

닭 배반엽세포로부터 유래된 잠정적 배아주세포의 동정

이기석 · 이 황 · 김기동 · 박성수 · 이상호

고려대학교 생명과학부/생명공학원

Identification of Putative Embryonic Stem Cells Derived from Embryonic Blastodermal Cells of Fertilized Hen's Eggs

K. S. Lee, H. Lee, K. D. Kim and S. H. Lee

Division of Life Sciences and Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701

ABSTRACT : Embryonic stem (ES) cells are pluripotent cell lines, which derived from preimplantation embryo. These cells have been used as a vehicle of foreign DNA for production of transgenic mammals. This experiment was performed to examined the possible use of blastodermal cells derived from hen's egg for germline manipulation. Stage X blastodermal cells isolated from fertilized eggs were cultured in DMEM containing 15% fetal calf serum. Blastodermal cells were co-cultured on the chicken embryonic fibroblast (CEF) or mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. To examine the effects of growth factors on stem cell growth, bFGF and LIF were added. There was no significant difference in colony formation of putative ES cells between CEF and MEF as a feederlayer, but the addition of growth factors enhanced the proliferation and inhibited differentiation of blastodermal cells. To characterize the cell colonies as a putative ES cells, putative embryonic cell colonies were stained by periodic acid Schiff's (PAS) reagent. The putative ES cell colonies showed intensive positive reaction similar to the property of undifferentiated PGC upto 20 days in vitro, but not in other cell types. This result demonstrates that PAS- positive cell colonies may be used for the study of establishment of chicken ES cell lines for the production of transgenic chicken.

(Key words : blastodermal cells, in vitro culture, PAS staining, ES cells)

서 론

최초로 생쥐의 포배기에서 유래한 내부세포괴로부터 배아주세포를 확립한 이후 (Evans와 Kaufman, 1981), 다른 계통의 생쥐 배아주세포가 여러 종류 보고되어 있어 유전자변환 연구와 유전자 표적연구 및 응용기술에 이용되고 있지만, 소, 돼지, 양, 닭과 같은 가축은 물론, 쥐, 햄스터, 토끼와 같은 실험동물의 경우에 있어서도 아직 배아주세포가 확립 및 이용되지 못하고 있다.

닭 (*Gallus domesticus*)과 같은 가금류의 경우 포유동물과 비교하여 볼 때 번식기관의 생리 · 해부학적 구조, 초기배의 형태 및 발생의 차이로 여러 가지 장단점이 있다. 특히 가금의 경우 난각이라는 모체와는 별개의 환경 하에서 발생하며, 난자내에 많은 난황을 보유하고 있어 난할이 전체 수정란에 걸쳐 일어나는 포유류와 달리 동물극 일부에 국한되며, 결국 배반엽 (blastoderm)을 형성하며, 방란 직후인 stage X (Hamburger와 Hamilton, 1951) 시기의 경우, 약 6,000~80,000개의 세포로 분열된 상태 (Eyal-Giladi 등, 1981)이므

로 기존에 포유류 수정란에 적용한 방법과 동일한 방법으로는 효율적인 외래 DNA의 도입이 어렵다.

이상의 어려움에도 불구하고 유전자변환 개체 생산에 있어서 가금이 가지는 다른 축종에 비해 많은 장점이 있기 때문에 여러 연구자들에 의해서 유전자변환 가금을 생산하기 위한 노력이 활발히 진행되고 있다. 즉, 병아리의 부화과정 및 성 성숙에 이르는 기간이 다른 축종에 비하여 짧고, 다른 가축에 비하여 번식능력이 대단히 높기 때문에 유전자변환 닭 계통의 조성이 용이하다. 이를 방법 중에서 방란 직후의 다능성이 있고 (Eyal-Giladi 등, 1981) 이식된 조직이나 세포를 받아들일 수 있는 (Mazullo, 1970) 배반엽세포의 조작을 통한 카이메라의 생산 및 이를 교배에 이용하여 유전자변환 가금을 생산하는 방법이 활발히 연구되어 왔다 (Petitte 등, 1990; Naito 등, 1991; Carscience 등, 1993; Thoraval 등, 1994; Han 등, 1996).

본 실험은 유전자변환 닭 생산을 위한 기반기술로서 수정란으로부터 배반엽세포를 회수하여 배양조건에 따른 특성을 조사하였다. 또한 되먹임세포 (feeder layer)간의 차이와 성장 인자의 · 유무 및 종류에 따른 배반엽세포의 성장효과를 구명

하였다. 따라서 본 실험은 이를 바탕으로 하여 배반엽세포의 체외배양 조건 및 닭 배아주세포의 확립을 위한 토대를 마련코자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 수정란의 구입 및 부란

본 실험실에서 사용된 계란은 (주)풀무원으로부터 구입한 ISA Brown계의 신선한 수정란으로서, 실험실에 반입된 수정란의 난각을 70% 에탄올로 세정한 후, 이후의 발생을 중지시키기 위하여 10°C에서 보관하였다. 수정란의 보관기간은 10일을 넘지 않도록 하였으며 이 기간이 지난 수정란은 실험에 이용하지 않았다. 수정란은 37°C의 부화기 (Showa Co., Japan)를 이용하여 부란시켰으며, 매 30분마다 좌우 각각 45°로 전란을 실시하였다.

2. 배반엽세포의 분리 배양

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, UK)을 기본배양액으로 DMEM에 15% 소 태아혈청 (FCS, Gibco, UK), 1mM L-glutamine (Sigma, U.S.A), 항생제 (50 Units penicillin/ml, 50 μ g streptomycin/ml, Gibco, UK)등 fDMEM을 첨가하여 닭 배아주세포 (chicken embryonic fibroblast, CEF)의 회수 및 증식에 사용되었으며, 20% 소 태아혈청, 50 μ M β -mercaptoethanol, nucleoside (8.0 μ g adenosine/ml, 8.5 μ g guanosine/ml, 7.3 μ g cytidine/ml and 2.4 μ g thymidine/ml, Sigma, USA), 1% non-essential amino acids (Gibco, UK), 1mM L-glutamine (Sigma, USA), 항생제 (50U penicillin/ml, 50 μ g streptomycin/ml, Gibco, UK)등 sDMEM은 mitomycin C로 처리한 CEF 유지 및 분리된 배반엽세포의 배양에 사용하였다. 세포의 분리 및 회수에는 0.25% (w/v) trypsin과 0.04% (w/v) EDTA가 첨가된 Ca²⁺ · Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS)을 이용하였다.

3. 성장인자의 효과

배반엽세포의 증식에 있어서, 재조합 성장인자의 첨가효과를 검토하기 위하여 bovine recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma, USA) 및 human recombinant leukemia inhibitory factor (LIF, Sigma, USA)를 각각 최종농도가 40ng/ml이 되도록 배양액 sDMEM에 첨가하여 colony 생성효과를 검토하였다.

4. CEF 및 생쥐 태아주세포 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 효과

CEF 및 MEF를 feeder layer로 하여 배반엽세포의 유지 및 colony형성에 관한 효과를 검토하였다.

5. 배반엽 세포의 증식 및 동정

Colony가 형성된 배반엽세포의 경우, 26 gauge needle 및 Pasteur pipette을 이용하여 되먹임세포층과 분리하고, 분리된 colony를 다시 여러 개의 세포조각 (cell fragment)으로 나눈 후, 미리 준비된 신선한 되먹임 세포가 배양중인 s-DMEM 배양소적내로 옮겨주었다. 이후의 배양조건은 초기배양 조건과 동일하며 매 3~4일 마다 계대배양을 실시하였다. 초기 배반엽세포의 동정 및 핵의 관찰을 위해 DNA 특이적인 형광물질인 Hoechst 33258 (Sigma, USA)을 이용하였다. 개개로 분리되어진 배반엽세포를 40 μ g/ml 농도의 Hoechst 33258이 첨가된 fDMEM에서 10분간 배양한 후, DNA와 결합되지 않은 Hoechst 33258 분자를 제거하기 위해 15분간 3회에 걸쳐 fDMEM으로 세정하였다.

또한, 닭 ES세포에 특이적인 발현을 보인다고 알려진 PAS염색을 이용한 닭 ES세포의 동정을 실시하기 위하여 우선 colony가 생성되어 있는 배양접시의 mineral oil을 제거한 후, 다시 배양접시를 -20°C로 냉각된 에탄올과 acetic acid의 혼합물 (7:1)로 세정하여 남아있는 mineral oil을 모두 제거하였다. 다시 동일용액을 3ml 첨가하여 40분 동안 고정시킨 후, 순수한 에탄올로 2회 세정하여 고정액을 제거한 후, 10분간 탈수시켰다. 염색을 위해 periodic acid로 2시간 처리한 후, 다시 에탄올로 탈수시키고, Schiff reagent를 첨가하여 10분간 반응시켰다. Sulfite solution으로 3회에 걸쳐 2분씩 처리한 후 PBS로 세정하여 현미경下에서 관찰하였다.

6. 현미경 관찰 및 사진촬영

섬유아세포 공배양과 배반엽세포의 관찰은 도립 현미경 (Diaphot TMD, Nikon, Tokyo, Japan)하에서 phase contrast filter (ELWD 0.3, Nikon)를 이용하여 관찰, 촬영하여 ASA 100 film (Konica, Tokyo, Japan)에 기록하였고, Hoechst 33258로 염색된 배반엽세포는 형광현미경 (Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하여 ASA 400 film (Kodak, U.S.A)에 기록하였다.

결과 및 고찰

1. 배반엽세포의 분리·동정 및 성장

닭의 발생 단계중 stage X의 수정란으로부터 회수된 배반엽(blastoderm)세포의 작은 cell clump를 mouth-pipette을 이용하여 분리하고 그 형태를 세포학적으로 동정하였다. 특히 핵의 상태를 Hoechst 33258을 이용하여 세포의 활성상태를 염색한 결과 수정란에 유일한 세포집단인 배반엽에서 실처럼 풀어져 있는 간기의 핵이 존재함을 확인하였다 (Figs. 1a~1c).

총 216개의 배반엽세포 조각 중, 되먹임세포인 CEF와 MEF에 각각 108개씩 공배양하였다. 분리된 세포조각은 각각 30 μ l s-DMEM에서 공배양 하였는데, 12시간 내에 되먹임세포층에 세포 일부가 부착되기 시작하였고, 24~48시간이 지난 후, colony가 형성되는 것이 관찰되었다. 각 실험구별 colony 형성 비율은 33.3~50.0%였다 (Table 1). 본 실험에서는 포유류의 배아주세포 계대배양에서 이용되는 trypsin-EDTA처리에 의한 clonal culture 대신에 colony 형성을 이 방법보다 월등히 높았던 mass culture 방식을 취하였다 (Park 등, 1995). CEF 및 MEF feeder를 이용하여 배반엽세포의 colony 형성을 조사한 결과, 각각 39.8% 및 44.8%로 나타나, MEF feeder에서 배양한 결과가 동종의 CEF feeder에서 배양한 결과보다 더 좋은 성적을 보였지만, 통계적인 유의차는 보이지 않았다.

초기배양 후, colony가 생성되면 colony 상태에 따라 3~4

일 간격으로 계대배양을 실시하였다. CEF feeder와 공배양한 경우는 실험구별로 각각 6.0, 7.5 및 7.3일, MEF feeder와 공배양한 경우는 각각 4.3, 5.8 및 5.6일이었다. 대부분 CEF feeder와 공배양한 경우 최대 3회의 계대배양이, MEF feeder와 공배양한 경우는 2회까지 계대배양이 가능했다.

초기배양에서는 MEF feeder와의 공배양 효율이 더 좋았지만 (Table 1), 1차 계대배양 후부터는 CEF feeder와의 공배양의 경우에 비해 낮아지기 시작하여 MEF feeder의 경우 35.5%, CEF feeder의 경우 43.6%의 colony 형성을 나타냈고, 결국 MEF feeder를 사용한 경우는 2차 계대배양 이후에는 colony가 생성되지 않았다. 이러한 사실은 계대배양이 진행되면서 포유류와 조류간에 되먹임세포의 특이성이 나타남을 의미한다고 볼 수 있다. 이 결과를 이용하여 배반엽세포의 지속적인 배양을 위해, 초기 배양 시에는 MEF feeder와 공배양한 후, 계대배양은 CEF feeder를 사용함으로서 colony 형성을 높일 수도 있으리라 사료된다. 비록 계대배양이 진행됨에 따라 CEF feeder와 공배양한 경우는 43.6%에서 71.4%로, MEF feeder와 공배양한 경우는 35.5%에서 50.0%로 colony 형성을 증가했지만 (Table 2), 실제로 생성된 colony의 총 수는 감소하여 세포의 증식이라는 측면에서 볼 때 아직까지 닭 배반엽세포에서 ES세포주를 확립하기까지는 많은 난관들을 극복하여야 할 것으로 보여진다.

2. 성장인자의 첨가효과

배아주세포의 확립을 위해서는 여러가지 환경조건이 적절하게 설정되어야 하는데, 되먹임세포와의 공배양과 더불

Table 1. Successful culture for the formation colonies during primary culture on the CEF and MEF

No. of experiments	No. of blastodermal cell fragment used	No. of blastodermal colonies formed sucessfully (%)	
		CEF	MEF
I	36	13 (36.1)	12 (33.3)
II	36	18 (50.0)	18 (50.0)
III	36	12 (33.3)	18 (50.0)
Total	108	43 (39.8)	48 (44.0)

Table 2. Survival rates of subcultured blastodermal cells on the CEF feeder

Growth factors used	No. of blastodermal cell fragments	No. of survived/seed during subculture			Culture period (days)
		1st	2nd	3rd	
sDMEM only	13	22/39 (56.4)	16/46 (34.7)	1/2 (50.0)	6.0
sDMEM + bFGF	18	21/57 (36.8)	19/45 (42.2)	9/12 (75.0)	7.5
sDMEM + LIF	12	15/37 (40.5)	10/29 (34.4)	10/14 (71.4)	7.5

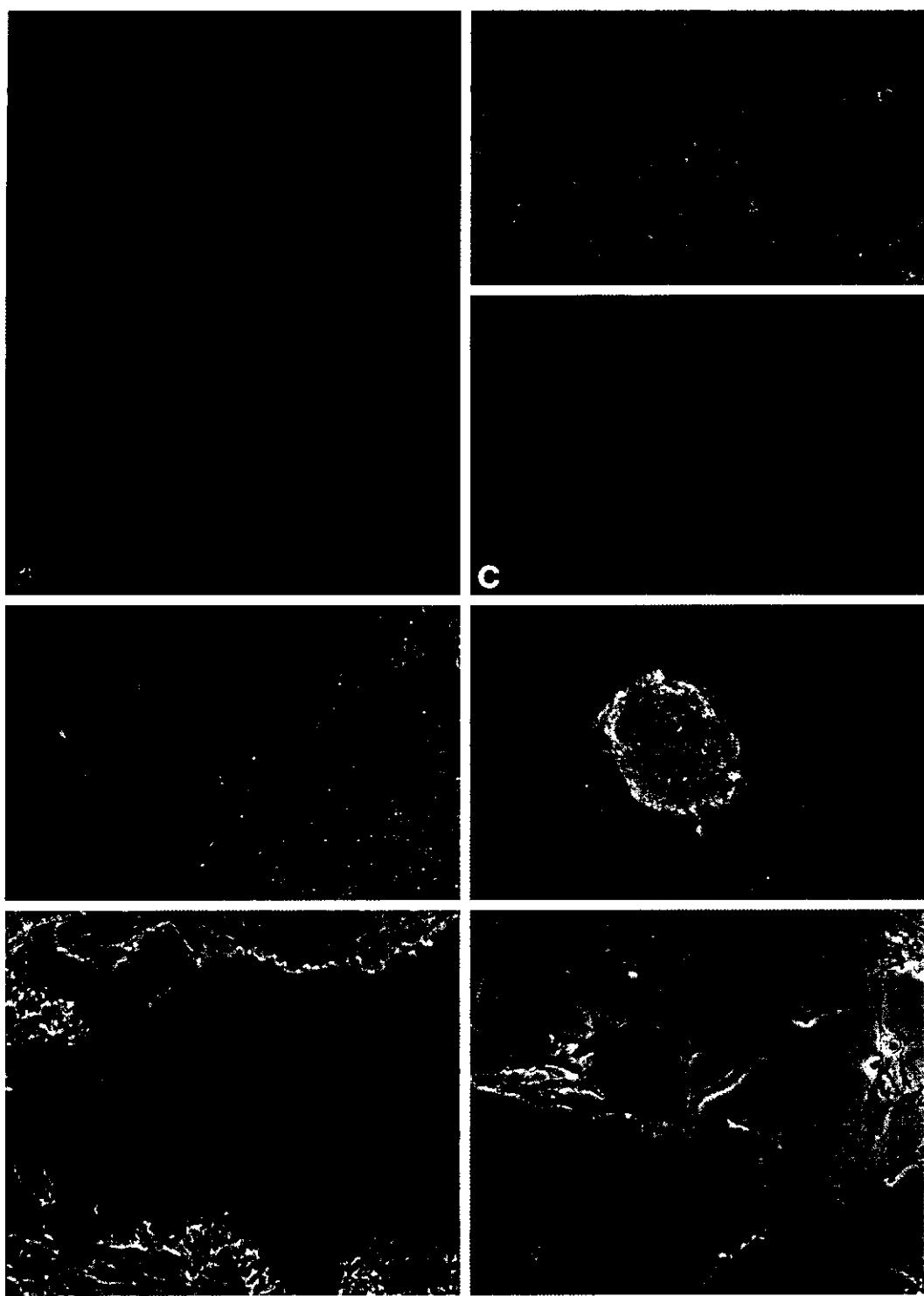


Fig 1. Formation of putative ES cell colonies obtained from the isolated embryonic blastodermal cells of hen's eggs. Blastodermal cells were isolated from fertilized hen's eggs and made into small cell clumps using a mouth-controlled pipette in PBS+BSA (a). Most of early cells in suspension contained large number of yolk granules (b). The cells at recovery were at the interphase as evidenced by a DNA-specific dye, Hoechst 33258, suggesting that they were inactive at this stage (c). The cells showed yolk granules at early culture upto about 10 days (d). The granules gradually disappeared in later stage of cells at 20 days after 3 subcultures (e). Representative PAS-staining of putative ES colonies, an early and a late colony at day 2 (f) and day 20 of cultures (g), respectively.

어 성장인자의 사용이 중요한 요소로 인정되고 있다 (Matsui 등, 1991). CEF feeder와 공배양한 실험구에 있어서 생성된 colony 개수는 LIF 첨가구가, colony 형성을에서는 bFGF 첨가구가 좋은 결과를 보였으며, MEF feeder와 공배양한 경우, 생성된 colony 개수 및 colony 형성을 모두 LIF 첨가구에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다 (Table 3).

그러나 LIF와 bFGF 첨가구에 있어서, 일반적으로 성장인자 첨가시 효과라고 알려진 세포수의 증식이라는 결과를 얻는데는 실패하였는데, 이러한 이유는 사용된 성장인자가 포유류 (human and bovine recombinant)에서 유래하여, 배양하고자 하는 세포인 닭의 배반엽세포의 세포막에 존재하는 수용체와 적절한 반응을 보이지 않는 종특이성 (species specificity)이 발생한 결과로 생각된다. 이와 관련하여 Zhou 등 (1993)에 의하면 닭에 있어서 성장인자의 하나인 stem cell factor (SCF)의 cDNA로 아미노산 서열을 조사한 결과 사람과 생쥐의 SCF의 아미노산 서열과 각각 53%와 52%만의 유사성을 갖는다는 보고가 있다. 또한 사람과 설치류 LIF의 DNA 염기서열간에 75%의 유사성이 보고되어 있고 (Stahl 등, 1990), 같은 포유류간의 배아주세포 확립에 대한 실험에 있어서도 이종의 LIF는 생쥐 배아주세포의 분화방지에 효과적이지 못하다는 결과가 알려져 있다 (Anderson, 1992).

이러한 사실을 종합해 볼 때 닭에 있어서 배아주세포를 확립하기 위해서는 닭 특이적인 배양방법 및 종 특이적인 성장인자의 사용이 절실히 요구되어진다고 생각된다.

3. 잠정적 배아주세포로서의 배반엽세포의 동정

생쥐 배아주세포의 연구를 통해서, 배아주세포는 colony를 형성하고 무한히 증식되며 (Robertson, 1987), 여러 가지 단가항체 (ECMA-7, SSEA-1)에 특이적으로 반응하며, alkaline phosphatase와 같이 효소분석방법을 이용하여 동정이 된다는 보고 (Williams 등, 1988)등 여러 특성을 지니고 있음이 밝혀져 있다. 본 실험에서는 닭 수정란으로부터 분리한 배반엽세포의 체외배양을 통해 잠정적 배아주세포로 발달시킨 후 이의 동정을 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다.

다.

배아주세포의 특징은 개개 세포막의 경계없이 전체적으로 뚜렷한 외각을 나타내는 colony를 형성한다는 것이다. 본 실험시 생성되었던 colony는 다양한 크기를 가지고 있었으며, 형성된 colony의 표면은 광채 (brightness)를 가지고 있었다. 생쥐의 ICM유래 colony가 투명한 것에 비하여 약간 노란색을 나타내었다. 이 노란색은 난황과의 물질 교환과정중에 배반엽에 침착된 난황색소 (xanthophyll)로 추측된다. 몇몇 colony의 경우 배양 중에 다양한 세포형태를 지닌 광범위한 분화양상을 나타내었다 (Figs. 1d~1e).

PAS 염색은 α -amino alcohol과 1,2-glycol group이 aldehyde로 되는 산화반응과 반응물인 aldehyde가 Schiff reagent에 의해서 purple-red color를 띠는 2가지 화학반응에 의해서 진행되는 것으로 알려져 있는데, 다능성을 갖는 닭의 원시생식세포 (PGC)에서 특이적으로 발현되는 것으로 밝혀졌다. PAS염색을 배양중인 배반엽성세포 colony에 적용한 결과, 주변의 되먹임세포에는 염색반응이 일어나지 않았으며 colony에만 각각 2일 및 20일까지의 culture에서도 특이적인 선홍색 발색 반응을 보였다 (Figs. 1f~1g). 이러한 결과는 이들 세포들의 유전적 조작과 미세주입으로 이어지는 일련의 과정을 통해서 보다 효율적인 유전자변환 닭의 생산의 가능성을 보여준다. 즉 세포주를 형성한 배반엽세포에 경제성을 가진 외래유전자를 도입시켜, 선발한 다음 이들 세포를 수용체 난의 배판에 미세주입하여 카이미라를 형성시킨다. 이러한 카이미라를 통해서 외래유전자가 발현된 개체의 유전적 선발이 가능하고 이를 교배하여 생식질에 공여체 배아세포로부터 유래한 닭을 생산할 수 있을 것이다.

적 요

닭 수정란의 배반엽세포의 체외배양 및 유지를 위하여 다양한 배양조건에서 이들 세포의 증식, 분화 및 주세포 (stem cell)의 특성 여부를 검토하였다. 수정란으로부터 분리된 stage X의 배반엽성 세포는 20% FCS를 함유한 DMEM 배양액에서 배양하였다. 배반엽성 세포는 닭 태아성 섬유아세

Table 3. Survival rates of subcultured blastodermal cells on the MEF feeder

Growth factors used	No. of blastodermal cell fragments	No. of survived/seed during subculture			Culture period (day)
		1st	2nd	3rd	
sDMEM only	12	4/24 (16.7)	3/6 (50.0)	- (-)	4.3
sDMEM + bFGF	18	19/33 (57.6)	18/36 (50.0)	- (-)	5.8
sDMEM + LIF	18	14/47 (29.7)	7/14 (50.0)	- (-)	5.6

포 (CEF)와 생쥐 태아성섬유아세포 (MEF)에서 각각 공배양 되었는데, 초기 배양에서 CEF와 MEF사이에 colony형성을 유의차가 없었다. 배아주세포의 배양에 있어서 성장인자의 첨가효과를 알아보기 위해서 bFGF와 LIF가 사용되었는데 계대배양이 진행될수록 LIF, bFGF, control순으로 colony 형성을 보였다. 본 실험의 결과 초기 배양에 있어서는 CEF와 MEF간에는 되먹임세포로서의 유의차가 없는 것으로 나타났고, 성장인자의 첨가는 배반엽세포의 증식에 효과가 있었다. 배양중인 배반엽세포를 각각 2일, 20일에 PAS염색한 결과 형태적으로 stem cell형태를 보이는 세포들이 선홍색을 보여주었다. 배반엽세포 colony는 미분화된 PGC와 같이 PAS염색에 대해서 강한 정색반응을 보였으나 다른 종류의 세포에서는 정색반응이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 PAS염색에서 정색반응을 보인 colony들이 최소 20일까지는 체외에서 stem cell형태를 보이며, 유전자변환 닉을 생산하기 위한 배아주세포의 확립연구에 이용될 수 있음을 보여준다.

(색인어 : 배반엽세포, 체외배양, PAS 염색, 잠정적 ES세포)

사사

본 연구는 '99년도 농림기술개발 연구 과제 첨단기술개발 사업에 의해 수행되었음.

인용문헌

- Anderson GB 1992 Isolation and use of embryonic stem cells from livestock species. *Anim Biotechnol* 3:16-175.
 Carsience RS, Clark ME, Verrinder AM, Gibbins V, Etches RJ 1993 Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117: 669-675.
 Evans MJ, Kaufman MH 1981 Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
 Eyal-Giladi H, Ginsberg M, Farbarov M 1981 Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J Embryol Exp Morph* 65: 139-147.
 Hamburge V, Hamilton HL 1951 A series of normal stages in the development of the chick. *J Morph* 88:

49-92.

- Han JY, Seo DS, Hong YH, Jeong DK, Shin YS 1996 Expression of lacZ gene in young chick gonad by the transfected primordial germ cells injection. *Korean J Poult Sci* 23: 61-69.
 Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa SI, Williams D, Zsebo K, Hogan BLM 1991 Effect of steel factor and leukemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353: 750-752.
 Marzullo G 1970 Production of chicken chimeras. *Nature* 225: 72.
 Naito M, Agata K, Otsuka K, Kino K, Ohta M, Hirose K, Perry MM, Egnchi G 1991 Embryonic expression of β -actin-lacZ hybrid gene injected into the fertilized ovum of the domestic fowl. *Int J Dev Biol* 35: 69-75.
 Park HB, Lee KH, Kim SU, Lee H, Choi SC, Lee SH 1995 *In vitro* proliferation, colonization and differentiation of blastodermal cells isolated from unincubated hen's egg. *Proc Korea Fed Soc Anim Sci No. B-9512 (Abstr.)*.
 Petitte JN, Clark ME, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ 1990 Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108: 185-189.
 Robertson EJ 1987 *Embryo-derived stem cell lines. In teratocarcinoma and embryonic stem cells: A practical approach.* IRL Press, Oxford, U.K. pp 1-49, 71-112.
 Stahl J, Gearong DP, Wilson TA, Brown MA, King JA, Gough NM 1990 structural organization of the genes for murine and human leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 265: 8833-8841.
 Thoraval P, Lasserrw F, Coudert F, Dambrine G 1994 Somatic and germline chicken chimeara as obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cell. *Poultry Sci* 73: 1897-1905.
 Vakaet L 1962 Some new data concerning the formation of the definitive endoblast in the chick embryo. *J Embryol Exp Morph* 10: 38-56.
 Williams MB 1994 Development and validation of swine embryonic stem cells: A review. *Reprod Fertil Dev* 6: 563-568.