

# 植物转脂蛋白的抗病机制研究进展\*

谢万钦 王 喆\*\* 李翠凤\*\*\*

南开大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 天津 300071

**摘要** 植物受病原菌侵染后会诱导病程相关蛋白的表达, 抑制病原菌的生长和蔓延, 并产生系统性获得抗性。目前已确定的病程相关蛋白有14种, 植物转脂蛋白被列入其中。关于转脂蛋白的作用尽管已争论多年, 但其准确的生理功能及作用机制至今仍不十分明确。近年来人们将焦点集中在转脂蛋白抗性功能与机制的研究上。文中介绍了目前这一领域的研究进展, 并根据该室的研究结果, 提出钙调素可能参与植物转脂蛋白抗性功能的调节, 为全面阐明转脂蛋白的抗病机制提供了新的研究线索。

**关键词** 植物转脂蛋白 钙调素 抗菌肽 抗病机制 植物病程相关蛋白

Van Loon 等发现在病原物胁迫或其他病理条件下植物会合成一些蛋白质, 如葡聚糖酶、几丁质酶、过氧化物酶、及其他相关蛋白酶和蛋白酶抑制剂等。1994年人们将这些由病原物诱导产生的特异性蛋白质统称为病程相关蛋白(PRs)<sup>[1-3]</sup>。PRs不仅在感染部位积累抑制病原物的生长和蔓延, 而且与植物系统性获得抗性(SAR)的产生相关。此外, 植物为抵御病原菌的攻击和自我保护, 在遭受侵染后, 还能诱导产生一系列其他抗性物质, 抗菌肽(AMPs)即为其中一类。抗菌肽存在于大多数植物中, 已知的植物抗菌肽均含偶数个半胱氨酸残基(4, 6或8个), 它们两两配对形成分子内二硫键, 起到稳定结构的作用。根据氨基酸组成和序列的差异, 植物抗菌肽可分为不同的家族, 包括硫素(thionin)、防御素(defensin)、转脂蛋白(LTP)、hevein和knottin类抗菌肽等<sup>[4-6]</sup>。

受病原菌诱导而过量表达的硫素、防御素和转脂蛋白能不同程度特异性抑制各种病菌的生长, 因此, 1998年在第五届国际植物病程相关蛋白专题研讨会上将上述3种抗菌肽也列入PR家族并分别命名为PR-12(防御素)、PR-13(硫素)和PR-14(转脂

蛋白)<sup>[7]</sup>。目前已确定的PRs有14种(表1), 它们属于不同蛋白家族, 抗菌机制各不相同<sup>[8,9]</sup>。本文

表1 病程相关蛋白家族<sup>[7]</sup>

家族成员	代表成员	蛋白性质	基因编号
PR-1	Tobacco PR-1a	未知	<i>γpr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β-1,3-glucanase	<i>γpr2</i> , [ <i>Gns2</i> (' <i>Glb'</i> )]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, III, V, VI, VII	<i>γpr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>γpr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatin-like	<i>γpr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>γpr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin'</i> )
PR-7	Tomato P <sub>89</sub>	Endoproteinase	<i>γpr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>γpr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	Peroxidase	<i>γpr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley 'PR1'	Ribonuclease-like	<i>γpr10</i>
PR-11	Tobacco class V chitinase	Chitinase, type I	<i>γpr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>γpr12</i>
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Thionin	<i>γpr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>γpr14</i> , <i>Ltp</i>

2005-12-20 收稿, 2006-01-23 收修改稿

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30370733)

\*\* 现通讯地址: 香港科技大学生物化学系

\*\*\* 通讯作者, E-mail: licf@nankai.edu.cn

主要介绍植物转脂蛋白的抗病机制研究进展。同时,我们从中国大白菜中发现的钙调素结合蛋白BP-10是一种新的植物转脂蛋白以及拟南芥LTP1具有钙调素结合活性的研究结果,为阐明LTP抗性机制提供了新的研究线索和思路。

## 1 植物转脂蛋白的结构与功能

根据分子质量的不同,转脂蛋白家族分为两类即LTP1和LTP2,前者分子质量约为9—10 ku,后者分子质量约为7 ku。因目前对LTP2的研究很少,本文仅讨论LTP1。LTP是一类广泛存在于高等植物的碱性小分子蛋白,pI约为9,由91—95个氨基酸残基组成,缺乏色氨酸。分子组成中最重要的特点是含有8个位置高度保守的半胱氨酸,其分布模式为2/3-C-8-12/15-CC-19-C-1-C-21/23-C-13-4/8(其中C表示半胱氨酸,数字表示间隔的氨基酸残基数)。核磁共振、红外和Raman光谱分析表明LTP主要由4个 $\alpha$ -螺旋组成,螺旋间通过4对二硫键连接,形成非常稳定的结构,分子内有一个疏水空穴,可结合和容纳脂肪酸分子<sup>[10]</sup>(图1(a))。研究表明转脂蛋白N-端含有一个由21—27氨基酸残基组成的信号肽结构,为分泌型蛋白。关于LTP的功能和作用机制已争论多年,根据不同实验结果,几种假说相继被提出。首先,Kader等<sup>[11]</sup>认为LTP参与胞内磷脂的转运、生物膜的合成和胞内脂肪酸代谢库的调节。然而蛋白N-端信号肽的发现和胞外定位,使人们开始重新认识LTP。Pyee等<sup>[12,13]</sup>提出在角质层形成过程中LTP可能参与角质层单体的转运,并且在角质层和胞壁界面之间确实观察到了LTP的存在。最近,Carvalho等<sup>[14,15]</sup>通过免疫电镜和蔗糖密度梯度离心分析结果认为除细胞壁外,LTP还存在于胞内细胞器及与脂类代谢相关的区域如乙醛酸循环体和一些蛋白贮存颗粒中。因此,认为LTP可能至少存在两类异构体:一类存在于胞外,执行防御功能;另一类则位于胞内不同的区域,执行脂类转运等功能。近年来的研究表明LTP在植物防御机制中起重要作用<sup>[16-19]</sup>,它被病原菌诱导而过量表达,并能抑制病原菌的生长和诱导植物系统抗性的产生,也由此被命名为PR-14。例如,大麦LTP在转基因烟草和拟南芥中

的过量表达能显著增强植物对病原菌的耐受性<sup>[20]</sup>。目前,尽管LTP抗病机制的研究信息有限,但一些重要的实验结果仍为阐明其作用机制提供了新的依据。

## 2 LTP抗性机制的研究

### 2.1 LTP可能干扰了elicitins触发的植物细胞致死性过敏反应

当病原物侵染植物后,会分泌一些对其生理功能极为重要并能引发植物抗性的物质,这些物质被称作激发子(elicitor),包括蛋白质和一些小分子有机化合物。例如,一些真菌分泌的elicitins就是其中一类很独特的、具有固醇携带活性的蛋白质<sup>[21-24]</sup>。由于很多真菌不能合成对其生存必需的固醇类物质,因此,elicitins可能在宿主和真菌之间穿梭,将宿主的固醇类物质带回到病原菌,启动有性或无性繁殖。同时elicitins与固醇形成复合物后,与存在于植物细胞膜上的elicitins受体结合,引起植物细胞的过敏反应,从而激活植物体内的防御机制<sup>[25]</sup>。最近,Buhot等<sup>[17,26]</sup>的体内竞争实验首次证明了LTP能与细胞膜上的elicitins受体结合,这一发现无疑对揭示LTP的抗病机制有重要意义。

比较LTP和elicitins,两者似乎存在着某种很微妙的关系。elicitins的分子质量与LTP相近,约为10 ku,但与LTP没有序列上的同源性,6个位置保守的半胱氨酸残基成为elicitins的特殊标志,其形成3对二硫键稳定了分子的空间结构,并在分子内部形成一个能容纳固醇和脂肪酸分子的疏水穴。Blein等<sup>[18,26]</sup>认为LTP与elicitins之间虽没有序列同源性,但在空间结构上显著的相似性使它们能够竞争性结合相同的膜受体(图1(b))。由于两者与膜结合的方式不同产生不同的效应:elicitin-固醇复合物与受体结合后引起植物过敏细胞的死亡,而LTP则起到elicitins拮抗剂的作用,这种内源LTP和外源elicitins之间与同一受体的竞争性结合最终降低了植物细胞对elicitins的敏感性,抑制了细胞的死亡并诱导系统抗性的产生。目前这一假说受到广泛重视。

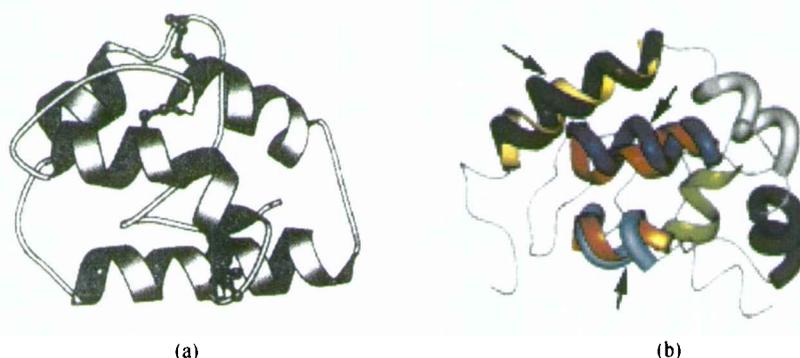


图1 LTP和 elicitins 的三维结构比较

(a) LTP的三维结构,黑点代表二硫键位置<sup>[4]</sup>; (b) elicitin (cryptogein)与小麦LTP1三维结构重叠图像,带状结构示小麦LTP1,管状结构示cryptogein,箭头指示两者重叠的 $\alpha$ 螺旋<sup>[17]</sup>

## 2.2 茉莉酸等脂类分子对LTP抗病作用的影响

脂类不仅是细胞的主要组成成分,而且一些脂类分子作为第二信使参与了动植物细胞功能的调节,在细胞信号转导中构成脂类信号通路.植物LTP分子中具有一个可容纳各类脂肪酸的可塑性疏水穴. Buhot等<sup>[27]</sup>研究了不同长度的脂肪酸(FA)、氧合脂类-茉莉酸(JA)及其前体亚麻酸(LA)对烟草LTP抗病功能的影响.受体竞争实验和脂结合分析结果表明,虽然LTP能与各类脂相结合,但惟有与JA的结合能显著增强LTP与质膜受体的特异性识别和亲和力.同时,用LTP-JA处理的烟草植物能显著提高抗病原物能力,而LTP-FA, LTP-LA复合物或LTP, LA及JA单独存在时均无上述效应.因此,他们首次提出LTP-JA复合物是LTP的生物活性形式,也是LTP和 elicitin-固醇复合物与质膜受体的竞争性结合形式.转脂蛋白与其特异性亲脂配基的协同作用是增强抗菌活性的关键因素. JA是不饱和脂肪酸亚麻酸在脂氧化酶的作用下生成的一种五元环氧合脂类.已经确认JA是植物应答各类损伤和病原物侵染产生的内源信号分子,参与了植物对各类胁迫的局部或系统性信号转导,但详细调节机制尚不清楚<sup>[21,28-30]</sup>.作为脂类信号分子的代表,JA与LTP的结合如何传递防御信息并引起植物系统性获得抗性已成为当前研究的热点.人们正在试图寻找LTP-JA复合物作为可移动信号引起植物远距离保护反应的实验证据.

## 2.3 LTP具有细胞毒性作用

作为抗菌肽,LTP除了通过可能的信号传递途

径以及参与角质屏障的形成来增强植物的防御机能外,自身也具有一定的真菌致死作用.最近Regente等<sup>[9]</sup>报道Ha-AP10(一种LTP)能通过改变细胞膜的通透性来杀死真菌,致死效应与使用剂量呈相关性,首次证明了LTP具有细胞毒性作用,也为合理解释LTP能直接抑制真菌生长提供了可靠的实验依据.研究发现,LTP的细胞毒性并不伤害植物细胞本身,说明LTP靶分子仅存在于真菌细胞膜上.Ge等<sup>[31,32]</sup>报道了水稻转脂蛋白LTP110的抗真菌活性,并对其保守氨基酸进行点突变,研究LTP110结构与抗真菌活性的关系,为LTP具细胞毒性作用提供了又一证据.

## 3 钙调素可能参与植物转脂蛋白抗性功能的调节

目前广泛认为植物系统性获得抗性(SAR)是植物抵御病原物攻击,实现自我保护的重要信号转导系统<sup>[33]</sup>.对SAR信号途径的研究和阐明可直接用于指导以基因工程方法培育抗病新品种和建立新的植物保护模式,有着极为重要的理论意义和实际应用价值.因此,人们从不同角度研究SAR的信号转导机制,特别是最近几年的研究为人们认识钙调素(CaM)在SAR信号途径中的作用提供了有价值的信息. Harding等<sup>[34]</sup>发现仅一个氨基酸突变(K115R)的CaM能明显增强转基因烟草对病原的抗性. Heo等<sup>[35]</sup>发现大豆在病原菌感染后30 min内,能诱导CaM异构体SCaM-4和SCaM-5的大量表达,同时发现SCaM-4和SCaM-5在转基因烟草

中的组成型表达能增强植物的广谱抗性,并诱导水杨酸(SA)非依赖性 SAR 的产生。随后, Yamakawa 等<sup>[36]</sup>报道从烟草花叶病毒感染的烟草中分离了 13 种 CaM 异构体基因并分析了它们的表达图谱,发现感染后 30 min 内 NtCaM1, 2, 3, 4 被诱导表达而明显积累,而且 SAR 途径的信号分子 SA 也可诱导它们的表达。为了深入研究 CaM 的作用, Kim<sup>[37]</sup>和 Reddy<sup>[38]</sup>等也相继用标记 CaM 筛选了真菌和细菌处理过的水稻、拟南芥细胞及大豆叶片 cDNA 表达文库,分离并鉴定了两种新的 CaM 结合蛋白(CaMBP) Mlo 和 PICBP。实验结果显示病原菌和外源 SA 均可强烈诱导这两种蛋白的表达和积累。说明 CaM 协同其结合蛋白一起参与了植物系统抗性功能的调节。至今, CaM 参与植物防御信号转导功能的调节已毋庸置疑,但其机制几乎一无所知,亦未见 CaM 与 LTP 相关性的报道。

本研究室经过多年研究,从中国大白菜中分离和鉴定了钙调素结合蛋白 BP-10<sup>[39]</sup>。近期研究发现它是植物转脂蛋白家族成员,具有典型的 LTP 二级结构 CD 特征图谱及脂结合活性和抗真菌活性,并证明 LTP 具有 CaM 结合特性<sup>[40,41]</sup>。为了进一步确认 LTP 为一类新的 CaMBP,揭示 CaM 和 LTP 之间的相互作用机制,我们根据 GenBank 提供的序列,克隆了拟南芥 LTP1。CaM-gel overlay 和 CaM-sepharose Pull-down 分析结果表明拟南芥 LTP1 不但具有 CaM 结合活性,并具有与 BP-10 相同的 Ca<sup>2+</sup>不依赖结合特征,即存在无钙条件下(存在 EGTA)也能与 CaM 结合<sup>[42]</sup>。采用基因删除和缺失的方法我们构建一系列 LTP1 突变体,研究 CaM 的结合域,我们发现其 CaM 结合域并非计算机软件预测中的 BAA 结构,而是位于 LTP C-末端的保守区域,这一区域正是 LTP 结合脂类的关键部位,提示 CaM 和脂类可能竞争性结合这一部位。

LTP 作为 SAR 基因编码的病程相关蛋白和抗菌肽,又具有 CaM 的结合特性,这一发现不仅为证明 CaM 参与植物 SAR 信号调节提供了新的更为直接的证据,而且为进一步揭示 LTP 的抗性机制提供了新的研究线索。同时, LTP 非同寻常的 CaM 结合方式和 CaM 结合域也预示着它们之间存在更复杂的调节机制。

植物在与微生物长期的相互作用过程中进化出一

系列的有效防御机制,脂类-转脂蛋白-病原物这一相互作用系统是自然选择的结果。然而,转脂蛋白抗性机制可能是多途径、多层次的,可能存在一个复杂的信号转导网络,这样,植物在抵抗病原物进攻时可及时做出有效应答。有关转脂蛋白的研究正在继续深入,焦点仍集中在其功能及可能的调节机制上。

## 参 考 文 献

- 1 Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, et al. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 6750-6754
- 2 Van Loon L C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 1999, 1-19
- 3 Van Loon L C, Gerritsen YAM. Protease activity and pathogenesis-related proteins in virus-infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Sci*, 1989, 63: 141-150
- 4 Broekaert W F, Cammue B P A, De Bolle M F C, et al. Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci*, 1997, 16(3): 297-323
- 5 Garcia-Ormedo F, Molia A, Alamillo J M, et al. Plant defense peptides. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1998, 47(6): 479-491
- 6 Thomma B P H J, Cammue B P A, Thevissen K. Plant defensins. *Planta*, 2002, 216(2): 193-202
- 7 Van Loon L C, Van Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55: 85-97
- 8 Theis T, Stahl U. Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 437-455
- 9 Regente M C, Giudici A M, Villalain J, et al. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett in Appl Microbiol*, 2005, 40: 183-189
- 10 Kader J C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 627-654
- 11 Kader J C. Proteins and the intracellular exchange of lipids: Stimulation of phospholipids exchange between mitochondria and microsomal fraction by protein isolated from potato tuber. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 380: 31-44
- 12 Kader J C. Lipid-transfer proteins: A puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 66-70
- 13 Pyee J, Yu H, Kolattukudy P E. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 311: 460

- 468
- 14 Carvalho A O, Teodoro C E S, Da Cunha M, et al. Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiol Plantarum*, 2004, 122: 328–336
  - 15 Carvalho A O, Machado O L T, Da Cunha M, et al. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 137–146
  - 16 Maldona A M, Doerner P, Dixon R A, et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature*, 2002, 419: 399–403
  - 17 Buhot N, Douliet J P, Jacquemard A, et al. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett*, 2001, 509: 27–30
  - 18 Gomes E, Sagot E, Gaillard C, et al. Non specific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis sp*) cells in response to fungal elicitor treatments. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(5): 456–464
  - 19 Molina A, Segura A, Garcia-Olmedo F. Lipid transfer proteins (nsLTP) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett*, 1993, 316: 119–122
  - 20 Molina A, Garcia-Olmedo F. Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J*, 1997, 12: 669–675
  - 21 Ponchet M, Panabieres F, Milat M L, et al. Are elicitors cryptograms in plant-fungi communications? A review of the plant and cell response to elicitor treatment and analysis of signaling involved. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 56: 1020–1047
  - 22 Boissy G, O'Donohue M, Gaudemer O, et al. The 2.1 Å structure of an elicitor-ergosterol complex: A recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Sci*, 1999, 8: 1191–1199
  - 23 Ricci P, Bonnet P, Huet J C, et al. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* elicitor necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, 1989, 183: 555–563
  - 24 Mikes V, Holeysovsky V, Tomasek, et al. Elicitor excreted by *Phytophthora* are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245: 133–139
  - 25 Osman H, Vauthrin S, Mikes V, et al. Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell*, 2001, 12: 2825–2834
  - 26 Blein J P, Coutos-Thevenot P, Marion D, et al. From elicitors to lipid-transfer proteins: A new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(7): 293–296
  - 27 Buhot N, Gomès E, Milat M L, et al. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation. *Mol Cell Biol*, 2004, 15: 5047–5052
  - 28 Turner J G, Ellis C, Devoto A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 2002, S153–S164
  - 29 Farmer E E, Almeras E, Krishnamurthy V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 372–378
  - 30 Zhao J, Davis L C, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 2005, 23: 283–333
  - 31 Ge X, Chen J, Li N, et al. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *Biochem Mol Biol*, 2003, 36(6): 603–607
  - 32 Ge X, Chen J, Sun C, et al. Preliminary study on the structural basis of the antifungal activity of a rice lipid transfer protein. *Protein Eng*, 2003, 16: 387–390
  - 33 Ryals J A, Neuenschwander U H, Willitis M G, et al. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 1996, 8: 1809–1819
  - 34 Harding S A, Roberts D M. Incompatible pathogen infection results in enhanced reactive oxygen and cell death responses in transgenic tobacco expressing a hyperactive mutant calmodulin. *Planta*, 1998, 206: 253–258
  - 35 Heo W D, Lee S H, Kim M C, et al. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 19: 766–771
  - 36 Yamakawa H, Mitsuhashi I, Ito N, et al. Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-mediated cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 3916–3929
  - 37 Kim M C, Lee S H, Kim J K, et al. Mlo, a modulator of plant defense and cell death is a novel calmodulin-binding protein. *J Biol Chem*, 2002, 277: 19304–19314
  - 38 Reddy V S, Ali G S, Reddy A S N. Characterization of a pathogen-induced calmodulin-binding protein: Mapping of four Ca<sup>2+</sup>-dependent calmodulin-binding domains. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 143–159
  - 39 尚克进, 凌启阁, 李翠凤, 等. 一种新的植物钙调素结合蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1991, 23: 416–422
  - 40 Liu H, Xue L, Li C F, et al. Calmodulin-binding Protein BP-10, a probable new member of plant nonspecific lipid transfer protein superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285: 633–638
  - 41 祁倩, 饶恩于, 李翠凤, 等. CaMBP-10的cDNA克隆和表达及钙调素结合活性分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(4): 451–456
  - 42 Wang Z, Xie W, Li C, et al. Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2005, 579: 1683–1687