

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.19.002

哺乳动物 PUF 家族蛋白 PUMILIO1 的伴侣蛋白研究 *

丁 燕 郑子萌 赵婷婷 石清华 徐宇君[△]

(南京医科大学生殖医学国家重点实验室 江苏 南京 210000)

摘要 目的:探索 NIH3T3 和 DU145 细胞中 PUM1 蛋白的伴侣蛋白。**方法:**收集 NIH3T3 和 DU145 细胞进行免疫沉淀实验,实验组和对照组分别使用抗 PUM1 抗体和抗 Goat-IgG 抗体。通过银染实验观察实验组与对照组是否有差异性条带,通过质谱鉴定和 Mascot 软件对差异性条带所包含的蛋白进行分析,鉴定 PUM1 蛋白在细胞中发挥作用时的可能互动蛋白。**结果:**在 NIH3T3 和 DU145 细胞银染实验中,实验组凝胶泳道均在约 37 KD 处出现差异性条带。对 NIH3T3 细胞中差异性条带进行质谱分析,通过 Mascot 软件肽质量指纹谱搜索,将有真实差异的蛋白评分最低阈值设为 65, $P < 0.05$,结果显示肽段评分最高的蛋白为 NDFIP2 蛋白。与 NCBI 数据库比对,检测到针对 NDFIP2 的肽段的覆盖率为 40 %。**结论:**NDFIP2 与哺乳动物 PUM1 蛋白在细胞内关联,可能是 PUF 家族蛋白的伴侣蛋白。

关键词:PUF;PUM1;NDFIP2;NIH3T3 细胞;DU145 细胞

中图分类号:Q51;Q591;R339.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)19-3606-04

Identification of a PUMILIO1 Associated Protein in Mammalian Cells*

DING Yan, ZHENG Zi-meng, ZHAO Ting-ting, SHI Qing-hua, XU Yu-jun[△]

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nan Jing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210000, China)

ABSTRACT Objective: To explore PUMILIO1 (PUM1) associated proteins in mammalian cells (NIH3T3 and DU145 cells). **Methods:** NIH3T3 and DU145 cells were respectively collected. Proteins were obtained by IP (Immunoprecipitation) experiment. Experimental group and control group were set up using anti PUM1 antibody and anti Goat-IgG antibody, respectively. Silver staining revealed differential bands in PUM1 pull-down lane in comparison to IgG lane. Proteins from the differential bands were analyzed by mass spectrum and Mascot software analysis. **Results:** A macroscopic differential band around 37 KD in experimental group was observed both in NIH3T3 and DU145 cells. NDFIP2 protein acquired the highest Mascot score using mass spectrum and peptide mass fingerprint in which the minimum threshold value of the score representing real differences of protein was set to 65 ($P < 0.05$). The peptides coverage specific to NDFIP2 was forty percent in reference to NCBI database. **Conclusions:** NDFIP2 was associated with PUM1 protein in mammalian cells and might be a partner protein of PUF family proteins.

Key words: PUF; PUM1; NDFIP2; NIH3T3 cells; DU145 cells

Chinese Library Classification (CLC): Q51; Q591; R339.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)19-3606-04

前言

PUF (PUMILIO and FBF) 家族蛋白属于高度保守的 RNA 结合蛋白,在羧基端有 8 个重复序列,是高度保守的 RNA 结合域,在哺乳动物中有两个同源基因 -*Pumilio 1* (*Pum1*) 和 *Pumilio 2* (*Pum2*)。PUF 蛋白主要通过结合靶标 mRNA 3'UTR 来抑制靶标 mRNA 的翻译或降低 mRNA 的稳定性,从而发挥重要的转录后调控作用^[1-4]。PUM1 蛋白在哺乳动物中具有重要作用,如通过抑制 *p53* 通路的激活因子抑制生殖细胞的凋亡保护小鼠精子发生^[5]。在雌性小鼠中,PUM1 蛋白缺失影响原始卵泡的储备,导致小鼠育性随年龄增加呈进行性下降^[6]。另外,PUM1 蛋白插入突变导致胚胎植入前死亡^[7]。在神经系统中,PUM1 蛋白同样具有重要作用,*Pum1* 单倍剂量不足导致小鼠共济失调样

神经退行性病变^[8]。在细胞中,PUM1 蛋白通过抑制 *p27* 的翻译促进细胞增殖。另外,PUM1 蛋白受非编码 RNA--*NORAD* 的调控,在维持基因组稳定性中发挥重要作用^[9-12]。有研究显示 PUF 蛋白在发挥作用时往往和其他蛋白相互作用,共同维持正常的生物过程^[13]。在线虫中,FBF 蛋白和 NANOS 蛋白结合来调节精卵转换。在果蝇中,PUMILIO 蛋白与 NANOS 蛋白和 CCR4 脱腺苷酶形成复合物,维持生殖干细胞的自我更新^[14,15]。PUMILIO 蛋白及 NANOS 蛋白与 BRAT 蛋白在果蝇中形成的三元复合物调控 *hunchback* mRNA,从而影响胚胎前后轴的发育^[16]。PUM1 蛋白在哺乳动物中发挥重要作用,但是目前 PUM1 蛋白在哺乳动物中的互动蛋白研究很少,仍需要进一步的研究和探索。本研究主要探讨了 NIH3T3 和 DU145 细胞中 PUM1 蛋白的伴侣蛋白。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270737);江苏省自然科学基金面上项目(BK2012838)

作者简介:丁燕(1989-),女,硕士研究生,主要研究方向:配子发生的分子机制,E-mail:dingyan34@njmu.edu.cn

△ 通讯作者:徐宇君(1965-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:配子发生的分子机制,E-mail:xuyujun@njmu.edu.cn,电话:025-86869505

(收稿日期:2017-02-12 接受日期:2017-02-28)

1 材料与方法

1.1 材料

NIH3T3 和 DU145 细胞 (ATGC), DMEM (Gibco, 货号: 11995-065), 胎牛血清 (Invitrogen, 货号: 10099141), 胰蛋白酶 (Invitrogen, 货号: 25200072), 抗 PUM1 抗体 (Bethyl lab, A300-201A; Abcam, ab92545), 抗 Goat-IgG 抗体 (Beyotime, A7007), 抗 Actin 抗体 (Sigma, A1978), 硫代硫酸钠、乙酸钠、硝酸银、甲醛均为国产分析纯。质谱分析采用 MaLDI-TOF/TOF-MS (基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱仪) 和 Mascot 软件。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NIH3T3 和 DU145 细胞均培养于含 10 % FBS、1 % 青霉素和链霉素的培养基中, 置于 37 °C, 含 5 % CO₂ 的培养箱中, 每隔 3 天进行传代。按照 2.0 E+06/皿传代到 100 mm 培养皿中培养, 待细胞长到 80 % 覆盖度时收细胞。-80 °C 冻存。

1.2.2 免疫沉淀实验 蛋白 A 琼脂糖珠与抗 PUM1 抗体 (Bethyl lab) 和抗 G-IgG 抗体交联, NIH3T3 和 DU145 细胞裂解液与交联复合物孵育, 得到蛋白后进行 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳), 其中抗 PUM1 抗体购自 Abcam 公司。

1.2.3 银染实验 SDS-PAGE 待蛋白样本中溴酚蓝跑出后, 凝胶用 ddH₂O 洗 2 次, 2 min/次。乙醇 40 mL, 乙酸 10 mL, ddH₂O 50 mL 混合液中固定 1 h。乙醇 30 mL, 硫代硫酸钠 0.2 g, 乙酸钠 6.8 g, ddH₂O 补齐至 100 mL 混合液敏化 30 min。ddH₂O 洗 3 次, 5 min/次。0.25 g AgNO₃ 溶于 100 mL ddH₂O, 用前加 20 μL

甲醛, 避光银染 20 min。ddH₂O 洗 2 min。2.5 g Na₂CO₃ 溶于 100 mL ddH₂O, 用前加 20 μL 甲醛, 显色 3-5 min。0.4 g 甘氨酸溶于 100 mL ddH₂O, 终止反应 15 min, 差异条带切下放入 10 % 乙醇, 4 °C 保存。

1.2.4 质谱样品的鉴定 切胶, 将单个条带切成 1 mm × 1 mm 的胶粒, 放入 EP 管中; 加 200 μL ddH₂O, 涡旋, 8000 × g 离心 30 s, 弃上清, 重复 3 次; 加入洗脱液 (50 mM NH₄HCO₃/CAN=1:1) 200 μL, 脱色, 涡旋, 8000 × g 离心 30 s, 弃上清, 重复 2 次; 乙腈脱水, 加入 100 % CAN 200 μL, 涡旋, 8000 × g 离心 30 s, 弃上清并自然干燥; 加入 10 mM DTT 200 μL, 56 °C 水浴 1 h, 8000 × g 离心 30 s, 弃上清; 加入 55 mM IAA (55 μL 1M IAA+945 μL 25 mM NH₄HCO₃) 200 μL, 室温避光 45 min, 8000 × g 离心 30 s, 弃上清; 依次用 25 mM NH₄HCO₃, 50 % CAN, 100 % ACN 200 μL 洗胶, 直至胶粒变白, 涡旋, 8000 × g 离心 30 s, 弃上清并自然干燥; 加入胰蛋白酶 (10 ng/μL), 酶量超过胶粒, 4 °C 静置 30 min, 使胶粒充分吸收酶; 吸出多余的酶, 加入 50 μL 25 mM NH₄HCO₃ 封闭液, 37 °C 水浴过夜; 加入 2 % TFA, 使 TFA 终浓度为 0.1 %, 终止酶解; 涡旋离心, 将上清液转移到新的 EP 管中; 加入萃取液 (30 % CAN+3 % TFA) 100 μL, 2 次, 每次萃取 10 min, 离心, 将上清液转移到新的 EP 管中; 加入 100 % CAN 100 μL 脱水 10 min, 将上清液转移到 EP 管中; 将上清液抽干, 除盐, 上机质谱检测; 上机前用 A 液复溶样品, 加入进样瓶 8 μL, 上样 5 μL。

2 结果

2.1 NIH3T3 和 DU145 细胞中 Pum1 IP 组的差异性条带

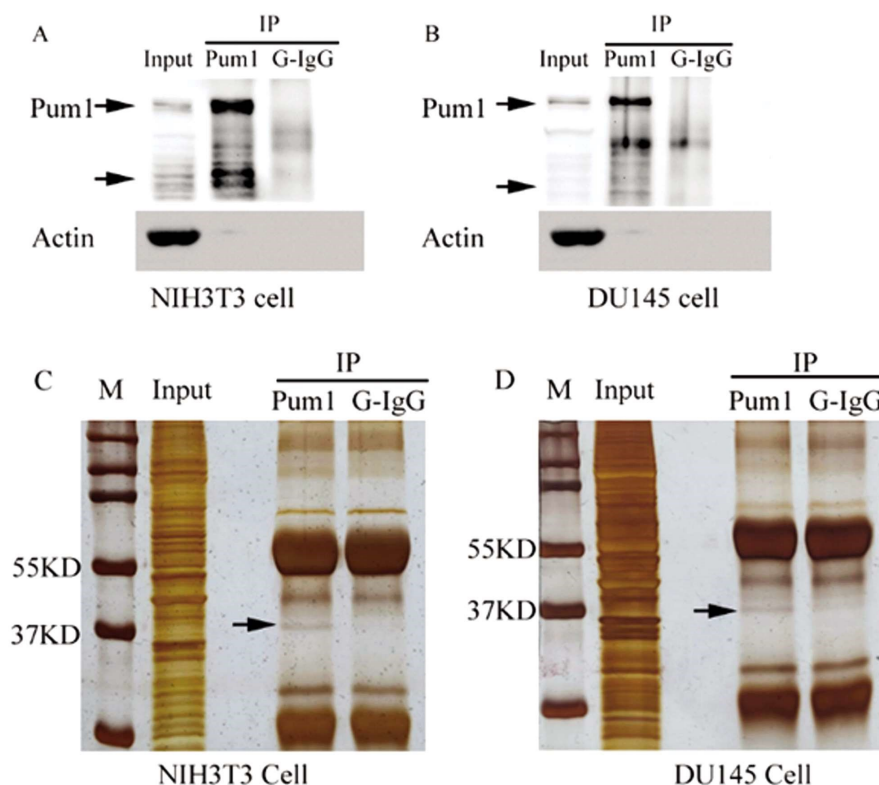


图 1 NIH3T3 和 DU145 细胞中 Pum1 IP 组出现差异性条带

Fig.1 Differential band was observed in Pum1 IP group of NIH3T3 and DU145 cells

通过 IP 实验,在 NIH3T3 和 DU145 细胞中,用抗 PUM1 抗体富集 PUM1 蛋白,用抗 Goat-IgG 抗体作为对照,Western Blot 结果显示 PUM1 抗体可以将 NIH3T3 和 DU145 细胞中 PUM1 蛋白富集,PUM1 蛋白包括 142 KD 和 75 KD,如图箭头所示(图 1 A,B)。然后进行银染实验(图 1 C,D),与对照组 Goat-IgG IP 相比,在 PUM1 IP 的凝胶泳道中,约 37 KD 处可见一条差异性条带,如箭头所示。并且在 NIH3T3 和 DU145 细胞中均可看到位置相近的这一条带。

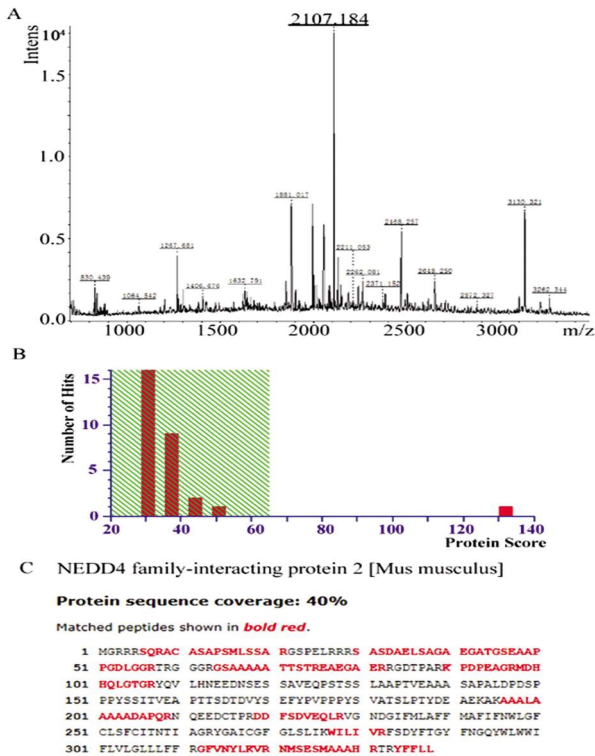


图 2 质谱和 Mascot 软件对切割的 37 KD 附近条带的分析结果

Fig.2 Results of Mass Spectrum and Mascot Software analysis on the excised around 37 KD protein band

2.2 NIH3T3 细胞中差异蛋白的质谱分析

差异条带切下后,用胰酶进行消化,MaLDI-TOF/TOF-MS 得到质谱图(图 2 A)。通过 Mascot 软件肽质量指纹谱搜索,将有真实差异的蛋白评分最低阈值设为 65, $P < 0.05$ 。我们检测到有真实差异的三个蛋白肽段评分分别为 132、122 和 104(图 2 B),这三个蛋白肽段都是来源于同一个蛋白 NDFIP2 (Nedd4 Family Interacting Protein2)。但是还检测到四个蛋白肽段评分分别为 64、54、53、42, $P > 0.05$ 。我们通过 Mascot 软件,与 NCBI 数据库比对,检测到针对 NDFIP2 的肽段的覆盖率为 40%,如图红色肽段所示(图 2 C)。因此,质谱鉴定差异条带所代表的主要蛋白为 NDFIP2 蛋白。

3 讨论

免疫沉淀和银染实验显示在 NIH3T3 和 DU145 细胞 PUM1 IP 泳道中,约 37 KD 处可以看到一条差异性条带,而在其他位置肉眼观察并未发现差异性条带,但这并不能排除这些位置存在与 PUM1 相互作用的蛋白的可能性,因为有些蛋白差

异性较小,银染凝胶不能直观反映,只有通过将实验组与对照组整个泳道进行质谱分析,才能全面准确地分析出 PUM1 潜在的相互作用的蛋白。而在凝胶 37 KD 处,差异性条带明显可见,提示 PUM1 蛋白与该处蛋白相互作用的可能性极高,为了明确该条带所包含的蛋白,我们进行蛋白质谱分析,检测到一些肽段评分不足 65 的蛋白, P 值大于 0.05,这可能由于鉴定到的肽段为非蛋白特异肽段引起。而三个蛋白评分大于 65, P 值小于 0.05,结果显示主要差异性蛋白为 NDFIP2 蛋白。这是首次报道 PUM1 免疫沉淀蛋白中存在 NDFIP2 蛋白。

Ndfip2 是 Ndfip 中的一员,其另一个同源基因为 Ndfip1。NDFIP1 和 NDFIP2 是相关的胞内体膜蛋白,能够结合和激活 E3 泛素化连接酶中 Nedd4 家族成员^[17,18]。在 HeLa 细胞中,敲减 Ndfip2 可以导致 EGFR 蛋白水平升高,而 ERK1/2 蛋白表达无明显变化。但是在饥饿的 293T 细胞中,加入 EGF(表皮生长因子)、EGFR 和 NDFIP2 都会出现磷酸化,而且 NDFIP2 的磷酸化是由 EGFR 激活 Src,Src 直接作用于 NDFIP2。HeLa 细胞中,NDFIP2 可以与 EGFR 在细胞内的点状结构中定位,很像胞内体隔间,NDFIP2 之前在这种结构中被检测到。而且磷酸化的 EGFR 可以与磷酸化的 NDFIP2 免疫共沉淀,表明 NDFIP2 可以从物理上和功能上与 EGFR 相互作用。在 HeLa 细胞中敲减 Ndfip2 并加入 EGF 可以使磷酸化的 ERK1/2 增多,说明 NDFIP2 可以抑制 EGFR 和 MAPK 信号通路^[19]。

那么,PUM1 蛋白是否在 EGFR 和 MAPK 信号通路中也发挥作用呢?大部分对 MAPK 的相关研究是关于线虫中 mpk-1,一个 MAPK/ERK 的同源基因和人 MAPK 同源基因 ERK2 和 p38a 的^[20-22]。FBF 蛋白在线虫中对生殖干细胞的维持起重要作用^[23]。MPK-1B 在线虫生殖细胞中表达,且 MPK-1B 在 gld-1 突变体中的表达(相当于 FBF 野生型)比 gld-1;fbf-1 fbf-2 突变体(相当于 FBF 突变体)中高 8 倍。机制研究发现 FBF 蛋白通过结合 mpk-1 3'UTR 中 FBE 来抑制 mpk-1 的翻译。同时,PUF 结合 MAPK 3'UTR 在人的胚胎干细胞中也是保守的。PUM2 通过结合 ERK2 和 p38a 3'UTR 上的 NREs 抑制 ERK2 和 p38a 的表达^[24]。PUM1 蛋白通过抑制 p53 通路的多个激活因子的翻译抑制生殖细胞的凋亡,从而保护精子发生的过程。其中,激活因子包含 MAPK 通路中的 Map2k3、Map3k1 和 Map2k7,PUM1 通过结合这些基因 3'UTR 中的 PBE 来抑制其翻译从而抑制生殖细胞的凋亡^[5]。果蝇中,PUMILIO 蛋白通过结合 EGFR 和 MAPK 3'UTR 上的 NREs 抑制 EGFR 和 MAPK 信号,进而维持果蝇刚毛和翅脉的正常发育,Pumilio 敲除后会导致刚毛和翅脉额外生长^[25]。由此,PUF 家族对 EGFR 和 MAPK 信号通路具有抑制作用。另外,鉴于 NEDD4 家族蛋白在泛素化中起重要作用^[26-28],NDFIP2 与 PUM 蛋白的关联提示它参与 PUM1 蛋白的降解。目前对于 PUF 家族蛋白在细胞内的代谢,以及如何被泛素化通路调控尚无任何报道,进一步深入研究可以直接验证泛素化是否参与 PUF 蛋白的代谢。

综上所述,NDFIP2 蛋白是 PUM1 的互动蛋白,共同参与调节 EGFR 和 MAPK 信号通路。前期人 PUM2 蛋白发现与高度保守的生殖蛋白 DAZ 家族蛋白和 NANOS 蛋白互动^[29-31],但 PUM1 蛋白的互动蛋白报道甚少。本研究是首次报道 PUF 家族蛋白与 NDFIP2 蛋白可能互动,对于 PUM1 蛋白的功能和调控

提供了新的线索。但 PUM1 蛋白和 NDFIP2 蛋白是否直接作用还需要免疫共沉淀实验进一步验证,而且两者所共同参与的生物学过程需要更深的探讨。为了更全面地探索 PUM1 蛋白在哺乳动物中的伴侣蛋白,应将特定组织的 *Pum1* IP 组和对照组的银染凝胶泳道全部进行质谱检测分析,设立更加严格的检测阈值,由此更深入的探讨 *Pum1* 在动物发生发展中所参与的生物过程及重要意义。

参考文献(References)

- [1] Miles WO, Lepesant JM, Bourdeaux J, et al. The LSD1 family of histone demethylases and the PUMILIO post-transcriptional repressor function in a complex regulatory feedback loop [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2015, 35(24): 4199-4211
- [2] Blackinton JG, Keene JD. Post-transcriptional RNA regulons affecting cell cycle and proliferation[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014, 34: 44-54
- [3] Narita R, Takahashi K, Murakami E, et al. A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(10): e1004417
- [4] Miles WO, Tschoep K, Herr A, et al. Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene [J]. *Genes & Development*, 2012, 26(4): 356-368
- [5] Chen Dong, Zheng Wei, Lin Ai-ping, et al. Pumilio 1 suppresses multiple activators of p53 to safeguard spermatogenesis[J]. *Current Biology*, 2012, 22(5): 420-425
- [6] Mak W, Fang C, Holden T, et al. An Important Role of Pumilio 1 in Regulating the Development of the Mammalian Female Germline[J]. *Biology of Reproduction*, 2016, 94(6): 134
- [7] Zhang C, Zhu T, Chen Y, et al. Loss of preimplantation embryo resulting from a *Pum1* gene trap mutation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 462(1): 8-13
- [8] Gennarino VA, Singh RK, White JJ, et al. Pumilio1 haploinsufficiency leads to SCA1-like neurodegeneration by increasing wild-type Ataxin1 levels[J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1087-1098
- [9] Fernandez S, Risolino M, Mandia N, et al. miR-340 inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting multiple negative regulators of p27 in non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(25): 3240-3250
- [10] Lee S, Kopp F, Chang TC, et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins[J]. *Cell*, 2016, 164(1-2): 69-80
- [11] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(1): 7-21
- [12] Kedde M, van Kouwenhove M, Zwart W, et al. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(10): 1014-1020
- [13] Weidmann CA, Raynard NA, Blewett NH, et al. The RNA binding domain of Pumilio antagonizes poly-adenosine binding protein and accelerates deadenylation[J]. *RNA*, 2014, 20(8): 1298-1319
- [14] Joly W, Chartier A, Rojas-Rois P, et al. The CCR4 deadenylase acts with Nanos and Pumilio in the fine-tuning of Mei-P26 expression to promote germline stem cell self-renewal[J]. *Stem Cell Reports*, 2013, 1(5): 411-24
- [15] Janicke A, Vancuylenberg J, Boag PR, et al. ePAT: a simple method to tag adenylated RNA to measure poly (A)-tail length and other 3' RACE applications[J]. *RNA*, 2012, 18(6): 1289-1295
- [16] Sonoda J, Wharton RP. *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor[J]. *Genes & Development*, 2001, 15(6): 762-773
- [17] Cristillo AD, Nie L, Macri MJ, et al. Cloning and characterization of N4WBP5A, an inducible, cyclosporine-sensitive, Nedd4-binding protein in human T lymphocytes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(36): 34587-24597
- [18] Shearwin-Whyatt LM, Brown DL, Wylie FG, et al. N4WBP5A (Ndfip2), a Nedd4-interacting protein, localizes to multivesicular bodies and the Golgi, and has a potential role in protein trafficking [J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(Pt 16): 3679-3689
- [19] Mund T, Pelham HR. Regulation of PTEN/Akt and MAP kinase signaling pathways by the ubiquitin ligase activators Ndfip1 and Ndfip2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(25): 11429-11434
- [20] Niaudet C, Bonnaud S, Guillonnet M, et al. Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis [J]. *Cellular Signalling*, 2017, 33: 10-21
- [21] Okazaki R, Doi T, Hayakawa K, et al. The crucial role of Erk2 in demyelinating inflammation in the central nervous system[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 235
- [22] Lim do Y, Shin SH, Lee MH, et al. A natural small molecule, catechol, induces c-Myc degradation by directly targeting ERK2 in lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 35001-35014
- [23] Priti A, Subramaniam K. PUF-8 Functions Redundantly with GLD-1 to Promote the Meiotic Progression of Spermatocytes in *Caenorhabditis elegans*[J]. *G3*, 2015, 5(8): 1675-1684
- [24] Lee MH, Hook B, Pan G, et al. Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(12): e233
- [25] Kim SY, Kim JY, Malik S, et al. Negative regulation of EGFR/MAPK pathway by Pumilio in *Drosophila melanogaster* [J]. *PloS One*, 2012, 7(4): e34016
- [26] Wang C, An J, Zhang P, et al. The Nedd4-like ubiquitin E3 ligases target angiotensinogen/p130 to ubiquitin-dependent degradation [J]. *The Biochemical Journal*, 2012, 444(2): 279-289
- [27] Xu D, Wang H, You G. An Essential Role of Nedd4-2 in the Ubiquitination, Expression, and Function of Organic Anion Transporter-3[J]. *Molecular Pharmacology*, 2016, 13(2): 621-630
- [28] Zhang H, Nie W, Zhang X, et al. NEDD4-1 regulates migration and invasion of glioma cells through CNrasGEF ubiquitination in vitro[J]. *PloS One*, 2013, 8(12): e82789
- [29] Xu EY, Moore FL, Pera RA. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(13): 7414-7419
- [30] Jaruzelska J, Kotecki M, Kusz K, et al. Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells[J]. *Development Genes and Evolution*, 2003, 213(3): 120-126
- [31] Moore FL, Jaruzelska J, Fox MS, et al. Human Pumilio-2 is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-like proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(2): 538-543