

# PTEN gene and phosphorylation of Akt protein expression in the LPS-induced lung fibroblast

HUANG Mao-lin, YANG Zhen-dong, GONG Lu-lu, CUI Ning

154th Hospital of People's Liberation Army, Xinyang Henan, China

Received: Jul 09, 2014

Accepted: Aug 26, 2014

Published: Sep 30, 2014

DOI: 10.14725/gjicmwm.v2n3a585

URL: <http://dx.doi.org/10.14725/gjicmwm.v2n3a585>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Abstract

**Objective:** To investigate PTEN gene expression and the Akt phosphorylation of protein expression in the LPS-induced lung fibroblast, to initially reveal the relation between PTEN gene and the Akt phosphorylated proteins to LPS-induced lung fibroblast proliferation mechanism. **Methods:** BrdU experiments was performed to evaluate the LPS-induced lung fibroblast proliferation, RT-PCR and Western Blot analysis were used to analyze the PTEN gene expression and Western blot was performed to analyze Akt phosphorylated protein expression. **Results:** PTEN mRNA level of the experimental group were significantly lower than the control group ( $P<0.05$ ) with LPS simulation for 24h and 72h, and there were no significant difference between the experimental group and control group the experimental group and control group ( $P>0.05$ ). PTEN protein expression levels of the experimental group were significantly lower than the control group ( $P<0.05$ ), at 72h, and PTEN mRNA levels had no significant differences between these of the experimental and control group at 6h,12h and 24h( $p>0.05$ ). Phosphorylation Akt protein level (relative to total Akt protein) was significantly higher than the control group ( $P<0.05$ ) at 24h and 72h, and phosphorylation Akt protein levels had no significant differences between these of the experimental and control group at 6h and 12h ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** PTEN gene and phosphorylation Akt protein involve in LPS-induced lung fibroblast proliferation signal transduction pathway.

## Key word

Pulmonary fibrosis cells; Lipopolysaccharide; Cell proliferation; Protein kinase B

## LPS 诱导的肺成纤维细胞 PTEN 基因表达 和 Akt 磷酸化蛋白表达的研究\*

黄茂林, 杨振东, 龚璐璐, 崔宁

解放军第一五四医院, 河南信阳, 中国

通讯作者: 崔宁 Email: [cnblcc@sohu.com](mailto:cnblcc@sohu.com)

\*基金项目: “十二五” 国家科技重大专项 (2013ZX10004202-002-006)

**【摘要】**目的 探讨 LPS 诱导肺成纤维细胞 PTEN 基因表达和 Akt 磷酸化蛋白表达, 初步揭示 LPS 诱导的肺成纤维细胞增殖机制中 PTEN 基因和 Akt 磷酸化蛋白的变化情况。方法 通过 BrdU 实验评价 LPS 诱导肺成纤维细胞增殖情况, 通过 RT-PCR 和 Western Blot 分析 LPS 诱导 LPS 诱导肺成纤维细胞增殖后细胞内 PTEN mRNA 水平和蛋白表达情况, 通过 Western Blot 分析 LPS 诱导肺成纤维细胞增殖后细胞 Akt 磷酸化蛋白表达情况。结果 在 6h、12h 时实验组和对照组 PTEN mRNA 转录水平差异无显著性 ( $P>0.05$ ), 24h 和 72h 时实验组 PTEN mRNA 转录水平显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。在 6h、12h 和 24h 时实验组和对照组 PTEN mRNA 转录水平差异无显著性 ( $P>0.05$ ), 在 72h 时实验组 PTEN 蛋白表达水平显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。在 6h、12h 时实验组和对照组 Akt 磷酸化蛋白 (相对总 Akt 蛋白) 差异无显著性 ( $P>0.05$ ), 在 24h 和 72h 实

验组 Akt 磷酸化蛋白（相对总 Akt 蛋白）显著低于对照组（ $P < 0.05$ ）。结论 PTEN 基因和 Akt 磷酸化蛋白参与了 LPS 诱导的肺成纤维细胞增殖信号转导途径。

【关键词】肺成纤维细胞；脂多糖；细胞增殖；蛋白激酶 B

各种原因引起的急性肺损伤（acute lung injury, ALI）可以发展为急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome, ARDS），引起弥漫性肺间质及肺泡内纤维化<sup>[1-3]</sup>，导致呼吸衰竭<sup>[4]</sup>。革兰阴性杆菌内毒素的成分脂多糖（LPS）是急性肺损伤的重要致病因素之一，大量的研究表明，LPS 可引起肺成纤维细胞（LF）活化和增殖导致肺纤维化。有关 PTEN 基因和 Akt 磷酸化蛋白在细胞增殖中表达情况的研究有很多，尤其是肿瘤细胞增殖中 PTEN 被认为是调控肿瘤细胞中的关键基因。本文探讨 LPS 诱导肺成纤维细胞 PTEN 基因表达和 Akt 磷酸化蛋白表达，初步揭示 LPS 诱导的肺成纤维细胞增殖机制中 PTEN 基因和 Akt 磷酸化蛋白的变化情况。

## 1 材料与方法

1.1 肺成纤维细胞原代培养 小鼠肺成纤维细胞来源于 8 周的 C57/BL6 小鼠<sup>[5,6]</sup>，小鼠处死后，肺组织分离，用 PBS 缓冲液漂洗后，剪切成  $1\text{mm}^3$  大小组织团。取 3ml PBS（含有 0.6g 肺组织），向组织中加入 3ml 0.25% 胰酶， $37^\circ\text{C}$  消化 40min，消化过程中轻微震荡。静置后洗去上清，加入 10% 小牛血清 DEME 培养基，用吸管反复吹打使细胞分散，用细胞培养液稀释细胞浓度至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。吸入细胞培养瓶中，培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ ， $37^\circ\text{C}$  培养 3 天。传代进行下列实验，最后吸入 96 孔板中，进行分组。

1.2 实验设计 随机分为实验组和对照组，每组设有 3 个复孔，每个培养瓶内细胞浓度均为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。实验组加入 LPS（Sigma, USA）至终浓度  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，培养 72h。对照组加入与 LPS 相同体积的 PBS，培养 72h。72h 后收集细胞，进行下列的 BrdU 实验、RT-PCR 和 Western Blot 实验。

1.3 BrdU 实验 分别在 6h、12h、24h 和 72h 时间点向 96 孔中加入 BrdU 储存液（5mg/ml）至  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，常温孵育 4h，胰酶消化后 PBS 洗脱， $400 \times g$  离心 5min 后收集细胞，用 70% 乙醇过夜重悬固定，将第一天的标本离心去上清，并用洗涤缓冲液（PBS + 0.5% IFS）洗涤。离心去上清，以 0.5 ml 2M HCl + 0.5% IFS（需新鲜配制！），室温孵育 20min。加入 1ml 洗涤缓冲液洗涤细胞。离心去上清，以 0.1M 的四硼酸钠（ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ）重悬细胞，室温孵育 2min。用 1ml 洗涤缓冲液洗涤细胞 2 次。用  $50 \mu\text{l}$  洗涤缓冲液重悬细胞，加入 anti-BrdU 抗体， $4^\circ\text{C}$  孵育 20min。加入 1.5ml 洗涤缓冲液洗一次。用  $50 \mu\text{l}$  洗涤缓冲液重悬细胞，加入用于封闭 Fc 段的抗体， $4^\circ\text{C}$  孵育 20min。加入 1.5ml 洗涤缓冲液洗涤一次。最后仪器在 OD450 进行读数。

1.4 实时定量 PCR 提取总 RNA 后，使用 Trizol 试剂盒（Invitrogen 公司，USA）和使用的 M-MLV 聚合酶反转录试剂盒（Promega 公司，USA）反转录成 cDNA。序列特异性引物分别为：GAPDH-F: 5'-TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3'，GAPD-R: 5'-GCTCCTGGAAGATGGTGATGG3'，PTE-F: 5'-CCATAACCCACCACAGC-3'，PTEN-R: 5'-AGTCCGTCCTTTCCAG-3'。 $95^\circ\text{C}$  变性 15s，45 个循环中参数设置为  $95^\circ\text{C}$  变性 5s， $60^\circ\text{C}$  退火 30s， $72^\circ\text{C}$  延伸 30s。在 IQ5 PCR 系统（Bio-Rad 公司，USA）进行。 $\Delta\Delta\text{Ct}$  法测定实时 PCR 产物的相对量。

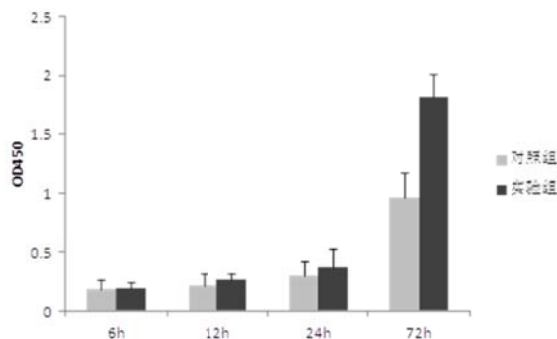
1.5 Western Blot 收集细胞，用裂解液（50mM Tris-HCl, PH7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 5mM EDTA, 2mM PMSF, 20g/ml aProtinin, 20g/ml leuPePtin, 10g/ml PePstanin A, 150mM benzamidine）在冰浴上孵育 15min。离心沉淀细胞碎片，收集上清。用 BCA 法进行蛋白定量后，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）。将蛋白转移至 PVDF 膜，密封，用适当抗体孵育，检测 ECL+PlusTM 印迹试剂盒（Amersham 公司，USA）。一抗：兔抗 P-Akt（4060; CST）；兔抗 PTEN（9188; CST），鼠抗 GAPDH 的（sc-32233; Santa Cruz Biotechnologies, USA），均按照 1:1000 稀释。二抗：羊抗鼠 IgG（SC-2005; Santa

Cruz Biotechnologies, USA) 和羊抗兔 IgG (SC-2004; Santa Cruz Biotechnologies, USA), 按照 1:5000 稀释。使用 Bio-Rad 凝胶成像仪曝光, 并使用 Image Lab 软件进行灰度分析。

1.6 统计学分析 采用 SPSS12.0 软件进行分析, 计量资料采取  $t$  检验, 以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

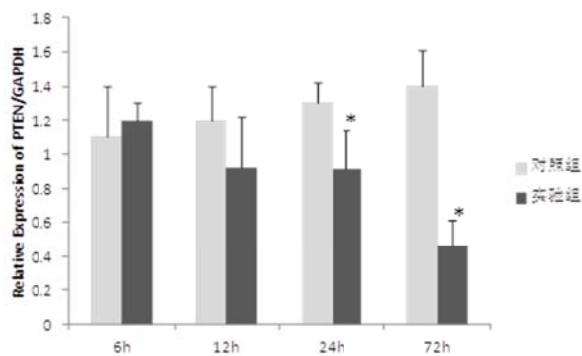
2.1 LPS 对肺成纤维细胞增殖的影响 结果如图 1 所示。1  $\mu$ g/ml LPS 刺激 6h、12h 和 24h 时, 实验组和对照组 DNA 合成量差异无显著性; 刺激 72h 时, 实验组细胞 DNA 合成量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。



注: 实验组与对照组比较差异有显著性 ( $*P < 0.05$ )

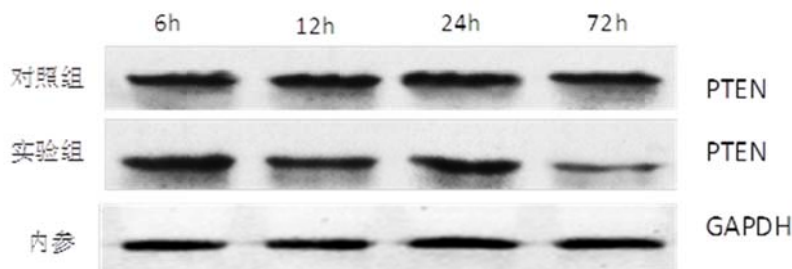
图 1 LPS 对肺成纤维细胞增殖的影响

2.2 LPS 诱导的肺成纤维细胞增殖中 PTEN 基因的表达情况 对不同时间点细胞内 PTEN 基因受到 LPS 诱导后, mRNA 转录水平和蛋白表达水平的分析结果如图 2 所示。mRNA 转录水平见图 2 (a): 在 6h 和 12h 时实验组和对照组 PTEN mRNA 转录水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 在 24h 和 72h 时实验组 PTEN mRNA 转录水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。蛋白表达水平见图 2 (b): 在 6h、12h 和 24h 时实验组和对照组 PTEN 蛋白表达水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 72h 时实验组 PTEN 蛋白表达水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。经 LPS 诱导后, 肺成纤维细胞增殖中 PTEN 基因在转录水平和蛋白表达水平上基本一致, 在 24h 时, 实验组 PTEN mRNA 表达量显著低于对照组, 而 PTEN 蛋白水平上实验组和对照组表达并无显著变化。



注: 实验组与对照组比较差异有显著性 ( $*P < 0.05$ )

(a) PTEN mRNA 转录情况



(b) PTEN 蛋白表达情况

图 2 LPS 诱导的肺成纤维细胞增殖中 PTEN 基因的表达情况

2.3 LPS 诱导的肺成纤维细胞增殖中 Akt 磷酸化蛋白的表达情况 对不同时间点细胞内 Akt 磷酸化蛋白水平的分析结果如图 3 所示。从结果可看出,在 6h 和 12h 时实验组和对照组 Akt 磷酸化蛋白(相对总 Akt 蛋白)差异无显著性;24h 实验组 Akt 磷酸化蛋白也高于对照组;在 72h 实验组 Akt 磷酸化蛋白(相对总 Akt 蛋白)显著高于对照组。

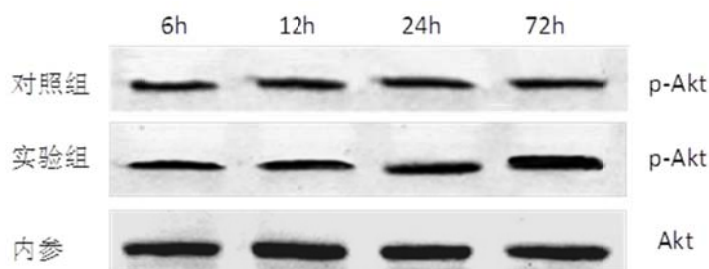


图 3 Akt 磷酸化蛋白表达情况

### 3 讨论

本文研究了 LPS 诱导的肺成纤维细胞增殖中不同时间点 PTEN 基因转录水平和蛋白水平的变化,以及下游磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) /AKT 信号通路中 Akt 磷酸化蛋白的表达变化情况。通过实验结果分析,初步揭示 LPS 诱导的肺成纤维细胞的作用机制。

通过 BrdU 实验发现 LPS 刺激 72h 后能显著促进细胞增殖,而其他时间点细胞增殖无明显变化,这与以前的文献报道的相一致<sup>[6]</sup>。LPS 处理肺成纤维细胞后,24h 和 72h 后 PTEN mRNA 转录水平显著下降,而 Western Blot 结果显示 PTEN 蛋白表达量在 72h 时才会显著下降。PTEN 表达在转录水平和蛋白质水平上基本吻合。24h 转录水平下调,而蛋白质水平的无明显变化,可能暗示 PTEN 在蛋白质水平存在延迟效应或者翻译抑制或者蛋白质修饰等。而 72h 时 Akt 磷酸化蛋白水平相对对照组显著升高。

诸多研究证明了 PTEN 在细胞生长中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。PTEN 是一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,其蛋白表达产物具有脱磷酸作用。PTEN 信号通路作用广泛,能调节一系列基本的细胞反应<sup>[9,10]</sup>。该基因的缺失表达往往与各种肿瘤的发生相关<sup>[11]</sup>。通过甲基化<sup>[12]</sup>、RNA 干扰技术<sup>[13]</sup>或对 PTEN 表达蛋白磷酸化<sup>[14]</sup>影响 PTEN 基因表达或表达产物后,细胞增殖速度加快,由此可说明 PTEN 基因具有抑制细胞增殖的功能。在诸多正常细胞,例如 Ishikawa cells<sup>[15]</sup>、Jurkat T cells<sup>[16]</sup>、Glycolytic glioma cells<sup>[17]</sup>、PC3 Prostate cancer cells<sup>[18]</sup>、leukemia cell<sup>[19]</sup>等细胞的增殖中 PTEN mRNA 转录水平和蛋白表达量均会下降。以上研究结果充分支持了本文的研究发现,因此可以得出,PTEN 基因同样可能会参与 LPS 诱导的细胞增殖,并且有关 PTEN 参与 LPS 诱导的肺成纤维细胞的增殖机制已经有报道,本文分析了 LPS 诱导不同时期的肺成纤维细胞内 PTEN 的表

达情况。Akt 磷酸化蛋白在细胞增殖中的作用已经被诸多研究者研究。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，是磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）/Akt 信号通路的主要成分，磷酸化的 Akt 能促使细胞生长，抑制细胞凋亡，增加癌变机会。结果表明，细胞增殖中 Akt 磷酸化蛋白水平会增加，因为 PI3K-Akt 信号转导途径会参与该过程，且磷酸化的 Akt 蛋白会激起 TSC-2<sup>[20]</sup>、PRAS40<sup>[21]</sup>、mTORC1<sup>[22]</sup>、GSK3<sup>[23]</sup>和 FOXO<sup>[24]</sup>等蛋白分子，从而调节细胞周期，促进细胞增殖。已经有研究者揭示了 PI3K-Akt 在 LPS 诱导的成纤维细胞增殖中的作用机理<sup>[5]</sup>。本文探讨了不同时期的 Akt 磷酸化蛋白的表达情况，发现在 72h 前的时间段内 Akt 磷酸化蛋白表达未显著性增加，72h 后 Akt 磷酸化蛋白上调表达。

PTEN 基因能使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸（PIP3）的磷酸脱磷酸形成磷脂酰肌醇-3,4,-二磷酸（PIP2），使其丧失信号功能，从而阻断 PI3K/Akt 信号通路，导致细胞增殖的抑制和促进细胞凋亡<sup>[5,7]</sup>。本研究也证明：在 72hPTEN 转录水平和蛋白水平都表达下调，而 Akt 磷酸化蛋白在蛋白水平上调表达。结合以前的报道，揭示 LPS 诱导肺成纤维细胞内 PTEN 基因表达受到抑制，同时激活 PI3K/Akt 信号通路，磷酸化的 Akt 上调表达，促进了肺成纤维细胞的增殖。此推论也与 BrdU 实验中 72h 肺成纤维细胞明显增殖相吻合。因此提出 PTEN 基因和 Akt 磷酸化蛋白可能参与了 LPS 诱导的肺成纤维细胞的作用机制。

本文探讨了 LPS 在作用 72h 后 PTEN 基因转录和表达水平显著下降，Akt 磷酸化蛋白水平显著增多。但是还缺乏更充分的证据去证明当 LPS 作用被干扰后细胞内 PTEN 和 Akt 磷酸化蛋白表达情况，以后会采用 RNA 干扰技术干扰 LPS 的作用受体，探讨干扰后的表达情况。同样获得 PTEN 基因被干扰或 Akt 基因被干扰后细胞增殖情况的数据信息，也应是下一步研究的重点。

## 【参考文献】

- [1] Tasaka S, Ishizaka A. Pulmonary fibrosis caused by ARDS. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 2005,94(6):1106-1111.
- [2] Li LF, Liao SK, Huang CC, et al. Serine/threonine kinase-Protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase regulate ventilator-induced Pulmonary fibrosis after bleomycin-induced acute lung injury: a Prospective, controlled animal experiment. *Crit Care*, 2008,12(4):R103.  
<http://dx.doi.org/10.1186/cc6983>
- [3] Nobauer-Huhmann IM, Eibenberger K, Schaefer-ProkoP C, et al. Changes in lung Parenchyma after acute respiratory distress syndrome (ARDS): assessment with high-resolution computed tomography. *Eur Radiol*, 2001,11(12):2436-2443.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s003300101103>
- [4] Ito T, Kusunoki S, Kawamoto M. Case of transfusion-related acute lung injury associated with severe intraoperative hypoxemia. *Masui*. 2008,57(10):1265-1268.
- [5] Susilowati H, Santoso AL, Barid I, et al. Rat Periodontal fibroblast responses to bacterial lipopolysaccharide in vitro[J]. *Journal of microbiology, immunology, and infection*, 2002,35(3):203-206.
- [6] He Z, Gao Y, Deng Y, et al. Lipopolysaccharide induces lung fibroblast Proliferation through Toll-like receptor 4 signaling and the Phosphoinositide3-kinase-Akt Pathway[J]. *PLoS One*, 2012,7(4):e35926  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.Pone.0035926>.
- [7] He Z Y, Zhu Y S, Jiang H. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by Phosphoinositide3 kinase Akt Pathway in fibroblasts during acute lung injury[J]. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2009,29(2):119-125.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10799890902845690>
- [8] Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol*, 2009,11(7):881-889.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncb1897>
- [9] Hamada K, Sasaki T, Koni PA, et al. The PTEN/PI3K Pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis. *Genes Dev*, 2005,19(17):2054-2065.  
<http://dx.doi.org/10.1101/gad.1308805>
- [10] Bleau AM, Hambarzumyan D, Ozawa T, et al. PTEN/PI3K/Akt Pathway regulates the side Population Phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*, 2009,4(3):226-235.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007>

- [11] Carnero A, Blanco-AParicio C, Renner O, et al. The PTEN/PI3K/AKT signalling Pathway in cancer, theraPeutic imPlications. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008,8(3):187-198.  
<http://dx.doi.org/10.2174/156800908784293659>
- [12] Hou P, Ji M, Xing M. Association of PTEN gene methylation with genetic alterations in the PhosPhatidylinositol 3-kinase/AKT signaling Pathway in thyroid tumors. *Cancer*, 2008,113(9):2440-2447.  
<http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23869>
- [13] Li T, Yang Y, Li X, et al. EGFR- and AKT-mediated reduction in PTEN exPression contributes to tyrPhostin resistance and is reversed by mTOR inhibition in endometrial cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 2012,361(1-2):19-29.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11010-011-1082-0>
- [14] Zhu D, Hensel J, Hilgraf R, et al. Inhibition of Protein kinase CK2 exPression and activity blocks tumor cell growth. *Mol Cell Biochem*, 2010,333(1-2):159-167.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11010-009-0216-0>
- [15] Wan X, Yokoyama Y, Shinohara A, et al. PTEN augments staurosporine-induced aPoPtosis in PTEN-null Ishikawa cells by downregulating PI3K/Akt signaling Pathway. *Cell Death Differ*, 2002,9(4):414-420.  
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4400982>
- [16] Xu Z, Stokoe D, Kane LP, et al. The inducible exPression of the tumor suPPressor gene PTEN Promotes aPoPtosis and decreases cell size by inhibiting the PI3K/Akt Pathway in Jurkat T cells. *Cell Growth Differ*, 2002,13(7):285-296.
- [17] Beckner ME, Gobbel GT, Abounader R, et al. Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Lab Invest*, 2005,85(12):1457-1470.
- [18] Bouali S, Chretien AS, Ramacci C, et al. PTEN exPression controls cellular resPonse to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-tyPe, hormone refractory Prostate cancer cells. *Oncol ReP*, 2009,21(3):731-735.
- [19] Barata JT. The imPact of PTEN regulation by CK2 on PI3K-dePendent signaling and leukemia cell survival. *Adv Enzyme Regul*, 2011,51(1):37-49.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.advenzreg.2010.09.012>
- [20] Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly PhosPhorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*, 2002,4(9):658-665.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncb840>
- [21] Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 Protein kinase. *Mol Cell*, 2007,25(6):903-915.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- [22] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. PhosPhorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR comPlex. *Science*, 2005,307(5712):1098-1101.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1106148>
- [23] Cross DA, Alessi DR, Cohen P, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by Protein kinase B. *Nature*, 1995,378(6559):785-789.  
<http://dx.doi.org/10.1038/378785a0>
- [24] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt Promotes cell survival by PhosPhorylating and inhibiting a Forkhead transcriPtion factor. *Cell*, 1999,96(6):857-868.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)