

人和大鼠自噬相关新基因 WIPI- 3 的电子克隆和序列分析^{*}王海涛¹ 畅继武¹ 马小兵² 张一兵¹ 韩瑞发¹ 马富玲¹ 张淑敏¹

(1 天津医科大学第二医院, 天津市泌尿外科研究所 天津 300211 2 华北煤炭医学院病理教研室 唐山 063000)

摘要 目的: 人和大鼠 WIPI- 3 基因的电子克隆和序列分析。方法: 综合运用基因电子拼接和比较基因组分析等生物信息学手段进行新基因的电子克隆和注释。通过拼接 CR593190、NM_019613 和 BC000974 cDNA 序列获得人 WIPI- 3 cDNA 全长序列, 通过拼接 EST 序列 CB727439、CB737031、BF557312、BG663387 和预测的 CDS 获得大鼠 WIPI3 基因的 cDNA 序列。结果: 成功克隆了人和大鼠自噬相关新基因 WIPI- 3 的 cDNA, 上述两个新基因序列均得到了人类基因组序列和 EST 序列的双重支持, 另外经 RT-PCR 验证电子克隆的基因序列也是正确的, 而且序列均已被 GenBank 收录, 其编号分别为: AM182326 和 NM_001039587。其中, 人 WIPI- 3 基因修正了目前基因库中注释的 WIPI- 3 序列, 而大鼠基因则是国际上首次克隆, 并被确定为参考序列。结论: 基因电子拼接结合种属同源基因比较分析, 可大大提高电子克隆的精确性, 这种方法可有效用于新基因的克隆和注释。

关键词: WIPI- 3; 电子克隆; 自噬; 生物信息学; 比较基因组

Identification and characterization of human and rat autophagy- related novel gene WIPI3 in silico

WANG Hai- tao¹, CHANG Ji- wu¹, MA Xiao- bing², ZHANG Yi- bing¹, HAN Rui- fa¹, MA Fu- ling¹, ZHANG Shu- min¹¹ Tianjin Institute of Urologic Surgery, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Pingjiang Road, HeXi District, 300211, Tianjin² Department of Pathology, North China Coal Medical College, 063000, Tangshan

ABSTRACT: WD- repeat proteins are key components of many essential biological functions including cell cycle control, apoptosis, signal transduction pathways, RNA metabolism, chromatin assembly, vesicular trafficking and tumor phenotypes. The recently identified WIPI1, WIPI2, WIPI3 and WIPI4 genes constitute the WIPI subfamily of WD40 repeat proteins. Dysfunctional WIPI- dependent autophagy has been linked to tumor progression pathway in multiple cancer types. Because human WIPI3 cDNA (NM_019613) was an aberrant cDNA with frame shifts due to 106 base erroneous insertions and two base substitutions compared with the ESTs and human genome draft sequences, we identified and characterized human WIPI3 gene by a bioinformatics approach. Human WIPI3 gene, consisting of 10 exons, was located within human chromosome 17 genomic contig NT_010663.14 and mapped to human chromosome 17q25.3 in the reverse orientation. Nucleotide sequence of human WIPI3 cDNA was determined in silico by assembling CR593190 cDNA, BC007838 cDNA and BC000974 cDNA. Two WIPI3 transcript variants with or without exon 1 and 2 were transcribed due to alternative splicing. In addition, 17 single nucleotide polymorphisms were found within the human WIPI3 genomic sequence by dbSNP databases mining. Nucleotide sequence of rat WIPI3 cDNA was determined by assembling CB708542, CB727439, CB737031, BF557312, BG663387 ESTs and predicted CDS within rat genomic contig NT_030059.12 by TBLASTN with mouse WIPI3 protein as a query. Rat WIPI3 gene was located at chromosome 10q32.3. The WIPI3 proteins is extremely conserved and the length are quite comparable in all species. Human WIPI3 protein isoform1 showed 99% total- amino- acid identity with rat and mouse WIPI3, 97% total- amino- acid identity with xenopus WIPI3, and 95% total- amino- acid identity with danio WIPI3. Human, rat, mouse, xenopus and danio WIPI3 were WD40 repeat homology proteins with 7- blade beta- propeller structure. dbEST expression profile showed that human WIPI3 gene up- regulated in several malignancies including stomach, large intestine, breast, ovary, kidney and pancreatic cancers. Normal tissues of testis and liver also showed over- expression. Part of these results were further verified by Gene Expression Omnibus (GEO) experimental databases. This is the first report on comprehensive characterization of human and rat WIPI3 gene.

Key words: WIPI- 3; In silico cloning; Autophagy; Bioinformatics; Comparative genomic strategy

前言

WD40 重复蛋白参与生物体内多种基本功能, 如细胞周期调控、凋亡、信号转导、RNA 代谢、染色质合成、细胞内小泡转运和肿瘤表型改变等^[1-5]。WD40 重复蛋白提供一个 β 折叠

层平台, 通过调节多种蛋白复合体的组装而影响蛋白质相互作用^[6]。最近发现, WIPI- 1、WIPI- 2、WIPI- 3、WIPI- 4 基因构成 WD40 重复蛋白家族的 WIPI 亚家族^[7]。遗传学研究证实酵母 WIPI- 1 同源基因 Atg18 可引起细胞自噬^[8-10]。最近研究发现线虫 WIPI 同源基因也属于自噬相关基因, 对持久过程

* 基金项目: 本研究受天津医科大学 2003 级博士创新基金项目资助

通讯作者: 王海涛, 男, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 泌尿肿瘤基础与临床

E- mail: peterock2000@126.com

(收稿日期: 2006- 04- 10 接受日期: 2006- 04- 25)

(dauer) 的启动和生命的延长至关重要^[11]。人 WIPI 蛋白也具有自噬功能,而且多种肿瘤细胞存在自噬能力缺陷^[7]。越来越多的证据显示,自噬现象是细胞死亡和肿瘤抑制机制之一,细胞自噬缺陷可促进肿瘤的进展^[12-13]。初步研究证实 WIPI 依赖性细胞自噬和多种肿瘤进展有关,故推测 WIPI 蛋白家族基因可作为一种新的肿瘤治疗靶点。随着生物信息技术的迅猛发展,电子克隆(in silico cloning)已成为新基因发现和克隆的主要策略^[14]。通过与人基因组序列和 dbEST 数据库比对发现,目前 Entrez Gene 数据库中注释的人 WIPI3 基因 cDNA 序列 NM_019613 是一个存在多个碱基替换引起移码改变的异常 cDNA,而且发现国际上尚未克隆大鼠 WIPI-3 同源基因。本研究电子克隆了人和大鼠 WIPI3 基因,并全面分析其染色体定位、外显子和内含子结构、阅读框(ORF),以及该基因产物的二级结构和功能。此外研究了人 WIPI-3 基因的单核苷酸多态性(SNP)、可变剪切体和该基因在肿瘤与正常组织之间的差异表达谱。同时分析了大鼠 WIPI-3 基因的染色体定位、阅读框(ORF)及外显子、内含子结构。

1 材料和方法

1.1 新基因电子克隆和分析

应用 TBLASTN 和 BLASTN 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索与人 WIPI3 cDNA 同源的未特化 cDNA、表达序列标签(EST),方法见文献^[15-17],以小鼠 WIPI3 同源蛋白质的氨基酸序列(NP_080069)作为 TBLASTN 程序的查询序列(query sequence);应用 TBLASTN 和 BLASTN 搜索与大鼠 WIPI3 基因同源的 cDNA 和 EST^[18];新基因通过手工拼接 EST 和 cDNA 序列获得,与基因组序列比对应完全吻合(多态位点除外),并符合外显子、内含子剪切规则。通过多序列比对 Genebank、Unigene 和 UCSC 数据库中 mRNA 序列,确定人 WIPI3 基因的可变剪切体。应用 dbSNP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)和 CGAP(<http://lpgws.nci.nih.gov/perl/snpbr>)数据库,获得人 WIPI3 基因序列中的 SNP;应用 ECgene 在线程序(<http://genome. chwa.ac.kr/ECgene>)和基因表达 Omnibus 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),分析人 WIPI3 cDNA 的数字差异表达谱^[19]。

1.2 新基因的结构和染色体定位

采用 UCSC-BLAT 在线服务器^[20]确定新基因的染色体定位和外显子与内含子边界,内含子序列应符合“gt...ag”规则。

1.3 分析推测的氨基酸序列

编码区预测、氨基酸翻译用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)确定^[21]。通过对种属同源基因序列的比较分析确定新基因真实翻译起始和终止点;多序列比对应用“ClustalW”程序^[22];ClustalW 程序比对结果输入序列比对编辑器(GENEDOC alignment editor)^[23]获得可视化图像并手工编辑;信号肽和跨膜结构域应用 Kyte Doolittle 疏水性分析;核定位信号采用 PSORT II 程序^[24];新蛋白的结构域应用 RPS-BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索;蛋白质二级结构应用 PSIPRED 在线服务器进行预测^[25]。

2 结果和分析

2.1 人 WIPI3 基因

2.1.1 鉴定人 WIPI-3 cDNA 序列:将 NM_019613 与人基因组序列和 dbEST 数据库比对,发现此序列在 128-233 位核苷酸之间存在 106 个碱基插入,在第 441 与 2178 位核苷酸存在碱基替换,从而形成移码改变。3' 端部分 cDNA BC000974 存在多个碱基替换,而 CR593190 是一个接近全长的 cDNA 序列,但是缺乏 polyA 加尾信号和 polyA 尾。WIPI3 cDNA 全长序列通过拼接 CR593190 cDNA, NM_019613 cDNA 和 BC000974 cDNA 序列获得,具体过程见图 1。ORF Finder 程序显示第 124-1158 位核苷酸区间为人 WIPI3 cDNA 的编码区(CDS),见图 1。尽管起始 ATG 序列不符合 Kozak 翻译起始一致序列规则[ACC(A/G)CCATGG]^[26],但是在人和其他种属 WIPI3 同源基因“ClustalW”比较分析中发现:预测的起始 ATG 上游 30nt 存在同一移码框内的终止子,不存在其他的 ATG,并且种属间均具有与之相同的翻译起始和终止点,这些都支持 ORF Finder 程序的预测结果。两个 cDNA 克隆(BC007838 and BC000974)中存在 polyA 尾证实了 3' 端为全长,这与终止子下游 1318nt 存在 AATAAA 加尾信号相一致。BLAT 分析证实,人 WIPI3 基因位于 17 号染色体基因组序列 NT_010663.14 的核苷酸 78165777-78199628 之间,作图于 17q25.3 反义链上。

2.1.2 人 WIPI-3 基因的可变剪切体:Unigene 数据库中发表了 10 个与人 WIPI-3 相应的 mRNA 克隆,在人 WIPI3 cDNA 序列和这些克隆之间进行多序列比对分析,确定了 WIPI3 基因存在两个可变剪切体(见图 1)。可变剪切体 1 是最长的转录体,与之相应的 mRNA 有 BC007838、BC000974 和 CR593190。可变剪切体 2 是外显子 1 和 2 缺失的转录体,与之相应的 mRNA 有 CR456770、AF091083 和 AY691427, NP_062559 是其对应的氨基酸序列。

2.1.3 人 WIPI-3 基因的单核苷酸多态性:通过搜索 dbSNP 和 CGAP 数据库发现,人 WIPI3 基因序列中存在 17 个 SNP,其中 15 个发生在内含子,另外两个发生在 CDS。SNP(rs2291393)造成 WIPI3 基因发生同义突变,不影响蛋白翻译。SNP(rs11540878)显示 WIPI3 基因 cDNA 第 301 位核苷酸发生 T→A 颠换,这种编码区多态性的后果为第 60 位氨基酸序列上的 Leu 被替换为 Ile,造成错义突变。

2.1.4 人 WIPI-3 cDNA 差异表达基因谱:应用 ECexpression 在线程序分析肿瘤和正常组织之间 WIPI3 的 EST 表达谱,结果表明 WIPI3 在胃癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌和胰腺癌等恶性肿瘤中表达上调,此外,在睾丸、肝脏、皮肤、脾脏等正常组织中也有表达,见图 2。

WIPI3 基因的广泛表达在 Gene Expression Omnibus(GEO)数据库中又得到了进一步验证。GEO 收集了高通量的基因表达资料,主要来源于 NCBI 基因芯片资料。搜索 GEO 数据库,有资料(GDS1096/GPL96 和 GDS181/GPL91)显示 WIPI3 基因在多达 30 种正常组织中广泛表达,睾丸和子宫表达最高,而胃和心脏表达最低。另外两个资料(GDS817/GPL91 和 GDS820/GPL96)显示 WIPI3 基因在乳腺癌中表达高于相应的正常组织。综上所述,联合分析 dbEST 和 GEO 数据库可以初步获得 WIPI3 基因表达谱。

2.2 大鼠 WIPI-3 基因

TBLASTN 显示大鼠 WIPI3 同源基因位于 10 号染色体基因

组序列(NT_030059.12),随后用 BLAST 程序搜索与之重叠的未特化的 cDNA 或 EST。EST CB708542 对应于大鼠 WIP13 cDNA 的 1-173 位核苷酸和 200-277 位核苷酸。EST 序列 CB727439、CB737031、BF557312 和 BG663387 分别对应于大鼠 WIP13 基因的第 432-686、720-974、922-1298 和 894-1296 位核苷酸。以小鼠氨基酸序列 NP_080069 为查询序列,用 TBLASTN 程序比对,从而获得大鼠 WIP13 基因的编码序列片段(CDS),该片段对应于大鼠 WIP13 cDNA 的第 55-1089 位核苷酸。大鼠 WIP13 基因的 cDNA 序列通过拼接 EST 序列 CB727439、CB737031、BF557312、BG663387 和上述大鼠 CDS 而获得。ORF Finder 程序显示 55-1089 位核苷酸为大鼠 WIP13 cDNA 的 CDS,种属中 5' UTR 和 CDS 的保守性强烈支持 ORF Finder 程序预测的编码区序列的正确性。两个 EST 克隆(EST BF557312 和 BG663387)中存在 polyA 尾证实获得了 3' 端全长,这与终止子下游 189nt 存在 AATAAA 加尾信号相一致。大鼠 WIP13 基因大鼠 WIP13 基因定位于 10q32.3。

2.3 推测的氨基酸序列

5 个种属的 WIP13 同源基因的多序列比对分析见图 3 可知。WIP13 蛋白高度保守,更为突出的是,在所有种属中其氨基酸长度均为 344aa,这预示着可能的种属保守功能(preserved function)。人 WIP13 蛋白单体 1 与大鼠和小鼠 WIP13 的总氨基酸同源率均为 99%,与非洲爪蟾和斑马鱼的总氨基酸同源率分别为 97% 和 95%。PSIPRED 程序预测 WIP13 蛋白质二级结构中含有 7 个由 4 条 β 折叠股构成的 β 折叠层,见图 4。

3 讨论

随着人类基因组草图的完成、EST 数据库的建立和生物信息技术的迅猛发展,基因序列、定位表达和功能研究等方面都积累了大量数据,并且绝大部分都能通过 Internet 共享。利用这些数据资源进行电子克隆(in silico cloning)日益成为发现新基因的主要策略^[14]。电子克隆是对数据库中大量 EST 进行分类、整合、组装,在线直接获得大片段或全长 cDNA 序列的方法,为实验克隆奠定基础。虽然人类基因组草图的完成^[27-28]为计算机程序预测新基因提供了可能,但是这种方法并不精确,需要依赖实验资料验证。大量的基因转录序列,包括 EST 和未特化的全长 cDNA 序列的发现全球共享使直接应用这些资料进行电子克隆成为一种最为快捷、有效的新基因发现手段^[29]。dbEST 序列的冗余性(redundancy)已经达到了单纯依靠拼接基因的重叠 cDNA 序列就可以获得基因全长的程度^[30]。如果结合种属同源基因的“比较基因组策略”(comparative genomic strategy),可大大提高电子克隆的精确性,这种方法已被有效用于新基因的鉴定和注释。大鼠、小鼠和斑马鱼等模式生物基因组测序的完成和相关数据库的发布,更给我们电子克隆新基因带来新机遇。

鉴定肿瘤相关基因对促进肿瘤分子诊断和拓宽治疗渠道

至关重要。模式生物和人类的基因组非常相似,两者具有密切相关的生化、生理、病理过程。对模式生物同源基因的研究有助于发现人类未知新基因及其功能。通过比较基因组策略鉴定已知基因家族中新的直向同源基因(Ortholog)和横向同源基因(paralog)可以大大扩展肿瘤相关基因的数目^[15-18]。目前国际上正在掀起一场通过大规模比较基因组策略鉴定新基因的热潮,日本学者已获取 30 多个肿瘤相关新基因^[16],我国学者也应充分利用生物信息学这一有力工具,争取获得更多具有独立知识产权的新基因,为人类疾病基因研究做出自己的贡献。

本研究采用生物信息学方法鉴定和特化了人和大鼠 WIP13 基因。目前 Entrez Gene 中注释的人 WIP13 cDNA 序列 NM_019613 是一个由于 128-233 位核苷酸之间存在 106 个碱基插入和第 441 和 2178 位核苷酸分别存在的碱基替换而造成移码突变的异常 cDNA。新的人 WIP13 基因 cDNA 序列通过电子拼接 CR593190、BC007838 和 BC000974 cDNA 而获得。大鼠 WIP13 cDNA 序列通过拼接 EST 序列 CB708542、CB727439、CB 737031、BF557312 和 BG663387,以及 TBLASTN 程序预测的大鼠基因组序列 NT_030059.1 中的编码序列片段获得。上述两个新基因均得到了人因基因组序列和 EST 序列的双重支持,基因序列符合外显子、内含子剪切规则,因此电子克隆的新基因 cDNA 序列非常可靠。虽然两个基因的编码区均不符合 Kozak 规则,但是在人和其他种属 WIP1-3 同源基因“ClustalW”比较分析中发现种属间均具有与之相同的翻译起始和终止点,这些都支持本研究电子克隆的新基因是正确的,另外经 RT-PCR 验证电子克隆的基因序列也是正确的,而且序列均已被 GenBank 收录,其编号分别为:AM 182326 和 NM_001039587。其中,人 WIP1-3 基因修正了目前基因库中注释的 WIP1-3 序列,而大鼠基因则是国际上首次克隆,并被确定为参考序列。生物信息学分析还显示:人 WIP13 基因存在两个可变剪切体,基因序列中存在 17 个单核苷酸多态性(SNP)。dbEST 表达谱显示人 WIP13 基因在胃癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤类型中表达上调,此外在正常睾丸和肝脏组织中也显示高表达。上述表达结果部分已经得到了基因表达实验数据库(GEO)的进一步验证,部分资料还与独立实验结果一致^[7],进一步说明了生物信息学分析的科学性。WIP13 氨基酸序列高度保守,在多个种属中长度完全相同,均为 344 个氨基酸残基。种属间 WIP1-3 蛋白为 WD40 重复蛋白同源体,含有 7 个由 4 条 β 折叠股构成的 β 折叠层结构。

总之,本研究应用生物信息学手段,电子克隆了人和大鼠的 WIP1-3 基因并初步分析了其功能特征,为 WIP1-3 基因的实验研究提供了重要指导,RT-PCR 验证序列是正确的,其他实验验证工作正在进行。因为 WIP1-3 基因在多种类型肿瘤中异常表达,且国外初步研究证实 WIP1 依赖的自噬异常与多种类型肿瘤的进展有关^[7],进一步研究 WIP1 基因蛋白家族组成、结构及其功能具有重要的理论和现实意义。

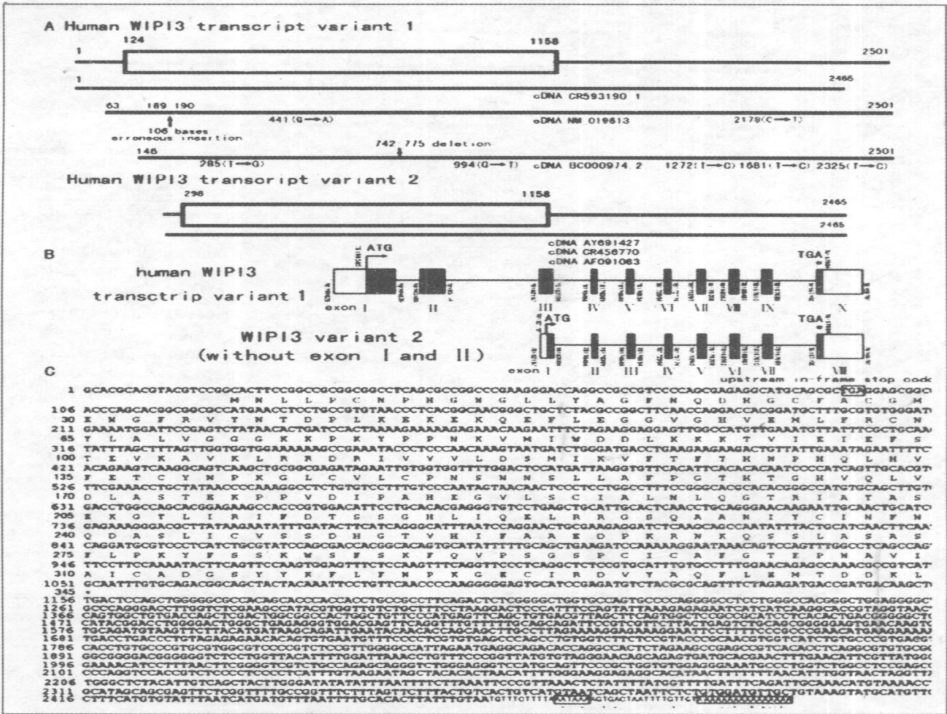


图1 人WIP13基因. A: 人WIP13基因的cDNA序列,通过拼接CR593190,NM_019613和BC000974 cDNA序列获得,矩形代表编码区;B: 人WIP13基因的可变剪切体、外显子和内含子边界.其在人类基因组序列NT_010663.14中位于78165777-78199628碱基之间,包括10个外显子,作图于17q25.3反向序列;C: 人WIP13基因的cDNA与其编码的344个氨基酸序列.左侧显示了碱基和氨基酸序列位置,终止子下游1318碱基位置存在典型加尾信号AATAAA,其后有polyA尾(见BC007838和BC000974序列)。

Fig. 1 Human WIP13 gene. A: cDNA was assemble with CR593190 cDNA, BC007838 cDNA and BC000974, open box stand for coding region. B: alternative splicing and exon- intron structure, consisting of 10 exons, located between 78165777- 78199628 of NT_010663.14 and mapped to human 17q25.3 in the reverse orientation. C: cDNA and the encoded 344 amino- acid sequence. The presence of the canonical AATAAA polyadenylation signal 1318 nt downstream of the stop codon and followed a polyA tail (in BC007838 and BC000974).

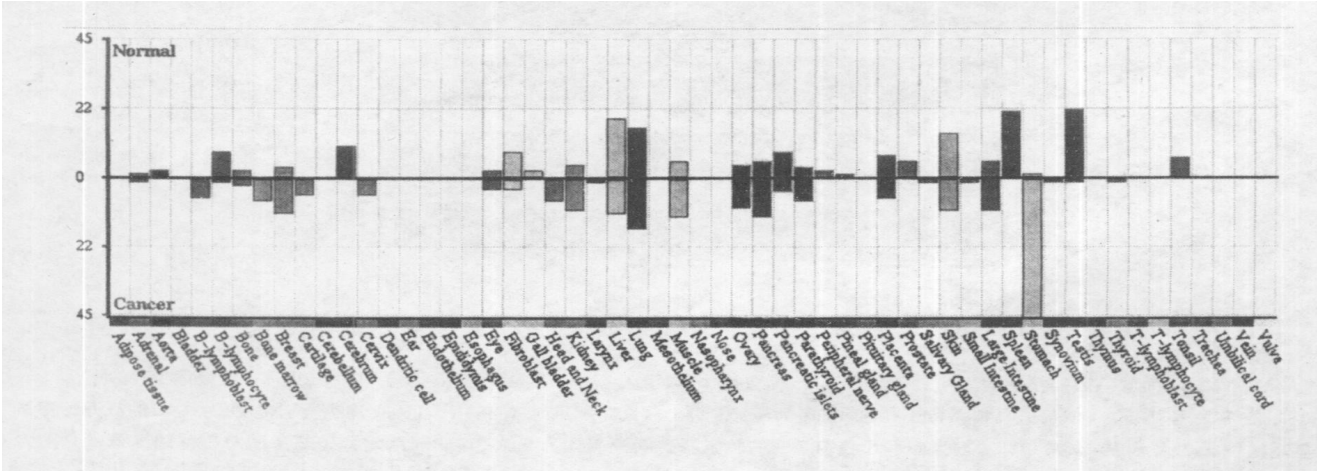


图2 人WIP13基因在不同组织中的的电子表达谱 横坐标代表组织 纵坐标表示 EST 数目。

Fig 2 human WIP13 cDNA expression profile This cluster show high frequency in several malignancies and normal tissues. Ordinate stand for the number of EST sequences and abscissa for the corresponding tissue type.

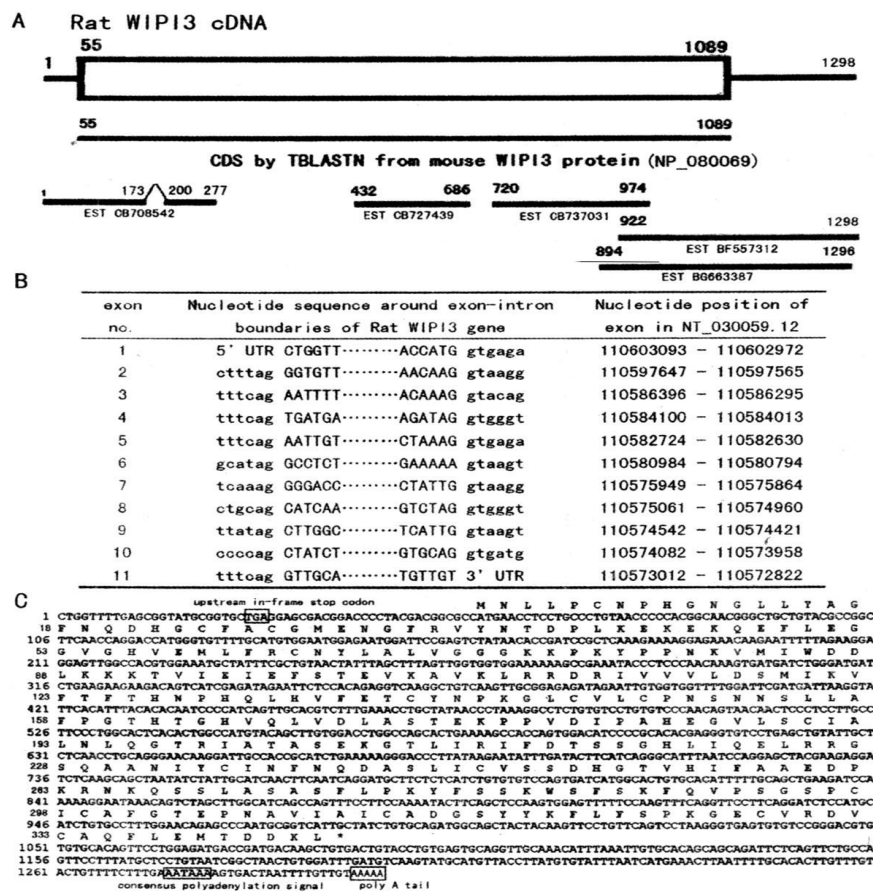


图3 大鼠WIP13基因 A: 大鼠WIP13基因的cDNA序列,通过拼接CB727439, CB737031, BF557312和BG663387 EST和预测的CDS序列获得。核苷酸55-1089为大鼠WIP13基因的编码区,图中以矩形表示; B: 大鼠WIP13基因的11个外显子及其与内含子边界,位于10q32.3反向序列,大写字母表示外显子,小写字母表示内含子; C: 大鼠WIP13基因的cDNA与其编码的344个氨基酸序列,左侧显示了碱基和氨基酸序列位置,终止子下游189碱基位置存在典型加尾信号AATAAA,其后有poly A尾(见BF557312和BG663387序列)。

Fig 3 Rat WIP13 gene. A: Rat WIP13 cDNA was assembled by rat CB727439, CB737031, BF557312 and BG663387 EST and predicted CDS. Nucleotide position of 55-1089 is the coding region and shown as open box. B: Exon-intron structure are shown by upper-case(exon) and lower-case letters(intron). Rat WIP13 gene consists of 11 exons, was mapped to 10q32.3 in the reverse orientation. C: Rat WIP13 cDNA and the encoded 344 amino-acid. The presence of the canonical AATAAA polyadenylation signal 189 nt downstream of the stop codon and followed a polyA tail (in BF557312 and BG663387).

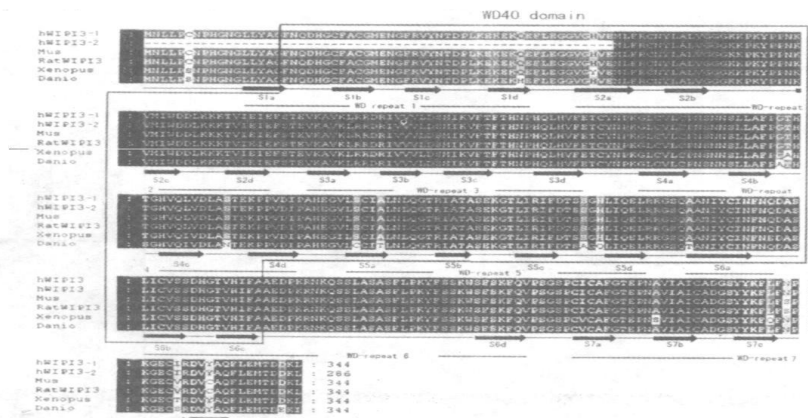


图4 脊椎动物WIP13同源基因的氨基酸多序列比对其二级结构 比对了人WIP13基因可剪变切体1和2(见图1)、大鼠WIP13(见图3)、小鼠WIP13(Genbank序列号: NP_080069)、斑马鱼WIP13(Genbank序列号: NP_956534)、非洲爪蟾WIP13(Genbank序列号: NP_001008184)的氨基酸序列。右侧显示氨基酸位置。人WIP13蛋白单体1与大鼠和小鼠WIP13的总氨基酸同源率均为99%,与非洲爪蟾和斑马鱼的总氨基酸同源率分别为97%和95%。深颜色代表相同的氨基酸,浅颜色代表相似。

Fig 4 Multisequence alignment of vertebrate WIP13 homologs. Human WIP13 isoform1 and isoform2 (Figure1), rat WIP13 (figure3), mouse WIP13(NP_080069), danio WIP13 (NP_956534) and xenopus WIP13 protein (NP_001008184) are aligned. Amino-acid residues are numbered on the right. Human WIP13 protein isoform 1 (344aa) showed 99% total-amino-acid identity with rat and mouse WIP13 (344aa), 97% total-amino-acid identity with Xenopus WIP13 (344aa), and 95% total-amino-acid identity with Danio WIP13 (344aa). Solid boxes represent identical amino acids; shaded boxes indicate similarity.

参考文献

- [1] Garcia- Higuera L., Fenoglio J., Li Y., et al: Folding of proteins with WD- repeats: comparison of six members of the WD- repeat superfamily to the G protein beta subunit[J]. *Biochemistry* 1996,35:13985- 13994
- [2] Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K. et al: The WD repeat: a common architecture for diverse functions[J]. *Trends Biochem. Sci.* 1999,24: 181 - 185
- [3] Li D, Roberts R: WD- repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases[J]. *Cell Mol Life Sci.* 2001, 58:2085- 97
- [4] Chemova OB, Hunyadi A, Malaj E et al: A novel member of the WD- repeat gene family, WDR11, maps to the 10q26 region and is disrupted by a chromosome translocation in human glioblastoma cells[J]. *Oncogene* 2001, 20: 5378- 5392
- [5] Honore B, Baandrup U, Nielsen S et al: Endonuclein is a cell cycle regulated WD- repeat protein that is up- regulated in adenocarcinoma of the pancreas[J]. *Oncogene* 2002, 21,1123- 1129
- [6] van Nocker S, Ludwig P: The WD- repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function[J]. *BMC Genomics* 2003, 4: 50
- [7] Proikas- Cezanne T, Waddell S, Gaugel A, Frickey T, Lupas A, Nordheim A. WIPI- 1alpha (WIPI49), a member of the novel 7- bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation- induced autophagy[J]. *Oncogene* 2004, 58:9314- 25
- [8] Barth H, Meiling- Wesse K, Epple UD et al: Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require At10p[J]. *FEBS Lett* 2001, 508: 23- 28
- [9] Georgakopoulos T, Koutoubas G, Vakonakis I, et al: Functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* YFR021w/ YGR223c/ YPL100w ORF family suggests relations to mitochondrial/peroxisomal functions and amino acid signalling pathways[J]. *Yeast* 2001, 18:1155- 1171
- [10] Guan J, Stromhaug PE, George MD, et al: Cvt18/ Gsa12 Is Required for Cytoplasm- to- Vacuole Transport, Pexophagy, and Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*[J]. *Mol. Cell. Biol* 2001, 12: 3821- 3838
- [11] Melendez A, Tallozy Z, Seaman M, et al: Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life- Span Extension in *C. elegans*[J]. *Science* 2003, 301: 1387- 1391
- [12] Gozaniak D and Kimchi A: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism[J]. *Oncogene* 2004, 23: 2891- 2906
- [13] Edinger AL and Thompson CB: Defective autophagy leads to cancer[J]. *Cancer Cell* 2003, 4: 422- 424
- [14] Kanehisa M, Bork P. Bioinformatics in the post- sequence era[J]. *Nat Genet.* 2003, 33 Suppl:305- 10
- [15] Katoh M: Paradigm shift in gene finding method: from benchtop approach to desk- top approach[J]. *Int J Mol Med* 2002, 10: 677- 682
- [16] Masaru Katoh. Genome- Wide Search of Human Genes Implicated in WNT Signaling Pathway Using Bioinformatics[J]. *Genome Informatics* 2002, 13: 367- 368
- [17] Andrea Rossi1, Quinn Deveraux2, Boris Turk3, et al: Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome[J]. *Biol. Chem* 2004, 385: 363- 372
- [18] Katoh M and Katoh M: Identification and characterization of mouse *ErbB2* gene in silico[J]. *Int J Oncol* 2003, 23: 831- 835
- [19] Kim P, Kim N, Lee Y, et al: ECGene: genome annotation for alternative splicing[J]. *Nucleic Acids Res* 2005, 33: D75- 9
- [20] Kent WJ: BLAT- the BLAST- like alignment tool[J]. *Genome Res.* 2002, 12: 656- 64
- [21] Rombel IT, Sykes KF, Rayner S, Johnston SA: ORF- FINDER: a vector for high- throughput gene identification[J]. *Gene* 2002, 282: 33- 41
- [22] Higgins, D., J. Thompson, T. Gibson, J. D. et al: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position- specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 4673- 4680
- [23] Nicholas, K. B., H. B. Nicholas, Jr., and D. W. Deerfield II: GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation[J]. *EMBnew News* 1997, 4: 14
- [24] Nakai K, Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization[J]. *Trends Biochem Sci* 1999, 24: 34- 6
- [25] McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT: The PSIPRED protein structure prediction server[J]. *Bioinformatics.* 2000, 16, 404- 405
- [26] Kozak, M. An analysis of 5' - noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15: 8125- 48
- [27] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al: Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. *Nature* 2001, 409: 860- 921
- [28] Ross MT, Grahm DV, Coffey AJ, et al: The DNA sequence of the human X chromosome[J]. *Nature* 2005, 434: 325- 37
- [29] Camargo AA, de Souza SJ, Brentani RR, et al: Human gene discovery through experimental definition of transcribed regions of the human genome[J]. *Curr Opin Chem Biol* 2002, 6: 13- 6
- [30] O'Brien KP, Tapia- Paez I, Stahle- Backdahl M, et al: Characterization of five novel human genes in the 11q13- q22 region[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 273: 90- 4
- (上接第 65 页)
- [25] Lejeune FJ, High dose recombinant tumor necrosis factor (rTNF α) administered by isolation perfusion for advanced tumors of the limbs: A model for biochemotherapy of cancer[J]. *European J Cancer*, 1995, 31A, 1009- 1016
- [26] Vaglini M, Belli F, Ammatuna M, et al. Treatment of primary or relapsing limb cancer by isolation perfusion with high- dose alpha- tumor necrosis factor, gamma- interferon, and melphalan[J]. *Cancer*, 1994, 73: 483- 492
- [27] Fraker DL, Alexander HL, Andrich M, et al. Treatment of patients with melanoma of the extremity using hyperthermic isolated limb perfusion with melphalan, tumor necrosis factor, and interferon gamma: results of a tumor necrosis factor dose- escalation study[J]. *J Clin Oncol.* 1996, 14: 479- 489
- [28] Takahashi M, Fujimoto S, Kobayashi K, et al. Clinical outcome of intraoperative pelvic hyperthermo- chemotherapy for patients with Duke's C rectal cancer[J]. *Int J Hyperthermia.* 1994, 10: 749- 754
- [29] Sugiyama A, Katayama M, Matsuda T, et al. Hepatic arterial infusion chemotherapy combined with hyperthermia for metastatic liver tumors of colorectal cancer[J]. *Seminars in Oncology.* 1997, 24: 135- 138
- [30] storm FK, Baker H, Scanlon EF, et al. Magnetic- induction hyperthermia: Results of a 5- year multi- institutional national cooperative trial in advanced cancer patients[J]. *Cancer*, 1985, 55: 2677- 2587
- [31] Colombo R, Da Pozzo LF, Lev A, et al. A new approach using local combined microwave hyperthermia and chemotherapy in superficial transitional bladder carcinoma treatment[J]. *J Uro*, 1995, 153: 959- 963
- [32] Colombo R, Da Pozzo LF, Lev A, et al. Neoadjuvant combined microwave induced local hyperthermia and topical chemotherapy versus chemotherapy alone for superficial bladder cancer[J]. *J Uro*, 1996, 155: 1227- 1232
- [33] Debes A, Willers R, Gobel U, et al. Role of heat treatment in childhood cancers: distinct resistance profiles of solid tumor cell lines towards combined thermochemotherapy[J]. *Pediatr- Blood- Cancer*, 2005, 45 (5): 663- 669
- [34] Advani R, Saba HI, Tallman MS, et al. Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia with combination chemotherapy plus the multidrug resistance modulator PSC 833[J]. *Blood*, 1999, 93(3): 787- 795
- [35] Stein U, Rau B, Wust P, et al. Hyperthermia for treatment of rectal cancer: Evaluation for induction of multidrug resistance gene(MDR1) expression[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(1): 5- 12
- [36] Kim SH, Yeo GS, Lim YS, et al. Suppression of multidrug resistance via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells[J]. *Exp Mol Med*, 1998, 30(2): 87- 92
- [37] 宋杨. 应用 ZME- II 型大功率微波热靶点效应治疗肿瘤的临床疗效研究. *生物磁学*, 2005, 5(4): 16- 18