

p11对神经细胞自噬的影响及其作用机制

冯来鹏^{1,2,3} 郭继强^{1,2,3} 杨婷婷^{1,2,3} 沈颖^{1,2,3} 王辉^{1,2,3*}

(¹新乡医学院免疫学研究中心, 新乡 453000; ²河南省分子诊断与医学检验技术协同创新中心, 新乡 453000;

³河南省免疫与靶向药物重点实验室, 新乡 453000)

摘要 该研究主要探讨p11(又称为S100A10)蛋白质对神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)和小鼠海马细胞自噬的影响及其作用机制。该文利用p11过表达质粒pcDNA3.0-p11和*p11*基因敲低质粒Si-p11分别转染至SH-SY5Y内, 24 h后提取其蛋白质和总RNA测其自噬相关基因的mRNA和蛋白质水平; 利用C57BL/6J小鼠腹腔注射丙咪嗪, 来上调小鼠海马p11的表达水平, 然后提取其海马组织的蛋白质和总RNA测其自噬相关基因的表达情况。该研究结果显示, *p11*基因过表达对神经细胞自噬发挥下调作用, *p11*敲低后对自噬发挥上调作用; *p11*基因敲除小鼠的海马细胞的自噬是上调的, 海马细胞p11高表达后自噬是下调的。因此认为, p11对于神经细胞自噬有可能发挥下调作用。

关键词 基因敲低; 转染; 基因敲除; 丙咪嗪; C57BL/6J

The Role of p11 in Nerve Cells Autophagy and Its Underlying Mechanism

Feng Laipeng^{1,2,3}, Guo Jiqiang^{1,2,3}, Yang Tingting^{1,2,3}, Shen Ying^{1,2,3}, Wang Hui^{1,2,3*}

(¹Research Central for Immunology, School of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China;

²Henan Province Molecular Diagnostics and Medical Laboratory Technology Collaborative Innovation Center, Xinxiang 453000, China;

³Henan Province Key Laboratory of Immunization and Targeted Drugs, Xinxiang 453000, China)

Abstract This study is to explore the effect of p11 (also known as S100A10) on the autophagy of both neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) and mouse hippocampal cells and its mechanism. Both the plasmid of over-expression of *p11* (pcDNA3.0-p11) and the plasmid of gene knockdown of *p11* (Si-p11) were transfected into SH-SY5Y. Then after 24 h, total protein and RNA of SH-SY5Y were extracted which were measured the expression of autophagy-related genes mRNAs and proteins. Then, C57BL/6J mice were injected imipramine into abdominal cavity to raise the expression level of p11 in hippocampus. The protein and RNA of hippocampus in injected C57BL/6J mice were extracted to detect the expression of autophagy-related genes. The results of the cell-experiments showed that the overexpression of *p11* had a down-regulation effect on autophagy of nerve cells, and gene knockdown of *p11* had an up-regulation effect on autophagy of nerve cells. The autophagy of hippocampal cells in mice without *p11* was up-regulated, and the autophagy of hippocampal cells in mice with p11 overexpression was down-regulated. Therefore, we believe that p11 may play a down-regulated role in the autophagy of nerve cells.

Keywords knockdown; transfection; knock out; imipramine; C57BL/6J

收稿日期: 2017-06-23 接受日期: 2017-11-09

国家自然科学基金(批准号: 30670910)和新乡医学院研究生科研创新支持计划项目(批准号: YJSCX201604Z)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13782552962, E-mail: wanghui@xxmu.edu.cn

Received: June 23, 2017 Accepted: November 9, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30670910) and Scientific Research Innovation Program for Postgraduates of Xinxiang Medical University (Grant No.YJSCX201604Z)

*Corresponding author. Tel: +86-13782552962, E-mail: wanghui@xxmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-01-05 17:45:31 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180105.1745.010.html>

p11又称为S100A10, 是S100家族的成员, 广泛分布于小鼠大脑、胃肠道、肾、肝、肺、脾和胸腺等部位^[1]。随着研究的不断深入, 发现p11的缺失可促进抑郁的产生^[2], 并有可能参与IFN- α 诱导的抑郁^[3]。抗抑郁药可以调控大脑自噬, 说明抑郁病人神经系统自噬功能有可能是异常的^[4]。p11可以调控actin的结构, 敲除*p11*, 细胞的actin结构受到严重制约^[5]。究其原因, 是因为p11是肌动蛋白的组织应力纤维所必需的, 并且它可以促进细胞极化和扩散^[6]。Annexin A2和p11通常以四聚体的形式发挥作用, 它们一起可以促进血纤维蛋白酶的激活和促进瘤的形成等^[7-8]。Annexin A2通过酪氨酸激酶和actin结合后再与细胞膜偶联, 在细胞内吞作用和细胞极化中发挥作用^[9]。随着研究的不断深入, 有人发现, 转录调控Annexin A2可以提高饥饿诱导的自噬, 这很有可能是通过JNK信号通路发挥作用^[10]。近年来又发现, 在绿脓杆菌感染中, Annexin A2通过Akt1-mTOR-ULK1/2信号通路调控自噬^[11], 那么p11与自噬有可能也是相关的。为了更加全面地阐明*p11*基因在神经细胞自噬中的作用和机制研究, 本研究利用*p11*敲除小鼠研究*p11*敲除或过表达对神经细胞和小鼠海马自噬功能变化的影响及其相关分子机制。

根据吞噬物进入溶酶体的途径不同将自噬分为3类: 巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)及分子伴侣介导的自噬(chaperone mediated autophagy, CMA)^[12]。其中, 研究得较为充分的巨自噬可以被压力诱导激活^[13-14]。神经元自噬通路的失调可能导致抑郁症^[15]。本研究运用转染试剂分别将质粒*p11*敲低质粒Si-p11和*p11*过表达质粒pcDNA3.0-p11转染至SH-SY5Y细胞, Western blot法检测诱导细胞自噬对p11蛋白质水平, 研究p11蛋白质水平变化与细胞自噬之间的关系。而研究自噬通常有2个蛋白质指标, 分别是p62和LC3II/I。其中, p62有2个结构域, UBA(ubiquitin-associated domains)和LIR(LC3-interacting region), 通过其LIR区域, p62可以和LC3结合进而促进选择性自噬^[16-17]。LC3I存在于细胞质中, LC3II是一种膜结合蛋白, 存在于自噬体的膜内和膜外, 自噬发生时, LC3I的一部分可以转换成LC3II^[18]。

丙咪嗪(imipramine, IMI)是临床上治疗抑郁症的常规用药, 有文章报道, 丙咪嗪可以提高小鼠海马p11的表达^[19]。借此, 我们将利用本实验已有的*p11*基因敲除的小鼠以及建立小鼠海马p11过表达模型

来研究p11过表达小鼠海马自噬的情况, 另外, 我们通过将pcDNA3.0-p11和Si-p11质粒转染至SH-SY5Y来研究p11是否参与神经细胞的自噬。

1 材料与方法

1.1 材料

SH-SY5Y细胞和表达p11的重组质粒pcDNA3.0均为本课题组保存。DMEM高糖培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司。胰蛋白酶、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE蛋白质上样缓冲液、SDS-PAGE电泳液以及Western blot转膜液购自上海碧云天生物技术有限公司。总蛋白提取试剂盒购自凯基生物技术股份有限公司。Trizol购自TaKaRa公司。反转录试剂盒和PCR Mix购自TOYOBO公司。鼠源 β -actin、兔源p62抗体、p11抗体、LC3抗体、羊抗鼠及羊抗兔二抗购自Proteintech公司。PVDF膜和ECL化学发光液购自Milipore公司。丙咪嗪购自中海威公司。Lipo 2000购自Invitrogen公司。SiRNA duplex购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 利用CRISPR/CAS9技术建立*p11*基因敲除小鼠, 本研究用的为*p11*第二外显子缺失7个碱基对的“ $\Delta 7$ 小鼠”。小鼠基因背景为C57BL/6J, 由美格生物科技提供, 小鼠均维持在SPF级的饲养环境。小鼠长到8周以后, WT和 $\Delta 7$ 小鼠各取7只, 提取海马组织, 用液氮研磨, 加1 \times Tricine上样缓冲液, 99 $^{\circ}$ C金属浴10 min, 上样10 μ L, Western blot测定p62、LC3、p11、actin蛋白质水平。本文中所有小鼠实验均经过新乡医学院伦理委员会批准。

1.2.2 给药 将14只野生型C57BL/6J小鼠分为IMI和PBS两组, 每组7只。IMI组注射丙咪嗪(华中海威), 用量20 mg/kg。PBS组注射PBS, 用量同上, 每天上午10点注射, 注射21 d。

1.2.3 海马组织蛋白和基因的检测 给药21 d后提取其海马组织的蛋白质和mRNA, Western blot检测p62、LC3、p11、actin蛋白质水平, Real-time PCR检测*p11*、*GAPDH* mRNA水平。

1.2.4 细胞培养 SH-SY5Y细胞用含10%胎牛血清的DMEM, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.5 质粒转染 将pcDNA3.0、Si-p11、pcDNA3.0-p11质粒分别转染至培养在24孔板的SH-SY5Y细胞中, 5 h后换成完全培养基。

1.2.6 Real-time PCR检测 细胞培养48 h后, 吸取其培养基, 用PBS清洗2遍, 加1 mL Trizol, 呈“十”字晃动24孔板, 显微镜下观察细胞全部处于漂浮状态, 然后转移至1.5 mL无RNA酶EP管中, 置于冰上, 加入200 μ L氯仿, 在振荡仪上振荡5~10 s, 静置10 min, 之后12 000 r/min离心10 min, 吸取上清400 μ L, 转移至另外的无RNA酶EP管中, 加入等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}$ C放置30 min。从-20 $^{\circ}$ C取出再次12 000 r/min离心30 min, 观察沉淀, 用枪吸出液体, 加入75%酒精清洗2遍, 12 000 r/min离心5 min, 吸去上清液, 37 $^{\circ}$ C放置5 min, 使乙醇挥发, 加入10 μ L DEPC水, 溶解沉淀, 配制1.2%琼脂糖凝胶, 有条带出现, 然后用TOYOBO试剂盒逆转录, 最后7500 Fast Real-Time PCR System进行Real-time PCR。引物见表1。

1.2.7 Western blot检测 细胞增殖达到80%~90%汇合时, 弃去培养基, 冷PBS漂洗2遍, 加入1 \times Tricine上样缓冲液100 μ L, 刮下细胞后放入1.5 mL无酶离心管中, 煮沸变性10 min。蛋白质样品于10% Tricine-SDS-PAGE分离胶、4% Tricine-SDS-PAGE

浓缩胶进行电泳, 湿转法转膜, 5%脱脂牛奶封闭2 h, 一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗膜3遍, 二抗室温孵育1.5 h, TBST洗膜3遍, 加ECL发光试剂发光。

1.3 统计处理

采用Graphad Prism 6.0软件进行t检验和单因素方差分析。各实验独立重复3次, 数据以均数 \pm 标准差表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *p11*敲除对小鼠海马组织p62表达的影响

Western blot结果(图1)显示, *p11*敲除的小鼠p11明显下调, p62也明显下调。p62是自噬的一个敏感指标, 有2个蛋白质结构域, 分别是UBA和LIR, 通过其LIR区域, p62可以和LC3结合, 进而促进选择性自噬^[16-17], 说明*p11*敲除的小鼠海马细胞的自噬受到了影响。

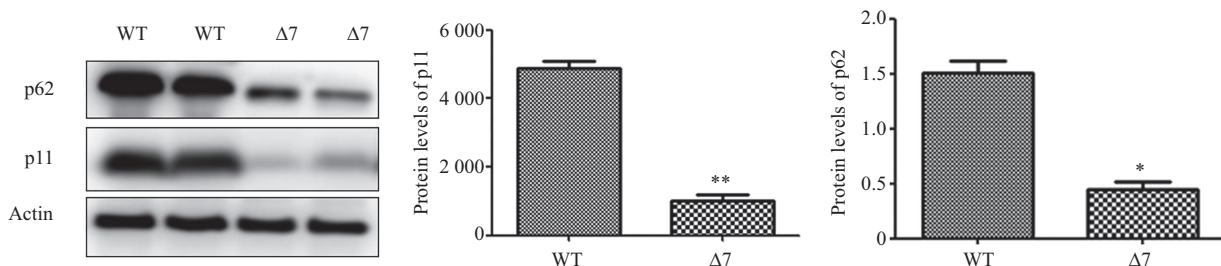
2.2 小鼠海马组织p11高表达对p62表达的影响

已有文献报道, 丙咪嗪(20 mg/kg)腹腔注射21 d可以提高小鼠海马p11的表达^[19]。我们将14只9周龄

表1 实时定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequence used for Real-time PCR

基因	引物序列(5'→3')
Gene	Primer sequence (5'→3')
<i>H-GAPDH</i>	F: GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT R: GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG
<i>H-p11</i>	F: GGC TAC TTA ACA AAG GAG GAC C R: GAG GCC CGC AAT TAG GGA AA
<i>H-PI3K</i>	F: TAT TTG GAC TTT GCG ACA AGA CT R: TCG AAC GTA CTG GTC TGG ATA G
<i>M-GAPDH</i>	F: AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG R: TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA
<i>M-p11</i>	F: TGG AAA CCA TGA TGC TTA CGT T R: GAA GCC CAC TTT GCC ATC TC

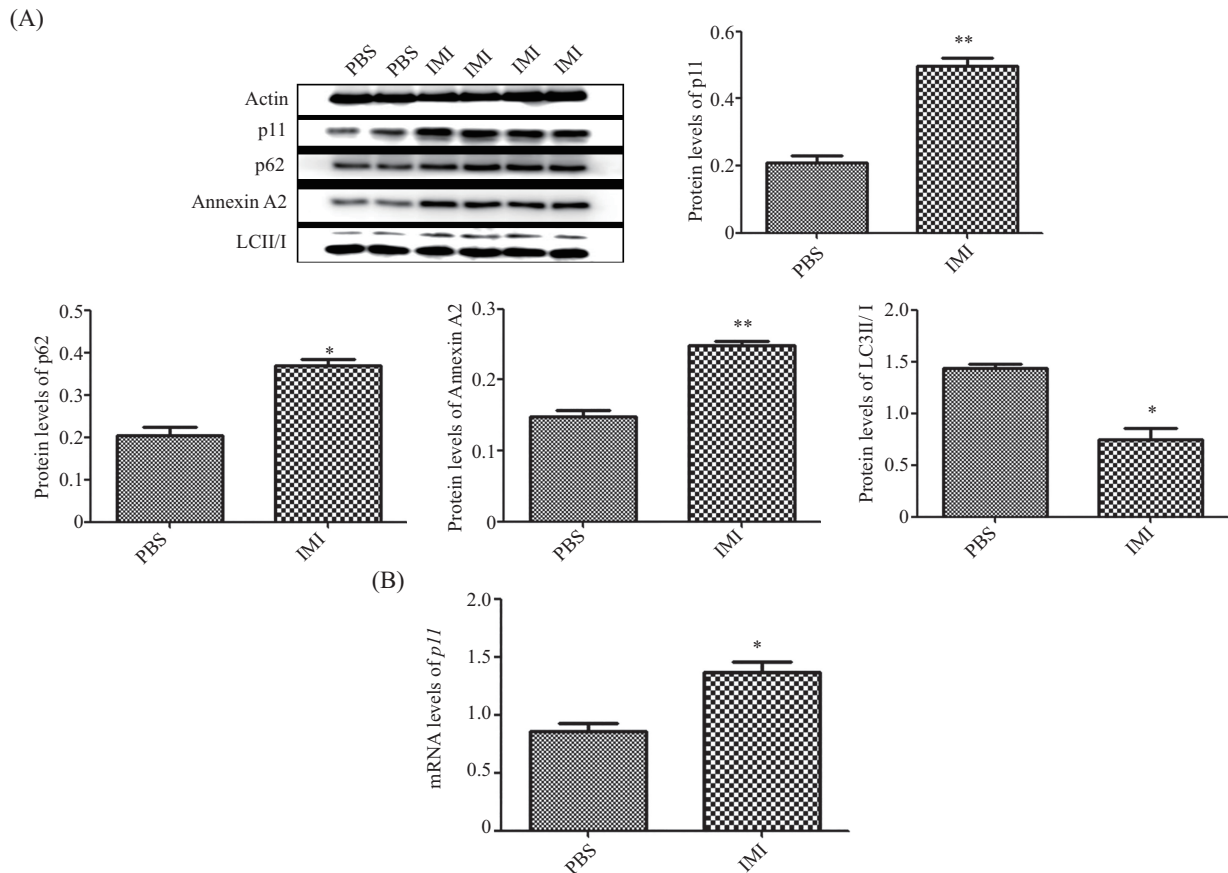


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与WT组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT group.

图1 小鼠*p11*基因敲除后海马细胞p62、p11蛋白的表达水平

Fig.1 p62, p11 expression levels of hippocampal cells in mice with *p11* knock out



A: p11高表达后, 海马细胞p62、p11、LC3II/I、Annexin A2蛋白的表达水平; B: p11高表达后, 海马细胞*p11* mRNA的水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与PBS组比较。

A: p62, p11, LC3II/I, Annexin A2 expression level of hippocampal cells in mice with p11 overexpression; B: *p11* mRNA level of hippocampal cells in mice with *p11* overexpression; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS group.

图2 p11蛋白高表达后对小鼠海马自噬的影响

Fig.2 The autophagy of hippocampal cells in mice with p11 overexpression

小鼠平均分成2组, 每组7只。每天上午进行注射, 实验组注射丙咪嗪(20 mg/kg), 对照组注射PBS。注射21 d后, 取其海马组织, 液氮研磨, 3只提取其总蛋白质, 另外4只提取其总RNA。总RNA提取好以后, 立刻逆转录, cDNA于 -20°C 保存。Western blot结果显示, IMI组p11、p62、Annexin A2明显上调, LC3II/I下调(图2A), p11过表达以后, 自噬有可能是下调的。Real-time PCR结果所示, 实验组*p11* mRNA水平上调, 说明丙咪嗪有可能通过影响*p11*的转录来影响p11的表达(图2B)。

2.3 SH-SY5Y细胞系*p11*过表达对LC3II/I的影响

用DMEM培养SH-SY5Y细胞, 铺24孔板过后第2 d进行转染。pcDNA3.0、pcDNA3.0-p11分别转染后进行Real-time PCR, 另2个孔提取总蛋白质。Western blot结果显示, p11表达上调, p62没有明显变化, LC3II/I明显下调, 说明p11高表达后, 自噬是下调的(图3A)。

Real-time PCR结果显示, *p11* mRNA水平显著上调, *PI3K*水平显著上调, *mTOR*略微上调。*mTOR*是自噬抑制剂, 从这点来看, p11有可能通过*mTOR*抑制自噬(图3B)。

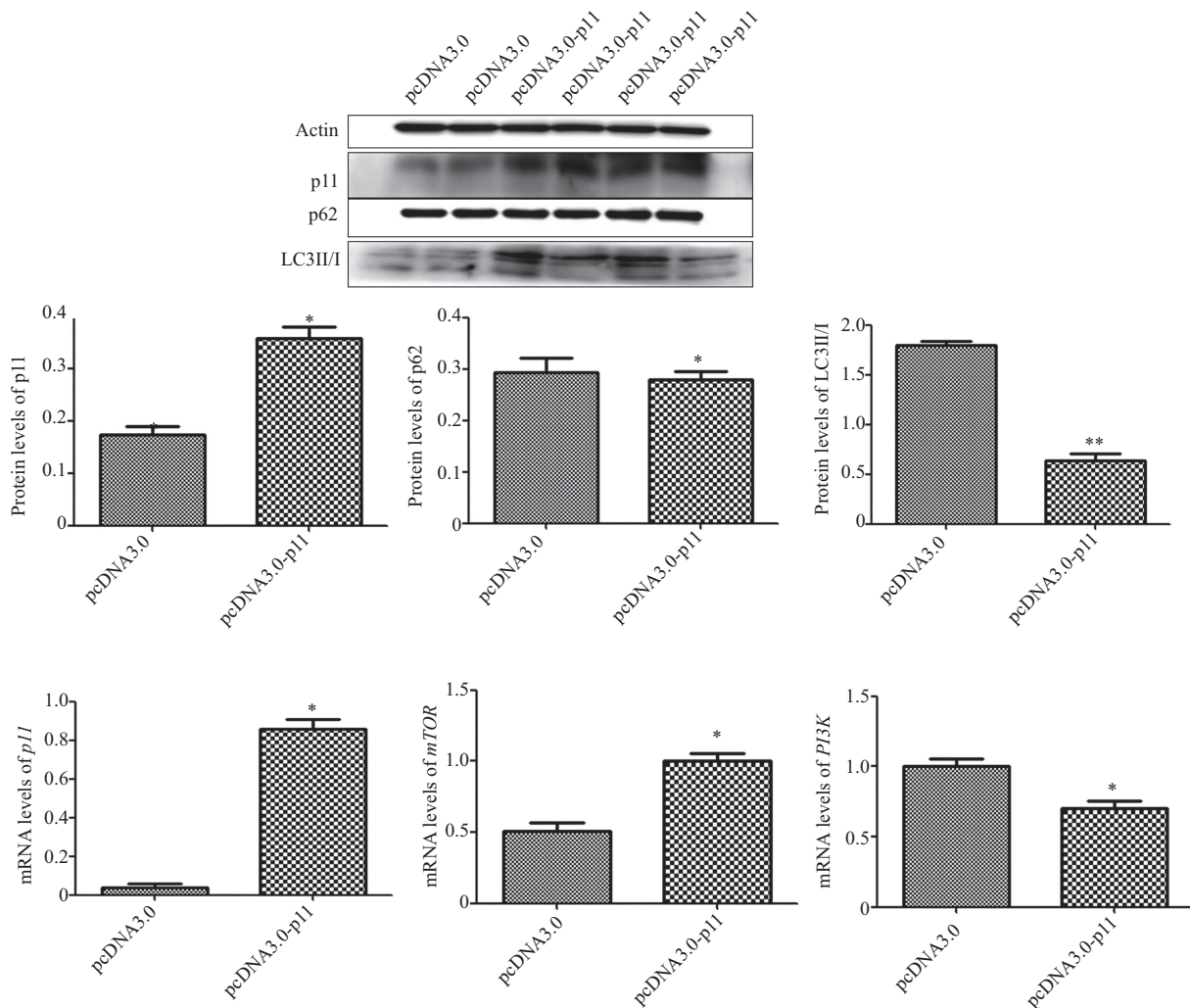
2.4 SH-SY5Y细胞系*p11*敲低后对LC3II/I的影响

用DMEM培养SH-SY5Y细胞, 铺24孔板过后第2 d进行质粒转染。pcDNA3.0、Si-p11分别转染4个孔, 5 h后换液, 42 h后每种质粒的1个孔换液, 换成无血清的培养基, 48 h后2个孔提取总RNA, 逆转录后进行Real-time PCR, 另2个孔提取总蛋白质用作Western blot。Western blot结果显示, p11、p62表达下调, LC3II/I明显上调, 说明*p11*敲低后, 自噬是上调的(图4), 但该图显示饥饿影响p11表达不明显。

3 讨论

近些年来, 自噬研究颇受重视, 自噬与多种疾

(A)



A: SH-SY5Y细胞中*p11*基因高表达后, p62、p11、LC3II/I蛋白的表达水平; B: SH-SY5Y细胞中*p11*基因高表达后, *p11*、*PI3K*、*mTOR* mRNA的水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与pcDNA3.0组比较。

A: p62, p11, LC3II/I expression levels of SH-SY5Y with *p11* overexpression; B: *p11*, *PI3K*, *mTOR* mRNA levels of SH-SY5Y with *p11* overexpression; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pcDNA3.0 group.

图3 *p11*基因高表达后对SH-SY5Y自噬的影响

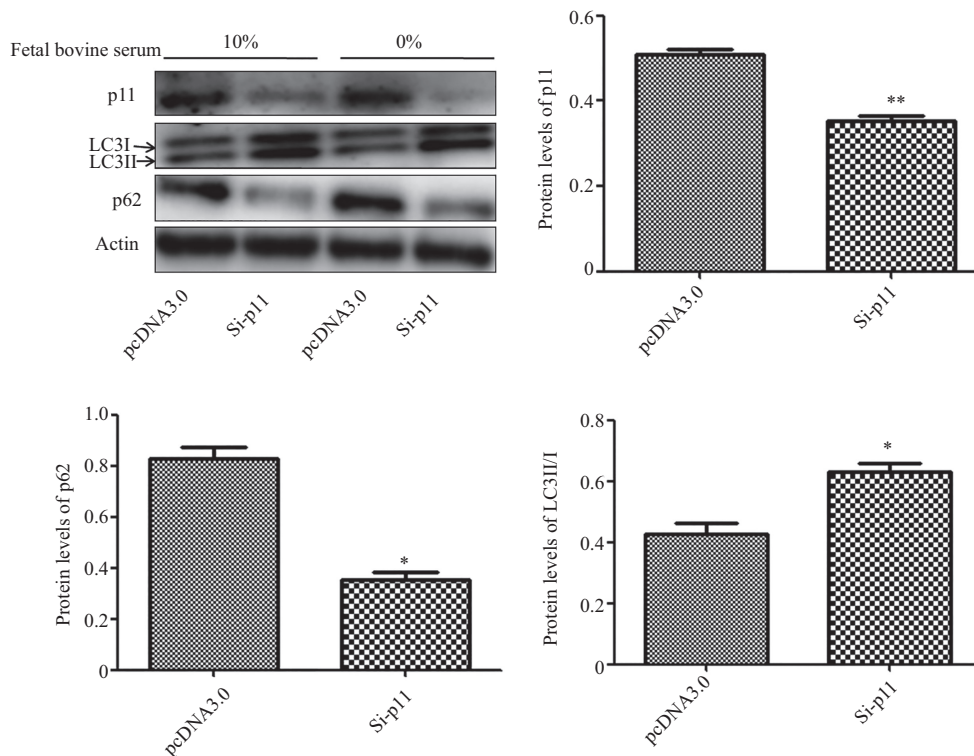
Fig.3 The autophagy of SH-SY5Y with *p11* overexpression

病相关, 比如一些神经退行性疾病^[20-21]、癌症^[22]等。本研究主要探讨p11对神经细胞自噬功能的影响。研究发现, *p11*基因敲低后, 与pcDNA3.0组比较, Si-p11组SH-SY5Y细胞的LC3II/I水平显著升高, p62蛋白质水平下调。p11过表达后, pcDNA3.0-p11较pcDNA3.0组, SH-SY5Y细胞的LC3II/I水平显著下调, p62蛋白质水平升高。这说明, *p11*基因敲低后细胞的自噬水平有可能升高, 而*p11*过表达后细胞的自噬水平下调。Western blot结果表明, p11与细胞自噬负相关。

Real-time PCR结果也显示, p11过表达后, 其*p11* mRNA水平明显升高。此外, 我们结合Real-time PCR其他指标(如*mTOR*、*PI3K*等)数据综合分析, p11

过表达后*PI3K*水平下调, *mTOR*水平上调。*mTOR*、*PI3K*是*PI3K*-*AKT*-*mTOR*信号通路上的关键分子, 而*mTOR*与自噬是负相关的, 所以我们猜测, p11可能通过*PI3K*-*AKT*-*mTOR*信号通路参与自噬并且发挥下调作用。然而, 其确切机制尚需深入的研究。自噬是一个复杂的过程, 受多种信号通路调控, 探究p11通过哪条信号通路影响自噬, 对优化自噬相关信号通路将会发挥巨大作用。

丙咪嗪是治疗抑郁症的常规用药, 对内源性抑郁症、反应性抑郁症及更年期抑郁症均有效, 也可用于小儿遗尿症, 但疗效均较慢, 然而, 其对精神分裂症伴发的抑郁状态无效。近期研究发现, 丙咪嗪可以提高小鼠大脑海马、副隔阂、大脑皮层p11的



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与pcDNA3.0组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pcDNA3.0 group.

图4 SH-SY5Y细胞p11基因敲低后, p62、p11、LC3蛋白的表达水平
Fig.4 p62, p11, LC3 expression levels of SH-SY5Y with p11 knockdown

表达。我们严格按照文献报道中所叙述的给小鼠腹腔注射丙咪嗪21 d后取其海马, 测其p11、LC3、Annexin A2和p62的表达情况, 结果显示, 注射丙咪嗪组p11表达显著上调, Annexin A2和p62也上调。我们推测, 丙咪嗪有可能通过Annexin A2来上调p11的表达, 进而影响细胞的自噬。p11作用的全面发现及其自噬信号通路的分子机制的探索, 将为p11在神经细胞自噬中的作用和机制研究提供新的思路。本研究探讨了p11对神经细胞自噬的作用, 但对于p11通过哪条信号通路影响自噬还需要进一步的探讨。

参考文献 (References)

- 1 Immer DB, Chaplin J, Baldwin A, Rast M. S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cell Mol Biol* 2005; 51: 201-14.
- 2 Svenningsson P, Kim Y, Warner-Schmidt J, Oh YS, Greengard P. p11 and its role in depression and therapeutic responses to antidepressants. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(10): 673-80.
- 3 Guo J, Zhang W, Zhang L, Ding H, Zhang J, Song C, *et al.* Probable involvement of p11 with interferon alpha induced depression. *Sci Rep* 2016; 6: 17029.
- 4 Jack J, Le WD. Molecular network of neuronal autophagy in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci Bull* 2015; 31(4): 427-34.
- 5 Jung MJ, Murzik U, Wehder L, Hemmerich P, Melle C. Regulation of cellular actin architecture by S100A10. *Exp Cell Res* 2010; 316(7): 1234-40.
- 6 Sayeed S, Asano E, Ito S, Ohno K, Hamaguchi M, Senga T. S100A10 is required for the organization of actin stress fibers and promotion of cell spreading. *Mol Cell Biochem* 2013; 374(1/2): 105-11.
- 7 Kwon M, Yoon CS, Jeong W, Rhee SG, Waisman DM. Annexin A2-S100A10 heterotetramer, a novel substrate of thioredoxin. *J Biol Chem* 2005; 280(25): 23584-92.
- 8 Bydoun M, Waisman DM. On the contribution of S100A10 and annexin A2 to plasminogen activation and oncogenesis: an enduring ambiguity. *Future Oncol* 2014; 10(15): 2469-79.
- 9 Grieve AG, Moss SE, Hayes MJ. AnnexinA2 at the interface of actin and membrane dynamics: A focus on its roles in endocytosis and cell polarization. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 852430.
- 10 Moreau K, Ghislat G, Hochfeld W, Renna M, Zavodszky E, Runwal G, *et al.* Transcriptional regulation of Annexin A2 promotes starvation-induced autophagy. *Nat Commun* 2015; 6: 8045.
- 11 Li R, Tan S, Yu M, Jundt MC, Zhang S, Wu M. Annexin A2 regulates autophagy in pseudomonas aeruginosa infection through the Akt1-mTOR-ULK1/2 signaling pathway. *J Immunol* 2015; 195(8): 3901-11.
- 12 Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 2005; 118: 7-18.

- 13 Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005; 12 Suppl 2: 1542-52.
- 14 Yang ZF, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 124-31.
- 15 Abelaira HM, Reus GZ, Neotti MV, Quevedo J. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life Sci* 2014; 101: 10-4.
- 16 Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, *et al.* Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem* 2008; 283: 22847-57.
- 17 Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; 7: 279-96.
- 18 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19: 5720-8.
- 19 Ding Q, Li H, Tian X, Shen Z, Wang X, Mo F, *et al.* Zinc and imipramine reverse the depression-like behavior in mice induced by chronic restraint stress. *J Affect Disord* 2016; 197: 100-6.
- 20 Caccamo A, Ferreira E, Branca C, Oddo S. p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy. *Mol Psychiatry* 2017; 22(6): 865-73.
- 21 Moloudizargari M, Asghari MH, Ghobadi E, Fallah M, Rasouli S, Abdollahi M. Autophagy, its mechanisms and regulation: Implications in neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 2017; 40: 64-74.
- 22 Thuwajit C, Ferraresi A, Titone R, Thuwajit P, Isidoro C. The metabolic cross-talk between epithelial cancer cells and stromal fibroblasts in ovarian cancer progression: Autophagy plays a role. *Med Res Rev* 2017; doi: 10.1002/med.21473.
- 23 Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang X, Yacoubi E, *et al.* Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 2006; 311(5757): 77-80.