stat3 信号上调后 ANXA1、ANXA6 和 ANXA11 蛋白在溶酶体膜上富集,这表明 ANXA11 可以在某些条件下参与溶酶体膜的生物合成。但是 ANXA11 蛋白相关囊泡状结构的性质和功能还有待进一步研究。

研究表明 ANXA11 蛋白 N 端结构域对其核内定位有着重要作用,缺乏 N 端结构域将影响其入核,但具体负责入核的序列尚不明确^[13]。研究通过蛋白质 Jpred 二级结构预测发现在 ANXA11 蛋白 N 端 40-44 位氨基端残基及 51-59 位氨基端残基处分别存在一个 α -螺旋,位于 ANXA11 蛋白 N 端的 p. G38R 和 p. D40G 突变会影响第一个螺旋的形成^[5]。本研究发现,相比 ANXA11wt、p. G38R 和

p. D40G 突变蛋白在细胞核内的分布显著减少,提示 p. G38R 及 p. D40G 突变可能通过影响第一个 α -螺旋的形成从而减少 ANXA11 蛋白的核定位。然而,在过表达 ANXA11wt、p. G38R 蛋白和 p. D40G 蛋白的小鼠原代神经元细胞中,并未观察到这 3 种蛋白在细胞核内外分布有明显差异^[5]。这可能是因为细胞模型的差异,小鼠原代神经元细胞与 HEK293 细胞不同,为不分裂且高度分化的细胞。事实上,ANXA11 蛋白的亚细胞分布也与细胞种类有关,研究发现在 14 日龄的大鼠胚胎迅速生长的未分化的间质细胞中,ANXA11 蛋白主要集中在细胞核内,然而在 18 日龄胚胎中,当这些组织分化成为结缔组织时,ANXA11 蛋白在细胞核和细胞质中便呈现均匀分布^[14]。虽然 ANXA11 蛋白及其突变体在 HEK293 细胞核内外的差异不能代表其在神经元内的分布情况,但我们也证明了 N 端的 p. G38R 和 p. D40G 突变可以影响 ANXA11 蛋白进入细胞核的能力。

ANXA11 蛋白的胞内定位与其细胞功能有着重要联系,但其在细胞核内的功能尚未明确。有研究对 mRNA 结合蛋白进行质谱分析发现 ANXA11 蛋白是候选的 mRNA 结合蛋白之一^[15],这提示 ANXA11 可能参与 RNA 的代谢加工。综上,我们的结果表明 p. G38R 及 p. D40G 突变改变了 ANXA11 蛋白的亚细胞定位,提示其影响胞内囊泡运输和 mRNA 加工,这可能是其导致 ALS 发生发展的重要机制之一。

4 结论

p. G38R 和 p. D40G 突变减少了 ANXA11 蛋白相关囊泡状结构的数目和 ANXA11 蛋白在细胞核的分布,这可能是引起 ALS 发病的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of als: A conspiracy of genes, environment and time [J]. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9(11): 617-628.
- [2] Chen L, Zhang B, Chen R, et al. Natural history and clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis in china [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015, 869(10): 1075-1081.
- [3] Zufiria M, Gil-Bea FJ, Fernandez-Torron R, et al. Als: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 142: 104-129.
- [4] Nguyen HP, Van Broeckhoven C, van der Zee J. Als genes in the genomic era and their implications for ftd [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(6): 404-423.
- [5] Smith BN, Topp SD, Fallini C, et al. Mutations in the vesicular trafficking protein annexin a11 are associated with amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(388): 9157.
- [6] Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 331-371.
- [7] Lecona E, Turnay J, Olmo N, et al. Structural and functional characterization of recombinant mouse annexin a11: Influence of calcium binding [J]. *Biochem J*, 2003, 373(Pt 2): 437-449.
- [8] Wang J, Guo C, Liu S, et al. Annexin a11 in disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 431: 164-168.
- [9] Satoh H, Nakano Y, Shibata H, et al. The penta-ef-hand domain of alg-2 interacts with amino-terminal domains of both annexin vii and annexin xi in a ca2+-dependent manner [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1600(1-2): 61-67.
- [10] Williams LH, McClive PJ, Van Den Bergen JA, et al. Annexin xi co-localises with calyculin in proliferating cells of the embryonic mouse testis [J]. *Develop Dynam*, 2005, 234(2): 432-437.
- [11] Shibata H, Kanadome T, Sugiura H, et al. A new role for annexin a11 in the early secretory pathway via stabilizing sec31a protein at the endoplasmic reticulum exit sites (eres) [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(8): 4981-4993.
- [12] Lloyd-Lewis B, Krueger CC, Sargeant TJ, et al. Stat3-mediated alterations in lysosomal membrane protein composition [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(12): 4244-4261.
- [13] Mizutani A, Watanabe N, Kitao T, et al. The long amino-terminal tail domain of annexin xi is necessary for its nuclear localization [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 318(1): 157-165.
- [14] Farnaes L, Ditzel HJ. Dissecting the cellular functions of annexin xi using recombinant human annexin xi-specific autoantibodies cloned by phage display [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 33120-33126.
- [15] Baltz AG, Munschauer M, Schwanhauser B, et al. The mrna-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts [J]. *Mol Cell*, 2012, 46(5): 674-690.