

应用酵母双杂交技术筛选人白细胞中与NS5A TP9蛋白结合蛋白的编码基因

李 强, 梁耀东, 成 军, 王 琳, 张 建, 邵 清, 刘 敏, 程明亮

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 张建, 邵清, 刘敏, 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

程明亮, 贵阳医学院第一附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

李强, 男, 生于1969-09-10, 四川泸州市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肝病的基础及临床研究.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130

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 cloning of genes coding for leukocyte proteins interacting with NS5ATP9 by yeast-two hybrid technique

Qiang Li, Yao-Dong Liang, Jun Cheng, Lin Wang, Jian Zhang, Qing Shao, Ming Liu, Ming-Liang Cheng

Qiang Li, Yao-Dong Liang, Jun Cheng, Lin Wang, Jian Zhang, Qing Shao, Ming Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Ming-Liang Cheng, The First Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130; 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 NS5ATP9, and to screen proteins in leukocytes interacting NS5ATP9 protein by yeast-two hybrid.

METHODS: The NS5ATP9 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and NS5ATP9 bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, and the yeast AH109 was then transformed. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing leukocytes cDNA library plasmid in 2×YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-

His-Ade) containing X- α -gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid DNA from blue colonies, we underwent analysis by bioinformatics.

RESULTS: Forty six colonies were sequenced, among which thirteen colonies were Homo sapiens immunoglobulin light chain, ten ubiquitin, two ferritin heavy chain, eleven Homo sapiens rearranged immunoglobulin lambda light chain, one 14-3-3 family protein, one Meningococcus PorA protein, three RNA polymerase III, one tobacco mitogen activated protein kinase, two cytochrome P450 II, one SLIT2 protein, and one dependent-protein kinase catalytic subunit.

CONCLUSION: Genes of NS5ATP9 interacting proteins in leukocytes are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of NS5ATP9 and associated proteins.

Li Q, Liang YD, Cheng J, Wang L, Zhang J, Shao Q, Liu M, Cheng ML. Screening and cloning of genes coding for leukocyte proteins interacting with NS5ATP9 by yeast-two hybrid technique. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(4):828-831

摘要

目的: 我们在以往的研究中, 应用抑制性消减杂交技术 (SSH) 筛选得到了丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活蛋白9(NS5ATP9), NS5ATP9是一种未知功能新基因. 为了进一步研究NS5ATP9的生物学功能, 应用酵母双杂交技术, 筛选并克隆人白细胞中与NS5ATP9蛋白相互作用蛋白的基因, 进一步阐明 NS5ATP9 的生物学功能及其作用途径.

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增 NS5ATP9 基因, 连接入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞 AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞cDNA文库质粒pACT2的酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基和X- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选阳性菌落并测序, 进行生物信息学分析.

结果: 成功克隆出 NS5ATP9 基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四重缺陷(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基上生长, 又能在铺有X- α -gal的四重培养基上变蓝的真阳性菌落46个, 其中含人类免疫球蛋白轻链13个, 核小体表面蛋白10个, 铁蛋白重链2个, 人类重组免疫球蛋白 λ 轻链11个, 14-3-3家族蛋白1个, 脑膜炎球菌 PorA 蛋白1个, RNA多聚酶III 3个, 烟草有丝分裂原激活蛋白激酶1个, 细胞色素 P450 II 2个, SLIT2 蛋白1个, DNA 依赖

蛋白激酶催化亚基 1 个。

结论: 成功克隆出丙型肝炎病毒 NS5ATP9 蛋白的结合蛋白, 为进一步研究 NS5ATP9 的生物学作用提供了新的线索。

李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 张建, 邵清, 刘敏, 程明亮. 应用酵母双杂交技术筛选人白细胞中与 NS5ATP9 蛋白结合蛋白的编码基因. 世界华人消化杂志 2004;12(4):828-831

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/828.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)严重危害人们的身体健康, 全世界慢性感染的人数超过 1.7 亿^[1]. 感染 HCV 后, 引起慢性肝炎、脂肪肝变、肝纤维化甚至发展成为肝细胞癌. 而对于慢性丙型肝炎的治疗, 目前主要用于干扰素 α 和利巴韦林抗病毒治疗, 但其疗效有限, 仅仅达 20-40%. 大量的研究表明, 作为 HCV 非结构蛋白 5A (HCV NS5A) 是干扰素 α 作用的靶位, 是否也可能是其他抗病毒药物的靶位, 这就有必要对他的功能作深入的研究.

我们实验室应用抑制性消减杂交技术(SSH)及生物信息学技术(bioinformatics), 筛选出 HCV NS5A 反式激活新型靶基因 NS5ATP9, 在 GenBank 中注册, 注册号为 AF529370. NS5ATP9 基因的编码序列全长为 336 个核苷酸(nt), 编码产物由 111 个氨基酸残基(aa)组成. 我们已经应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对于 NS5ATP9 反式调节基因进行筛选, 成功筛选出反式调节作用的靶基因, 为了进一步从不同的角度研究 NS5ATP9 的作用, 我们又运用酵母双杂交技术筛选 NS5ATP9 蛋白结合蛋白基因, 对这种基因的功能进行初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD 克隆载体、pGADT7-AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株 (K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒 pGBKT7-53 (AH109)、编码 DNA-BD/鼠 p53 融合蛋白、pTD1-1 (Y187)、质粒 pACT2 中编码 AD/SV40 大 T 抗原融合蛋白、以及预转化的 cDNA 白细胞文库(Y187)、质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白(PT3183-1), 以上产品均购自 Clontech 公司. 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司, Nco I、BamH I、半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR 扩增 NS5ATP9 基因, 凝胶电泳、回收、连接到 T 载体、酶切、测序符合率达 100%, 与 pGBKT7 载体连接, 用 Nco I 和 BamH I 双酶切鉴定后, 表明酵母表达载体 pGBKT7-NS5ATP9 构建成功, 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109 后, 在四缺培养基上培养以排除其自身激活作用^[2-3].

1.2.2 诱饵与白细胞文库的酵母配合 挑取在 SD/-Trp 选择培养基上生长转化子(计数大于 1×10^9 细胞/ml)与白细胞文库混合, 30 °C 轻摇配合过夜, 24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 18 d 后把长出大于 3 mm 的酵母集落, 在铺有 X- α -半乳糖苷酶的 QDO 上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在 QDO 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落.

1.2.3 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 分析, 所获基因都能在 GenBank 数据库中找到同源基因.

2 结果

2.1 部分筛选克隆 Bgl II 酶切鉴定结果 pACT2 内含有两个 Bgl II 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 使用该内切酶消化将释放出白细胞文库的基因片段(图 1).

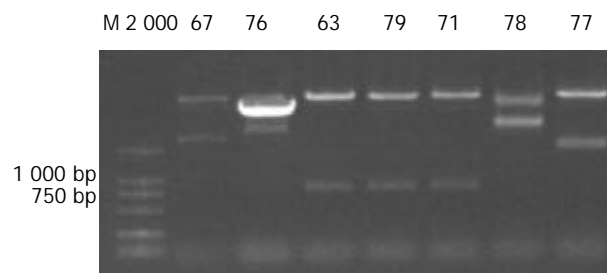


图 1 酵母双杂交技术筛选的部分克隆的 Bgl II 酶切鉴定.

2.2 cDNA 测序与同源性分析初步结果 配合后筛选出既能在 4chongquexian 重缺陷(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有 X- α -gal 的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 46 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 46 个均与已知基因的部分序列高度同源(98-100%), 详细结果见表 1.

表 1 诱饵与白细胞文库酵母菌株配合结果

序号	筛选出目的基因	同源性	相同克隆数
1	人类免疫球蛋白轻链	99%	13
2	核小体表面蛋白	98-100%	10
3	铁蛋白重链 1	98-99%	2
4	人类重组免疫球蛋白 λ 轻链	98-99%	11
5	14-3-3 家族蛋白	100%	1
6	脑膜炎球菌 PorA 蛋白	99%	1
7	RNA 多聚酶 III	99%	3
8	烟草有丝分裂原激活蛋白(MAP)激酶	100%	1
9	细胞色素 P450 II	99%	2
10	SLIT2 蛋白	99%	1
11	DNA 依赖蛋白激酶催化亚基	98%	1

3 讨论

丙型肝炎病毒基因编码 10 种蛋白, 包括结构蛋白和非结构蛋白. 非结构蛋白 NS5A 与丙型肝炎的致病有关, 而丙型肝炎的致病机制可能与病毒蛋白对肝细胞或白细胞的作用有关. 非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 9 (NS5ATP9) 是 NS5A 的反式激活新型靶基因编码的蛋白, 研究他的功能对理解 NS5A 蛋白的作用具有重要意义. 因此, 我们利用 1990 年代初出现的酵母双杂交技术, 进行了白细胞文库的筛选, 希望筛选出与病毒蛋白相互作用的蛋白基因. 酵母双杂交系统是分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法. 酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白 X 和 Y 分别融合到一酵母转录激活因子的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子, 从而导致下游“报告基因”的转录, 产生容易探测到的表型^[4-8].

我们在真核表达载体 pGBK-T7 中构建 pGBKT7-NS5ATP9 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 NS5ATP9 基因, 与人白细胞 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合, 筛选出与之相互作用的蛋白基因 11 种. 其中, 有基因编码的蛋白属于 14-3-3 家族的蛋白, 通过结合磷酸丝氨酸, 遏制蛋白介导信号转导, 他普遍存在与动、植物中, 编码的蛋白与 RAF1 和 CD25 磷酸酶相互作用, 在连接有丝分裂信号和细胞周期中起重要作用^[9-17]. 脑膜炎球菌 PorA 蛋白用作疫苗是很有前途的, 虽然已经搞清楚这个蛋白的结构, 但是对他的结构与 PorA 蛋白抗体的关系还知甚少, 研究发现可能主要与效应器功能活动和可变区基因序列有关^[18]. 由 RNA 多聚酶 III 引起转录包含多聚酶的复原, 启动, 延伸, 终止的步骤. 多聚酶 III 由 16 个亚单位组成, 一部分受 HeLa 细胞修饰, 能分解成 hRPC32、hRPC39、hRPC62 亚复合物, 但他的核心缺乏亚复合物, 不能与附属因子连接而使启动子依赖的转录启动. 特有的转录启动能力需要自然亚复合物恢复. 亚单位的一部分与 RNA 多聚酶 III 转录起始因子的两个亚复合物(hTBP/hTFIIIB90)相互作用. 这些说明 hRPC32-hRPC39-hRPC62 亚复合物经 TFIIIB、hRPC39 相互作用指导 RNA 多聚酶 III 结合到 FIIIB-DNA 复合物^[19-21], 提示 NS5ATP9 可能与转录有关. 烟草有丝分裂原激活蛋白激酶在细胞的分裂中起重要作用, 而 NS5ATP9 能与他相互作用, 提示他可能与肝细胞的分化有关^[22]. SLIT2 是一种分泌型的富含亮氨酸重复区的蛋白质, 有明确的肿瘤抑制作用, SLIT2 转染 COS-7 细胞的培养液能延缓细胞的生长和诱导 SW48 结肠癌细胞凋亡, SLIT2 的过表达可以抑制 70% 的体外培养乳腺癌细胞的集落化生长, 在发生肺癌及乳腺癌时, 由于其启动子的甲基化或等位基因的丢失而导致其失活^[23-26]. 铁蛋白是主要铁储存蛋白, 由两部分亚基(重链和轻链)构成. 基因分析显

示他由多基因家族或者多个外显子编码. 细胞内铁蛋白的生物合成受铁的调节, 他是翻译调节的顺式元件, 在铁蛋白重链 5' - 非翻译前导区. 鼠纤维母细胞瞬时转染体\稳定转化体能激活人铁蛋白重链 mRNA 的转录. mRNA 翻译是基因表达调控的重要机制, 不同亚单位说明铁吸收、存储、释放的不同. 铁蛋白重链使细胞内铁分离, 刺激铁调节蛋白 2 的表达, c-myc 抑制了他的表达而使铁库储存铁增加. 这就调控细胞内铁的浓度, 对细胞增生调控起重要作用^[27-36].

通过以上结果提供的这些线索, 我们可以进行更深入的研究, 进一步弄清各种蛋白对 NS5ATP9 生物学功能的影响及其确切的作用, 为寻找与 HCVNS5A 的靶位相互作用的蛋白开辟新道路. 当然, 这些结合蛋白的发现只是研究病毒蛋白功能的一个起点, 在极其复杂的体内环境中, 需要更多的实验证据来揭示这种结合的生物学意义.

4 参考文献

- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. *Hepatology* 1995;22:1883-1885
- Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'bait' vector in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gambin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 1997;91:961-971
- Conklin DS, Galaktionov K, Beach D. 14-3-3 proteins associate with cdc25 phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7892-2896
- Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Honore B, Andersen AH, Walbum E, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signaling pathway. *J Mol Biol* 1993;231:982-998
- Yu T, Robb VA, Singh V, Gutmann DH, Newsham IF. The 4.1/ezrin/radixin/moesin domain of the DAL-1/Protein 4.1B tumour suppressor interacts with 14-3-3 proteins. *Biochem J* 2002;365:783-789

- 13 O' Kelly I, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 2002;111:577-588
- 14 Li Y, Inoki K, Yeung R, Guan KL. Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 2002;277:44593-44596
- 15 Shumway SD, Li Y, Xiong Y. 14-3-3 β binds to and negatively regulates the tuberous sclerosis complex 2(TSC2) tumor suppressor gene product, tuberin. *J Biol Chem* 2003;278:2089-2092
- 16 Li Y, Inoki K, Vratsis P, Guan KL. The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem* 2003;278:13663-13671
- 17 Parvaresh S, Yesilkaya T, Baer K, Al-Hasani H, Klein HW. 14-3-3 binding to the IGF-1 receptor is mediated by serine autophosphorylation. *FEBS Lett* 2002;532:357-362
- 18 Wang J, Jarvis GA, Achtman M, Rosenqvist E, Michaelsen TE, Aase A, Griffiss JM. Functional activities and immunoglobulin variable regions of human and murine monoclonal antibodies specific for the P1.7 PorA protein loop of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2000;68:1871-1878
- 19 Wang Z, Roeder RG. Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 1997;11:1315-1326
- 20 Jones E, Kimura H, Vigneron M, Wang Z, Roeder RG, Cook PR. Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against subunits of human RNA polymerases I, II, and III. *Exp Cell Res* 2000;254:163-172
- 21 Hu P, Wu S, Sun Y, Yuan CC, Kobayashi R, Myers MP, Hernandez N. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol Cell Biol* 2002;22:8044-8055
- 22 Calderini O, Glab N, Bergounioux C, Heberle-Bors E, Wilson C. A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *J Biol Chem* 2001;276:18139-18145
- 23 Allol A, Morton D, Maher ER, Latif F. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63:1054-1058
- 24 Allol A, Da Silva NF, Viacava P, Minna JD, Bieche I, Maher ER, Latif F. SLIT2, a human homologue of the *Drosophila* Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. *Cancer Res* 2002;62:5874-5880
- 25 Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 1999;400:331-336
- 26 Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 1999;96:771-784
- 27 Boyd D, Jain SK, Crampton J, Barrett KJ, Drysdale J. Isolation and characterization of a cDNA clone for human ferritin heavy chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4751-4755
- 28 Costanzo F, Santoro C, Colantuoni V, Bensi G, Raugei G, Romano V, Cortese R. Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for a human apoferritin H chain: evidence for a multigene family. *EMBO J* 1984;3:23-27
- 29 Boyd D, Vecoli C, Belcher DM, Jain SK, Drysdale JW. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *J Biol Chem* 1985;260:11755-11761
- 30 Worwood M, Brook JD, Cragg SJ, Hellkuhl B, Jones BM, Perera P, Roberts SH, Shaw DJ. Assignment of human ferritin genes to chromosomes 11 and 19q13.3-19qter. *Hum Genet* 1985;69:371-374
- 31 Costanzo F, Colombo M, Staempfli S, Santoro C, Marone M, Frank R, Delius H, Cortese R. Structure of gene and pseudogenes of human apoferritin H. *Nucleic Acids Res* 1986;14:721-736
- 32 Chou CC, Gatti RA, Fuller ML, Concannon P, Wong A, Chada S, Davis RC, Salser WA. Structure and expression of ferritin genes in a human promyelocytic cell line that differentiates in vitro. *Mol Cell Biol* 1986;6:566-573
- 33 Hentze MW, Keim S, Papadopoulos P, O'Brien S, Modi W, Drysdale J, Leonard WJ, Harford JB, Klausner RD. Cloning, characterization, expression, and chromosomal localization of a human ferritin heavy-chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7226-7230
- 34 Dhar M, Chauthaiwale V, Joshi JG. Sequence of a cDNA encoding the ferritin H-chain from an 11-week-old human fetal brain. *Gene* 1993;126:275-278
- 35 Wu KJ, Polack A, Dalla-Favera R. Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 1999;283:676-679
- 36 Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Albertini A, Arosio P. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem* 2000;275:25122-25129