

逆转录病毒载体介导的 RNA 干扰稳定抑制肌肉生长抑制素 GDF-8 的表达

刘超武¹, 杨倬², 赵斌¹, 刘长梅²

1 华中农业大学生命科学与技术学院, 武汉 430070

2 中国科学院微生物研究所分子病毒室, 北京 100101

摘要: 为将肌肉生长抑制素的干扰序列表达盒hU6-siGDF-8有效导入肌成纤维细胞C2C12中,以pAV-hU6+27载体为基础构建逆转录病毒载体pXSN-hU6-siGDF-8,并使之与pVSV-G质粒共转染GP-293细胞,用包装出的病毒粒子感染宿主细胞C2C12, G418筛选稳定整合逆转录病毒的抗性细胞库。2周后, Western Blotting和Real-Time PCR分析结果显示,细胞内源性的GDF-8基因的表达得到了有效的抑制; MTT法和细胞流式仪分析表明, G418抗性细胞得到了更有效的增殖,并且G₀/G₁期细胞数量减少了13.7%, S期细胞数量增加了14.9%。因此,逆转录病毒载体的RNA干扰系统可以稳定抑制GDF-8基因表达,它将成为治疗肌肉萎缩疾病的一个强有力的工具。

关键词: 肌肉生长抑制素 GDF-8, C2C12 细胞系, 逆转录病毒, shRNA

Inhibiting GDF-8 Expression by Retrovirus-Based RNAi Stably

Chaowu Liu¹, Zhuo Yang², Bin Zhao¹, and Changmei Liu²

1 School of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2 The Laboratory of Molecular Virus, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

Abstract: We cloned human U6 promoter from pAVU6+27 vector into pXSN to transcribe small RNA. Meanwhile, a shRNA targeting GDF-8 was cloned down-stream of the hU6 promoter to construct recombinant vector. Then the packing cell GP-293 was co-transfected the recombinant with pVSV-G to generate virus particle. Resistant C2C12 cell pools were screened using G418. Levels of mRNA and protein of GDF-8 were tested by Real-Time PCR and western blotting. Cell proliferation and cell cycle were analyzed using MTT and FACS. The expression of GDF-8 was dramatically decreased by the retrovirus-based system in C2C12 cells. Cells proliferated effectively after integrating the recombinant. The cells in G₀/G₁ phase decreased by 13.7%, while cells in S phase increased by 14.9%. In conclusion, the retrovirus-based RNAi could be used to stably silence GDF-8. It can be a powerful tool in curing muscle atrophy.

Keywords: GDF-8 gene, C2C12 cells, retrovirus vector, shRNA

Received: April 18, 2007; **Accepted:** June 4, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation (No. 2005CB522901).

Corresponding author: Changmei Liu. Tel: +86-10-64807372; E-mail: liuchm@im.ac.cn

国家自然科学基金 973 资助项目(No. 2005CB522901)。

肌细胞分化、生长是由一些正向调控因子和负向调控因子进行双向调节的。肌细胞生长抑制素(GDF-8, growth differentiation factor-8), 属于转化生长因子超家族(transforming growth factor beta), 是近年来发现的一类重要的肌细胞生长调控因子^[1,2], 研究表明抑制GDF-8 表达活性可以使哺乳动物骨骼肌质量增加^[3], 缺失GDF-8 基因的小鼠有肌肉过度生长的现象^[4]。因此, 敲除GDF-8 基因、改变前体肽切割位点保守氨基酸、或者利用GDF-8 基因中和抗体等, 都能有效刺激肌肉生长发育。然而基因敲除技术花费时间长、成本高, 中和抗体活性难于持久, 并有可能产生损伤机体的免疫反应, 目前需要解决的问题是寻找一种合理的工具用于肌肉生长疾病治疗的相关研究。

RNAi技术因具有投入少、周期短、操作简单等优点而具有广泛的应用前景。2001年, Elbashir等人首次用外源21~23nt的siRNA成功地在哺乳动物细胞中诱导了RNA干扰^[5], 使人们认识到小于30bp的siRNA是哺乳动物RNA干扰赖以发生的重要中间效应因子。实验室用来表达siRNA的工具主要有质粒载体、慢病毒载体和腺病毒载体^[6-8], 其中质粒载体最为常见。然而将载体有效地导入哺乳动物细胞一般需要借助转染试剂, 这种外源基因的导入方法因存在无法准确地确定转染效率、难以保证每次实验的可重复性、不能在体内产生长期的抑制等障碍, 限制了它在哺乳动物系统中的应用^[9]。病毒载体表达shRNA的优势在于可以高效稳定地感染宿主细胞, 避免了由于质粒转染效率低而带来的种种问题。

本文根据靶向GDF-8 基因的有效序列^[10], 设计、构建和鉴定pXSN-hU6-siGDF-8 逆转录病毒载体, 利用不同的检测方法评价它在细胞水平上调控GDF-8 基因表达的可行性。结果表明, GDF-8 基因的表达得到了有效的抑制, 同时细胞生长增殖没有受到影响, 因此基于逆转录病毒载体的RNA干扰系统可以用于肌肉生长调节的相关研究。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒、细胞系以及主要试剂

C2C12 肌成纤维细胞系、GP-293 人胚胎肾细胞系由实验室保存。逆转录病毒载体 pXSN 及病毒包装质粒 pV-SVG 由中国协和医科大学刘德培教授惠

赠, pAVU6 + 27 由美国密歇根大学 Engelke 博士惠赠, DH5 α 由实验室保存。博大泰克公司的小型质粒快速提取试剂盒和胶回收试剂盒, Takara 公司的限制型内切酶, 中杉金桥公司的羊抗兔和兔抗羊的 IgG 辣根过氧化物的二抗以及 beta-actin 一抗, Santa Cruz 公司的 GDF-8 单克隆抗体, QIAGEN 大提质粒试剂盒。英骏公司合成引物, Augct 公司合成 DNA 序列, Invitrogen 公司的脂质体 LipofectamineTM2000 和 TRIzol 裂解液, Sigma 公司的 DMEM 和胎牛血清, Amersham 公司的 ECL system 发光液, Promega 公司的 Real-Time PCR 试剂及反转录试剂。其他药品试剂购于 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

本实验保持的细胞株肌成纤维细胞C2C12 和包装细胞GP293 培养于DMEM培养基中, 培养基含有10%的胎牛血清和100 μ g/mL链霉素、100 μ g/mL青霉素的双抗, 培养条件为37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂的培养箱。当细胞培养至培养皿80%面积时传代。

1.3 逆转录病毒载体的构建

根据GDF-8 基因426~446 位点的序列设计sense和antisense oligos^[10], 退火形成双链DNA的结构如图1(a)所示, 在DNA oligos的末端设计了Sal I/Xba I 双酶切位点。为使转录有效终止, 还在末端设计了终止信号dT(5)。

将合成的寡核苷酸退火后连接到 pAV-hU6+27 的hU6 启动子的下游, 筛选出阳性克隆后, 将hU6+27-siGDF-8 表达盒克隆到pXSN载体(图1(b))上形成逆转录病毒载体 pXSN-hU6-siGDF8, 测序正确后, 根据 QIAGEN 试剂盒的说明书操作, 大量抽提质粒用于包装病毒。

1.4 逆转录病毒的包装及 G418 抗性细胞库的建立

将 6×10^6 GP-293 细胞接种于100 mm平皿中, 细胞达到80%融合后, 按照每孔 2×10^5 的密度传代, 12 h后采用磷酸钙介导的方法转染: 取15 μ g逆转录病毒载体和8 μ g的pVSV-G质粒, 同时滴加62 μ L 2mol/L CaCl₂, 加水至总体积500 μ L; 另取500 μ L 2 \times HEPES缓慢加入到上述DNA/CaCl₂溶液中, 轻轻吹打几次混匀, 室温放置20 min, 可见溶液变混浊。将混合液逐滴加入GP-293 细胞培养皿中, 迅速放回CO₂ 孵箱中培养12 h后, 换新鲜预热的完全培

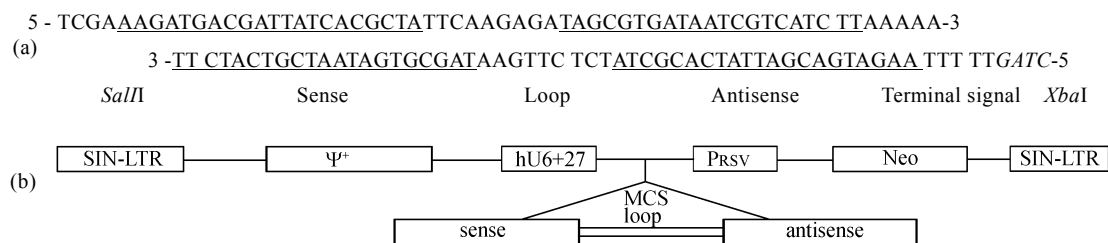


图 1 反转录病毒载体 pXSN 和双链 siGDF-8 结构

Fig. 1 The construction of retrovirus vector pLXSN and siGDF-8

(a) the structure of double siGDF-8; (b) the structure of retrovirus vector pXSN; hU6+27: The initiate site of transcription; Ψ^+ : Packing information; SIN: self-inactivating; LTR: Long terminal repeat; MCS: multiple cloning sites; PRSV: Rous sarcoma virus promoter; Neo: neomycin phosphotransferase gene

养液, 继续培养 48 h, 包装出病毒粒子, 上清用 0.45 μm 的滤膜过滤, 加入终浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Polybrene 用作感染液, 感染生长 24 h 的密度为 3×10^5 细胞 C2C12, 24 h 后加 800 μg G418 抗性筛选, 2 周后得到 G418 抗性稳定的细胞库。用试剂盒提取 G418 抗性细胞库的基因组, PCR 方法分析整合特异性的目的基因片段。PCR 的引物序列:

正义链引物: 5'-GGATCCAAGGTCGGGC-AGGAAG-3

反义链引物: 5'-CTTGCATGCCTGCAGG-TCCTAGTA-3

1.5 GDF-8 基因 mRNA 的表达水平的分析

用 TRIzol 裂解整合了重组逆转录病毒的细胞, 然后按常规方法提取总 RNA, 1.5% 琼脂糖鉴定其完整性, 然后定量到 2 μg 后反转录成 cDNA, 同时设计 GDF-8 和 β -actin 特异性引物做 Real-Time PCR 定量分析, β -actin 作为相对定量的内参照。采用 Applied Biosystems Prism 7000 系统, 用公式 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 进行相对定量计算^[11], 每个样品重复 3 次。PCR 反应的条件为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 s; 40 个循环。PCR 引物序列如下:

β -actin forward: 5'-GAACCCTAAGGCCAA CCGTGA A-3

β -actin reverse: 5'-CTCAGTAACAGTCCGCCT AGA A-3

GDF-8 forward: 5'-CAGACCCGTCAAGACTCC TACA-3

GDF-8 reverse: 5'-CAGTGCCTGGGCTCATGT CAAG-3

1.6 GDF-8 基因的蛋白表达水平的分析

利用细胞蛋白裂解液裂解整合了重组逆转录病毒的细胞, 离心提取总蛋白作 Western Blotting 定量分析, 用 Bio-Rad Laboratories 系统定量到 30 μg , 12% SDS-PAGE 分离目的蛋白, 半干转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 孵育特异性抗体后, 加 ECL 发光液发光, X-ray 自显影, 采用图像系统软件 Bandscan 5.0 分析确定目的蛋白水平的差异。

1.7 细胞增殖分析

采用 MTT 分析, 将整合了重组逆转录病毒的细胞按照每孔 6000 个细胞接种于 96 孔板中, 分别培养 24、36、48、60、72 h, 加 5 g/L 甲基噻唑基四唑 (MTT) 20 μL , 继续培养 4 h 后倒掉, 加 150 μL 二甲基亚砜, 然后利用分光光度计测定在 570/630 nm 处的 OD 值, 每个样品设置 3 个重复。

1.8 细胞周期分析

收集整合了重组逆转录病毒的细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 冰浴 30 min 之后, 加 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶 (PI) 染色, 用 1% BSA 和 10% Rnase A (1 mg/mL) 的溶液悬浮细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 然后流式细胞仪分析细胞的周期。

2 结果分析

2.1 反转录病毒载体 pXSN-hU6 + 27-siGDF-8 的构建

首先将 shGDF-8 克隆到 pAVU6+27 载体上, 阳性克隆的 *Sal I/Xba I* 酶切鉴定是 450 bp 的片段, 阴性克隆 *Sal I/Xba I* 酶切鉴定是 400 bp 的片段; 接着将 pAVU6+27-siGDF-8 的 hU6-siGDF-8 表达盒和空 hU6 启动子克隆到 pXSN 载体上, 构建成逆转录病

毒 pXSN-hU6-siGDF-8, 其阳性克隆的 *Bam*H I/*Xho* I 酶切鉴定是 450 bp 的片段, 提取质粒测序正确, 表明逆转录病毒载体 pXSN-hU6-siGDF-8 构建成功(图 2)。

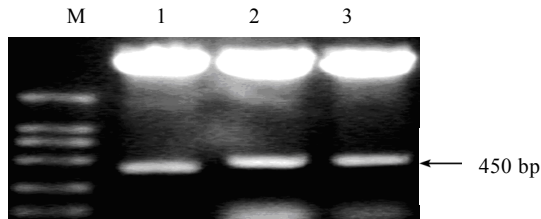


图 2 重组反转录病毒载体 pXSN-hU6 + 27-siGDF-8 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant vector pXSN-hU6 + 27-siGDF-8

M: marker DL 2000; 1: pAV-hU6+27; 2: pAV-hU6+27-siGDF-8; 3: pXSN-hU6-siGDF-8

2.2 G418 抗性细胞库的建立

提取整合了重组逆转录病毒的细胞基因组, 利用特异性的引物 PCR 扩增鉴定, 得到一条 400 bp 左右的特异性片段, 说明 pXSN-hU6-siGDF-8 成功整合到了 G418 抗性的细胞中; 另外 PCR 扩增得到 350 bp 特异性片段的细胞整合的是 pXSN-hU6。结果表明, 逆转录病毒成功整合到了 G418 抗性细胞中。PCR 鉴定的结果如下图 3。

2.3 hU6-siGDF-8 表达盒整合细胞后对 GDF-8 基因表达的影响

提取 G418 抗性细胞的总 RNA, 反转录成 cDNA 并以其为模板, 实时荧光定量 PCR 分析目的基因 mRNA 的表达水平; 同时提取 G418 抗性细胞的总

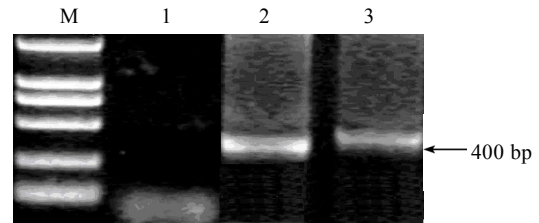


图 3 重组反转录病毒整合到 C2C12 细胞系的鉴定

Fig. 3 Identification of the integration cells by PCR

M: marker DL 2000; 1: control, transfect without any plasmid; 2: mock, transfect pXSN-hU6; 3: transfect pXSN-hU6-siGDF-8

蛋白, Western blotting 分析目的基因蛋白水平。 β -actin 基因设为内参照。

实验结果表明, 与对照相比, 整合了 hU6-siGDF-8 表达盒的细胞, GDF-8 基因的 mRNA 水平抑制率达到了 94.5%(图 4 (a)), 同时, GDF-8 基因的蛋白表达水平也得到了明显的降低(图 4 (b))。另外, 不转染任何质粒的细胞与整合了 pXSN-hU6 的细胞相比, 基因 GDF-8 的 mRNA 和蛋白质的表达水平没有差别。

2.4 hU6-siGDF-8 表达盒整合细胞后对细胞增殖和细胞周期的影响

MTT 法分析可以得知细胞增殖情况, 碘化丙啶染色可以分析细胞周期。实验结果表明, 与不转染质粒的对照比较, 整合 hU6-siGDF-8 表达盒的细胞得到了更有效的增殖, 也就是说, 当 GDF-8 基因表达受到抑制后, 可以显著地促进肌细胞增殖(图 5a); 并且此时它的 S 期细胞数量增加了 14.9%, G0/G1 期细胞数量减少了 13.7%(图 5b)。另外, 不转染任何质粒的对照组和转染 pXSN-hU6 相比, 细胞增殖和细胞周期情况没有差别。

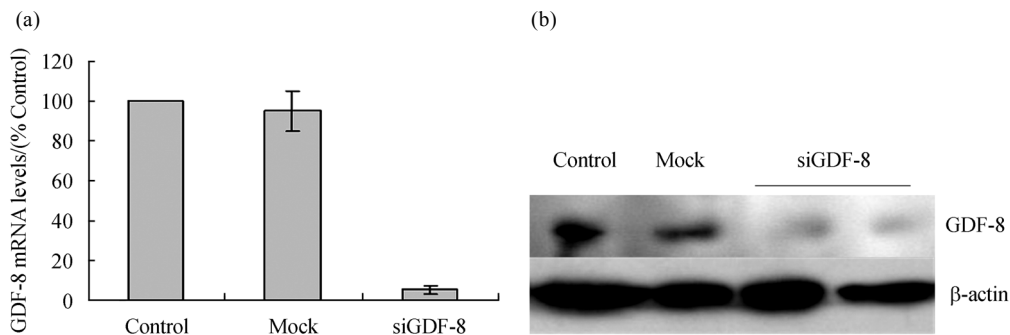


图 4 逆转录病毒载体整合细胞后对 GDF-8 基因表达的影响

Fig. 4 The influence to the expression of GDF-8 after C2C12 integrating with retrovirus vector

(a) Real-Time PCR analyse the mRNA expression of GDF-8; (b) Western Blotting analyse the protein expression of ; control, transfect without any plasmid; mock, transfect pXSN-hU6; siGDF-8, transfect pXSN-hU6-siGDF-8

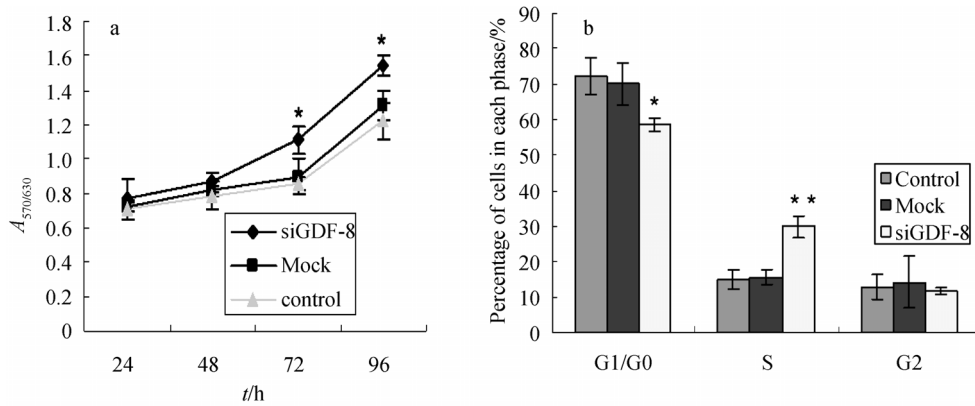


图 5 逆转录病毒载体整合细胞后对细胞增殖和细胞周期的影响

Fig. 5 The influence to cell proliferation and cycle after C2C12 integrating with retrovirus vector

(a) MTT analyse the proliferate of C2C12; (b) FACS analyse the cell cycle; control, transfect without any plasmid; mock, transfect pXSN-hU6; siGDF-8, transfect pXSN-hU6-siGDF-8. Comparisons between two groups were performed by paired Student's t test. A value of $P < 0.05$ was considered significantly different. * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$

3 讨论

肌肉生长抑制素GDF-8可以负调控肌肉的生长, 胎儿期它控制肌肉纤维生成的数量, 成熟期又能够激活静息细胞而使肌肉增生肥大^[12]。虽然GDF-8基因的表达并不是肌肉萎缩的根本原因, 但是抑制其表达最终刺激了静息的卫星细胞活化, 显著地改善病人肌肉生长的状况。因此, 越来越多的肌肉萎缩疾病治疗已经将它作为一个重要的靶点。

现在研究表明^[13], 采用质粒表达干扰GDF-8基因的shRNA可以使骨骼肌的质量得到显著的增加, 注射表达shRNA的质粒两周后, 小鼠GDF-8基因和蛋白质的被抑制, 同时伴随了肌纤维长度和肌肉质量的增加。然而, 这种策略的效果并不理想, 首先质粒在组织中吸收并不完全或者不能够完全到达靶细胞; 其次肌肉的表面的胶原组织和基质是阻止外源表达系统有效的进入靶细胞的最大障碍, 并且随着个体年龄的增加, 胶原组织更加丰富, 导致了将外源基因有效的导入变为一个更加突出的问题; 另外实验还表明, shRNA在肌肉组织中表达不均匀严重影响了治疗效果^[14]。

发夹结构的shRNA抑制小鼠的GDF-8基因表达的效果甚至超过直接使用siRNA, 用shRNA降低GDF-8表达活性的策略可以显著地增加肌肉生长和加快肌肉的再生速度。本研究利用了人源的U6启动子构建干扰序列表达盒hU6-siGDF-8, 可以高效的表达shGDF-8, shRNA在Dicer RNase酶系的切割作用下形成21 bp的双链小siRNA, 它选择性的结合到

GDF-8的mRNA上并最终将其降解。实验结果表明GDF-8的mRNA的抑制率达到了94.5%, 而Thomas^[13]等设计的siRNA直接对HEK293细胞中的GDF-8进行干扰, 抑制效果只能达到80%左右。提示shRNA可以有效、特异地干扰C2C12细胞中GDF-8基因的表达。

逆转录病毒不但可以突破肌肉表面的胶原组织和基质的阻止, 轻松的感染任何静息的肌细胞^[15], 同时还能够在疱疹口炎病毒G的包膜蛋白作用下, 特异性的识别一种在所有细胞上都存在的磷脂, 大大地提高了其感染有丝分裂细胞的效率。将逆转录病毒载体pLXSN的3 LTR的260 bp片段切除得到pXSN, 可以避免5 LTR启动子表达产物对细胞生长增殖的干扰^[16], 同时pLXSN的3 LTR切除, 降低了产生活性病毒的可能性; 另外本研究包装产生的病毒粒子只具有有一次感染能力。因此, 经过改造后的逆转录病毒载体pXSN更加安全, 将它应用到基因治疗的研究中变得更加实际。

用药物G418筛选整合逆转录病毒的抗性细胞库, 15 d后得到稳定整合hU6-siGDF-8表达盒的细胞, 对于筛选出的每一个细胞来说, 其整合几率是百分之百, 那么相对就提高了靶基因的抑制效率。本研究中整合hU6-siGDF-8表达盒的细胞与对照相比, GDF-8基因的得到了稳定的抑制, 同时S期细胞的数量增加了14.9%, G0/G1期细胞数量减少13.7%, 并且细胞的增殖更加活跃。而整合hU6空表达盒的病毒载体与不整合病毒载体的细胞相比, 两者的GDF-8基因表达水平基本一致, 细胞周期也没有明

显的差别。表明带有 hU6 启动子的病毒载体整合宿主细胞并不影响细胞内源性的 GDF-8 基因表达和细胞的生长增殖。提示 hU6-siGDF-8 表达盒可以用来长期、稳定地干扰 C2C12 细胞中 GDF-8 基因的表达。

因此, 将 shRNA 干扰技术与逆转录病毒相结合建立的基因治疗策略, 与以前外源基因的导入方法相比, 从某种程度上解决了 shRNA 不能够长期有效的抑制靶标基因的局限, 它作为一种稳定有效、特异快捷和成本相对低廉的方法, 将在哺乳动物肌肉生长失调疾病的基因治疗研究中起到重要的作用^[17,18]。但是这种治疗策略的安全性还需要在动物水平上作进一步的深入研究, 以防止基因异位产生肌肉过度增加或萎缩。

致谢 刘超武是华中农业大学生命科学技术学院和中国科学院微生物研究所分子病毒实验室联合培养的硕士研究生。本研究工作是在中国科学院微生物研究所分子病毒实验室田波院士和刘长梅副研究员的指导下完成, 杨怀义副研究员对论文的撰写提出了宝贵的意见, 在此表示诚挚的感谢。

REFERENCES

- [1] Dominique J, Henri B, Ve'ronique G, *et al.* Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research*, 2003, **286**: 263–275.
- [2] Thomas M, Langley B, Berry C, *et al.* Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 40235–40243.
- [3] Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, **20**: 61–86.
- [4] Grobet L, Pirottin D, Farnir F, *et al.* Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*, 2003, **35**: 227–238.
- [5] Elbashir, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, **15**: 188–200.
- [6] Gary R. Glimpses of a Tiny RNA World Science, 2001, **294**: 797–799.
- [7] Dull T, Zufferey R, Kelly M, *et al.* A Third-Generation Lentiviral Vectors with a conditional packaging system. *J Virol*, 1998, **72**(11): 8463–8471.
- [8] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 2003, **33**: 401–406.
- [9] Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 14943–14945.
- [10] Thomas R, Magee, Artaza, MG, *et al.* Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *J Gene Med*, 2006, **8**: 1171–1181.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, **25**: 402–408.
- [12] Grobet L, Pirottin D, Farnir F, *et al.* Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*, 2003, **35**: 227–238.
- [13] Thomas R, Jorge N, Monica G, *et al.* Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *J Gene Med*, 2006, **8**: 1171–1181.
- [14] Artaza JN, Bhasin S, Magee TR, *et al.* Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology*, 2005, **146**: 3547–3557.
- [15] Jun O, Stephen E. Transgene expression in hypertrophied and aged skeletal muscle *in vivo* by lentivirus delivery. *J Gene Med*, 2004, **6**: 278–287.
- [16] J Fang, Zhang YZ, Liu CM. A retrovirus-based system to stably silence hepatitis B virus genes by RNA interference. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 1679–1685.
- [17] Kim Y, Park S, Balaban R, *et al.* A functional genomic screen for cardiogenic genes using RNA interference in developing *Drosophila embryos*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(1): 159–164.
- [18] Zheng L, Liu J, Batalov S, *et al.* An approach to genome-wide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(1): 135–140.