

乙型肝炎病毒E抗原肝细胞结合蛋白E-18调节基因的表达谱芯片研究

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州贵阳人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础研究及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-18 with microarray assay

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No.01MB135.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the biological functions of a novel hepatitis B virus e antigen (HBeAg) binding protein E-18, and to use cDNA microarray technique to screen genes regulated by E-18.

METHODS: A novel gene E-18 coding for HBeAg was screened and identified by using yeast two-hybrid system 3 and co-immunoprecipitation technique. The E-18 coding DNA fragment was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique from HepG2 cell. The expressive vector of pcDNA3.1-E-18 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected with pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-E-18, respectively by using lipofectamine. The total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNA of each sample were subjected to microarray screening

with 1 152 cDNA probes and analyzed by bioinformatics.

RESULTS: E-18 cDNA sequence was obtained and identified by yeast two-hybrid screening and bioinformatics analysis. The expressive vector was constructed and confirmed by DNA sequencing analysis and restriction enzyme digestion. High quality mRNA and cDNA of transfected HepG2 cells had been prepared and successful microarray screening conducted. From the scanning results, there were 52 differential expression genes, of which 36 genes were down-regulated, and 16 genes were up-regulated.

CONCLUSION: Microarray technique is successfully used to screen the genes trans-regulated by E-18. The expression of E-18 protein affects the expression spectrum of HepG2 cell.

Lu YY, Liu Y, Cheng J, Ling YD, Chen TY, Shao Q, Wang L, Zhang LX. Screening and identification of genes trans-regulated by a novel HBeAg binding protein E-18 with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):817-820

摘要

目的: 应用基因芯片技术对于pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-E-18分别转染的HepG2细胞的基因表达谱进行分析, 筛选能被E-18反式调节的靶基因, 研究未知功能的HBeAg结合蛋白E-18的生物学功能。

方法: 应用酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术筛选并验证HBeAg的肝细胞结合蛋白基因, 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从HepG2细胞中扩增E-18蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术构建表达载体pcDNA3.1(-)-E-18。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析并比较。

结果: 筛选出肝文库中HBeAg结合蛋白E-18的编码基因, 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定鉴定正确。提取转染细胞的总mRNA并进行逆转录成为cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1 159个基因表达谱的筛选中, 发现有52个基因有差异表达, 其中36种基因表达水平显著下调, 16种基因表达水平显著上调。

结论: 成功地应用DNA芯片技术筛选出HBeAg结合蛋白新基因E-18的反式调节蛋白, 证明E-18基因的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 E 抗原肝细胞结合蛋白 E-18 调节基因的表达谱芯片研究. 世界华人消化杂志 2004;12(4):817-820

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/817.asp

0 引言

乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)在临床上作为判断 HBV 活动性复制的指标之一, 普遍认为他是一种免疫耐受因子, 调节乙型肝炎的免疫发病机制^[1-4]. 但 HBeAg 与肝细胞之间的相互作用以及作用后产生的效应, 目前研究较少且没有明确的结果, 因此寻找 HBeAg 与肝细胞间的相互作用蛋白, 并进一步明确其间的作用机制、作用效应, 有助于发现新的 HBV 感染防治方法. 我们用酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术筛选并验证了一个未知功能的 HBeAg 结合蛋白基因 E-18 的存在, 并进一步用基因表达谱芯片技术筛选能被 E-18 反式调节的蛋白基因, 为全面深入了解 E-18 的功能及其在 HBV 致肝细胞损伤中的作用研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), 酵母双杂交系统 -3 试剂盒及相关试剂、PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒、50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech); pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega), Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I、BamH I 和 Pst I 等限制性内切酶购于 Takara 生物公司, 新基因 E-18 扩增引物(P1 5' -GAA TTC ATG TCC AGG TGG ACT CTG AG-3', P2 5' -CTC GAG TCA AAA GTC CAC AAA ACT GC-3')的合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法

1.2.1 HBeAg 肝细胞结合蛋白 E-18 的酵母双杂交筛选及鉴定 应用酵母双杂交技术筛选 HBeAg 肝细胞结合蛋白的研究原理、方法、操作步骤以及 E-18 基因真核表达载体的构建等参考相关的研究论文^[5-13].

1.2.2 真核表达载体及细胞转染 E-18 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-E-18 由本室构建. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-E-18 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2.3 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 E-18 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析.

1.2.4 探针标记 逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-

dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

1.2.5 芯片制备 包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.6 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.7 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 大于 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 小于 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 以 HBeAg 为“诱饵”筛选肝细胞文库及鉴定结果 筛选出 HBeAg 结合蛋白新基因 E-18^[17], 免疫共沉淀技术再次证实.

2.1 E-18 蛋白的表达载体构建 E-18 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-E-18 构建成功, 经相应的限制性内切酶消化鉴定正确.

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ 大于 1.89, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 E-18 蛋白调节的基因表达 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上, 就判断为 E-18 蛋白的上调基因. 研究发现有 16 种基因的表达水平上调(表 1), 36 种基因表达水平下调(表 2).

表 1 E-18 蛋白影响表达上调的基因

基因种类	GenBank 号(NM)
博来霉素水解酶	000386
DNA 依赖蛋白酶催化亚基	U47077
苹果酸脱氢酶	005917
cAMP 依赖蛋白激酶	002736
磷脂酶 B	006330
焦磷酸酶	021129

鲨烯环氧酶	003129
遍在蛋白特异性蛋白酶 1	003368
遍在蛋白整合酶 E2D	003340
C5 类固醇脱氢酶	014814
平滑肌细胞相关蛋白 -3	AB01473
维生素 A 反应素	005215
TGF- β 受体	D50683
鸟苷酸环化酶 β 3	003276
染色体分离基因 -1	001316
酪蛋白激酶 1	001892
FKBP 相关蛋白	053274
胸腺素	BD017169
选择素 2	003591
CGI-107 蛋白	016045
cofilin 亚型 1	AF134802
NCK- 相关蛋白	013436
附加素 A4	001153
podocalyxin	005397
细胞分裂周期素 23	004661
mastermind	014757
CD53 抗原	000560
视网膜母细胞瘤结合蛋白	AJ243706
结直肠癌突变基因	006407
结直肠癌缺失基因	002387
P53 结合蛋白 -1	005657
氯化物细胞内途径蛋白 4	013943
钙黏蛋白相关蛋白	004389
未知基因 KIAA0107	006918
未知基因 KIAA1641	025190
未知基因 MGC: 9535	000857

表 2 E-18 蛋白影响表达下调的基因

基因种类	GenBank 号(NM)
谷胱甘肽过氧化物酶	001509
Na、K-ATP 酶	D00099
组织蛋白酶 E	001910
胰岛素样生长因子	X57025
RNA 聚合酶 II	002695
EDRK 富集因子 2	005770
金属硫蛋白	005950
肌糖蛋白 1G	000232
G 蛋白通路抑制因子 1	004172
prosaposin	002778
胞膜糖蛋白	007002
局限性小肠结肠炎因子	016353
未知蛋白	AK055991
未知蛋白	AK000383
未知蛋白	AK025912
未知蛋白	AF090094

3 讨论

HBeAg 在 HBV 感染形成的免疫耐受过程中起着关键作用, 是研究有效防治乙型肝炎病毒(HBV)感染的关键点之一^[14-18]. 通过酵母双杂交技术和体外免疫共沉淀技术, 我们发现并验证了肝细胞中与 HBeAg 有相互作用未知蛋白 E-18. 为研究 E-18 的生物学功能, 用基因表达谱芯片技术对新蛋白 E-18 作了初步的研究, 发现受其影响表达水平改变的基因, 以期从中找出线索, 为深入研究 E-18 的具体生物学功能奠定基础^[19-21].

构建 pcDNA3.1(-)-E-18 真核表达载体, 将空载体作为对照共同转染 HepG2 细胞, 应用基因表达谱芯片, 发现 E-18 的表达可使 HepG2 细胞中 36 种基因的表达水平下调, 16 种基因表达水平上调. 在差异表达的基因中包括各种参与氧化还原反应的酶类(Na、K-ATP 酶、谷胱甘肽过氧化物酶、苹果酸脱氢酶、磷脂酶 B、焦磷酸酶、鲨烯环氧酶、C5 类固醇脱氢酶)、细胞信号转导和细胞周期相关蛋白基因(G 蛋白通路抑制因子 1、TGF- β 1 受体、鸟苷酸环化酶 β 3、酪蛋白激酶 1、cAMP 依赖蛋白激酶)、免疫反应调节蛋白基因(FKBP 相关蛋白、胸腺素、选择素 2)及肿瘤发生相关基因(视网膜母细胞瘤结合蛋白、结直肠癌突变基因、结直肠癌缺失基因、p53 结合蛋白 -1)等及未知基因. 其中 Prosaposin(多聚顺反子 polycistronic)为含 511 个氨基酸的糖蛋白, 存在于各种组织和体液中, 同时以分泌型和膜整合型 2 种形式存在, 是 saposin 的前体, 含有 80 个固定的氨基酸残基是结构域, 有相同的半胱氨酸残基、糖基化作用位点、超螺旋区及蛋白裂解位点, 能激活鞘类磷脂溶酶体水解酶, 具有特异性水解酸性神经鞘磷脂的活性, 还能刺激神经节苷脂(GM)1 β -半乳糖苷酶的活性, 推测在体外具有结合和运送神经节苷脂的活性^[22-24], E-18 对其起上调作用. FKBP 是亲免疫家族中的一员, 是免疫抑制剂藤霉素(FK-506)和拉帕霉素的细胞内受体^[25], E-18 下调其表达, 提示 E-18 可能通过影响免疫抑制剂与 FKBP 结合来调节免疫. 肌动蛋白解聚因子(actin-depolymerizing factor, ADF/cofilin)是肌动蛋白相关蛋白家族中的成员, 是肌动蛋白生长锥的一个重要调节因子, 对于肌动蛋白在各种细胞中的迅速转位非常重要, 在生长锥中与肌动蛋白协同存在, 协助轴突的延伸及细胞运动, 其活性受 LIM 激酶和磷酸酯酶的可逆性磷酸化作用调节^[26-27]. NCK 相关蛋白 1(NCKAP1)是 Nap1 类似物, 位于人类 2q32 染色体上, 能诱导神经元细胞的凋亡^[28]. 黏附素 4 属于黏附素家族, 是一类钙依赖的磷脂结合蛋白, 功能未完全明了, 其中部分成员是膜相关因子, 参与胞饮和胞吐过程. 黏附素 4 与家族其他成员间约有 45-59% 的同源性, 有相同的大小及内含子、外显子, 编码蛋白具有 ATP 结合活性, 在体内有抗凝血和抑制磷脂酶 A2 的活性^[29]. Mastermind 是一种 Notch 通路中的重要蛋白质, 决定着细胞的命运, 他可与细胞内 Notch 受体结

合形成复合物,并能增加 Notch 诱导基因的表达,有证据表明该蛋白可能在 Notch 通路中作为一种转录的协同激活因子起效,还有报道 Mastermind 还是 Notch 增强子复合物从染色体上解聚激活转录过程中的调控元件^[30]. 氯化物细胞内途径蛋白通过离子泵作用调节囊泡内 pH 值,通过介导氯的渗透维持大的细胞内 pH 值^[31]. E-18 能下调上述基因的表达,提示其可能通过多种途径干预细胞生理活动.

随着越来越多的未知功能蛋白质被发现,对新蛋白的生物学功能以及他们在疾病发生、发展、转化过程中的变化规律的研究逐渐成为生命科学的热点,同时由于新技术的不断创新,使一系列的研究成为可能.我们成功应用基因表达谱芯片技术对 E-18 新基因的反式调节基因进行了初步的研究,为下一步的深入研究奠定了基础.

4 参考文献

- Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:218-222
- Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
- Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
- 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,洪源,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 陆荫英,李克,成军,王琳,刘妍,段惠娟,张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,李莉,刘妍,段惠娟. 丙型肝炎病毒 NS2 基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 王琳,李克,成军,陆荫英,王刚,刘妍,钟彦伟,段惠娟,洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 陆荫英,刘妍,李克,成军,王琳. 乙型及丙型肝炎受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 马守东,洪源,成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:450-451
- 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞. HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin-alpha1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
- Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
- Milich DR. Do T cells “see” the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
- Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Grner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
- Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
- 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384
- Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- Morimoto S, Martin BM, Kishimoto Y, O'Brien JS, Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156:403-410
- Kretz KA, Carson GS, Morimoto S, Kishimoto Y, Fluharty AL, O'Brien JS. Characterization of a mutation in a family with saposin B deficiency: a glycosylation site defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2541-2544
- Hiraiwa M, Soeda S, Kishimoto Y, O'Brien JS. Binding and transport of gangliosides by prosaposin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11254-11258
- Neye H. Mutation of FKBP associated protein 48 (FAP48) at proline 219 disrupts the interaction with FKBP12 and FKBP52. *Regul Pept* 2001;97:147-152
- Gungabissoon RA, Bamburg JR. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* 2003;51:411-420
- Hussey PJ, Allwood EG, Smertenko AP. Actin-binding proteins in the Arabidopsis genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002;357:791-798
- Suzuki T, Nishiyama K, Yamamoto A, Inazawa J, Iwaki T, Yamada T, Kanazawa I, Sakaki Y. Molecular cloning of a novel apoptosis-related gene, human Nap1 (NCKAP1), and its possible relation to Alzheimer disease. *Genomics* 2000;63:246-254
- Kojima K, Yamamoto K, Irimura T, Osawa T, Ogawa H, Matsumoto I. Characterization of carbohydrate-binding protein p33/41: relation with annexin IV, molecular basis of the doublet forms (p33 and p41), and modulation of the carbohydrate binding activity by phospholipids. *J Biol Chem* 1996;271:7679-7685
- Fryer CJ, Lamar E, Turbachova I, Kintner C, Jones KA. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* 2002;16:1397-1411
- Chuang JZ, Milner TA, Zhu M, Sung CH. A 29 kDa intracellular chloride channel p64H1 is associated with large dense-core vesicles in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 1999;19:2919-2928