

SARS 冠状病毒 N 蛋白激活 *hfgl2* 凝血酶原酶基因的研究*

姚华宁¹, 王战会², 韩梅芳¹, 侯金林², 罗小平¹, 宁琴^{1**}

(1.华中科技大学同济医学院附属同济医院感染免疫研究室感染科, 湖北武汉 430030; 2. 南方医院感染内科, 广东广州 510515)

Nucleocapsid Protein of SARS-associated Coronavirus Upregulates the Transcription of *hfgl2* Prothrombinase /fibroleukin Gene

YAO Hua-ning¹, WANG Zhan-hui², HAN Mei-fang¹, HOU Jin-lin², LUO Xiao-ping¹, NING Qin^{1**}

(1.Department of Infectious Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2.Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

Abstract: The structural protein of SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) responsible for the activation of *hfgl2* gene was investigated. Gene fragments encoding the nucleocapsid, the membrane, and spike proteins were amplified by RT-PCR, and they were cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (+). The plasmids were verified by restriction endonuclease analysis and sequencing. Chinese hamster ovary (CHO) cells were co-transfected with a plasmid carrying the *hfgl2* promoter/luciferase and with one of the recombinant plasmids containing the genes encoding the N, M and S structural proteins. Luciferase activity was assayed as a measure of promoter function. Immunohistochemistry showed that genes encoding the structural protein of SARS-CoV were successfully expressed only in those cells transfected with the recombinated plasmids. Co-transfection of N gene expression construct with the reporter construct containing *hfgl2* promoter in CHO cells showed a remarkable increase in luciferase activity compared with nontransfected cells. However, there was no significant difference in luciferase activity in cells cotransfected with pcDNA3.1-M and with pcDNA3.1-S2 along with *hfgl2* promoter/ luciferase reporter gene. We conclude that the nucleocapsid protein of SARS-CoV upregulates the transcription of *hfgl2* prothrombinase/fibroleukin gene.

Key word: Coronavirus; Nucleocapsid; Gene regulation; *hfgl2*/fibroleukin; SARS

摘要: 研究鉴定激活 *hfgl2* 凝血酶原酶基因的 SARS 冠状病毒结构蛋白。从 SARS 尸检肺组织中抽提 RNA 后制备 cDNA, 分别扩增 SARS-CoV 的 N、S2 和 M 全长基因序列, 再分别克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 上。应用免疫组织化学分析鉴定 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-M 和 pcDNA3.1-S2 的表达。构建人纤维介素 (*hfgl2*) 启动子荧光素酶报告基因质粒, 并将 SARS 冠状病毒结构蛋白表达质粒分别与其共转染以明确激活 *hfgl2* 基因转录的 SARS 冠状病毒结构蛋白。将目的片段克隆至 pcDNA3.1 (+), 经酶切鉴定和测序鉴定无误; 免疫组织化学染色可见明显的 CHO 细胞胞浆棕染。与 *hfgl2* 启动子共转染实验阐明 SARS 冠状病毒膜 (M) 蛋白和刺突糖 (S2) 蛋白对 *hfgl2* 基因的激活与对照组无显著差异, 而 SARS 冠状病毒核心 (N) 蛋白可激活 *hfgl2* 启动子, 使其转染活性提高 4.6 倍。SARS 冠状病毒 N 蛋白可增强 *hfgl2* 基因的转录活性。

关键词: 凝血致活酶; 冠状病毒; 核蛋白质类; 基因表达调控; 严重急性呼吸综合征

中图分类号: R511

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0319-05

收稿日期: 2005-12-08, 修回日期: 2006-02-15

* 基金项目: 科技部 973-SARS 专项 (2003CB514112), 教育部首批 SARS 项目基金 (教技司[2003]64 号)。

作者简介: 姚华宁 (1977-), 女, 硕士研究生, 研究方向为 SARS 冠状病毒的基础研究。

** 通讯作者: 宁琴 (1966-), 女, 教授, 主任医师, 研究方向为传染病学和感染免疫学。Corresponding author. Tel (027) 83662391, Fax: 027-83662391, Email: qning@tjh.tjmu.edu.cn

严重急性呼吸综合征 (Severe acute respiratory syndrome, SARS) 作为一种新型传染病^[1], 严重危害人民群众的身体健康。SARS 冠状病毒(SARS-associated coronavirus, SARS-CoV)是导致该传染病的主要病原体, 它编码的刺突糖 (S2) 蛋白、膜 (M) 蛋白和核心 (N) 蛋白在病毒入侵、中和抗体的产生中发挥重要作用, 且具有一定的抗原性^[2-4]。近期有研究显示在 SARS 患者的肺组织中有血栓形成^[5], 而纤维介素 (Fgl2) 基因与局部血栓形成有密切的联系^[6-8]。研究显示在小鼠 SARS 模型肺损伤中发现 *fgl2* 基因表达量增加^[9]。Fgl2 具有凝血酶原酶的功能, 能催化凝血酶原转化为凝血酶, 启动凝血级联途径, 导致局部纤维素的沉积^[10]。为阐明 SARS 冠状病毒结构蛋白与人纤维介素基因 (*hfgl2*) 的相互作用, 我们分别构建了 SARS 冠状病毒结构蛋白 N、M 和 S2 的真核表达质粒和 *hfgl2* 启动子荧光素酶报告基因质粒 (*hfgl2p-LUC*)。将 SARS 冠状病毒结构蛋白基因与 *hfgl2p-LUC* 共转染中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 通过检测相对荧光素酶的活性, 探讨了 SARS 病毒蛋白与宿主基因 *hfgl2* 的相互作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

载体 pcDNA3.1(+) 购于 Invitrogen 公司。JM109 购自大连宝生物公司。pGL2-Basic 质粒、 β -Gal 质粒、CHO 细胞为本室保存。PM166 克隆由多伦多大学 Gary Levy 教授提供。

T4DNA 链接酶购于 promega 公司, 限制性内切酶购于大连宝生物公司。DNA 凝胶回收试剂盒及质粒中提试剂盒购于 Omega 公司。Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司。兔抗 SARS 冠状病毒 N 蛋白多克隆抗体、兔抗 SARS 冠状病毒 M 蛋白多克隆抗体和兔抗 SARS 冠状病毒 S2 多克隆抗体由中国科学院武汉病毒研究所提供。羊抗兔免疫组织化学试剂盒购自北京中山试剂公司。

1.2 构建 SARS 冠状病毒结构蛋白的真核表达质粒

选自2003年2月10日确诊为SARS死亡病例(符合卫生部2003年4月15日颁布的SARS诊断标准)的肺组织, 抽提RNA为模板合成 cDNA, PCR方法扩增S2、M和N基因。S2片段长度为1653bp, S2片段扩增引物为: S2S:5' -CTCGGATCCCATGTCGACA CTTCTTATG-3' 和S2A:5' -CCTGCTCGAGTATAT TGCTCAT-3'; M基因片段长度为666bp, M基因扩

增引物为: MS:5' -CTCGGATCCATGGCAGACAA CGGTAC-3' 和MA:5' -CTGCTCG-AGTTACTGTAC TAGCAAAGC-3'; N基因片段长度为1266bp, N基因扩增引物为: NS: 5' -³/CTCGGATCCATGTCTG ATAATGG-ACCCC-3' 和NA: 5' -³/CTGGCGGCCG CTG CCTGAGTTGAATCAGCAG-3'。其中S2和M的正向(S)引物5' 端设计 *BamH* I 内切酶位点, 反向(A)引物5' 端设计 *Xho* I 内切酶位点。N基因正向(S)引物5' 端设计 *BamH* I 内切酶位点, 反向(A)引物5' 端设计 *Not* I 内切酶位点。反应总体积为30 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性1min 后, 94 $^{\circ}$ C 20s 55 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共35个循环。获得的PCR产物和克隆载体 pET28 和 pET32 连接, 连接产物转化进入 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞, 次日挑选转化子, 并用 PCR 和酶切的方法筛选鉴定重组体^[11]。再将 pET28 载体上的 N、S2 基因和 pET32 载体上的 M 基因分别克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 (+)。分别用内切酶 *BamH* I 与 *Not* I 和 *BamH* I 与 *Xho* I 酶切 pET28-N、pET28-S2 和 pET32-M 重组体及 pcDNA3.1 (+), 回收酶切产物, 将重组体的酶切小片断与 pcDNA3.1 (+) 酶切的大片断用 T4DNA 链接酶连接, 转化感受态细菌 JM109, 筛选阳性克隆。转化子经相应内切酶酶切鉴定并进行 DNA 测序。

1.3 构建 *hfgl2* 启动子荧光素酶报告基因质粒

从人基因组 P1 质粒的亚克隆 PM166 (pBlue-script-m166) 中酶解出人纤维介素基因 *hfgl2* 基因 5' 端 1.3 kb DNA 片断 (含 *hfgl2* 启动子全长) 克隆至 pGL2 虫荧光素酶报告基因质粒 pGL2-Basic 的 *Sma* I 和 *Xho* I 位点, 从而形成了 *hfgl2* 启动子荧光素酶报告基因质粒 *hfgl2p-LUC*。

1.4 共转染实验

在 CHO 细胞系进行转染实验。取 1 μ g pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-M 或 pcDNA3.1-S2, 与 1 μ g *hfgl2p-LUC* 或 pGL2-Basic 以及 0.48 μ g β -Gal 质粒溶于 100 μ L OPTI-MEM 培养液, 后与 100 μ L OPTI-MEM 培养液混合 (含 5 μ L Lipofectamine 2000), 将混合物置于室温中孵育 20min。将上述混合物按每孔 200 μ L 的体积加到六孔板上汇合率 90%-95% 的 CHO 细胞内, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件培养 44-48h 后, 收集细胞, 用细胞裂解液裂解, 离心取上清进行 β -Gal 活性检测, 并在荧光分光光度计 (TD-20) 上检测荧光素酶的活性。

1.5 免疫细胞化学分析鉴定 SARS 冠状病毒结构蛋白表达

采用免疫细胞化学方法对转染了病毒蛋白的

CHO 细胞爬片分别进行 SARS 冠状病毒 N 蛋白、M 蛋白和 S2 蛋白的检测。检测 SARS 冠状病毒蛋白的一抗为用 SARS 冠状病毒蛋白免疫的兔来源的多克隆抗体。分别将 1 μ g pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-M 和 pcDNA3.1-S2 通过 Lipofectamine 2000 转染至 CHO 细胞, 按转染试剂盒说明进行操作, 转染后 8h 加入完全培养基, 转染后 24h 将细胞接种于另一六孔板中的无菌玻片上制作细胞爬片, 转染后 48h 取出表面覆盖 CHO 细胞的玻片, 冷丙酮固定, 用链霉卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物法 (SP 法) 对 CHO 细胞中的 *hfgl2* 基因的表达产物进行免疫组织化学染色 (多抗稀释为 1:200), 显微镜下观察并摄片。

1.6 统计学分析

四次重复试验的结果用平均值 \pm 标准误表示, 组间比较用 SPSS 软件进行配对 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 真核表达质粒的构建

pET28-N、pET28-S2 和 pET32-M 经 *Bam*H I 与 *Not* I 和 *Bam*H I 与 *Xho* I 双酶切后与经同样酶切的表达载体 pcDNA3.1 (+) 进行连接, 重组的质粒经酶切及测序分析, 证实 3 个片断正确插入表达载体。双酶切结果显示, 酶切片断的大小均与预期 (图 1) 相符。将所构建的真核表达质粒 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-M 和 pcDNA3.1-S2 送上海博亚公司测序, 结果与 GenBank 上的序列一致。

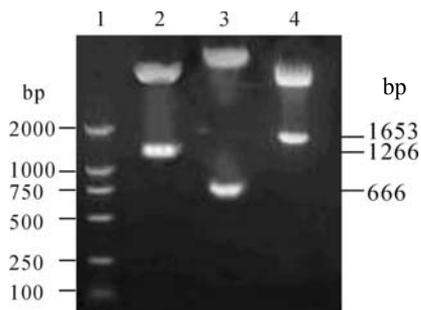


图 1 重组质粒双酶切产物分析

Fig.1 Electrophoretic analysis and identification of recombinant plasmids

1, Marker DL2000; 2, pcDNA3.1-N/ *Bam*H I *Not* I; 3, pcDNA3.1-M/ *Bam*H I *Xho* I; 4, pcDNA3.1-S2/ *Bam*H I *Xho* I.

2.2 重组 SARS 冠状病毒蛋白基因的体外表达

为鉴定真核表达质粒的构建是否成功, 我们将所构建的质粒转染入 CHO 细胞, 并用细胞组织化学方法进行了检测。转染了 pcDNA3.1 (+) 空质粒的细胞作为阴性对照, 未转染质粒的细胞为空白对

照。在显微镜下观察, 转染了 pcDNA3.1-N、pcDNA3.1-M 和 pcDNA3.1-S2 的阳性细胞胞浆中有明显的棕染, 胞核中着色不明显, 而阴性对照和空白对照均未见棕染。(图 2) 说明 N 基因、M 基因和 S2 基因的真核表达质粒构建成功, 能够在蛋白水平表达。

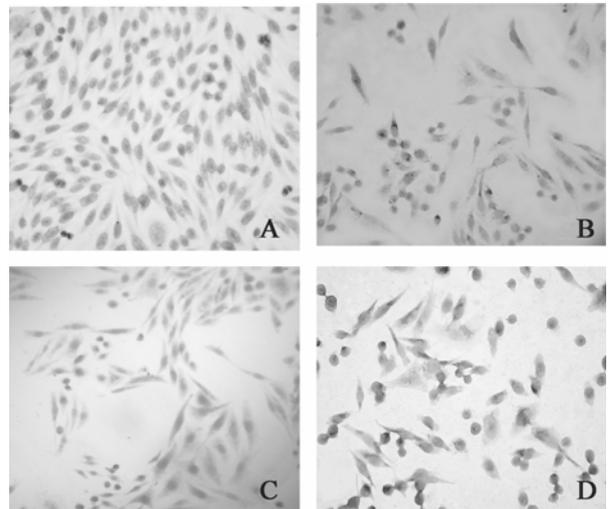


图 2 SARS 冠状病毒蛋白基因在 CHO 细胞中的表达

Fig.2 Expression of SARS-CoV genes in CHO cells
A, CHO cells transfected with pcDNA3.1(+), as negative control; B, CHO cells transfected with pcDNA3.1-N; C, CHO cells transfected with pcDNA3.1-M; D, CHO cells transfected with pcDNA3.1-S2.

2.3 SARS 冠状病毒 N 蛋白可增强 *hfgl2* 基因的转录活性

为确定 SARS 冠状病毒蛋白对 *hfgl2* 基因是否具有转录激活作用, 我们在 CHO 细胞系进行了转录激活实验, 观察病毒蛋白对 *hfgl2* 基因的启动子的激活作用。用 β -Gal 的活性值来校正荧光素酶的活性值, 以相对的荧光素酶值来衡量激活作用的大小。严格重复 4 次共转染实验。以 pGL2-Basic 的相对荧光素酶值为 1, 其他的相对荧光素酶值与之进行对比, 结果显示: 在 CHO 细胞中, 转染 pcDNA3.1-N 蛋白组的酶的活性是对照组的 6 倍。应用 SPSS 统计学分析软件对四组荧光素酶活性倍数进行分析, 结果显示 N 蛋白组与 pcDNA3.1 空质粒组比较 $P < 0.01$, 说明 N 蛋白可增加 *hfgl2* 基因的转录活性。荧光素酶活性值在 M 蛋白组、S2 蛋白组与 pcDNA3.1 空质粒组间无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 3), 说明 M 蛋白和 S2 蛋白对 *hfgl2* 基因不具有明显的激活作用。

3 讨论

fgl2 基因是近年发现的一种新的基因, 其编码

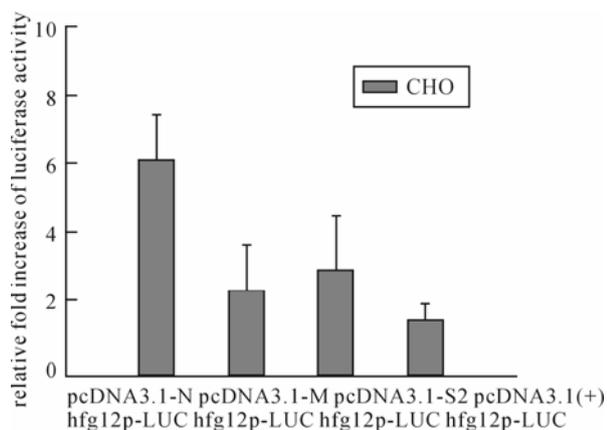


图3 SARS冠状病毒蛋白对 *hfgl2* 基因转录活性的影响

Fig.3 Effects of SARS-CoV protein on transcriptional activation of *hfgl2* in CHO cells

pcDNA3.1-N, pcDNA3.1-M or pcDNA3.1-S2 was cotransfected with *hfgl2*-LUC or pGL2-Basic in CHO cells for 40-44 h, and cells were harvested for measurement of luciferase activity. Values represent the means \pm S.E.M of four separate experiments. * represents $p < 0.01$ compared with cells cotransfected with empty pcDNA3.1 vector.

的蛋白属于纤维蛋白原超家族的一员,具有丝氨酸蛋白酶活性^[6]。*hfgl2*位于人类7q11, 23染色体。跨膜型*fgl2*由活化的巨噬细胞或内皮细胞表达,具有凝血酶原酶的功能,能催化凝血酶原转化为凝血酶,启动凝血级联途径^[12,13]。

重型病毒性肝炎、移植排斥反应、出血热等疾病演变过程中的一个共同的重要病理特征是局部炎性细胞聚集,血窦微血栓形成导致微循环障碍,局部纤维素沉积,最终细胞坏死并丧失功能。近来研究表明,在上述疾病病变区域即微血栓形成和局部纤维素沉积区域的巨噬细胞和血管内皮细胞高度表达*Fgl2*^[14-16]。有研究显示SARS患者的肺组织中有血栓形成^[5]。根据血栓形成区*fgl2*基因的高表达现象,我们推测*hfgl2*基因参与SARS的炎性病变。因此,病毒蛋白对*fgl2*基因调控的研究也是相当重要的。Ning等^[17,18]曾发现,MHV-3的(核心)蛋白可激活*fgl2*基因的启动子活性,并发现,在启动子-372-306(相对于ATG翻译起始点)位置,存在着对转录激活起重要作用的反式作用因子作用位点,肝细胞核因子4(HNF4)这一肝脏特异性转录因子可与之结合,启动该基因的转录和激活。本研究提示,SARS冠状病毒核心蛋白能激活与局部血栓形成有密切联系的*hfgl2*基因,进一步揭示了SARS冠状病毒与宿主基因之间的关系。推测SARS冠状病毒核心蛋白对*fgl2*启动子具有激活作用的机制,与其结构和功能密切相关。研究显示,SARS冠状病毒核心蛋白可诱导CD4(+) T细胞反应^[19],

而且它由于含有赖氨酸富集区,可通过磷酸化,暴露核定位信号,促使其转运进入宿主细胞核内,发挥其调节蛋白的作用。

本研究同时发现SARS冠状病毒的膜蛋白(M)和刺突糖蛋白(S2)对*hfgl2*基因没有明显的激活作用。M蛋白在序列上变化很大,但在蛋白整体的化学性质上则存在很大的保守性,其N端位于膜外,C端位于膜内,C端区域是与N蛋白相互作用的主要部分^[20]。推测M蛋白需通过与N蛋白相互作用才能发挥其作用,而单一的M蛋白没有激活功能。SARS冠状病毒刺突糖(S2)蛋白包括1个N螺旋、1个M螺旋、1个C螺旋和1个穿膜部分,介导病毒外壳膜和宿主细胞膜发生融合^[21]。推测S2蛋白并不能转移至宿主细胞核内,影响宿主基因的转录。

SARS冠状病毒核心蛋白的表达可促进c-Fos, ATF2, CREB-1和FosB的启动子转录,活化AP-1信号传导途径^[22]。由此可知,病毒蛋白可激活宿主细胞内多种信号转导途径,从而参与基因的转录激活。通过生物信息学分析,在*hfgl2*基因启动子也存在着AP-1、AP-4、CdxA等转录因子结合位点,推测SARS冠状病毒核心蛋白作用于这些顺式作用元件而激活该基因。进一步的机制还有待研究。

致谢: 中国科学院武汉病毒研究所王汉中教授、胡志红教授提供SARS冠状病毒结构蛋白多克隆抗体。多伦多大学Gary Levy教授提供PM166克隆。

References

- [1] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348 (20): 1953-1966.
- [2] Hofmann H, Hattermann K, Marzi A, *et al.* S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients [J]. *J Virol*, 2004, 78 (12): 6134-6142.
- [3] He Y, Zhou Y, Siddiqui P, *et al.* Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (8): 3718-3726.
- [4] Li S, Lin L, Wang H, *et al.* The epitope study on the SARS-CoV nucleocapsid protein [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2003, 1(3): 198-206.

- [5] Robertson M. Fgl2 : link between hepatitis B and SARS [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8 (17) : 768-770.
- [6] Levy G A, Liu M F, Ding J W, *et al.* Molecular and functional analysis of the human prothrombinase gene (HFGL2) and its role in viral hepatitis [J]. *Am J Pathology*, 2000, 156: 1217-1224.
- [7] Chen Y, Ning Q, Wang B J, (陈悦, 宁琴, 王宝菊) *et al.* Expression of human fibroleukin gene acute on chronic hepatitis B and its clinical significance [J]. *Natl Med J China (中华医学杂志)*, 2003, 83 (6): 446-450.
- [8] Zhu C L, Yan W M, Zhu F, *et al.* Fgl2/fibroleukin expression and its correlation with disease progression in mice and human severe viral hepatitis [J]. *World Gastroenterol*, 2005, 44 : 6936-6940.
- [9] Yan W M, Zhu C L, Luo X P, *et al.* Establishment of a Substitutive SARS Murine Model and Its Application in SARS Study [J]. *J Clin Immunol*, 2005, Suppl (1), 166-167.
- [10] Chan C W, Chan M W, Liu MF, *et al.* Kinetic analysis of a unique direct prothrombinase, fgl2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity [J]. *J Immunol*, 2002, 168: 5170-5177.
- [11] Ma S W, Wang Z H, Zhang K, (马世武, 王战会, 张克) *et al.* Expression of recombinant SARS associated coronavirus structural protein in Escherichiacoli BL21 [J]. *Med J Chin PLA (解放军医学杂志)*, 2004, 29 (9) : 748-751.
- [12] Ding J W, Ning Q, Liu M F, *et al.* Fulminant hepatic failure in murine hepatitis virus strain 3 infection: tissue-specific expression of a novel fgl2 prothrombinase [J]. *J Virol*, 1997, 71 (12): 9223-9230.
- [13] Ning Q, Brown D, Parodo J, *et al.* Ribavirin inhibits viral-induced acrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response [J]. *J Immunol*, 1998, 160 (7): 3487-3493.
- [14] Marsden P A, Ning Q, Fung L S, *et al.* The fgl2/ fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112 (1): 58-66.
- [15] Sun Y, Ning Q, Li J W, (孙奕, 宁琴, 李锦文) *et al.* Expression of mgf12/fibroleukin in mouse cardiac allograft and its potential clinical implication [J]. *Chin J transplant (中华器官移植杂志)*, 2003, 24 (5) : 294-297.
- [16] Zhang L, Ning Q, Guo H, (张丽, 宁琴, 郭晖) *et al.* Expression of human fibrinogen-like protein 2/fibroleukin in renal acute allograft rejection and its potential clinical implication [J]. *Natl Med J China (中华医学杂志)*, 2004, 84 (6) : 474-477.
- [17] Ning Q, Liu M, Kongkham P, *et al.* The nucleocapsid protein of murine hepatitis virus type 3 induces transcription of the novel fgl2prothrombinase gene [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (15) : 9930-9936.
- [18] Ning Q, Lakatoo S, Liu M, *et al.* Induction of prothrombinase fgl2 by the nucleocapsid protein of virulent mouse hepatitis virus is dependent on host hepatic nuclear factor-4 alpha [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (18) : 15541-15549.
- [19] Xu X J, Gao X M. Immunological Responses against SARS-Coronavirus Infection in Humans [J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1 (2) : 119-122.
- [20] Fang X, Ye L, Timani K A, *et al.* Peptide domain involved in the interaction between membrane protein and nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38 (4) : 381-385.
- [21] Liu S, Xiao G, Chen Y, *et al.* Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors [J]. *Lancet*, 2004, 363 (9413) : 938-947.
- [22] He R, Leeson A, Andonov A, *et al.* Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311 (4): 870-876.