

硫酸乙酰肝素与口蹄疫病毒感染

独军政 常惠芸* 高闪电 才学鹏*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室
农业部畜禽病毒学重点开放实验室 国家口蹄疫参考实验室 兰州 730046)

摘要: 受体是病毒宿主嗜性和致病机制的主要决定因素。硫酸乙酰肝素(HS)是一种多聚阴离子碳水化合物,广泛存在于真核细胞的细胞膜和细胞基质。HS是许多病毒在细胞膜上的特异受体或辅助受体。目前发现口蹄疫病毒可利用HS和整联蛋白($\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 8$)作为病毒受体。口蹄疫病毒可能在不同的感染阶段利用不同类型的受体与宿主细胞相互作用。研究病毒受体的结构和功能对理解病毒与宿主细胞的关系具有重要意义。本文主要论述了HS的生物学特性及其与口蹄疫病毒感染的关系。

关键词: 硫酸乙酰肝素, 口蹄疫病毒, 受体, 宿主范围

Heparan Sulfate and Foot-and-mouth Disease Virus Infection

DU Jun-Zheng CHANG Hui-Yun* GAO Shan-Dian CAI Xue-Peng*

(National Foot-and-mouth Disease Reference Laboratory, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture,
State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046)

Abstract: Receptors are primary determinant of viral tropism and disease pathogenesis. Heparan sulfates (HS) are ubiquitous, polyanionic carbohydrate chains linked to core proteins in cell membranes and extracellular matrices of all eukaryotes. HS have also been demonstrated to function as receptors or co-receptors for a number of different viruses. To date, HS and four RGD-dependent integrins, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 1$, and $\alpha v\beta 8$ have been reported to serve as receptors for Foot-and-mouth disease virus (FMDV). Different receptors may be used to interact with host cells during FMDV infection. Studies on the structure and function of receptors are very important for understanding the interaction between host cells and FMDV. Here, We mainly reviews the progress on the biological characteristics of HS and its roles in FMDV infection.

Keywords: Heparan sulfate, Foot-and-mouth disease virus, Receptors, Host tropism

病毒受体是指在细胞内或细胞膜表面可以特异地与病毒结合并介导病毒感染细胞的一类分子。病毒在细胞内增殖的过程大致包括吸附、侵入、脱壳、病毒成分的合成、装配和释放等。病毒受体是决定

病毒宿主特异性和组织嗜性的主要因素之一,其本质是糖蛋白、蛋白聚糖、脂类或糖脂,大多数属于蛋白质。病毒受体可以是单体也可以是多分子复合物,具有特异性、高亲和性、饱和性、结合位点的

有限性等特性。大多数病毒受体分布于细胞表面,但有些病毒还需要细胞内受体的参与进入细胞核进行复制、转录、包装成病毒粒子。病毒结合细胞受体主要是通过病毒吸附蛋白(Viral attachment protein, VAP) 吸附到细胞表面的受体分子上。VAP 通常是指形成有囊膜病毒包膜和无囊膜病毒衣壳的多肽类物质。目前已发现了许多结合受体的 VAP 和部分 VAP 的结构域^[1]。研究表明,口蹄疫病毒、副流感病毒、疱疹病毒、人免疫缺陷病毒、人巨细胞病毒、痘苗病毒、猪繁殖呼吸综合征病毒、腺联病毒 2 型、登革病毒、伪狂犬病毒、辛德毕斯病毒等均能利用硫酸乙酰肝素(Heparan sulfate, HS)作为病毒受体或共受体入侵细胞^[2,3]。HS 是很多病毒的共同受体,特定的硫酸化顺序和分子结构决定其对病毒的特异性。病毒受体的研究有助于从分子水平阐明病毒的感染与免疫机制以及病毒与宿主细胞的相互关系。本文主要就 HS 的生物学特性及其在口蹄疫病毒感染过程中的作用机制进行综述。

1 硫酸乙酰肝素的生物学特性

HS 是一种高度硫酸化的糖胺聚糖(Glycosaminoglycans, GAGs), GAGs 是由重复二糖单位(氨基己糖、己糖醛酸或半乳糖)构成的无分枝长链多糖,广泛存在于细胞膜和细胞外基质。根据糖残基的性质、连接方式、硫酸基的数量和存在的部位, GAGs 一般可分为四类:透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)/硫酸皮肤素(DS)、硫酸角质素(KS)及硫酸乙酰肝素(HS)/肝素。GAGs 由细胞合成后分泌到细胞外,并能与细胞膜上的细胞外基质受体结合。换句话说,细胞外基质是细胞分泌物在细胞附近构成的精密网络。组成 GAGs 的二糖单元中有一个糖残基必定是氨基糖,即 N-乙酰葡萄糖胺或乙酰半乳糖胺,氨基糖大都硫酸化,另一个糖残基多为糖醛酸。GAGs 可与蛋白质共价结合,形成蛋白聚糖,其功能由核心蛋白和 GAGs 的性质决定^[4]。在 GAGs 中作为病毒受体参与病毒入侵细胞过程的多糖分子是 HS^[5],其一级结构是 L 型艾杜糖酸(L-iduronic acid)和 D 型乙酰葡萄糖胺(D-glucosamin)二糖类的重复二聚体,二者以木糖残基在肽链上与丝氨酸(Serine)残基形成 O-糖苷键而共价连接于糖蛋白核心蛋白上,形成硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(Heparan sulfate proteogly-

cans, HSPGs), 核心蛋白穿越脂质双层或通过葡萄糖磷脂酰肌醇与脂质双层结合,如成纤维细胞和上皮细胞的质膜中一种称为联合素的蛋白聚糖,它是细胞外基质的受体蛋白,其核心蛋白穿膜,细胞外区连有 HS,细胞内区与肌动蛋白丝相接^[6,7]。同一机体不同组织或不同机体的相同组织中 HS 含量和硫酸化程度及位点都不同。

由于肝素(Heparin)与 HS 的糖基基本相似,大部分研究都利用肝素来分析 HS 在病毒感染过程中的作用。和 HS 相比,肝素的硫酸化程度比较高,而乙酰化程度比较低。肝素是由糖醛酸和葡萄糖胺连接起来的重复二糖单位组成的多糖链混合物。含 10~30 个二糖单位不等,分子量 4000~20000,平均分子量 12000。2-O-硫酸- α -L 艾杜糖醛酸及 6-O-硫酸-N-硫酸- α -D 葡萄糖胺是其中的主要单糖,由其组成的三硫酸二糖的重复单位构成了肝素的所谓“规则区”,是肝素结构的主要部分,另外的单糖残基,如 α -L-艾杜糖醛酸、6-O-硫酸-N-乙酰- α -D 葡萄糖胺、 β -D 葡萄糖醛酸及 3-6-双-O-硫酸-N-硫酸- α -D 葡萄糖胺以很低的频率出现于“非规则区”。一定数目的 6 位无硫酸化的葡萄糖胺及 2-O-硫酸- α -D 葡萄糖醛酸的存在,使得肝素中出现了 10 种不同的单糖(4 种糖醛酸和 6 种葡萄糖胺),从而使得肝素的整个结构变得异常复杂。到目前为止,肝素和 HS 的精确结构还不清楚。肝素酶(Heparinase)是一种内切糖苷酶,能够作用于 HS 或肝素的 2-O-艾杜糖酸处使其降解,因此,肝素酶也被大量应用于病毒细胞受体 HS 的相关研究^[8]。

生理条件下 HS 碳链上的 N-硫酸根和 O-硫酸根基团使糖链带有大量的负电荷,这一硫酸化的多糖序列结构不但赋予了 HSPGs 的阴离子特征和高密度的负电荷,而且也使 HSPGs 具备了能与包括病毒在内的其他细胞外物质相互作用的能力^[9]。病毒与靶细胞表面受体的相互作用是建立感染的首要步骤。第一个被证明以 HS 作为受体的病毒是单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)1 型和 2 型,研究人员发现 HSV 与多种培养细胞的结合是通过 HS 介导的,证据是这种结合能被肝素酶所阻断^[10]。1993 年,Compton 等发现人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV) 囊膜上的粘附蛋白先与细胞表面的硫酸乙酰肝素结合才可以进一步进入细胞,

而且 HCMV 能被吸附于肝素-琼脂糖亲和层析柱上^[11]。后来, 研究表明许多病毒均可利用 HS 作为受体或共受体入侵细胞, 如疱疹病毒首先和细胞膜上的 HS 结合, 然后才是与膜上的第二受体结合并导致病毒囊膜与质膜的融合使病毒进入细胞。1996 年, Jackson 等^[12]发现口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 能利用细胞膜上的 HS 作为细胞受体, 其实验证据是: 1) FMDV 与培养细胞的结合可被肝素特异阻断; 2) 以肝素酶处理后的细胞与 FMDV 作用后, 其蚀斑的形成明显减少; 3) FMDV 不能感染 HS 缺陷型的细胞。

2 硫酸乙酰肝素介导口蹄疫病毒感染

FMDV 属小 RNA 病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*), 呈球形, 无囊膜。衣壳是由 4 种结构蛋白(VP1、VP2、VP3 和 VP4)组成的 60 个不对称原粒构成的二十面体, 其中 VP1、VP2 和 VP3 位于衣壳表面, VP4 则完全位于衣壳里面。病毒粒子表面的特征是由 VP1 140-160 位的 β G 和 β H 链形成的 G-H 环突出于表面, G-H 环含有高度保守的 RGD 基序。FMDV 有七个血清型, 分别为 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3, 每种血清型包括多个亚型, 各型之间无交叉反应性。已经发现的 FMDV 受体有两类: 整联蛋白(Integrin)和 HS^[13]。整联蛋白分子可与含有 RGD 基序的蛋白配体结合, 研究发现至少有 $\alpha\beta 3$ 、 $\alpha\beta 6$ 、 $\alpha\beta 1$ 、 $\alpha\beta 8$ 四种整联蛋白能与 G-H 环上的 RGD 基序作用介导口蹄疫病毒的感染, 不同的病毒血清型表现出对不同整联蛋白的利用效率不同^[14]。许多实验表明 HS 对 FMDV 来说可能是一种替换受体, 或是该病毒感染进入细胞的一种旁路途径^[15]。

HS 最初被认为是某些 O 型 FMDV 株进入细胞的共受体。后来发现一些其他血清型(如 A、C、Asia1、SAT1)的 FMDV 也可结合 HS^[16]。Jackson 等曾经认为 HS 是病毒与细胞结合的第一步, 其后是病毒与整联蛋白分子作用^[12]。遗憾的是, 由于 FMDV 不同毒株可以使用不同种类的受体, HS 与整联蛋白之间究竟存在何种功能关系到目前尚无证据。如对 O1 Compos 毒株的两个变异株(vCRM4 和 vCRM8)分析发现, vCRM4 毒株在细胞上形成较小的噬斑, 对牛无感染力, 能与肝素结合, 不能在 HS 缺陷的细胞中复制, 而且即使该细胞能够表达 $\alpha\beta 3$

也是如此; vCRM8 毒株可形成大的噬斑, 对牛有较强的感染力, 不能与肝素结合, 只能感染表达 $\alpha\beta 3$ 的细胞。

FMDV 结合 HS 和整联蛋白的快速转换在病毒的致病机理中扮演什么角色? 尽管与 HS 高度吸附的 FMDV 在培养细胞中病毒增殖较快, 但是对牛的致病力较弱, 而且, 与 HS 结合的病毒感染牛后产生了强毒力的毒株, 且该毒株再次失去了与 HS 的结合能力。这些结果显示, 与 HS 的高度结合不利于 FMDV 在动物体内的生存繁殖^[17]。尽管还不清楚 FMDV 野毒株是否与 HS 有较低的亲和力, 但可以肯定的是细胞表面有效受体的浓度是结合 FMDV 的关键。我们预测 FMDV 与 HS 受体较低的亲和力能够增加 FMDV 通过整联蛋白介导的感染力, 在感染的动物体内, FMDV 是否可以通过与 HS 结合来感染特定的组织仍待进一步研究阐明^[18]。

研究表明, 小核糖核酸病毒科的成员普遍具有高度的变异性, 它们变换几个甚至一个衣壳表面蛋白的氨基酸残基, 就可以结合不同的受体。当 FMDV 衣壳外表面只有一个或两个氨基酸残基发生变化, 使其所带正电荷增加时, FMDV 结合 HS 的能力会明显提高。如 O 型 FMDV 田间株 VP3 第 56 位具有组氨酸(Histamine)残基, 在细胞中传代时会转变为精氨酸(Arginine), 随之形成了高亲和力的硫酸乙酰肝素结合位点, 从而导致了病毒受体由整联蛋白到 HS 的转变^[17]。单个氨基酸的改变引发了病毒吸附 HS 的能力改变, 这提示人们, 在带有 60 个结合位点的二十面体病毒粒子上与 HS 存在多个作用位点, 从而放大了病毒单个氨基酸序列改变引起的受体转换效应。

两个细胞培养适应的毒株 O1BFS 和 A10 与 HS 相互作用的晶体结构已被解析, 在两个复合物中 HS 的结合位点由原粒中央的浅窝形成, 这一点与心病毒的受体结合位点相似^[19]。这两个模型揭示病毒粒子表面的一个结合位点可以与 4-5 个糖基结合, 这在 O1BFS 和 A10 两种血清型病毒几乎是相同的。与病毒相连的糖基是完全硫酸化的, 它们大约与病毒的 3 个主要结构蛋白(VP1、VP2、VP3)的 9 个氨基酸残基相连。该位点同时也是 FMDV 5 个抗原位点中的一个(位点 4)。与没有配基的病毒结构比较, 病毒与 HS 结合并没引起病毒构象的改变。病毒 VP3 的 56 位精氨酸占有病毒与硫酸基团相互作用的关

键位置(见图 1), 当 O1BFS 病毒适应到培养细胞后, VP3 第 56 位的氨基酸由原来的组氨酸转变为精氨酸。第二个与 HS 相连的残基为 VP2 135 位的精氨酸, 该残基在 O1BFS 和 A10 是保守的, 它通过水分子与 HS 二糖相互作用并起辅助作用, 其他与 HS 连接的氨基酸残基在两种病毒并不是保守的。尽管组成该结合位点的氨基酸大部分是不同的, 但 HS 与

病毒结合的结构在两种病毒是保守的, 这提示这个位点与 HS 结合有其保守性和生物学优势^[20]。对 C 型 FMDV 的进一步研究发现, 在衣壳的不同位置有残基与 HS 作用, 说明在 C 型病毒可能不止有一类结合位点^[18]。我们认为 O 型与 A 型病毒与 HS 复合物晶体结构的相似性提示该结合位点对病毒的繁殖起重要作用, 也许与 FMDV 的持续感染有关。

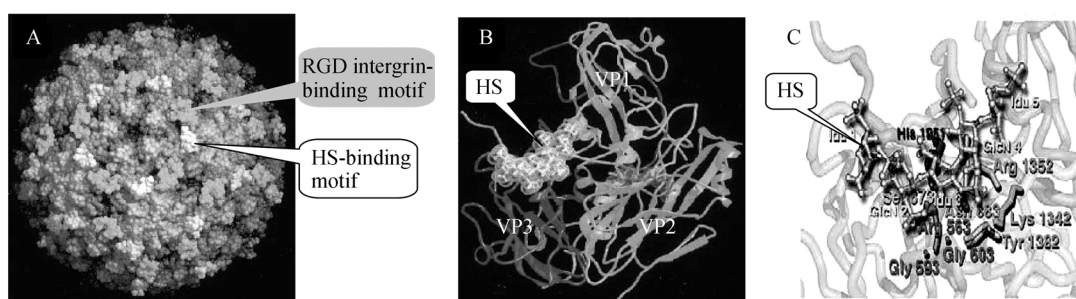


图 1 FMDV 与 HS 受体相互作用示意图

Fig. 1 Schematic diagram of interaction between FMDV and HS

A: FMDV 受体吸附位点模式; B: HS 与结构蛋白 VP1、VP2、VP3 作用模式; C: B 图的局部放大

A: Receptor-binding site of FMDV; B: Interaction of HS and VP1, VP2, and VP3; C: Partial amplification of B diagram

另有实验证实, VP1 C 末端 201-211 位的氨基酸可能参与了病毒与细胞的吸附过程^[21]。用赖氨酸特异的内切蛋白酶处理将这些氨基酸残基选择性缺失后, 发现病毒粒子不能再与细胞相互作用。这个区域到底是与 HS 还是整连蛋白作用是不清楚的。VP1 C 末端 201-211 位区段的序列与玻连蛋白的肝素结合位点相似, 提示该区段可能与 HS 相互作用。然而, FMDV 与 HS 复合物的晶体结构显示, 情况并非如此。毒株 O1BFS 和 A10 VP1 195 位的组氨酸和 193 位的赖氨酸分别与 HS 相连, 推测 VP1 的 C 末端可能有助于这些残基与 HS 相互作用。晶体结构分析显示, FMDV 的 HS 结合位点大约在离 RGD 基序约 15Å, 二者在空间位置上彼此靠近, 提示整联蛋白与 HS 受体可能同时与 FMDV 结合。是否所有的 FMDV 均是这种情况有待验证。

3 小结

病毒与受体的相互作用是一个非常复杂的过程。在发病的不同阶段, 病毒有可能利用不同的受体。从理论上讲, HS 序列的多样性将允许多种特异蛋白与其结合, 然而, 为何病毒或其他病原却存在高度特异的识别位点呢? 病毒吸附蛋白与 HS 受体

之间识别的分子基础又是什么呢? 这些问题有待我们深入研究。FMDV 除了可利用整联蛋白和 HS 作为受体外, 有人又提出了 FMDV 存在第三类受体的假设。如 Baxt 等^[22]发现 FMDV 可利用 Fc 受体吸附巨噬细胞; Rieder 等利用基因重组将一种能与病毒结合的单链抗体(single-chain antibody, scAb)与细胞粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM 1) 融合, 产生了一种新的 FMDV 受体(scAb/ICAM1)^[23], FMDV A₁₂ 能够感染表达这类替代受体的 CHO 细胞, 但不能感染正常的 CHO 细胞。Zhao 等用 FMDV A₁₂ 感染性克隆与 O/CHA/90 及其细胞适应株 vac-O/CHA/90 的 cDNA 构建嵌合病毒, 当将 RGD 人工突变为 KGE 后, 在排除利用 HS 的情况下嵌合病毒仍可在培养细胞中生长^[24]; 另外一些已发现的 FMDV 细胞吸附位点的自然突变体有 GGD、TGD、RDD、PGD、KGN、RSG、KGD、IGD 等^[25]。由此推测存在第三类 FMDV 受体是完全有可能的。当然, 在研究 FMDV 的宿主嗜性时, 除了 FMDV 受体外, 还应该考虑病毒本身的原因。例如, 1997 年台湾的口蹄疫流行毒对猪的致病力高, 但不感染牛, 测序发现该毒株的 3A 蛋白缺失 10 个氨基酸, 反向遗传学技术证明了这种缺失与病毒对牛的

致病力减弱有一定关系^[26,27]。对在这个地区近 30 年流行的病毒进行分析表明,除了这样基因的缺失外,在缺失基因的周围区段引起的 3A 蛋白突变,同样对该表型有影响。由此可见,从病毒和其受体两个方面研究才有可能揭示造成病毒宿主嗜性差异的原因。FMDV 受体的研究除在理论上具有重要的意义外,也有非常重要的应用价值。从理论上阐明 FMDV 受体的结构及其在 FMDV 感染宿主细胞过程中所起的作用,便可以根据配体与受体结合的原理,及配体、受体分子的结构与性质,设计相应的化学药物以阻断 FMDV 与宿主细胞的结合,从而为预防和控制口蹄疫提供新的思路和线索。

参 考 文 献

- [1] Schneider-Schaulies J. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*, 2000, **81**(Pt6): 1413–1429.
- [2] Dimitrov DS. Cell biology of virus entry. *Cell*, 2000, **101**(7): 697–702.
- [3] Mettenleiter C. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Res*, 2002, **82**(1-2): 3–8.
- [4] Imberty A, Lortat-Jacob H, Perez S. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr Res*, 2007, **342**(3-4): 430–439.
- [5] Spillmann D. Heparan sulfate: Anchor for viral intruders? *Biochimie*, 2001, **83**: 811–817.
- [6] Ledin J, Staatz W, Li JP, *et al.* Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J Biol Chem*, 2004, **279**(41): 42723–42741.
- [7] Kreuger J, Spillmann D, Li JP, *et al.* Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol*, 2006, **174**(3): 323–327.
- [8] Vlodavsky I, Ilan N, Naggi A, *et al.* Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. *Curr Pharm Des*, 2007, **13**(20): 2057–2073.
- [9] Bernfield M, Gotte M, Park PW, *et al.* Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Ann Rev Biochem*, 1999, **68**: 729–777.
- [10] Spear PG. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Semin Virol*, 1993, **4**: 167–180.
- [11] Compton T, Dawn M. Initiation of human cytomegalovirus infection require initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 1993, **193**(2): 834–841.
- [12] Jackson T, Ellard M. Efficient infection of cells in culture by type O Foot-and-Mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 1996, **70**(8): 5282–5287.
- [13] Jackson T, King AM, Stuart DI, *et al.* Structure and receptor binding. *Virus Res*, 2003, **91**(1): 33–46.
- [14] 独军政, 常惠芸, 高闪电, 等. 整联蛋白与口蹄疫病毒感染. *微生物学通报*, 2007, **34** (5): 960–964.
- [15] Baranowski E, Sevilla N, Verdaguer N, *et al.* Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 1998, **72**(8): 6362–6372.
- [16] Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Sevilla N, *et al.* Cell recognition by foot- and -mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility inaphthovirus receptor usage. *J Virol*, 2000, **74**(4): 1641–1647.
- [17] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, *et al.* Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol*, 1997, **71**(7): 5115–5123.
- [18] Fry E, Lea SM, Jackson T, *et al.* The structure and function of a foot-and-mouth disease virus- oligosaccharide receptor complex. *EMBO J*, 1999, **18**(3): 543–554.
- [19] Luo M, Vriend G, Kamer G, *et al.* The atomic structure of mengo virus at 3.0 Å resolution. *Science*, 1987, **235**(4785): 182–191.
- [20] Escarmis C, Carrillo EC, Ferrer M, *et al.* Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-andmouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J Virol*, 1998, **72**(12): 10171–10179.
- [21] Fox G, Parry NR, Barnett PV, *et al.* Cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine -/glycine-/aspartic acid). *J Gen Virol*, 1989, **70**(3): 625–637.
- [22] Baxt B, Mason PW. Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell cultures following Fc receptormediated adsorption. *Virology*, 1995, **207**(2): 503–509.
- [23] Rieder E, Berinstein A, Baxt B, *et al.* Propagation of an attenuated virus by design: engineering a novel receptor for a noninfectious foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(19): 10428–10433.
- [24] Zhao QZ, Pacheco JM, Mason PW. Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in Animals. *J Virol*, 2003, **77**(5): 3269–3280.
- [25] Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, *et al.* Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2005, **79**(10): 6487–6504.
- [26] Knowles NJ, Davies PR, Henry T, *et al.* Emergence in Asia of foot-and-mouth diseaseviruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *J Virol*, 2001, **75**(3): 1551–1556.
- [27] Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, **74**(2): 987–991.