

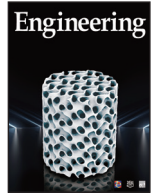


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Medical Engineering—Article

时间序列多组学整合分析揭示原代肝细胞体外培养去分化过程伴随非降解性泛素化修饰的增加

姜正一[#], 孙泽宇[#], 欧阳晓希[#], 赵亚磊[#], 周梦豪, 王保红, 李启睿, 范林骁, 张赛男, 李兰娟^{*}

State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2019
Revised 7 February 2020
Accepted 20 February 2020
Available online 8 June 2020

关键词

去分化
原代肝细胞
翻译后修饰
泛素化蛋白质组学
磷酸化蛋白质组学
转录组学

摘要

目前, 原代肝细胞 (PHC) 在各个研究领域被广泛使用, 但是由于在体外培养过程中肝细胞特异性功能的迅速退化 (即去分化), 严重限制了它的应用范围。尽管学者们已经对PHC的转录调控和全细胞蛋白质组 (WCP) 进行了广泛研究, 但只有为数不多的研究考虑了蛋白质翻译后修饰 (PTM) 在这一过程中的作用。为了揭示引起PHC去分化的潜在机制, 我们收集了在体外培养0 h、6 h、12 h、24 h和48 h的大鼠原代肝细胞样本, 对各个时间点细胞样本的转录组、WCP、泛素化蛋白质组和磷酸化蛋白质组进行了定量分析。我们的数据包含了原代肝细胞体外培养去分化过程中详细的多组学分析结果, 包括2196个蛋白质、2056个泛素化修饰位点和4932个磷酸化修饰位点。这项研究表明, PHC去分化过程中基因转录水平和蛋白质表达量之间的相关性较低。泛素化修饰组和对应的WCP联合分析表明, PHC去分化伴随着非降解性K27泛素化修饰位点的增加。对差异表达的磷酸化修饰蛋白进行功能富集分析, 表明该过程中有铁死亡参与。其中, 有404种蛋白质同时具有泛素化修饰位点和磷酸化修饰位点, 被鉴定为与去分化事件有关的关键蛋白。最终, *Ptbp1*、*Hnrpd*、*Hnrnpu*和*Srrm2*被鉴定为PHC去分化过程中的hub分子。综上所述, 我们的数据为抑制原代肝细胞体外培养去分化提供了潜在靶点分子及新的见解。

© 2020 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

原代肝细胞被认为是评价药物-代谢相互作用[1]、建立嗜肝疾病模型[2]及肝细胞移植模型的理想细胞[3]。与其他模型 (如肝癌细胞系和干细胞来源的肝细胞样细胞) 相比, 它的功能是无可比拟的[4]。终末分化的原代肝细胞在体内微环境的精确调控下可以维持细胞功能稳定, 而离体的原代肝细胞在较短时间内便会发生去分

化或上皮-间充质转化 (EMT), 主要表现为细胞形态的改变和肝功能急剧下降[5–7]。因此, 去分化的发生极大地限制了原代肝细胞的应用。

近年来, 大量研究对与去分化相关的机制进行了报道, 包括蛋白激酶B (Akt)、细胞外调节蛋白激酶1/2 (ERK1/2) [6]、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和核因子kappaB (NF-κB) 信号通路的参与[8]; 还包括肝细胞核因子 (HNF) (HNF4α和HNF1) 的下调、Snail的诱

* Corresponding author.

E-mail address: lji@zju.edu.cn (L. Li).

[#] These authors contributed equally to this work.

导[9]以及非编码转录基因的紊乱[10]。研究者们已经采取了各种策略来维持体外环境中原代肝细胞的功能,包括从内部改变基因的表达(如过表达*HNF4 α*),及从外部添加小分子化合物(如将其与肝非实质细胞共同培养)[11–15]。Xiang等[16]研究发现,联合使用Forskolin(FSK)、SB431542(SB43)、DAPT(Notch抑制剂)、IWP2(Wnt抑制剂)和LDN193189(BMP抑制剂)可维持部分肝细胞功能长达数周,这是通过阻断转化生长因子(TGF)- β 通路来实现的。然而去分化的确切机制尚不清楚,如何在体外环境中维持原代肝细胞特异性功能仍然有待进一步研究。

考虑到信使核糖核酸(mRNA)和蛋白质表达之间的相关性很低,从转录组学层面对去分化进行研究是远远不够的[17]。鉴于肝脏中含有大量的高丰度蛋白质,全蛋白质组学分析很难挖掘去分化过程中的低丰度关键蛋白。综上,我们推测蛋白质翻译后修饰(PTM)可能会为原代肝细胞体外去分化提供更有价值的信息。

泛素是一种由76个氨基酸组成的蛋白质,在泛素激活酶(E1)、泛素转移酶(E2)和泛素连接酶(E3)的协同作用下可与底物结合。去泛素化酶(DUB)可以将泛素链从底物上去除,因此这一过程是可逆的[18]。泛素链有7个赖氨酸残基(K)(包括K6、K11、K27、K29、K33、K48和K63)以及N端蛋氨酸残基(M1),这些位点都可以作为延伸链的结合位点。不同的泛素化修饰类型介导不同的生物学功能。K48和K11连接通常与26S蛋白酶体介导的蛋白质降解有关,而K63和K27连接通常与非降解性功能相关[19]。

研究表明,泛素化修饰在某些细胞分化或去分化过程中有着重要作用。Buckley等[20]、Choi和Baek[21]通过泛素-蛋白酶体系统(UPS)靶向RNA干扰(RNAi)技术筛选出了在胚胎干细胞(ESC)分化中发挥重要作用的E3酶——FBXW7。此外,CD4⁺T细胞分化为辅助性T细胞也需要泛素化修饰的参与[22]。UPS的调节因子UBA1参与诱导多能干细胞(IPSC)向运动神经元分化[23]。Lauschke等[10]从转录组层面开展研究,表明在肝细胞去分化过程中有泛素化通路参与。这些研究为“泛素化修饰在肝细胞去分化中发挥作用”这一假设提供了理论基础。不同类型的翻译后修饰之间普遍存在着协同调节,以介导细胞完成不同的功能[24],泛素化与磷酸化之间的交流尤为紧密[19,25]。

在本研究中,我们采用液相色谱-质谱串联技术

(LC-MS/MS),系统地分析了体外5个不同时间点的原代肝细胞泛素化和磷酸化修饰蛋白质组的动态变化。这一研究不仅对先前研究进行了补充,也为深入研究原代肝细胞去分化提供了新的思路。

2. 材料与方法

2.1. 实验设计及统计原理

应用HF-X质谱法对大鼠去分化原代肝细胞和四种细胞系的可溶性蛋白的WCP、泛素组和磷酸化蛋白质组进行分析。为了验证实验所测量的生物学可靠性,我们在每个实验对每个指标点的原代肝细胞的4个生物学重复都进行了分析。

我们使用标准配对*t*检验来确定去分化(6 h、12 h、24 h、48 h)与0 h之间是否存在统计学差异。

2.2. 大鼠原代肝细胞的提取及培养

实验动物:雄性SD大鼠,体质量为250~300 g,由浙江省实验动物中心提供。将大鼠被关在不锈钢笼子里,将其光周期设置为12 h光期+12 h暗期,并采用两步酶灌注法分离原代肝细胞[26]。小鼠腹腔注射4% (*m/V*)的水合氯醛(每100 g注射0.7 mL)麻醉。用含1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸(Sigma-Aldrich, USA)的无钙培养液通过门静脉对肝脏进行原位灌注,直至血液被完全冲走。接着在灌注装置中加入37 $^{\circ}\text{C}$ 的含0.08% (*m/V*)消解酶(Gibco, USA)的灌注液,然后加入0.05% (*m/V*)胶原酶IV(Sigma-Aldrich, USA)灌注液。两种灌注液交替输注,直至大鼠肝脏表面出现微小裂隙,然后将肝脏移至装有冷藏后的洗涤缓冲液的烧杯中,并用干净的剪刀将其切碎。用Percoll梯度离心法对分解后的细胞进行纯化(GE Healthcare, Sweden)。在之后的实验中我们只使用存活率大于90%的肝细胞。将原代肝细胞重新在Williams E培养基(Sigma-Aldrich, USA)中悬浮培养,以每10 cm培养皿中 1×10^7 个细胞的密度接种于I型胶原涂层平板(BD Dickinson, USA)。Williams E培养基中添加10%胎牛血清(Gibco, USA)、1 \times 胰岛素-转铁蛋白-硒(Life Technologies, USA)、0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松(Life Technologies, USA)、1 \times 谷氨酰胺(Life Technologies, USA)和1 \times 青霉素(100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)或链霉素(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)(Sigma-Aldrich, USA)。3 h后,将培养基换成无胎牛血清的培养液。

2.3. 超级 SILAC 样本的制备

应用细胞培养中氨基酸稳定同位素标记法 (SILAC) 将 Mac-RH-777、RH-35、HSC-T6 和 CRHR-7919 细胞培养在含有 10% 透析胎牛血清、 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -精氨酸 (Arg^{10}) [$50 \mu\text{g} \cdot (500 \text{ mL})^{-1}$] 和 $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -赖氨酸 (Lys^8) [$50 \mu\text{g} \cdot (500 \text{ mL})^{-1}$] (SigmaAldrich, USA) 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中, 直至它们被完全标记, 至少培养 6 代 [27]。重标记裂解物以 1:1:1:1 的比例混合从而获得超级 SILAC 混合物。

2.4. 蛋白质的提取和分解

培养 0 h 的原代肝细胞称为培养前分离的新鲜肝细胞。在指定的时间点和 4 个细胞系中用冷藏后的 $1 \times$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤原代肝细胞两次, 然后加入裂解缓冲液 ($1 \times$ 蛋白酶抑制剂、 $1 \times$ 磷酸化酶抑制剂、 $1 \times 8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素中的 PR-619)。接着将裂解液在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下, 以 $11\ 304 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离出不溶性碎片。收集离心管中的上清液并用 BCA 蛋白检测试剂盒 (Invitrogen, USA) 测定其蛋白质浓度。在每个指定时间点将 10 mg 蛋白质与 1 mg 超级 SILAC 混合。

将混合后的蛋白质在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下用 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二硫苏糖醇 (DTT) 还原 30 min, 接着加入 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碘乙酰胺 (IAA) 在室温下避光反应 30 min。然后借助 Zeba 旋转脱盐离心柱 (Thermo Fisher Science, USA) 用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸氢铵 (ABC) 代替裂解液中 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素。所有样本在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下与胰酶以 40:1 (*m/m*) 的比例过夜培养。分解后得到的多肽通过三氟乙酸 (TFA) 酸化, 其最终浓度为 1% ($\text{pH} \leq 3$)。酸化的多肽以 $1696 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液用预处理的 Sep-pak C18 固相萃取柱 (Waters, USA) 脱盐 [28]。将脱盐后的多肽置于真空冷冻干燥机 (Labconco, USA) 中冷冻干燥 48 h 以上。

2.5. 抗 K- ϵ -GG 抗体的化学交联

我们的实验使用针对泛素残基 (K- ϵ -GG) 的 PTMScan[®] 试剂盒 (CST, USA) 和针对磷酸化丝氨酸/苏氨酸基序 [pS/T] 的 PTMScan[®] 试剂盒 (CST, USA)。将所有微珠在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的庚二亚氨酸二甲酯 (DMP) (Sigma, USA) 中重新悬浮培养, 在室温下进行端对端旋转孵育 30 min。为了停止交联反应, 将微珠用 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙醇胺 ($\text{pH} 8.0$) 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 2 h。在交联后, 用 1 mL 冷藏后的 $1 \times$ PBS 洗涤这些微珠 3 次。

2.6. 泛素化和磷酸化多肽的富集

将干燥后的肽在 $1 \times$ 人细胞凋亡抑制因子 (IAP) 缓冲液 (CST, USA) 中重新悬浮培养并在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下以 $9420 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 除去其中的不溶性物质。将上清液与洗涤过的交联微珠在试管中孵育 2 h, 然后以 $94 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s。用 1 mL 冷藏后的 IAP 缓冲液洗涤微珠 3 次, 用 $50 \mu\text{L}$ 0.15% 的三氟乙酸 (TFA) 对泛素化的多肽进行洗脱。通过真空离心使洗脱液完全干燥并根据说明书使用 PTMScan[®] Phospho-Enrichment IMAC Fe-NTA Magnetic Beads (CST, USA) 使磷酸肽富集。

2.7. 串联质谱标签

在磷酸肽富集后, 用串联质谱 (TMT) 试剂盒 (TMT10plex) 标记已修饰的多肽。第一个重复时 5 个时间点的原代肝细胞被标记为 126、127N、127C、128N 和 128C, 第二个重复时 5 个时间点的原代肝细胞被标记为 129N、129C、130N、130C 和 131。第三个和第四个重复时用另一种 TMT10plex 试剂盒标记。用 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的四乙基溴化铵 (TEAB) ($\text{pH} 8.0$) 溶解多肽, 并将其与 8 mL 的 TMT 标记试剂混合。室温下反应 1 h, 加入 5% 的羟胺孵育 15 min 使反应停止。将所有样本放置在一个新的试管中, 并用离心法去除不溶性物质。将上清液用自制的 C18 脱盐装置进行除盐冻干。

2.8. 强阳离子交换层析

将标记的多肽在 80 mL 15% 乙腈 (ACN) 和 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 溶液中悬浮培养, 并用自制的强阳离子交换 (SCX) 柱对其进行分离。分别用以下几种方法对 SCX 柱进行预处理: $80 \mu\text{L}$ 乙腈; $80 \mu\text{L}$ 80% 乙腈和 0.1% 三氟乙酸; $80 \mu\text{L}$ 15% 乙腈, $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵和 0.1% 三氟乙酸; $80 \mu\text{L}$ 15% 三氟乙酸和 0.1% 三氟乙酸。在 15% 乙腈中 $30 \sim 250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酸铵中洗脱得到 5 个组分。标记的多肽在分离后呈现完全脱盐冻干的状态。

2.9. LC-MS/MS 分析

用 0.1% 的甲酸和 2% 的乙腈溶解冻干多肽。通过依赖于 Q Exactive HF-X 质谱仪的 UltiMate 3000 RSLCnano 系统 (Thermo Fisher Scientific, USA) 对多肽进行分析。起始我们采用恒定流速为 $400 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 及 120 min 3%~80% 的线性梯度的 0.1% 甲酸缓冲液。WCP、泛素组和磷酸化蛋白质组的 MS 谱采用 120 000 分辨率, 其质荷比的范围为 $300 \sim 1500 \text{ m/z}$, 自动增益控制目标为 $3\text{E}6$ 。

在MS2光谱采集过程中,分辨率为30 000,高能碰撞诱导碎裂(HCD)设置为27%。此外,我们使用依赖于数据的自动增益控制目标为2E5的方法对MS2光谱上的前20名进行了分析,设置其隔离窗口为1.0 *m/z*。排除电荷小于2或大于7的数据,动态排除设置为30 s。

2.10. 数据库检索

使用MaxQuant软件中的UniProtKB数据库对多肽进行鉴定及定量[26]。在检索时,选择半胱氨酸烷基化(arbamidomethyl, C)作为固定修饰。在寻找泛素化位点时,选择氧化(oxidation)、N端乙酰化(acetyl protein N-term)及丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化修饰[phosphor (STY)]作为可变修饰。胰蛋白酶对于分解蛋白质具有特异性,将允许的最大漏切数设置为2。我们使用20 ppm (1 ppm = 10^{-6})进行第一次离子耐受性研究,使用4.5 ppm进行普遍离子耐受性研究。设置肽段鉴定时假阳性率标准为FDR < 0.01。将磷酸化位点和泛素化位点定位概率大于0.9定义为高可信度修饰位点。除了上述参数外,我们还应用了MaxQuant软件中的默认参数。

质谱蛋白质组学的数据和数据集标识符PXD015897已经通过蛋白质组数据资源共享系统iProX一起存至ProteomeXchange数据库中[29]。

2.11. 生物信息学分析

采用配对样本*t*检验进行差异分析。显著性差异的蛋白质或位点需满足:差异倍数(FC) > 1.5且与0 h相比 $P < 0.05$,而差异明显的蛋白质或位点只需满足FC > 1.5而*P*值不受限制。

GO、KEGG通路分析是采用ORA分析,通过WebGestalt数据库实现[4]。使用WebLogo3分析多肽基序的相似性[30]。使用STRING数据库构建蛋白质互作(PPI)网络[31]。使用Cytoscape工具将功能性蛋白质相互作用网络可视化[32]。使用CytoHubba筛选hub基因[33]。使用Perseus软件进行时间序列聚类分析[34]。

2.12. Western 免疫印迹

用12%的聚丙烯酰胺凝胶分离出20 μg 的蛋白质,然后转移到硝化纤维滤膜上(Bio-Rad, USA)。使用1 \times 封闭缓冲液(Beyotime, China),在室温条件下封闭膜30 min。然后将膜与抗HNF1 α 抗体(Cat#: 89670S;

1:2000; CST, USA)、抗E-钙黏蛋白抗体(Cat#: 76055; 1:1000; Abcam, USA)、抗N-钙黏蛋白抗体(Cat#: 98952; 1:1000; Abcam, USA),或抗波形蛋白抗体(Cat#: 92547; 1:1000; Abcam, USA)在4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,并且在和相应的二次抗体孵育前使用1 \times 洗涤缓冲液冲洗膜3次。

2.13. 流式细胞术

在使用Percoll液纯化后,使用1 \times PBS洗涤 5×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的原代肝细胞两次,然后用4%多聚甲醛在室温下固定15 min。使用Triton-100帮助渗透。根据制造商的方案,其使用浓度为1:500 (*m/m*)的白蛋白抗体(Cat#: ab207327; Abcam, USA)。

2.14. 免疫荧光

使用1 \times PBS洗涤盖玻片上培养的 5×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 原代肝细胞两次,用4%多聚甲醛在室温下固定15 min,然后用0.5% Triton X-100在室温下透化肝细胞10 min,并且用5%牛血清白蛋白(BSA)封闭20 min。将其与抗E-钙黏蛋白抗体(Cat#: 76055; 1:1000; Abcam, USA)、抗N-钙黏蛋白抗体(Cat#: 98952; 1:1000; Abcam, USA),或抗波形蛋白抗体(Cat#: 92547; 1:1000; Abcam, USA)在4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,再和相应的二次抗体共同孵育1 h。观察前,细胞核在室温下用DAPI (Abcam, USA)染色4 min。

2.15. 实时定量 PCR 分析

使用Trizol (Sigma-Aldrich, USA)提取总RNA,并使用cDNA第一链合成试剂盒(Roche Applied Science, Germany)对其进行逆转录。使用SYBR Green PCR master Mix (Roche Applied Science, Germany)和QuantStudio5 PCR系统(Thermo Fisher Science, USA)进行聚合酶链反应(PCR)。这些引物列在附录A的表S1中。

2.16. 微阵列分析

我们在每个时间点进行了三次重复。样本由上海OE生物技术有限公司采用Agilent大鼠IncRNA基因芯片V3 (8 \times 60 K, 设计ID: 084409)。本研究中的基因不仅在5个时间点均被检测到,而且在相邻时间点之间也存在显著性差异 ($P < 0.05$, FC > 1.5)。

3. 结果

3.1. 体外培养过程中原代肝细胞去分化相关标志物表达量持续升高

我们发现采用两步酶解灌流法分离得到的细胞，白蛋白高表达[图1 (a) 和图S1]，vWF（肝窦内皮细胞标志物），CD163（枯否细胞标志物）和desmin、CK-43、 α -SMA（肝星状细胞标志物）低表达（图S2）。这表明分离纯化的细胞为原代肝细胞。在体外单层培养6 h后，上皮标志蛋白E-钙黏蛋白表达明显降低，培养24 h后间质标志蛋白N-钙黏蛋白和波形蛋白表达明显上升，此结果与以前的报道结果相似[图1 (b)~(g)] [7]。正如图S3中所示，其相应的mRNA结果呈现出相同的趋势。此外，光镜下观察发现，原代肝细胞逐渐丧失了肝细胞

的正常形态——72 h后类似于成纤维细胞样（图S4）。

总之，这一部分表明，体外培养48 h的大鼠原代肝细胞是研究去分化相关机制的良好模型。

3.2. TMT 和 super-SILAC 的联合应用

由于细胞内泛素化修饰蛋白的含量很低，因此研究泛素化修饰需要较大的起始蛋白质量 (> 10 mg)。我们前期预实验发现，一只大鼠所分离的原代肝细胞只能获得大约5 mg蛋白质，因此很难在每个指定的时间点获得足够的细胞。最终，我们决定收集多只大鼠的肝细胞样本，之后按照相同时间点进行合并。我们将40只SD大鼠的原代肝细胞随机分成4组（即4个生物学重复），并将来自同一时间点的同一组内的细胞样本放到同一个试管中（图2）。这种方法为进一步研究后续泛素化修饰组

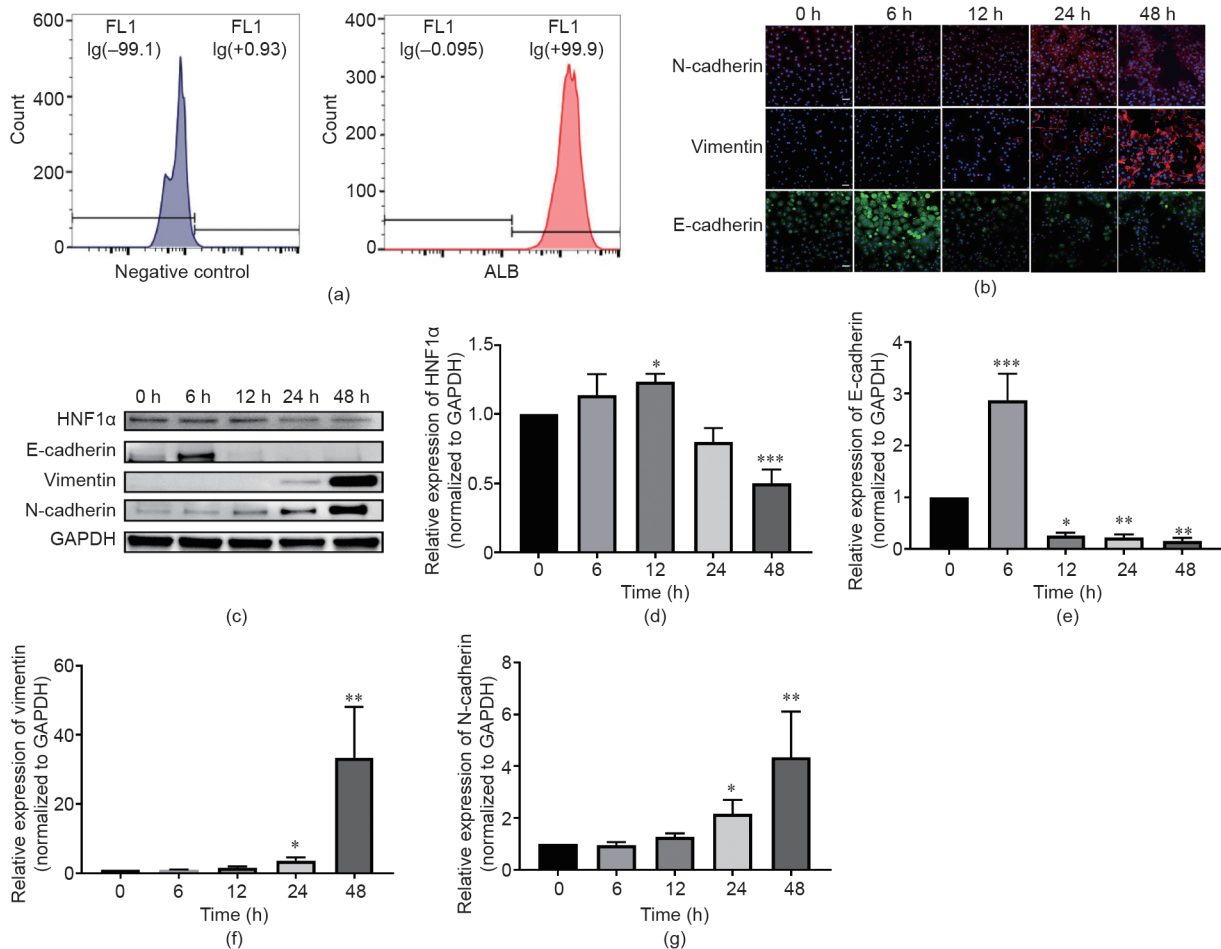


图1. 原代肝细胞在体外经历去分化改变。(a) 流式技术显示原代肝细胞分泌白蛋白。FL1指对照组（左边）和实验组（右边）中第一个通道FITC连接的二抗的比例。FL1 (-99.1)表示对照组中99.1%的细胞不分泌白蛋白。FL1 (+0.93)指对照组中0.93%的细胞分泌白蛋白。FL1 (-0.095)指实验组中0.095%的细胞不分泌白蛋白。FL1 (+99.9)指实验组中99.9%的细胞分泌白蛋白。(b) 细胞免疫荧光显示上皮-间质转换相关分子标志物在去分化过程中发生改变。0 h表示细胞刚从肝脏中分离，未在培养皿中培养之前（比例尺，100 nm）。(c) 免疫印迹显示HNF1 α 及三种上皮-间质转换分子标志物的改变。GAPDH作为内参。(d)~(g) 柱状图显示与(c)图相对应的四种蛋白质的相对定量变化。*，**，***分别表示与0 h相比， $P < 0.05$, 0.01和0.001。误差线表示均值 \pm 标准差。

学提供了足够的蛋白质量和生物重复。

考虑到多肽水平的免疫沉淀 (IP) 富集效率不同, 可能会引起较大的误差。我们首先制作了super-SILAC内参: 通过重标的稳定同位素将4种代表性细胞系 (RH-35、CHRH-7799、HSC-T7和MAD-25) 实现完全标记, 然后以1:1:1:1 (*m/m*) 的比例进行混合[27]。

在起始蛋白酶解之前, 我们就将super-SILAC添

加至样本中, 因为对蛋白质水平进行定量检测比多肽水平的定量检测更准确。在已报道的研究中, 使用的super-SILAC和样品是等量混合的[27]。目前借助TMT技术, 我们一次可以检测10个样本。各个样本中原本含量较低的泛素化位点, 可以通过TMT的“累计效应”来提高泛素化位点的检出率。因此, 我们使用的super-SILAC与样本的比例为1:10。最终, 在super-SILAC内

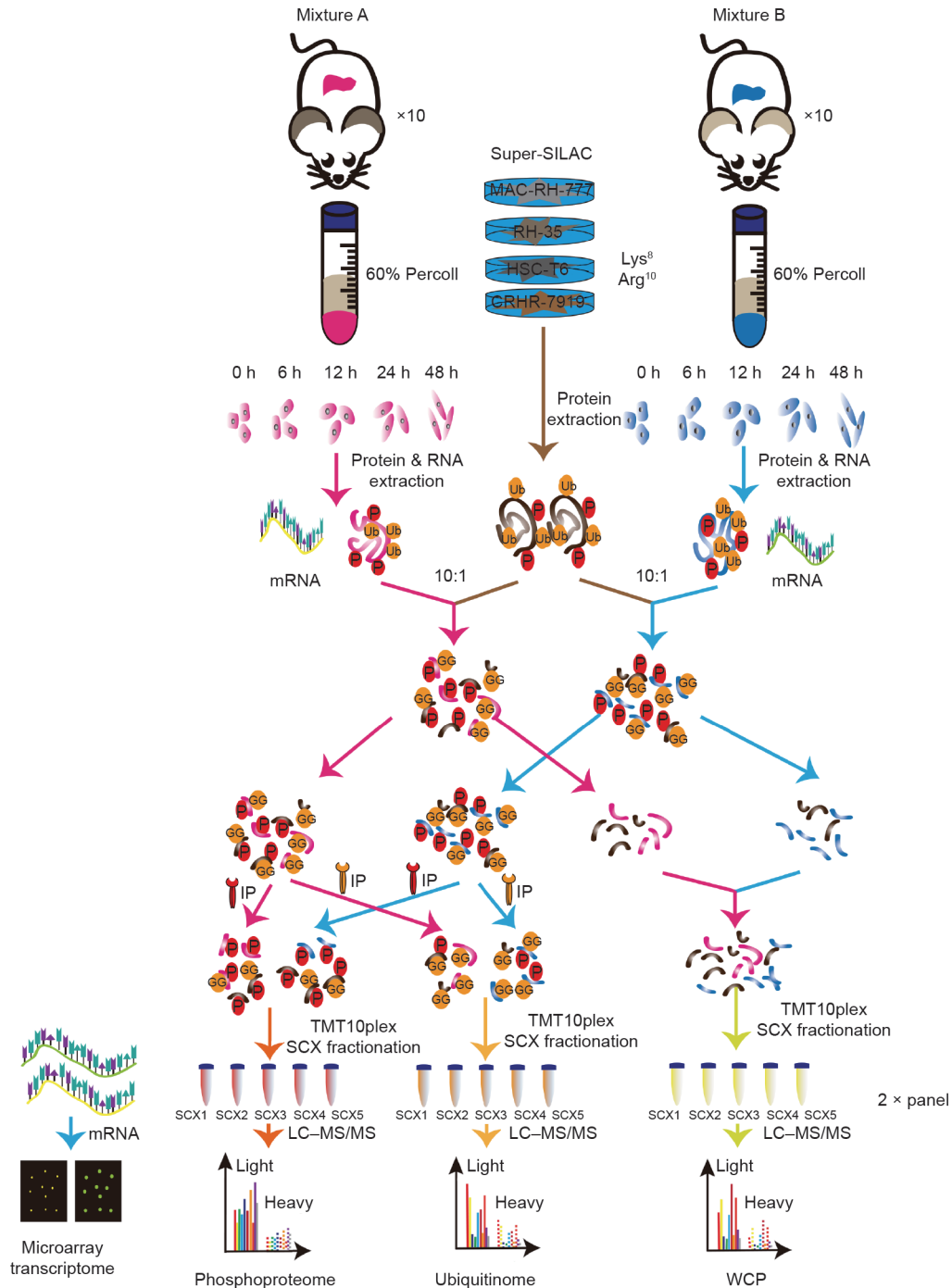


图2. 多组学分析流程图, 包括蛋白质纯化、酶解、多肽富集及生物信息学分析。Ub表示泛素化修饰; GG表示双甘氨酸肽; P表示磷酸化修饰; IP表示蛋白免疫共沉淀。

参中，我们定量了63个泛素化位点和270个磷酸化位点。但这个方法有一个明显的缺点：super-SILAC用量的减少会导致样本覆盖率的降低。为了解决这个问题，我们在总体水平上校正了质谱鉴定结果，而不是依赖于样本和super-SILAC中定量的单个蛋白质或通过建立低丰度蛋白质的正态分布[27,35]。具体地说，我们根据下面的公式确定了第1组（包括生物重复1和2）和第2组（包括生物重复3和4）的校正系数：

第1组校正系数=生物重复1（或2）在6 h（或12 h、24 h、48 h）的super-SILAC平均强度/生物重复1在0 h的super-SILAC平均强度。

第2组校正系数=生物重复3（或4）在6 h（或12 h、24 h、48 h）的super-SILAC平均强度/生物重复3在0 h的super-SILAC平均强度。

为了使数据结果具有可比性，我们首先对WCP进行分析，然后对泛素化和磷酸化修饰位点进行富集，并将上述校正标准应用于这三种组学。

这次研究中将TMT和super-SILAC联合用于WCP、泛素化修饰和磷酸化修饰蛋白质组分析，是一次新的尝试。

3.3. 与原代肝细胞去分化相关的 WCP

目前关于肝细胞去分化的组学相关研究，主要包括基因转录组、microRNA或蛋白质组，而很少有研究关注翻译后修饰组学的作用[36–38]。为了使我们的研究

更加可靠准确，我们首先深入分析了该模型中的WCP。

我们总共鉴定了2196种蛋白质，其中，2188种蛋白质在至少两次生物重复中被定量，其中有1928种蛋白质在所有重复中被定量[图3 (a)]。与Cliff Rowe在2010年获得的蛋白质组学数据相比[38]，在我们的WCP数据中有1929种新的蛋白质被定量[图3 (b)]。波形蛋白是上皮-间质转化的重要标志物[7]。我们观察到，在所有生物学重复中，波形蛋白在48 h显著上调，并且与Western印迹和免疫荧光结果一致[图3 (c)]。super-SILAC校正后，我们对各时间点的蛋白质丰度进行相关性分析，其相关性良好，相关性系数介于0.87–0.99 [图3 (d)]。总体而言，我们进行了重复WCP分析并对肝细胞去分化过程中的相对蛋白质丰度进行了量化。在之后的实验中，我们将使用蛋白质丰度的变化来校正PTM的变化。

为了确定肝细胞去分化过程中蛋白质丰度的变化，我们比较了6 h、12 h、24 h和48 h（去分化阶段）和0 h（未去分化阶段）的蛋白质丰度。结果显示，随着体外培养时间延长，有显著性差异（ $FC > 1.5$, $P < 0.05$ ）的蛋白质数量逐渐增加（6 h时为35个，48 h时为110个）[图3 (e)和表S2]。GO-CC分析表明，差异性显著的蛋白质在24 h前主要分布在线粒体中，48 h时主要分布在细胞骨架中，GO-BP显示差异蛋白在氧化还原反应中富集。KEGG分析显示肝脏代谢功能（如脂肪酸降解、代谢和碳代谢）出现下降[图3 (f)]。

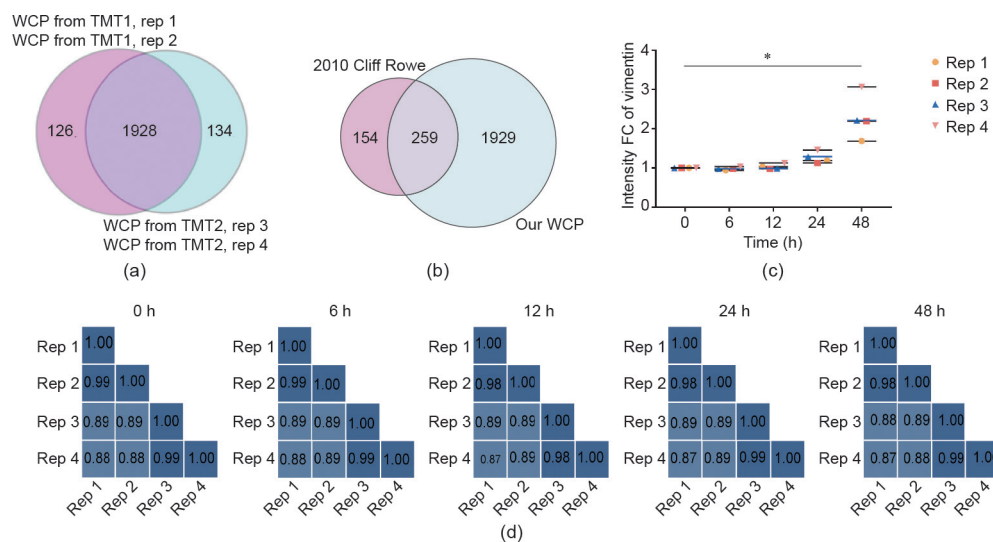


图3. 去分化过程中的全蛋白质组学。(a) 维恩图表示在各个生物重复中定量的蛋白质数目及其之间的交集。(b) 维恩图表示本实验中定量的蛋白质数目和外部数据集间的交集。(c) 在全蛋白质组学数据中波形蛋白的表达量随时间递增 (*代表 $P < 0.05$)。 (d) 热图显示各个时间点不同生物重复间皮尔森相关系数。Rep代表各个生物重复。

3.4. 肝细胞去分化过程中基因转录与对应蛋白质丰度的相关性较小

细胞内蛋白质丰度是蛋白质产生和降解的综合结果。为了确定蛋白质的减少/增加是否由降低/增加的mRNA翻译或蛋白质降解所导致,我们对同一时间点的转录组(GSE138071)和WCP进行了联合分析。在同一时间点,不同生物重复转录组学数据的Pearson相关系数都在0.9以上,这表明其具有良好的重复性[图4(a)]。我们将同一时间点的肝细胞放在一起,通过对转录组的无监督主成分分析(PCA),我们发现相同时间点的生物重复相互聚集,不同时间点的生物重复相互远离。其中,24 h和48 h的样本彼此靠近,0 h的样本和它们的距离较大[图4(b)]。转录组的数据覆盖了WCP中85% [图4(c)]。此外,我们发现在去分化过程中转录组和对应蛋白质丰度之间的相关性很小[Pearson相关系数在0.02~0.23之间,图4(d)]。我们发现显著改变的mRNA对应的蛋白质产物中,超过93%的在各个时间点都保持不变。此外,数个蛋白质含量的变化方向与其相关的mRNA改变趋势相反:4种蛋白(ac1873、纤维蛋白原 β 链、酪氨酸氨基转移酶、载脂蛋白C-I)在24 h时其表达水平显著升高,而其mRNA水平显著降低。载脂蛋白C-I、肌球蛋白轻链1/3、骨骼肌异构体和载脂蛋白E在48 h时也有相似的变化趋势。Hsp90 ATPase活性因子1在24 h时mRNA表达上调而蛋白质丰度降低(图S5)。

因此,我们认为翻译后修饰是引起去分化过程中,基因转录水平和WCP表达水平不一致的重要原因。

3.5. 原代肝细胞去分化过程中的泛素化修饰水平的动态图谱

为了获得准确定量的泛素化修饰位点,我们使用super-SILAC作为参考进行矫正。我们一共鉴定出了2056个泛素化修饰位点,其中有1952个被准确定量,它们归属于1028个蛋白质[图5(a)]。在这1028个泛素化修饰蛋白中,有437个蛋白质只在泛素化修饰组学中被定量。这表明泛素化修饰位点的富集,能够帮助发现在WCP中未能检测到的蛋白质[图5(b)]。其中,只有一个泛素化修饰位点的蛋白质占61% (63/100),含有多个泛素化修饰位点的蛋白质占39% (39/100) [图5(c)]。核糖体结合蛋白1含有高达31个泛素化修饰位点。其他含有10个或10个以上泛素化修饰位点的蛋白质包括热激同源71 kDa蛋白、细胞色素P450 2E1、醛酮还原酶家族

成员1D1、过渡型内质网ATP酶、角蛋白和II型细胞骨架8、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶。对泛素化多肽进行基序分析后,我们发现K残基附近没有相对保守基序(图S6)。各个时间点的生物重复的相关系数在0.61~0.96之间,这个结果证明我们采用的是一种重复性良好的泛素化位点富集流程[图5(d)]。与0 h相比,在6 h、12 h、24 h和48 h显著上调的泛素化修饰位点数目增多($FC > 1.5$, $P < 0.05$)。这表明体外培养时间越长,泛素化修饰水平波动越明显[图5(e)]。通过KEGG分析,我们发现24 h前显著上调的泛素化蛋白在细胞色素P450 (CYP450)与外源物质的糖酵解/糖异生途径中富集。48 h时,显著下调的泛素化蛋白在铁死亡中富集(图S7)。GO-CC分析表明,显著减少的泛素化蛋白主要分布在细胞膜上。

如果一种蛋白质只有一个被显著调控泛素化修饰位点,那么该位点的变化就代表了这一蛋白质修饰水平的改变。对于含有多个泛素化修饰位点的蛋白质,我们计算了所有显著性改变的泛素化修饰位点的“平均比率”,并用这一指标代表蛋白质泛素化修饰水平的改变。在此基础上,我们利用欧氏距离将泛素化修饰程度显著变化的蛋白质分为3簇[图5(f)和表S3]。第1簇含有138个蛋白质。GO-CC分析表明第1簇的泛素化蛋白主要位于胞质核糖体、过氧化物酶体和线粒体。GO-MF分析显示,第2簇在氧化还原反应中富集,而第3簇与多种转运蛋白活性有关。通过KEGG通路分析发现,第3簇蛋白质在与CYP450相关的外源物质代谢中富集(图S8)。CYP450是各种E3连接酶的重要靶点,尤其在氧化应激期间(图S8)[37,39]。在CYP450s中,我们一共定量了81个泛素化位点,它们归属于23个CYP450s。与0 h相比,其中,有55个位点(归宿于19个CYP450s)发生了改变(图S9)。其中,有16个CYP450 (69.6%)有多个泛素化修饰位点(图S10)。CYP2e1有10个泛素化发生改变:K159、K194、K237、K243、K249、K275、K324、K420、K428和K94(图S9)。CYP2e1上的Lys324泛素化修饰位点在其他研究中已有报道,但其对CYP2e1周转的影响尚未发现[40,41]。这一修饰位点的真正作用还有待进一步研究。

接着,我们比较了泛素化修饰蛋白丰度和相应全蛋白丰度之间的相关性。在WCP和泛素组中总共有591个蛋白质同时被定量[图5(b)]。随着去分化时间的延长,大部分蛋白质在全蛋白水平上保持不变[图5(g)]。然而,其中大多数蛋白质的泛素化修饰水平发生显著上调或下调[图5(h)]。这表明真正发生变化的是泛素化修

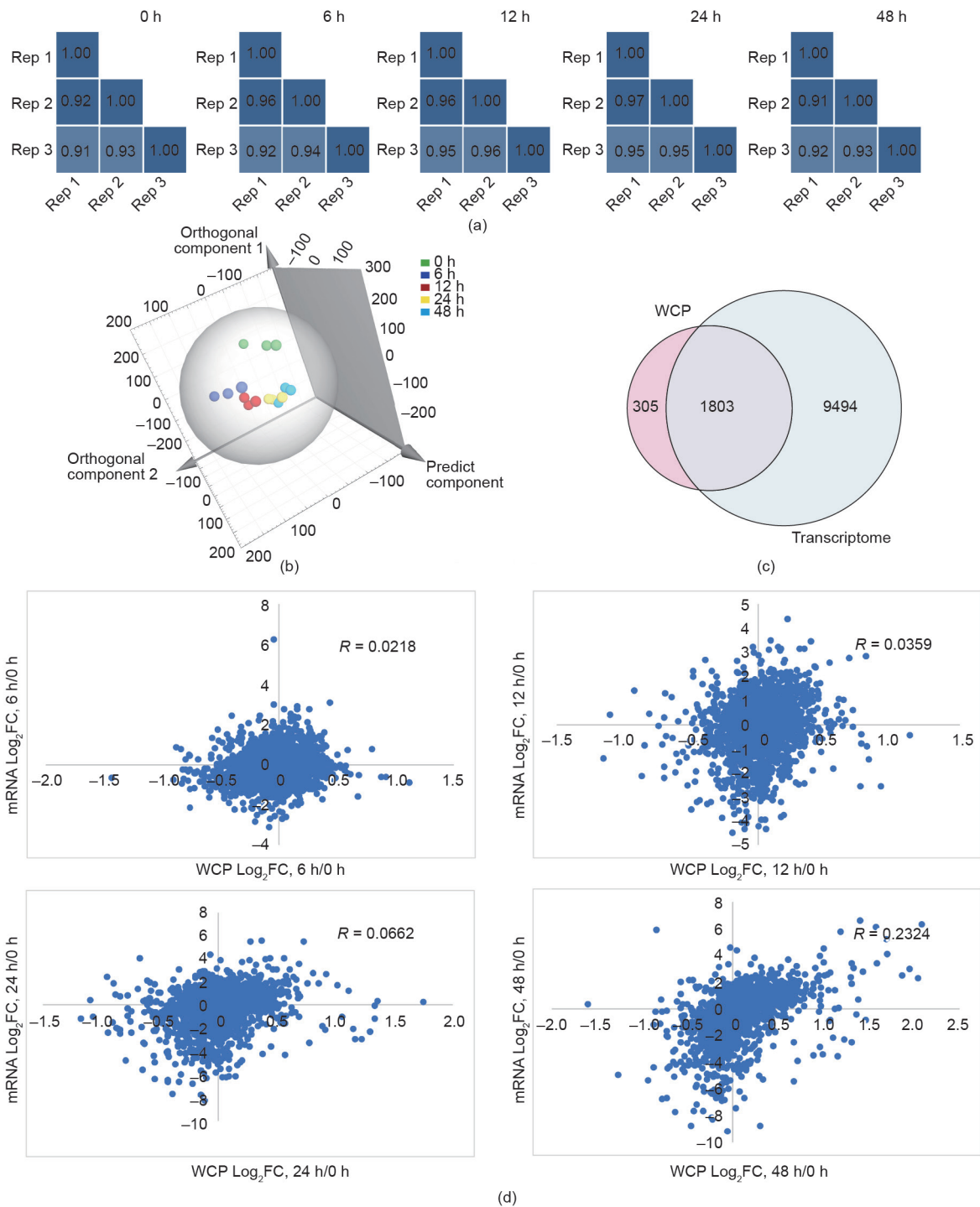


图4. 细胞去分化过程中全蛋白质组学和转录组学之间相关性较弱。(a)不同时间点,各生物重复之间转录组的皮尔森相关系数显示较好的重复性。(b)主成分分析显示各时间点各生物重复的聚集情况。(c)维恩图显示全蛋白质组学数据和转录组学数据之间的交集。(d)显示全蛋白质组学数据和转录组学数据之间的相关性。

饰位点的水平,而不是蛋白质含量。此外,由于泛素组图谱与相应的蛋白质之间没有发现相反方向的变化,我们推测蛋白酶体的降解可能不是去分化中泛素化修饰的主要类型,而非降解泛素化可能在去分化转化中起重要作用。为了验证我们的假设,我们分析了这一过程中泛

素链本身的动态变化。除K33外,其他5种典型的泛素链包括K6、K11、K29、K48和K63都在我们的数据集中被定量。其中K27是引起非降解性泛素化修饰的类型[42],也是唯一一个在去分化过程中显著上调的类型,这与我们的假设是一致的[图5(i)和图S13]。

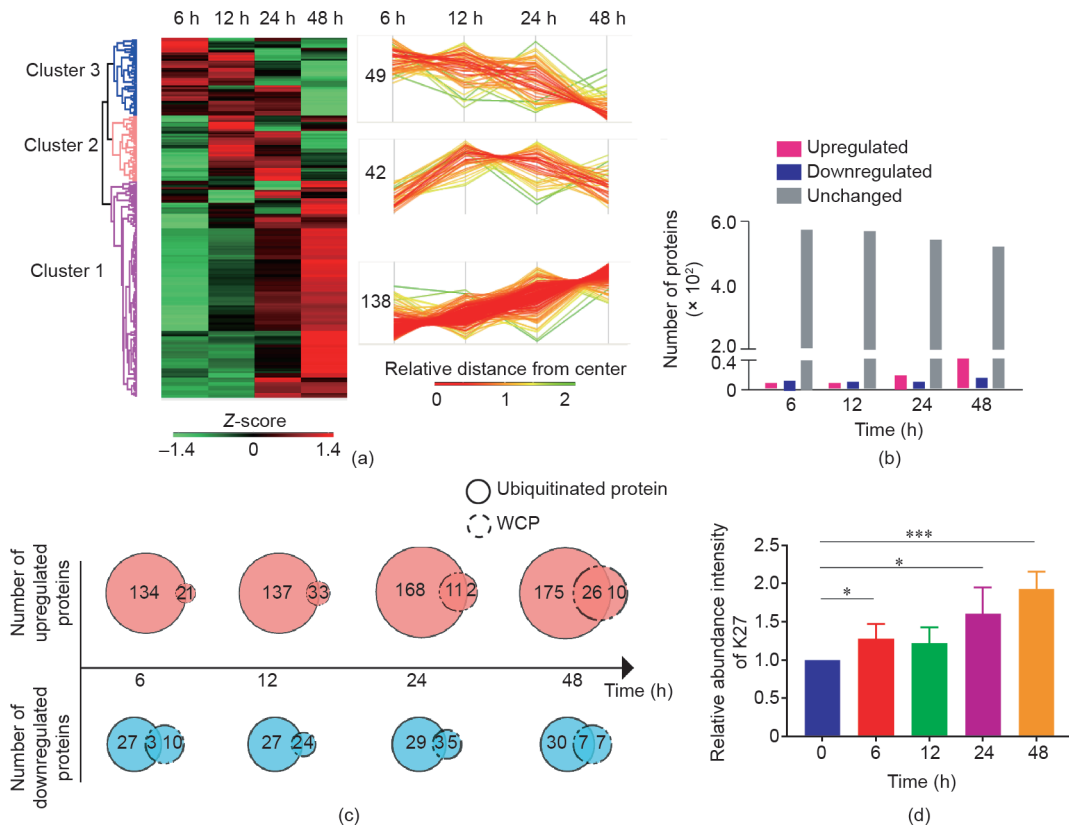


图5. 去分化过程中泛素化蛋白质组学的动态变化。(a) 去分化过程中发生显著改变的泛素化蛋白的时间序列聚类分析。(b) 柱状图显示591个蛋白质中在各时间点发生显著改变的蛋白质的数目。(c) 显示各时间点差异表达的全蛋白质和差异表达的泛素化修饰蛋白之间的差异。(d) 柱状图显示各时间点K27修饰位点的丰度变化。*, **, ***分别表示与0 h相比, $P < 0.05, 0.01$ 和 0.001 。误差线表示均值±标准差。

综上所述,我们对去分化过程中泛素化图谱的全面动态变化进行了评估,并发现了非降解性泛素化修饰的作用。

3.6. 去分化过程中伴随着磷酸化蛋白质修饰组学的改变

考虑到磷酸化修饰和泛素化修饰常常相互结合,共同决定蛋白质分子的功能和最终命运,我们采用Fe-NTA富集策略进一步分析了PHC去分化过程中的磷酸化修饰蛋白谱的动态变化[43,44]。

总体而言,我们一共鉴定了4932个磷酸化修饰位点,其中,4496个位点至少在两次生物重复中被成功定量,且具有高的置信度(定位可能性大于0.9)。这些磷酸化修饰位点对应于2295个磷酸化修饰蛋白[图S14(a)]。与WCP定量结果共同分析发现,有1590个低丰度蛋白质只在磷酸化修饰组中被成功定量,而在WCP中未被定量[图S14(b)]。此外,我们观察到单磷酸化修饰位点是去分化过程中的主要修饰类型(超过50%) [图S14(c)]。经过super-SILAC内参校正后,我们发现各个时间点之间磷酸化修饰多肽强度的皮尔逊相关系

数均超过0.5,表明实验的重复性良好[图S14(d)]。我们发现蛋白质——丝氨酸/精氨酸重复矩阵2——含有高达40个磷酸化修饰位点,但是没有一位点在PHC去分化过程中任一时间点有显著性改变(表S4)。我们观察到大多数磷酸化修饰位点(4319, 87.57%)位于丝氨酸残基上,而苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化修饰分别只有555(11.25%)和58(1.18%) [图S14(e)]。除了酪氨酸修饰位点,我们观察到高度富集基序,包括Ser(xxSPxx)和Thy(xxTPxx)的基序[图S14(f)]。与0 h时相比,我们发现29个磷酸化位点在6 h被显著调节。而在之后的12 h、24 h和48 h,显著变化的磷酸化修饰位点分别增加到31个、45个和58个[图S14(g)和表S5]。这表明PHC在体外去分化过程中磷酸化修饰波动愈发明显。

我们发现髓磷脂表达因子2的S422位点和肌球蛋白白调节轻链RLC-A 1的T19位点在各个时间点都有显著性改变。这提示去分化在不同的时间点具有独特的磷酸化谱[图6(a)]。我们还观察到有两种蛋白质在同一时间点同时包含上调和下调的磷酸化修饰位点,包括24 h

时血影蛋白 β 链的T2133位点（上调， $\log_2FC = 1.00$ ）和S2111位点（下调， $\log_2FC = -1.02$ ），以及24 h时紧密连接蛋白2的T905位点（上调， $\log_2FC = 0.76$ ）和T958位点（下调， $\log_2FC = -0.80$ ）[图6（b）]。根据欧几里德距离进行时间序列聚类分析，将99个发生显著改变的磷酸化修饰蛋白分为3簇[图6（c）和表S6]。来自簇1的60个磷酸化修饰蛋白强度在最初的24 h内保持不变，然后从24 h到48 h之间开始增加，提示它们在后期维持去分化状态中起着重要作用。根据GO-CC分析，该簇中的蛋白质多定位于细胞骨架。KEGG分析它们与紧密连接和局部黏附有关（图S15）。簇2中磷酸化修饰蛋白强度在最初的12 h内未改变，随之急剧下降，12 h之后再保持稳定。GO-BP分析表明，TGF- β 2（可促上皮间质转化）的生成在该簇中富集[40][图6（d）]。相反，GO-CC分析发现（图S15），簇3中的磷酸化修饰蛋白在前24 h迅速增加，并且主要位于线粒体中。这一发现与Wanet等[45]的研究结论相一致，他们证明了线粒体重塑在人类肝脏去分化过程中不可或缺的作用。KEGG分析显示，许多代谢途径，包括脂肪酸生物合成、氮代谢和精氨酸生物合成，在簇3中富集（图S15）。此外，一种新发现的细胞死亡类型——铁死亡——也在簇3中富集，这一现象将在后面进行讨论（图S15）。

3.7. 原代肝细胞体外去分化过程中泛素化修饰和磷酸化修饰的共同调节

总之，我们一共定量了404种同时具有泛素化和磷酸化修饰位点的蛋白质，发现其中71%具有多个泛素化或多磷酸化修饰位点[图7（a）、（b）]。我们将泛素化和磷酸化位点同时发生明显变化的蛋白质定义为“共同调节蛋白质”（ $FC > 1.5$ ）。按照这一标准，我们在所有时间点中共鉴定出32种共调节蛋白[图7（c）]。为了揭示去分化过程中32个共调节蛋白中的关键蛋白，我们进行了PPI网络分析，然后通过5种不同的cytoHybba排序方法找寻潜在的hub蛋白[33,46]（表1）。最后，我们找到了4个hub分子，包括*Ptbp1*、*Hnrpd*、*Hnrnpu*和*Srrm2*[图7（d）]。值得注意的是，我们发现，它们的蛋白质水平是不变的，但是它们的泛素化位点显著上调，并且伴随着磷酸化位点增加[图7（e）、（f）和图S16]。这表明与蛋白质水平相比，翻译后修饰会发挥更重要的作用。UniProt数据库显示*Hnrpd*调控肝细胞去分化过程，我们的研究结果与此一致。

4. 讨论和结论

关于人及其他动物原代肝细胞去分化过程中的转录

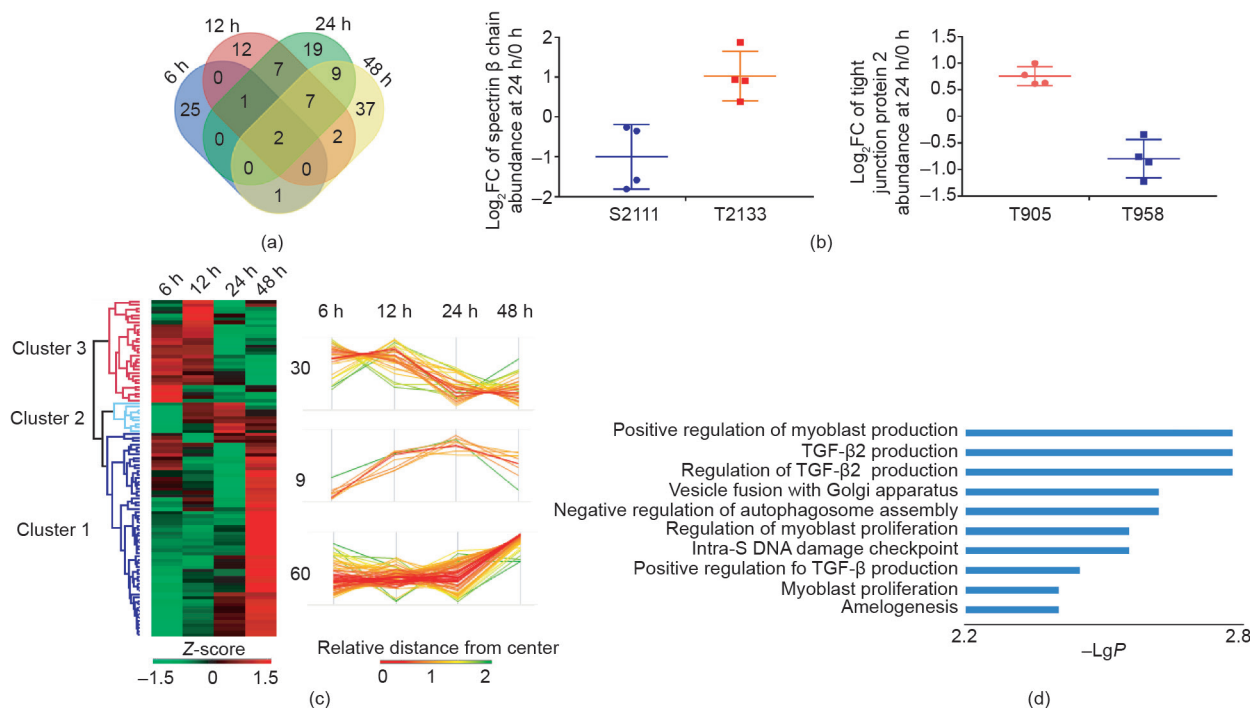


图6. 原代肝细胞体外培养去分化过程中磷酸化蛋白质组学的动态变化。(a) 维恩图显示各时间点间发生显著性变化的磷酸化位点的交集。(b) 显示两个同时具有上调和下调的磷酸化修饰位点的蛋白质。(c) 具有显著差异表达的磷酸化蛋白质的时间序列分析。(d) 聚类2中磷酸化修饰蛋白的生物学功能分析。

组和蛋白质组学研究已经有大量报道，这些研究为揭示肝细胞去分化的潜在机制提供了许多有价值的见解。但是只有少数研究关注了翻译后修饰在这一过程中的作用[2,4,10,37,47]。在这项研究中，我们联合了转录组、全蛋白质组、泛素化和磷酸化修饰组，扩展了对肝细胞去

分化的现有认识。需要注意的是，尽管使用人原代肝细胞样本对这项研究更有价值，但使用大鼠肝细胞仍旧是一个必然选择。通常细胞中的泛素化修饰蛋白含量极低，必须有大于10 mg的蛋白质量来满足质谱检测的最低限值。此外，为了提高泛素化多肽鉴定率，蛋白酶体

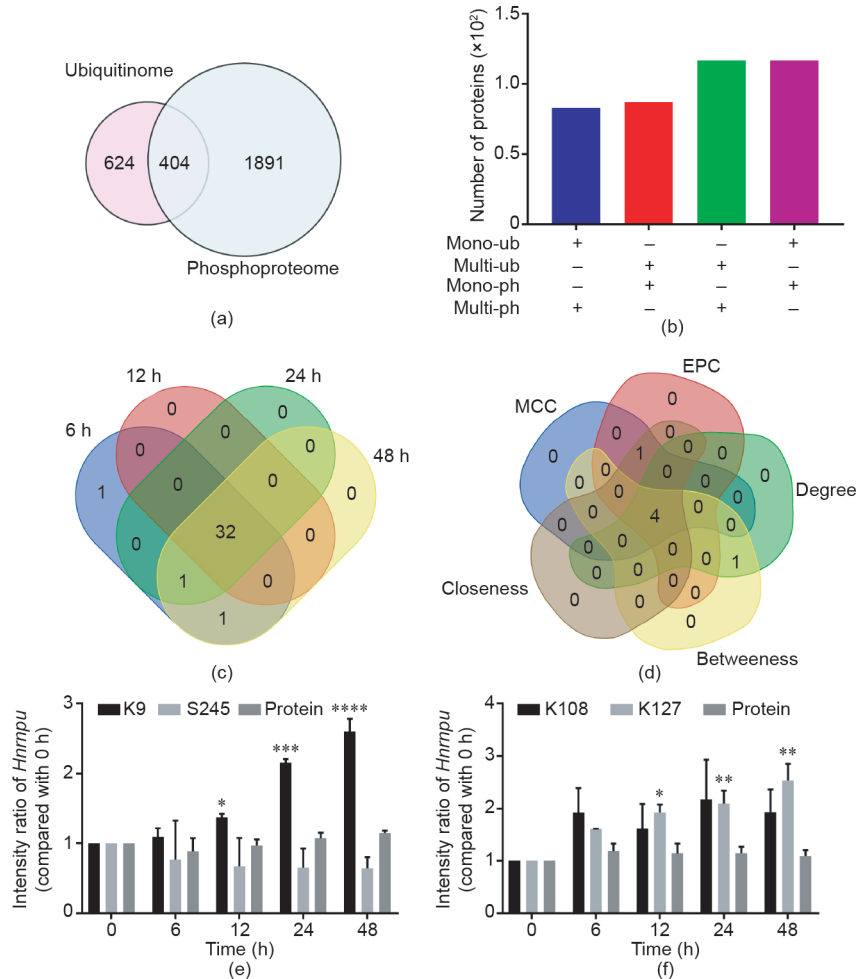


图7. 原代肝细胞体外培养去分化过程中的共修饰蛋白谱。(a) 维恩图显示泛素化蛋白组和磷酸化蛋白组之间的交集。(b) 柱状图显示单位点和多位点泛素化及磷酸化修饰蛋白的数目。(c) 维恩图显示各时间点之间同时具有泛素化修饰和磷酸化修饰的蛋白质交集。(d) 维恩图显示五种不同的算法预测的hub分子间的交集。(e) 柱状图显示各时间点上Hnrnpu分子中泛素化修饰位点和磷酸化修饰位点的变化情况。(f) 柱状图显示各时间点上Hnrpd分子中泛素化修饰位点和磷酸化修饰位点的变化情况。*, **, ***, ****分别表示与0 h相比, $P < 0.05, 0.01, 0.001$ 和 0.0001 ; 误差线表示均值±标准差。MCC: 最大团中心性。EPC: 边缘扩散组件。

表1 从共调节蛋白鉴定出的hub蛋白

| Catology | Rank methods in cytoHubba | | | | |
|--------------------|---------------------------|-----------|-------------|--------|--------|
| | MCC | Closeness | Betweenness | EPC | Degree |
| Gene symbol Top 10 | Hnrpd | Srrm2 | Srrm2 | Hnrpd | Srrm2 |
| | Ptbp1 | Hnrpd | Cat | Hnrnpu | Hnrpd |
| | Hnrnpu | Ptbp1 | Hnrpd | Ptbp1 | Ptbp1 |
| | Srrm2 | Hnrnpu | Ptbp1 | Srrm2 | Hnrnpu |
| | Ncl | Ncl | Hnrnpu | Ncl | Cat |

MCC: maximal clique centrality; EPC: edge percolated component; Degree: node connect degree. Closeness and Betweenness are topological algorithms based on shortest paths.

抑制剂MG132被广泛用于提高泛素化修饰位点的水平[48,49]。然而, MG132可以影响细胞周期和细胞应激相关的途径, 而对蛋白质翻译产生影响[50,51]; 因此, 它破坏了细胞内的原始真实状态, 可能导致与实际状态不同的结果。因此, 我们决定实验过程中不使用MG132, 以避免这种可能的干扰。这一方案无疑增加了检测泛素化位点的难度。体外原代肝细胞的自发凋亡和非增殖特性也使培养过程中蛋白质量逐渐减少[8]。综合以上些因素, 几乎不可能从人类供体中获得足够量的肝细胞来开展泛素化修饰组学研究。

考虑到细胞中泛素化修饰蛋白的低化学丰度, 我们利用TMT标记的累积效应。为了精确定量具有较低丰度的修饰蛋白质(位点), 我们将super-SILAC与样品的比例从1:1降低到1:10, 并从整体水平上对蛋白质(位点)水平进行校正[52,53]。总的来说, 我们的研究提供了肝细胞去分化过程中泛素化修饰和磷酸化修饰水平的动态图谱。通过蛋白质丰度和基因转录的联合分析, 我们揭示了它们之间的低相关性。在许多其他研究中也观察到了类似的现象, 如CD4⁺ T细胞激活, 这表明mRNA和蛋白质表达之间的非同步性是一种常见的现象, PTM可能在这一生物学过程中发挥重要作用[54–56]。作为生物功能的最终执行者, 蛋白质及其修饰应该得到更深入的研究。应该注意的是, 在不添加蛋白酶体抑制的情况下, 我们的泛素化数据集可能只代表了丰度相对较高的泛素化修饰位点, 而可能忽略了那些丰度相对较低的泛素化位点。另一个需要解决的问题是, 我们无法识别泛素化位点上泛素链的具体类型及空间结构。如何以良好的富集效率保持泛素链与底物之间共价连接的完整性仍有待探索。在整合泛素化修饰组和WCP后, 我们发现在去分化过程中K27介导的非降解性泛素化增加。应该注意的是, 二甘氨酸残基也来自泛素样蛋白, 包括NEDD8和ISG15 [57], NEDDylated或ISGylated残基在我们的泛素化蛋白质组学中的贡献度仍需要进一步评估。对磷酸化蛋白质组进行GO分析后, 我们发现铁死亡可能参与去分化过程。为了验证去分化过程中的铁死亡的作用, 需要进一步关注活性氧(ROS)的积累、无染色质浓缩的正常大小的细胞核以及具有退化嵴特定形态特征的致密微型线粒体[58,59]。

PTM之间的交流增加了信息处理的特异性和复杂性, 这一领域仍然缺乏大规模的研究。目前, PTM间交流主要有三种类型:

(1) 同一条肽上出现两个以上的PTM。由于酶消化后氨基酸序列相对较短, 使得其很难被检测到[25]。

(2) 在扰动后或在一个时间依赖过程中, 一个蛋白质上相继或同时出现两个或两个以上的修饰。然而, PTM发生的真实顺序以及它们如何协调仍不清楚[25]。

(3) 修饰发生在空间上相互接近而非序列上相互靠近的不同蛋白质上。

在我们的数据集中, 我们没有检测到类型(1)。类型(3)可以在相关进化学的帮助下进行分析[60]。

总的来说, 这些有价值的数据集揭示了肝细胞去分化的动态泛素化和磷酸化修饰的改变。我们的工作为进一步研究去分化机制, 奠定了重要的基础, 从而为拓宽原代肝细胞的体外应用提供可能。

致谢

本工作得到了国家重点研究发展项目(2016YFC1101304/3)、国家自然科学基金(81400589, 81790630, 81790633)和中国医学科学院传染病与微生物生态研究所(2019RU021)支持。

Compliance with ethics guidelines

Zhengyi Jiang, Zeyu Sun, Xiaoxi Ouyang, Yalei Zhao, Menghao Zhou, Baohong Wang, Qirui Li, Linxiao Fan, Sainan Zhang, and Lanjuan Li declare that they have no conflicts of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.02.011>.

References

- [1] Gomez-Lechon MJ, Tolosa L, Conde I, Donato MT. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014;10(11):1553–68.
- [2] Xia Y, Carpentier A, Cheng X, Block PD, Zhao Y, Zhang Z, et al. Human stem cell-derived hepatocytes as a model for hepatitis B virus infection, spreading and virus–host interactions. *J Hepatol* 2017;66(3):494–503.
- [3] Soltys KA, Setoyama K, Tafaleng EN, Gutiérrez AS, Fong J, Fukumitsu K, et al. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *J Hepatol* 2017;66(5):987–1000.
- [4] Schuetz EG, Li D, Omiecinski CJ, Muller-Eberhard U, Kleinman HK, Elswick B, et al. Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol* 1988;134(3):309–23.
- [5] Heslop JA, Rowe C, Walsh J, Sison-Young R, Jenkins R, Kamalian L, et al.

- Mechanistic evaluation of primary human hepatocyte culture using global proteomic analysis reveals a selective dedifferentiation profile. *Arch Toxicol* 2017;91(1):439–52.
- [6] Cicchini C, Amicone L, Alonzi T, Marchetti A, Mancone C, Tripodi M. Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte. *Liver Int* 2015;35(2):302–10.
- [7] Mehta A, Comunale MA, Rawat S, Casciano JC, Lamontagne J, Herrera H, et al. Intrinsic hepatocyte dedifferentiation is accompanied by upregulation of mesenchymal markers, protein sialylation and core alpha 1,6 linked fucosylation. *Sci Rep* 2016;6:27965.
- [8] Fraczek J, Bolleyn J, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M. Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Arch Toxicol* 2013;87(4):577–610.
- [9] Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004;303(5662):1378–81.
- [10] Lauschke VM, Vorrink SU, Moro SM, Rezayee F, Nordling Å, Hendriks DFG, et al. Massive rearrangements of cellular microRNA signatures are key drivers of hepatocyte dedifferentiation. *Hepatology* 2016;64(5):1743–56.
- [11] Ahmed HMM, Salerno S, Morelli S, Giorno L, de Bartolo L. 3D liver membrane system by co-culturing human hepatocytes, sinusoidal endothelial and stellate cells. *Biofabrication* 2017;9(2):025022.
- [12] Bale SS, Geerts S, Jindal R, Yarmush ML. Isolation and co-culture of rat parenchymal and non-parenchymal liver cells to evaluate cellular interactions and response. *Sci Rep* 2016;6:25329.
- [13] Hiramatsu K, Matsumoto Y, Miyazaki M, Tsubouchi H, Yamamoto I, Gohda E. Inhibition of hepatocyte growth factor production in human fibroblasts by ursodeoxycholic acid. *Biol Pharm Bull* 2005;28(4):619–24.
- [14] Vinken M, Papeleu P, Snykers S, de Rop E, Henkens T, Chipman JK, et al. Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality. *Crit Rev Toxicol* 2006;36(4):299–318.
- [15] Lang R, Stern MM, Smith L, Liu Y, Bharadwaj S, Liu G, et al. Three-dimensional culture of hepatocytes on porcine liver tissue-derived extracellular matrix. *Biomaterials* 2011;32(29):7042–52.
- [16] Xiang C, Du Y, Meng G, Soon YL, Sun S, Song N, et al. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes in vitro. *Science* 2019;64(6438):399–402.
- [17] Schwanhaussner B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011;73(7347):337–42.
- [18] Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 2009;78:363–97.
- [19] Williamson A, Werner A, Rape M. The Colossus of ubiquitylation: decrypting a cellular code. *Mol Cell* 2013;49(4):591–600.
- [20] Buckley SM, Aranda-Orgilles B, Strikoudis A, Apostolou E, Loizou E, Moran-Crusio K, et al. Regulation of pluripotency and cellular reprogramming by the ubiquitin–proteasome system. *Cell Stem Cell* 2012;11(6):783–98.
- [21] Choi J, Baek KH. Cellular functions of stem cell factors mediated by the ubiquitin–proteasome system. *Cell Mol Life Sci* 2018;75(11):1947–57.
- [22] Pagani M, Rockstroh M, Schuster M, Rossetti G, Moro M, Crosti M, et al. Reference proteome of highly purified human Th1 cells reveals strong effects on metabolism and protein ubiquitination upon differentiation. *Proteomics* 2015;15(21):3644–7.
- [23] Bax M, McKenna J, Do-Ha D, Stevens CH, Higginbottom S, Balez R, et al. The ubiquitin proteasome system is a key regulator of pluripotent stem cell survival and motor neuron differentiation. *Cells* 2019;8(6):581.
- [24] Elia AE, Boardman AP, Wang DC, Huttlin EL, Everley RA, Dephore N, et al. Quantitative proteomic atlas of ubiquitination and acetylation in the DNA damage response. *Mol Cell* 2015;59(5):867–81.
- [25] Iesmantavicius V, Weinert BT, Choudhary C. Convergence of ubiquitylation and phosphorylation signaling in rapamycin-treated yeast cells. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(8):1979–92.
- [26] Kreamer BL, Staecker JL, Sawada N, Sattler GL, Stephen Hsia MT, Pitot HC. Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. *Vitro Cell Dev Biol* 1986;22(4):201–11.
- [27] Deeb SJ, D'Souza RC, Cox J, Schmidt-Suprian M, Mann M. Super-SILAC allows classification of diffuse large B-cell lymphoma subtypes by their protein expression profiles. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(5):77–89.
- [28] Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 2003;75(3):663–70.
- [29] Ma J, Chen T, Wu S, Yang C, Bai M, Shu K, et al. iProX: an integrated proteome resource. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D1211–7.
- [30] Schneider TD, Stephens RM. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 1990;18(20):6097–100.
- [31] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D607–13.
- [32] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13(11):2498–504.
- [33] Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Mt Ko, Lin CY, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol* 2014;8(Suppl 4):S11.
- [34] Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016;13(9):731–40.
- [35] World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. In: WHO guidelines approved by the Guidelines Review Committee. Geneva: World Health Organization; 2015.
- [36] Boersema PJ, Geiger T, Wiśniewski JR, Mann M. Quantification of the N-glycosylated secretome by super-SILAC during breast cancer progression and in human blood samples. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(1):158–71.
- [37] Beigel J, Fella K, Kramer PJ, Kroeger M, Hewitt P. Genomics and proteomics analysis of cultured primary rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2008;22(1):171–81.
- [38] Rowe C, Goldring CE, Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane BS, Sanderson C, et al. Network analysis of primary hepatocyte dedifferentiation using a shotgun proteomics approach. *J Proteome Res* 2010;9(5):2658–68.
- [39] Correia MA, Sadeghi S, Mundo-Paredes E. Cytochrome P450 ubiquitination: branding for the proteolytic slaughter? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:439–64.
- [40] Banerjee A, Kocarek TA, Novak RF. Identification of a ubiquitination target/substrate-interaction domain of cytochrome P-450 (CYP) 2E1. *Drug Metab Dispos* 2000;28(2):118–24.
- [41] Huan JY, Streicher JM, Bleye LA, Koop DR. Proteasome-dependent degradation of cytochromes P450 2E1 and 2B1 expressed in tetracycline-regulated HeLa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199(3):332–43.
- [42] Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(9):679–90.
- [43] Lai Y, Zhu M, Wu W, Rokutanda N, Togashi Y, Liang W, et al. HERC2 regulates RPA2 by mediating ATR-induced Ser33 phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation. *Sci Rep* 2019;9(1):14257.
- [44] Li D, Yang W, Ren J, Ru Y, Zhang K, Fu S, et al. The E3 ubiquitin ligase TBK1 mediates the degradation of multiple picornavirus VP3 proteins by phosphorylation and ubiquitination. *J Virol* 2019;93:e01438–19.
- [45] Wanet A, Remacle N, Najar M, Sokal E, Amould T, Najimi M, et al. Mitochondrial remodeling in hepatic differentiation and dedifferentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;54:174–85.
- [46] Otasek D, Morris JH, Boucas J, Pico AR, Demchak B. Cytoscape Automation: empowering workflow-based network analysis. *Genome Biol* 2019;20(1):185.
- [47] Baker TK, Carfagna MA, Gao H, Dow ER, Li Q, Searfoss GH, et al. Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2001;14(9):1218–31.
- [48] Udeshi ND, Mani DR, Eisenhaure T, Mertins P, Jaffe JD, Clauser KR, et al. Methods for quantification of in vivo changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(5):148–59.
- [49] Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, et al. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics* 2011;10(10).
- [50] van der Wal L, Bezstarosti K, Sap KA, Dekkers DHW, Rijkers E, Mientjes E, et al. Improvement of ubiquitylation site detection by Orbitrap mass spectrometry. *J Proteomics* 2018;172:49–56.
- [51] Sap KA, Bezstarosti K, Dekkers DHW, Voets O, Demmers JAA. Quantitative proteomics reveals extensive changes in the ubiquitinome after perturbation of the proteasome by targeted dsRNA-mediated subunit knockdown in *Drosophila*. *J Proteome Res* 2017;16(8):2848–62.
- [52] Quadroni M, Potts A, Waridel P. Hsp90 inhibition induces both protein-specific and global changes in the ubiquitinome. *J Proteomics* 2015;120:215–29.
- [53] Fiskin E, Bionda T, Dikic I, Behrends C. Global analysis of host and bacterial ubiquitinome in response to salmonella typhimurium infection. *Mol Cell* 2016;62(6):967–81.
- [54] Dybas JM, O'Leary CE, Ding H, Spruce LA, Seeholzer SH, Oliver PM. Integrative proteomics reveals an increase in non-degradative ubiquitylation in activated CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2019;20(6):747–55.
- [55] Noya SB, Colameo D, Bruning F, Spinnler A, Mircsof D, Opitz L, et al. The forebrain synaptic transcriptome is organized by clocks but its proteome is driven by sleep. *Science* 2019;366(6462):eaav2642.
- [56] Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012;3(4):227–32.
- [57] Xu G, Paige JS, Jaffrey SR. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol* 2010;8(8):868–73.
- [58] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;49(5):1060–72.
- [59] Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. Identification of genotypeselective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 2003;3(3):285–96.
- [60] Minguetz P, Parca L, Diella F, Mende DR, Kumar R, Helmer-Citterich M, et al. Deciphering a global network of functionally associated post-translational modifications. *Mol Syst Biol* 2012;8:599.