

文章编号: 1004-0374(2009)01-0092-05

小分子物质对维持胚胎干细胞未分化状态的调控作用

赵 贇, 谭玉珍*

(复旦大学上海医学院人体解剖与组织胚胎学系, 上海 200032)

摘要: 胚胎干细胞作为一种具有多潜能和高度自我更新能力的种子细胞, 已被广泛地应用于医学研究领域。在体外培养条件下, 胚胎干细胞可被诱导分化为三个胚层来源的组织细胞, 故被看作为最具有应用前景的种子细胞。近年来, 对于在体外培养条件下如何维持胚胎干细胞的多能性即使其较长时期的处于未分化状态成为研究热点, 其中一些天然存在或人工合成的小分子物质可通过作用于某些特定的靶信号通路, 调控胚胎干细胞的命运。本文概述了几种小分子物质的最新研究进展, 并对小分子物质在成体多分化潜能胚胎样干细胞分化调控方面的应用前景进行评述。

关键词: 小分子物质; 胚胎干细胞; 成体多分化潜能胚胎样干细胞; 未分化

中图分类号: Q813; Q254 **文献标识码:** A

Small molecules in maintaining embryonic stem cell undifferentiation

ZHAO Yun, TAN Yu-zhen*

(Department of Anatomy, Histology and Embryology, Shanghai Medical School of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Embryonic stem cells self-renew indefinitely while having some potentiality to generate all three germ-layer derivatives. The use of embryonic stem cells as a potential seed cell in regeneration medicine is a promising approach to the treatment of disease and injury. Natural and synthetic small molecules have been shown to be useful chemical tools for maintaining long-term undifferentiated state of embryonic stem cells. In this review, we will look at several small molecules that have been reported in the recent researches as effectors of embryonic stem cell undifferentiation. We hypothesize that the maintenance of undifferentiation in embryonic stem cells by using small molecules can also make the same effects on those pluripotent adult embryonic-like stem cells.

Key words: small molecules; embryonic stem cell; pluripotent adult embryonic-like stem cell; undifferentiation

在哺乳动物的早期胚胎发育过程中, 从囊胚期的内细胞群分离得到的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)在体外能自我更新并且在一段时期内保持未分化状态, 在特定的诱导条件下可以向三胚层的组织细胞特异性分化^[1, 2]。基于这种特性, 胚胎干细胞已被广泛地应用于再生医学、细胞工程、组织工程等生物医学研究领域。近年来, 许多研究集中于在体外培养条件下对胚胎干细胞未分化状态与自我更新能力的调控方面, 尤其是目前已从化学分子库中筛选出一些小分子物质, 利用这些天然存在或人工合成的小分子物质可有效地调控胚胎干细胞

的分化命运。本文主要综述了作用于胚胎干细胞内的某些靶信号通路的小分子物质, 分析了它们在维持胚胎干细胞未分化状态中的作用机制, 并对小分子物质在成体多分化潜能胚胎样干细胞分化调控方面的应用前景进行评述。

1 小分子物质: 一种安全有效的外源性化学干预工具

在胚胎干细胞研究领域, 近来较多的研究是

收稿日期: 2008-07-17; 修回日期: 2008-09-03

*通讯作者: yztan@shmu.edu.cn

针对维持胚胎干细胞长期自我更新和未分化状态。这些研究主要集中于胚胎干细胞在体外培养时所处的培养微环境, 如滋养层依赖培养以及在培养基中加入细胞因子和生长因子等, 以此使胚胎干细胞在较长时期内保持未分化状态^[3]。Ying 等^[4]研究表明, 作为一种普遍的培养基添加剂, 胎牛血清中可能含有骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP), BMP 可与白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 结合, 通过调控 LIF/STAT 信号途径, 从而维持鼠胚胎干细胞 (mouse embryonic stem cells, mESCs) 的未分化状态。因此, 大量的研究选择 BMP 作为抑制胚胎干细胞分化的有效工具。然而, 某些细胞因子或生长因子对人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 未分化状态的调控效果尚不理想, 如 Daheron 等^[5]研究发现用 BMP 等针对 LIF/STAT 信号途径的调控并不能有效地阻止人胚胎干细胞的分化。为了使胚胎干细胞尤其是人胚胎干细胞今后能被更好地应用于临床研究, 寻找便捷且更具优势的调控方法是目前的重要研究方向。

最近, 研究者们开始将目光聚焦在一些天然存在或人工合成的小分子物质上, 这些小分子物质已被从化学分子库中筛选出来, 并且成功地应用于胚胎干细胞分化命运的研究中。实验证明, 在体外培养的过程中通过加入这些小分子物质不但使鼠胚胎干细胞, 而且可以使人胚胎干细胞长期保持其自我更新能力和维持其未分化状态^[6]。作为一种外源性化学干预工具, 这些小分子物质的作用机理主要是针对胚胎干细胞内的某些靶信号转导通路 (如 Wnt、MAPK/ERK 信号通路) 来发挥调控作用。McNeish^[7]研究发现某些小分子物质还可以使干细胞成为药物研究的筛选工具。由此可见, 小分子物质未来在胚胎干细胞乃至成体干细胞应用领域中将发挥巨大的作用。

2 作用于 Wnt 信号通路的小分子物质

在 Wnt 信号通路中, Wnt 蛋白可以与细胞膜表面的特异性卷曲蛋白受体结合, 从而激活细胞内的信号分子, 进而调节细胞核内靶基因转录。目前已知 Wnt 信号通路的组成包括: 细胞外因子 (Wnt 配体)、跨膜受体 (Frizzled)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、DNA 结合蛋白 TCF (T cell factor)。Wnt 信号通过一系列相互作用使 β -catenin 在细胞质内积聚后进入细胞核内, 与 TCF 共同作用, 并通过与转录活化因子 p300/CBP 家族结合, 启动靶基因的表达^[8]。胚

胎干细胞分化时, Wnt/ β -catenin 表达水平下降, 而 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) 和 IQ-1 这两种小分子能够分别作用于 Wnt 信号通路的不同环节, 通过激活 Wnt 信号维持胚胎干细胞的未分化表型。

2.1 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) BIO 是目前人工合成的一种可渗透入细胞的小分子物质, 它能选择性地抑制糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 的活性。GSK-3 β 是 Wnt 信号通路中一个重要的激酶, 也是一个重要的负调控因子。当胚胎干细胞分化时, Wnt/ β -catenin 表达水平下降, GSK-3 β 与 β -catenin 形成复合物, 启动对 β -catenin 的泛素化降解^[9]。在人胚胎干细胞和鼠胚胎干细胞的培养基中添加微量的 BIO 时, BIO 可渗透入细胞质内, 通过与 GSK-3 β 结合, 即占据了 GSK-3 β 上的 ATP 结合域, 从而阻遏了 GSK-3 β 与 β -catenin 形成复合物, 导致 β -catenin 在胞质内聚集 (图 1)。 β -catenin 在胞质内聚集后即进入细胞核, 激活 Wnt 信号通路的下游环节并维持其在一定水平^[10]。进入细胞核中的 β -catenin 与 TCF 共同作用后, 再与转录活化因子 CBP 结合, 从而启动 β -catenin/CBP 介导的基因转录, 导致 Oct-4 和 Sox-2 靶基因转录增强, 促进 Oct-4 和 Sox-2 的表达 (图 1)。作为胚胎干细胞特异性的转录因子, Oct-4 的高表达对于维持胚胎干细胞的自我更新和未分化状态是必要的, 随着胚胎干细胞的分化, Oct-4 的表达逐渐下降。

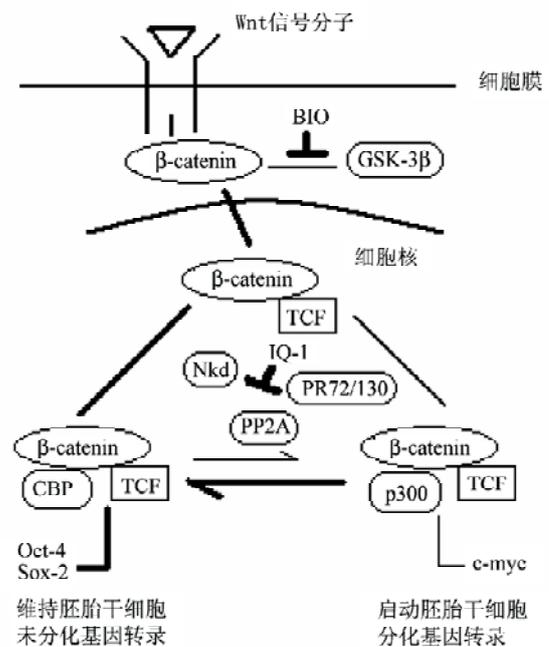


图1 BIO与IQ-1的作用机制

由此可见, BIO 能够维持人胚胎干细胞和鼠胚胎干细胞的未分化状态和自我更新能力。将 BIO 从胚胎干细胞培养基中去除后, 胚胎干细胞仍可以进行正常分化^[6]。这些结果表明, BIO 是一种安全、高效的小分子物质, 它对胚胎干细胞的分化抑制作用不会影响后续对胚胎干细胞的诱导分化研究。

2.2 IQ-1 Miyabayashi 等^[11]从化学分子库中筛选出一种被命名为 IQ-1 的小分子物质, 通过实验发现, IQ-1 不依赖 LIF 就能维持体外培养中的胚胎干细胞长期保持未分化状态和自我更新。IQ-1 可以与胚胎干细胞核内的丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)磷酸酶 PP2A 的亚单位 PR72/130 结合, 从而阻止 PP2A/PR72/130/Nkd 复合物的形成(图 1)。当 PP2A 的亚单位 PR72/130 与一种 Wnt 信号负调控元件 Nkd 蛋白相互作用后, 即形成 PP2A/PR72/130/Nkd 复合物, 这一复合物可以使 Ser-89 上的共活化蛋白 p300 磷酸化, 磷酸化的 p300 与进入细胞核内的 β -catenin 产生极大的亲和力, 从而启动 β -catenin/p300 介导的基因转录^[12]。这是胚胎干细胞分化过程中一个重要的转录调控点, 当该基因转录被启动后, 胚胎干细胞即发生分化。当 IQ-1 与 PR72/130 结合后, 阻遏了 PP2A/PR72/130/Nkd 复合物的生成, 从而降低了 p300 的磷酸化, 使 β -catenin 与 p300 的结合能力减弱, 而与 CBP 的亲和力增强, 进一步启动 β -catenin/CBP 介导的基因转录(图 1)。由于该基因转录的产物是 Oct-4 和 Sox-2, 因此 IQ-1 对于维持胚胎干细胞的未分化状态起重要作用。此外, Miyabayashi 等^[11]还观察到当 IQ-1 与 Wnt-3a 结合后也可上调胚胎干细胞的转录因子 Oct-4、Sox-2 和 Nanog 的表达。

3 作用于 MAPK/ERK 信号通路的小分子物质

SC1 是一种细胞毒性低、作用效能高的小分子物质, 主要针对胚胎干细胞内的 MAPK/ERK 信号通路发挥作用。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是细胞内的一类丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)蛋白激酶。MAPK 信号通路存在于大多数细胞内, 对于胚胎干细胞而言, 该通路可将细胞外刺激信号转导入细胞内, 是胚胎干细胞分化过程中的一条重要信号通路。细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)是 MAPK 家族的一员, Armstrong 等^[13]发现, 胚胎干细胞分化时 MAPK/ERK 信号通路的表达水平下降。ERK 定位于胞浆内, 当激活后转位至细胞核内, 通过调节转录因子

活性从而产生细胞效应。目前已知 ERK 有 5 个亚家族, 其中 ERK1/2 与胚胎干细胞的分化关系密切。经典的 ERK 信号传递步骤遵循三级酶促级联反应, 即上游激活蛋白 Ras \rightarrow C-Raf \rightarrow ERK 激酶 1/2 (MEK1/2) \rightarrow ERK1/2^[14]。其中, Ras 蛋白通过 RasGTP 酶激动蛋白(RasGAP)在活化态的 GTP 结合构象(RasGTP)和失活态的 GDP 结合构象(RasGDP)之间进行变换。当胚胎干细胞分化信号出现时, 信号经 RasGTP \rightarrow C-Raf \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2 传递, 最终引起细胞分化。Chen 等^[15]研究发现, 将 SC1 加入鼠胚胎干细胞的培养基中, SC1 能有效地阻遏 RasGAP 和 ERK1/2。RasGAP 被阻遏后, 无法发挥其对 Ras 的抑制作用, 即 RasGTP 不能转变为 RasGDP, 导致 RasGTP 表达过量。过量表达的 RasGTP 可与 p110 结合进而激活了另一条维持胚胎干细胞自我更新和未分化作用的 PI3K-Akt 信号通路(图 2)。此外, SC1 对 ERK1/2 的阻遏, 使得 ERK 信号通路无法发挥其促使胚胎干细胞分化的作用(图 2)。Chen 等^[15]还发现 SC1 也可通过抑制 p53 中 Ser-315 的磷酸化起到刺激 Nanog 的瞬时高表达, Nanog 的瞬时高表达对 SC1 维持胚胎干细胞长期保持未分化状态起到了部分协同作用。

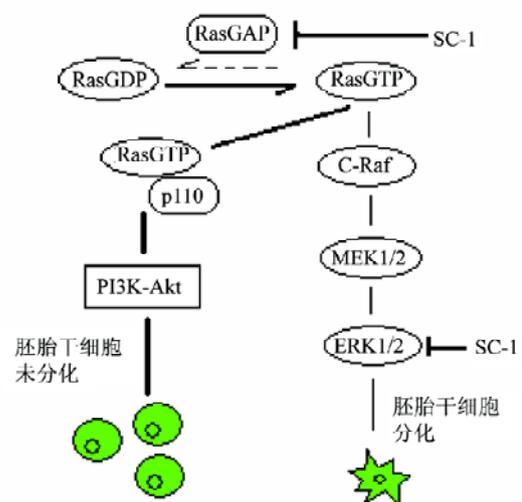


图2 SC-1的作用机制

4 作用于其他信号通路的小分子物质

除了上述的 Wnt、MAPK/ERK 信号通路外, 目前还发现 PI3K-Akt 信号通路在维持胚胎干细胞未分化状态中也起到一定的作用, 当胚胎干细胞分化时, 该信号通路表达下调^[13]。PI3K 是磷脂酰肌醇 3- 激酶家族, 该家族参与体内多种信号通路, 当

PI3K被激活后即在质膜上产生第二信使PIP3, PIP3与细胞内含有PH结构域的信号蛋白Akt和PDK1(phosphoinositide-dependent kinase-1)结合,促使PDK1磷酸化Akt蛋白的Ser308导致Akt的活化,活化的Akt通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白糖原合成激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)等来发挥生物学作用^[16]。

Paling等^[17]利用一种能抑制PI3K/Akt通路的小分子LY294002^[18]后发现,当PI3K被抑制后即使在加入LIF的情况下,胚胎干细胞仍然发生分化。Paling等^[17]的研究证实了PI3K-Akt信号通路在维持胚胎干细胞自我更新和未分化状态中起着调控作用。另外,Storm等^[19]的研究也发现,Nanog的表达部分依赖于PI3K信号通路,通过抑制PI3K信号途径中的下游靶蛋白GSK-3可以调节Nanog RNA与Nanog蛋白的表达。由此可见,对PI3K/Akt信号通路的调控可以影响胚胎干细胞的分化命运。LY294002是抑制该通路的一种小分子,相信随着研究的不断深入,将会筛选出能够激活PI3K/Akt信号通路的小分子。根据Paling等^[17]的推测,当PI3K/Akt信号通路被激活后,可使GSK-3在Ser21和Ser9位点发生磷酸化而失活,如果将GSK-3的失活与前述的Wnt/ β -catenin途径相联系,那么失活后的GSK-3无法与 β -catenin相结合,即可使 β -catenin的量被维持在一定水平。这一推测很可能成为今后的研究方向,若能寻找出针对PI3K/Akt信号通路进行正向调控的小分子,将使小分子物质对胚胎干细胞分化命运的调控网络更趋完善。

5 小分子物质在成体多分化潜能胚胎样干细胞未分化状态调控中的应用前景

5.1 成体中的多分化潜能胚胎样干细胞 近年来的研究发现,成体中含有类似于胚胎干细胞的多分化潜能胚胎样干细胞,例如Kucia等^[20]从骨髓中分离纯化的小胚胎样干细胞(very small embryonic-like stem cell, VSEL),就是一种具有胚胎干细胞生物学特征的多分化潜能干细胞。这种细胞在体外具有无限增殖和较长时期维持自我更新的能力,在特定的诱导条件下能向三胚层组织细胞特异性分化。此外,骨髓中的多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell, MAPC)也被检测出表达Oct-4⁺、SSEA-1⁺和Nanog^[21]。除骨髓组织外,研究人员又先后从支气管上皮^[22]、表皮毛囊^[23]、视网膜^[24]等处分离出Oct-4⁺细胞,这些从成体组织中分离出的胚胎样干细胞都

具有胚胎干细胞的多分化潜能,表达未分化的胚胎干细胞所特有的标志物如SSEA-1⁺、Oct-4⁺、Nanog和Rex-1。

5.2 小分子物质在成体多分化潜能胚胎样干细胞未分化状态调控中的应用 有研究显示,成体中具有多分化潜能的胚胎样干细胞可能是由原始上胚层衍生而来或是原始生殖细胞的子代^[25]。以骨髓中的VSEL为例,目前推测VSEL是一类在胚胎发育过程中贮存于骨髓中的处于静止或休眠状态的胚胎样干细胞,能够协同造血干细胞参与骨髓的长期造血,被动员后能从骨髓经外周血液循环迁移至其他的器官内定居^[26]。从其他组织中分离出的成体多分化潜能胚胎样干细胞也可在组织或器官受到损伤的情况下协同该组织特异性的干细胞发挥修复作用^[25]。鉴于这类成体多分化潜能胚胎样干细胞具有强大的分化和扩增能力,它们也可以作为种子细胞被应用于再生医学、组织工程等生物医学研究领域。

上述提到的BIO、IQ-1、SC1这些小分子物质可以安全、高效地调控胚胎干细胞的分化命运,维持胚胎干细胞长期保持未分化状态。Schugar等^[6]认为,小分子物质的应用范围并不仅仅局限于胚胎干细胞,对于一些胚胎样干细胞、肿瘤细胞的分化命运同样可以起到调控作用。据此,我们推测如将这些小分子物质导入成体多分化潜能胚胎样干细胞内,也可能通过作用于相同的信号通路维持胚胎样干细胞长期处于未分化状态。这一推测是基于以下两点理由:首先,成体多分化潜能胚胎样干细胞类似于胚胎干细胞,具有胚胎干细胞的生物学特性;其次,这类细胞在体外也具有与胚胎干细胞相似的无限增殖和较长时期维持自我更新的能力。Ratajczak等^[26]观察到在体外培养条件下少量纯化后的VSEL能在一段时期内维持其未分化状态,如将其于C2C12鼠成肌细胞滋养层共培养后可以形成类似胚体的结构。鉴于Wnt、MAPK/ERK等经典信号通路在控制胚胎发育过程中起作用,故本文推测对于成体多分化潜能胚胎样干细胞而言,小分子物质同样可以针对其特定的靶位点发挥其调控作用;但是,这一假设还需要通过分离纯化成体中的多分化潜能胚胎样干细胞及其进一步的体外实验研究予以证实。

6 展望

目前小分子物质已经作为一种对胚胎干细胞分化命运进行调控的重要化学工具。鉴于小分子物质

各自针对不同的信号通路,随着研究的深入,利用这些小分子物质可以帮助研究者更清晰地阐明胚胎干细胞、成体中的多分化潜能胚胎样干细胞在维持未分化状态中的信号调控网络,揭示其中的分子机理。最近的研究将CHIR99012、PD184352、PD0325901这三种小分子从化学分子库中筛选出来,利用它们进一步解释Wnt、MAPK/ERK信号通路在维持胚胎干细胞未分化状态中某些未知的分子机制^[27]。未来小分子物质将帮助我们更好地对胚胎干细胞、胚胎样干细胞加以利用,为胚胎干细胞在再生医学、细胞工程、药物研制等领域中的应用带来新的契机。

【参 考 文 献】

- [1] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7634-8
- [2] Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-6
- [3] Ogawa K, Matsui H, Ohtsuka S, et al. A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes Cells*, 2004, 9(5): 471-7
- [4] Ying QL, Nichols J, Chambers I, et al. BMP induction of id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, 115(3): 281-92
- [5] Dagher L, Opitz SL, Zaehres H, et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2004, 22(5): 770-8
- [6] Schugar RC, Robbins PD, Deasy BM. Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. *Gene Ther*, 2008, 15(2): 126-35
- [7] McNeish JD. Stem cells as screening tools in drug discovery. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7(5): 515-20
- [8] Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with β -catenin to activate gene expression. *J Cell Biol*, 2000, 149(2): 249-54
- [9] Aberle H, Bauer A, Stappert J, et al. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 1997, 16(13): 3797-804
- [10] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 2004, 10(1): 55-63
- [11] Miyabayashi T, Teo JL, Yamamoto M, et al. Wnt/ β -catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(13): 5668-73
- [12] Ratcliffe MJ, Itoh K, Sokol SY. A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction. *J Biol Chem*, 2000, 275(46): 35680-3
- [13] Armstrong L, Hughes O, Yung S, et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF- κ B signaling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(11): 1894-913
- [14] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-2
- [15] Chen SB, Do JT, Zhang QS, et al. Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17266-71
- [16] Kolanus W, Seed B. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(5): 725-31
- [17] Paling NR, Wheadon H, Bone HK. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, 2004, 279(46): 48063-70
- [18] Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, et al. A specific inhibitor of phosphoinositide 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, 1993, 269(7): 5241-8
- [19] Storm MP, Bone HK, Beck CG, et al. Regulation of Nanog expression by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6265-73
- [20] Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺SSEA-1⁺Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 2006, 20(5): 857-69
- [21] Zeng LP, Rahrmann E, Hu QS, et al. Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells*, 2006, 24(11): 2355-66
- [22] Ling TY, Kuo MD, Li CL, et al. Identification of pulmonary Oct-4⁺ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(25): 9530-5
- [23] Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 1879-88
- [24] Koso H, Ouchi Y, Tabata Y, et al. SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway. *Dev Biol*, 2006, 292(1): 265-76
- [25] Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, et al. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4⁺ stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*, 2007, 21(5): 860-7
- [26] Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, et al. Very small embryonic-like stem cells: Characterization, developmental origin, and biological significance. *Exp Hematol*, 2008, 36(6): 742-51
- [27] Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-23