Korean Journal of Life Science
Vol. 12. No. 1. 113~119, 2002

방선균이 생산하는 인산화타이로신 단백질 포스파타아제의 분자생물학적 연구

최학선* · 신용국[1] · 김춘성 · 김시욱

조선대학교 단백질소재연구센터
[1]국립보건원 중앙유전체연구소

The Molecular Study of Phosphotyrosine Protein Phosphatase (PtpA) from *Streptomyces coelicolor* A(3)2

Hack Sun Choi*, Yong Kook Shin[1], Chun Sung Kim and Si Wouk Kim

Reserch Center for Proteineous Materials Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea
[1]Central Genome Center, Korea National Institute of Health 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul 122-701, Korea

Abstract

The cloning and expression of Phosphotyrosine Protein Phosphatase into *E. coli* provides important tools of understanding of its functions and signal transduction mechanisms. The abundant soluble protein of the Phosphotyrosine Protein Phosphatase A (PtpA) and the active site mutant PtpA(C9S) were produced using the expression vector pET26 in *E. coli* and pIJ6021 with the thiostrepton in *S. lividans*. The enzyme activity of both proteins extracted by Ni-NTA column had same results from the expression vector pET26 and pIJ6021. The enzyme activity of phosphatase was found in the protein of PtpA, but not in that of C9S. The western blot detected by penta His-tag antibody resulted in the inducer, thiostrepton was not a good trigger to induce a large amount of PtpA protein. The overexpression of both proteins had no significantly different effect on the A factor cascade related to the secondary metabolite and mycelium formation between PtpA and C9S. However, overproduction of PtpA protein using pIJ6021 in *S. lividans* brought about a dramatic decrease in the amount of phosphotyrosine proteins (p200, p90, and p65), but no significantly phenotypic variation in *S. lividans*. This indicates that PtpA has an important proteome role in signal transduction mechanism of producing massive amount of phosphotyrosine protein in *Streptomyces* sp.

Key words – PtpA, pIJ6021, PtpA(C9S), *S. lividans*

서 론

방선균은 호기성, 그람 양성 세균으로서 균사(mycelium), 기질균사(substrate mycelium), 기중균사(aerial mycelium) 및 포자(spore)를 순차적으로 형성하는 복잡한 형태 및 분화를 행하는 전형적인 토양 미생물이다[1]. 이들은 형태 분화(morphological differentiation)와 동시에 항생제를 포함한 상업적으로 중요한 이차대사산물(secondary metabolite)을 생산하기 때문에 산업적으로 매우 중요한 미생물로서 주목받고 있다. 최근 동물세포의 신호전달 연구 및 세균 신호전달 연구가 활발히 이루어지고 있고, 방선균의 형태

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 062-230-6754, Fax : 062-225-6040
E-mail : choihs@mail.chosun.ac.kr

분화 및 항생제 생산은 signal transduction 경로와 밀접한 관계가 있다는 사실이 보고되어지고있다[5,9].

신호전달에 관련된 효소는 주로 세린/트레오닌 단백질 키나아제, 히스티딘 키나아제, 그리고 타이로신 키나제 등이다. 이들은 진핵생물에서 주로 연구가 많이 되어 왔지만, 원핵생물인 세균에서는 그 연구가 부족한 상태이다. 그러나 세린/트레오닌 단백질 키나아제와 히스티딘 키나아제에 대한 연구가 세균에서 집중적으로 행하여지고 있고, 방선균에서도 단백질 인산화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[2]. 이들 중에 세린, 트레오닌인을 인산화시키는 단백질 키나아제가 발견되었으며, 이차대사 산물 생산이 진핵생물과 유사한 세린/트레오닌 단백질 키나아제와 two-component 조절 시스템인 히스티딘 키나아제에 의하여 조절되어진다고 알려지게 되었다[7,12,14].

방선균에서 신호전달에 중요한 포스포 타이로신 단백질을 확인하기 위해 포스포 타이로신 항체를 사용하여 실험한 결과 *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolar*등에서 타이로신 인산화가 확인되었고, 이들 균에서 단백질 타이로신 키나아제의 활성을 처음으로 관찰할 수 있었다[15].

세균에서 진핵과 유사한 PTPase(타이로신 단백질을 탈인산화시키는 효소)는 방선균에서 처음으로 분리되어 phosphotyrosine phosphatase (PTPase)로 확인되었다[10]. 그리고 이들은 진핵생물의 PTPase와 구조가 매우 유사하였으며, 효소활성부위에 시스테인을 공통적으로 가지는 같은 효소로서 알려지게 되었으나, 아직까지 이 효소의 대량 발현 및 방선균에서 발현 연구는 전혀 되어 있지 않았고, target 단백질에 대한 연구가 전무하여 이들을 연구하고자한다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

실험에 사용한 대장균은 JM109, JM110, 및 BL21 (DE3)을 사용하였고, 항생제(Ampicillin; 50㎍/㎖, Kanamycin; 25㎍/㎖)를 포함하는 LB배지를 사용하여 대장균을 배양하였다. 대장균에 사용한 클로닝 벡터 및 발현벡터는 pUC19와 pET26b을 사용하였다. 방선균은 *Streptomyce lividans*와 *Streptomyces coelicolor* A3(2)을 사용하였고 배지는 YEME [6]배지에 접종하여 30℃에서 배양하였다. 방선균의 발현벡터는 pIJ6021로서 항생제는 thiostrepton (50㎍/㎖)과 Kanamycin(15㎍/㎖)을 사용하였다.

일반적인 재조합 기술

제한효소, T4 ligase, Taq polymerase는 Takara Suzo Co에서 구입하여 사용하였고, 대장균의 유전자조작은 Maniatis 등[11]에 따라서 행하였으며, 방선균에 관한 실험은 Hopwood 등의 방법[6] 방법으로 실험하였다.

대장균에서 *ptpA*와 *ptpA(C9S)* 유전자의 발현 및 단백질 정제

PtpA 및 *ptpA(C9S)* 유전자를 *S. coelicolar* 염색체를 주형으로 다음과 같은 primer로 PCR하였다(*Nde*I: gccCATATGACCTACCGCGTCTGTTTCGTGTGC, *Xho*I attCTCGAGCCGGCAGGTGGAAGTGGGCGGCGGCG). 증폭된 단편을 *Nde*I과 *Xho*I으로 절단하여 pET26(+)에 삽입하여 대장균(BL21 DE(3))에 형질전환 하여 형질 전환체를 확인하였으며, 대장균 발현 숙주에서 단백질을 발현시켰다. PtpA (C9S) 단백질을 만들기 위해서 아미노산 9번의 시스테인을 세린으로 전환하기 위해 다음과 같은 primer로 PCR하였다 (*Nde*I: gccCATATGACCTACCGCGTCTGTTTCGTGAGC, *Xho*I: attCTCGAGCCGGCAGGTGGAAGTGGGCGGCGGCG). PtpA 단백질을 발현시키기 위해 *ptpA* 유전자를 가지고있는 대장균을 16시간 전 배양하여 새로운 배지에 1% 접종하여 3시간 배양하였고, 최종 농도 1mM IPTG를 첨가하여 2시간 더 배양하여 단백질을 발현시켰고, 이들 단백질의 발현정도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그리고 대장균을 모아서 원심분리하여 초음파로 파쇄하고 13,000rpm으로 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 발현된 단백질은 Qiagen사의 protocol에 준하여 Ni-NTA Spin column을 사용하여 정제하였다.

방선균에서 *ptpA*와 *ptpA(C9S)* 유전자의 발현 및 단백질 정제

방선균에 발현시키기 위해 *Bam*HI 제한효소 부위를 가지고있는 합성 올리고를 pET26벡터에 삽입하여 pET26-*Bam*HI 벡터를 만들었다. PCR을 사용하여 *ptpA*와 *ptpA(C9S)* 유전자를 증폭하여 pET26에 삽입하여 pET26-PtpA을 만들었다. *Nde*I과 *Xho*I로 절단된 pET26-*Bam*HI에 동일한 효소로 절단된 *ptpA* 유전자를 삽입하여 pET26-PtpA-*Bam*HI 벡터를

만들었다. pET26-PtpA-*Bam*HI 벡터에 제한효소 *Nde*I과 *Bam*HI을 사용하여 *ptpA*을 분리하였고, 방선균의 발현벡터인 pIJ6021[13]에 동일한 제한효소로 절단하여 *ptpA* 유전자를 삽입하여 pIJ6021-PtpA-His tag을 만들었다. 또한 pIJ6021-PtpA(C9S)-His tag 벡터도 상기와 같은 방법으로 구축하였다[13]. 이렇게 만든 벡터 (pIJ6021-PtpA-His tag, pIJ6021-PtpA(C9S)-His tag)을 방선균 protoplast에 형질전환 하였다.

PtpA 및 PtpA(C9S) 단백질을 발현시키기 위해 *ptpA* 및 *ptpA(C9S)* 유전자를 가지고있는 방선균을 YEME 배지에서 48시간 전 배양한 후, 새로운 YEME 배지에 전배양액 1%를 접종하여 48시간 배양하였다. 그리고 원하는 유전자를 발현시키기 위해 최종 농도 5㎍/㎖ thiostrepton를 첨가하여 24시간 배양하여 유도시키고, 원하는 단백질의 발현정도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 배양된 방선균을 모아서 원심 분리하여 초음파로 방선균을 파쇄하고 13,000rpm으로 원심 분리하여 상등액을 회수하였다. 발현된 단백질은 Qiagen사의 protocol에 준하여 Ni-NTA Spin column을 사용하여 정제하였다.

Ptp효소 활성 측정

Phosphotyrosine phosphatase활성은 Wo의 방법[16]에 따라 측정하였고, *p*-nitrophenylphosphate 기질을 사용하여 410nm에서 유리된 *p*-nitrophenol양을 측정하였다.

Anti-phosphotyrosine 및 penta His-tag항체를 이용한 방선균 단백질의 Western blot 분석

방선균 파쇄물 10㎍을 SDS-PAGE하여 PVDF 막에 electrotransfer시킨후, 막을 10% blocking reagent (Boehringer Mannheim)에 넣어 2시간 상온에서 반응하여 blocking시켰다. 그리고 5000:1로 희석한 anti-phosphotyrosine peroxidase 및 penta His-tag항체를 첨가하여 1시간 상온에서 반응시킨 다음, 이 막을 TBST (Tris buffed saline-Tween 20) 완충액으로 5회 세척한 뒤 Boehringer Mannheim 형광 발색 방법에 따라 현상하였다.

결과 및 고찰

PtpA 및 *ptpA(C9S)* 유전자의 클로닝 및 대장균에서의 발현

방선균의 PtpA는 기존의 동물 및 세균의 phosphotyrosine protein phosphatase와 구조가 유사하며, 특히 효소활성 부위의 시스테인 잔기가 두 개 붙어있는 것이 특징적이다. 방선균의 PtpA및 PtpA(C9S) (효소활성 부위인 시스테인을 세린으로 치환하여 효소활성이 없는 단백질) 단백질을 유전자 증폭기술을 이용하여 이들 유전자를 클로닝하였다. 그리고 이 유전자를 단백질 발현벡터인 pET26b에 클로닝하여 단백질 발현 실험을 실시하였다. pET26b 발현 벡터에 클로닝한 *ptpA* 및 *ptpA(C9S)* 유전자는 1mM IPTG에 유도되어 다량의 단백질을 발현하였고, 이들 대부분은 soluble 단백질이었다(Fig. 1A). 그리고 이들 효소를 정제하기 위해 Ni-NTA 컬럼에 흡착시켜, 250mM 이미다졸로 용출하여 정제한 결과 대부분 불순물이 제거된 상태로 정제되었다(Fig. 1B). 정제된 효소를 투석하여 활성을 측정해본 결과 PtpA에서 활성이 존재하였지만, PtpA(C9S)에서 효소활성은 존재하지 않았다는 것을 알 수 있었다.

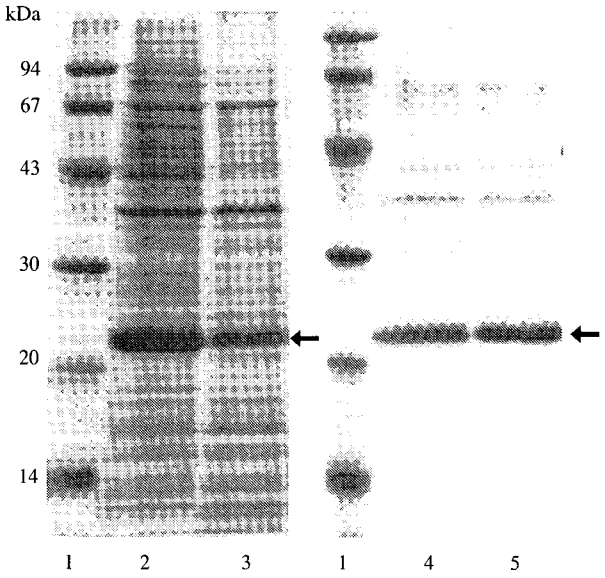

Fig. 1. Overproduction and purification of recombinant PtpA. Soluble proteins from *E. coli* BL21 and purified PtpA were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular mass standards. Lane 2, 3, soluble fraction from BL21 cells harboring pET26-PtpA and pET26-PtpA (C9S), respectively. Lane 4, 5, the purified PtpA and PtpA(C9S) proteins using Ni-NTA column. The location of ptpA and ptpA(C9S) proteins are indicated by arrows.

방선균에서 *ptpA* 및 *ptpA(C9S)* 유전자의 발현

방선균에서 PtpA 및 PtpA(C9S) 단백질의 기능을 알기 위해서 앞 실험에서 사용한 *ptpA* 및 *ptpA(C9S)* 유전자를 이용하여 방선균 발현벡터인 pIJ6021에 cloning하였다(Fig. 2). 지금까지 알려진 방선균의 발현벡터는 주로 방선균 tip promoter 및 tip terminator를 사용하여 단백질을 발현시켰는데, 이중 최근에 개발된 pIJ6021는 효율적인 방선균 발현벡터로 널리 알려져서 본 실험에 사용하였다. 따라서 본 실험에서 *ptpA* 및 *ptpA(C9S)* 유전자를 이 벡터에 cloning하고 방선균에서 발현시켰다. 이때 효율적인 단백질 정제를 위하여 C말단에 히스티딘 잔기에 해당하는 유전자를 붙여서 실험을 실시하였다. *PtpA* 및 *ptpA(C9S)* 유전자는 thiostrepton에 유도되어 다량의 단백질을 발현하였으며, 이들 대부분은 soluble 단백질로 나타났다(Fig. 3A). 발현량은 대장균보다는 적었지만 충분한 양을 확보할 수 있었고, 이들 효소를 정제하기 위해 Ni-NTA 컬럼에 흡착시켜, 250 mM 이미다졸로 용출하여 정제한 결과, 대부분 불순물이 제거된 상태로 순수하게 정제되었다(Fig. 3B). 정제된 이 효

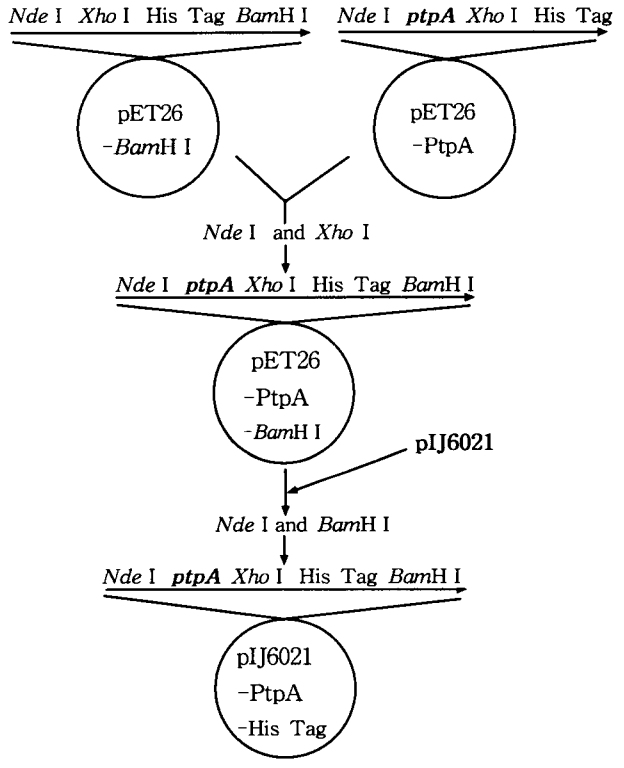

Fig. 2. Construction of pIJ6021-PtpA-His tag and pIJ6021-PtpA(C9S)-His tag.

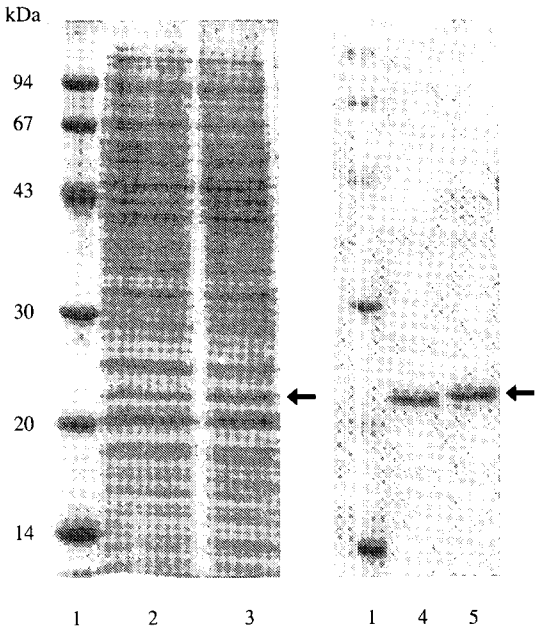

Fig. 3. Overproduction and purification of recombinant PtpA in *Streptomyces*. Soluble proteins from *Streptomyces* and purified PtpA were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular mass standards. Lane 2, 3, soluble faction from *Streptomyces* harboring pIJ6021-PtpA and pIJ6021-PtpA(C9S), respectively. Lane 4, 5, the purified PtpA and PtpA(C9S) protein using Ni-NTA column. The location of PtpA and PtpA(C9S) proteins are indicated by arrows.

소들을 투석하여 활성을 측정해 본 결과, PtpA에서만 활성을 나타내었고, PtpA(C9S)에서는 활성이 검출되지 않았다.

방선균에서 *ptpA* 및 *ptpA(C9S)* 유전자 유도 및 검출

PtpA 유전자 발현 및 유도제인 thiostrepton의 효과를 알아보기 위해 각 유전자를 발현시키고, 발현된 양을 확인하기 위해서 penta His-tag 항체(anti-penta His-tag)를 사용하여 Western blot을 실시하였다. 그 결과 유도제인 thiostrepton을 첨가하지 않아도 기본적으로 유전자가 발현되었고, thiostrepton을 첨가한 경우에는 보다 많은 양의 PtpA 및 PtpA(C9S) 단백질이 발현되었다(Fig. 4). 이들 유전자의 표현형을 알기 위해서 과도하게 이 유전자들을 발현한 결과, 방선균의 균사형성 및 항생제 생산에 영향을 주지 못했다. 따라서 이 효소의 기능은 이차대사 생산 및 균사형성에

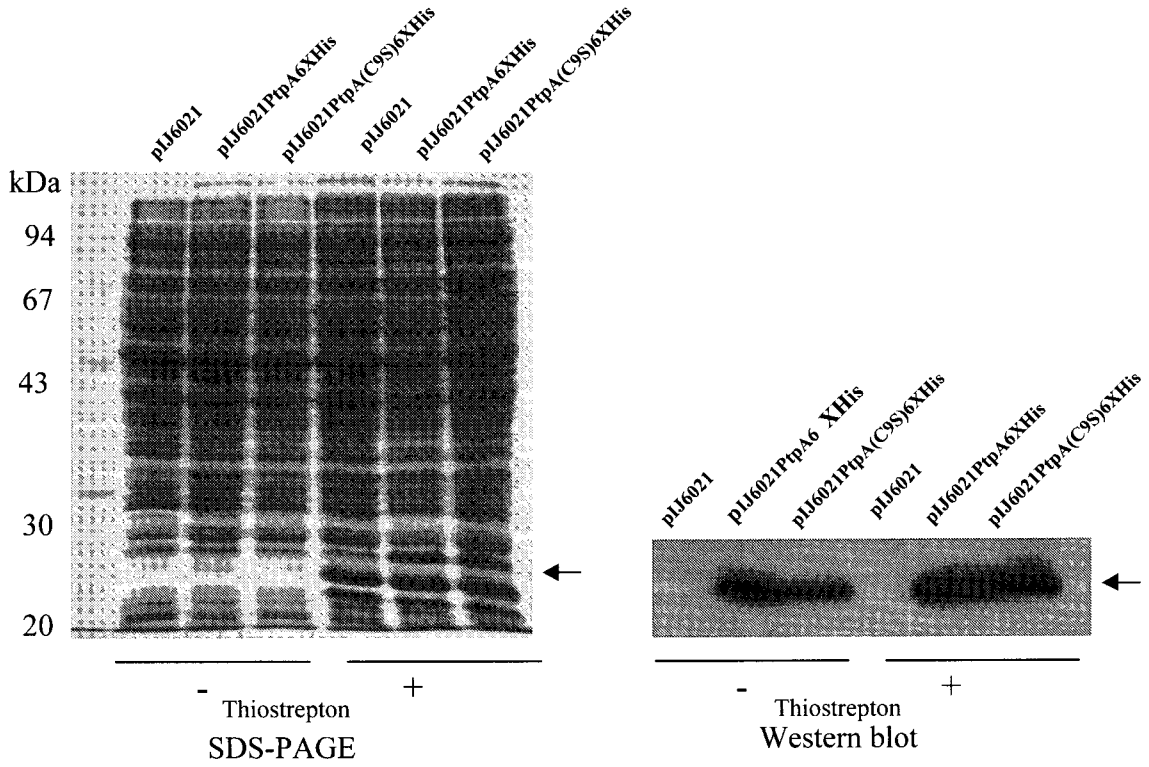

Fig. 4. Induction and detection of PtpA and PtpA(C9S) proteins. (A) Total protein of *S. lividans* TK21 containing pIJ6021, *ptpA* and *ptpA(C9S)* gene. Lane 1, 2, and 3 is uninduced total protein of *S. lividans* TK21 containing pIJ6021, *ptpA* and *ptpA(C9S)* gene. Lane 4, 5, and 6 is induced total protein of *S. lividans* TK21 containing *pIJ6021*, *ptpA* and *ptpA(C9S)* gene (B) Immunoblot analysis with penta His-tag antibody. Lane 1, 2, and 3 is uninduced total protein of *S. lividans* TK21 containing pIJ6021, *ptpA* and *ptpA(C9S)* gene. Lane 4, 5, and 6 is induced total protein of *S. lividans* TK21 containing pIJ6021, *ptpA* and *ptpA(C9S)* gene PtpA and PtpA(C9S) proteins are indicated by arrow.

중요한 A factor cascade[5]에 관련되어 있지 않다는 것으로 판명되었다. 따라서 PtpA binding 단백질을 분석해야만 이들의 생물학적 기능을 파악할 수 있으리라 생각되었다.

방선균에서 발현된 PtpA 및 PtpA(C9S)와 타이로신 인산화 단백질의 연관성

PtpA의 생물학적 기능을 파악하기 위해 이 효소의 기질 및 표적 단백질을 분석하였다. PtpA 및 효소활성부위가 변형된 PtpA(C9S)을 대량 발현시킨 방선균에서 각각의 타이로신 인산화 단백질의 패턴 변화를 시간 별로 분석하였다. 특히 Western blot의 감도를 증가시키고 부분적인 해상도를 증가시키기 위해서 아크릴 아마이드 함량을 7.5%, 12.5%로 변화를 주어 실험을 실시하였다. 시간별로 분석한 결과 시간 변화 추이와 타이로신 인산화 단백질의 패턴 변화가 거의 없었지만, 발현된 유전자의 종류에 따라서는 타이로신 인산화 단백질의 패턴 변화를 명확히 나타내었다. PtpA 단백질이 다량 발현되는 방선균에서는 전체 타이로신 인산화 단백질의 종류 및 양의 현저한 변화를 확인할 수 있었으며, 전적으로 감소하는 경향을 나타내었고, 활성 부위의 변이에 의해 기질 단백질과 결합 만 하는 PtpA(C9S) 단백질(Dorminant negative)은 wild type과 같은 타이로신 인산화 단백질 패턴을 나타내었다. 따라서 이러한 결과로 보아 PtpA는 세포내 여러 기질 단백질에 작용하여 탈인산화을 촉진하며, 특히 3종류의 단백질 p200, p90, 그리고 p65에 직접 작용한다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 5). 또한 이들 세 타이로신 단백질은 PtpA의해 조절 받는 단백질로 확인되었으며, 보다 많은 실험을 통해 이들 단백질의 종류 및 기능을 파악하여야 할 것이다.

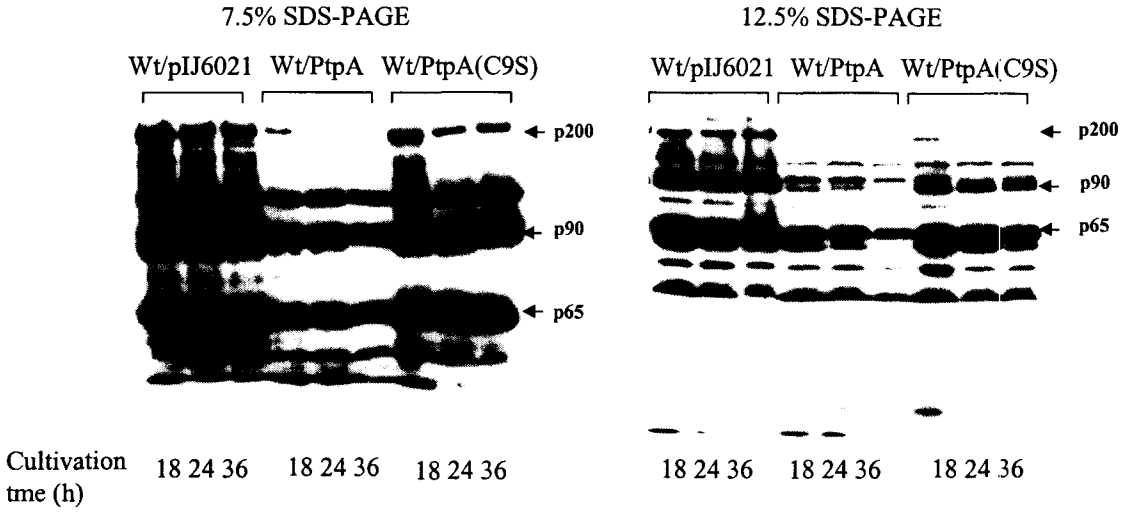

Fig. 5. Changes in the profiles of phosphotyrosine-proteins in *S. lividans* TK21.

요 약

방선균에 존재하는 단백질 타이로신 포스파타아제의 기능을 알아보기 위하여 우선 이 유전자를 대장균에 클로닝하여 대량으로 발현시킨 결과, 발현된 단백질은 soluble형태로 존재하여 자신의 효소활성을 가지고 있었으나, 효소활성부위에 대한 변이주의 경우에는 기질과 결합은 하였으나 활성이 없는 것으로 나타났었다.

방선균에서 이 효소의 세포내 기작 및 결합 단백질을 파악하기 위해 대장균에 클로닝한 유전자를 방선균 발현벡터(pIJ6021)에 클로닝을 하였다. 이렇게 만든 유전자를 inducer인 thiostrepton을 이용하여 발현시킨 결과, 활성형의 단백질 타이로신 포스파타아제가 대량으로 생산되었다. 그리고 이들 유전자를 방선균에서 과잉 발현시킨 결과 항생제 생산 및 형태 변화 등의 표현형은 나타나지 않았다. 이 효소와 반응하는 기질 및 결합 단백질을 찾기 위해서 이들과 결합은 하지만 반응하지 않는 돌연변이 단백질 타이로신 포스파타아제 (PtpA(C9S))를 유전자 조작하여 방선균에서 과잉 발현시켰다. 그 결과 표현형은 없었지만 인산 타이로신 단백질의 패턴변화를 알 수 있었고, 단백질 타이로신 포스파타아제에 의하여 인산화 조절되는 단백질 3개 찾을 수 있었다. 이들 세 단백질(p65, p90 그리고 p200)은 *ptpA(C9S)*가 발현된 방선균에서 보다 더 많은 인산화 패턴을 나타내었으며, 이들은 가능한 단백질 타이로신 포스파타아제의 표적이라고 생각되었다. 만약 이들의 구조가 밝혀진다면, 방선균의 타이로신 포스파타아제의 기능 및 신호전달 과정의 역할을 파악할 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Chater, K. F. 1993. Genetics of Differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 685-713.
2. Dobrova, Z., M. Jiresova, T. Petrik, P. Rysavy, J. Naprstek and J. Janecek. 1990. Protein phosphorylation in *Streptomyces albus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**, 145-148.
3. Freestone, P., T. Mirella, S. C. Clarke, T. Nystrom and V. Norris. 1998. Tyrosine phosphorylation in *Escherichia. coli*. *J. Mol. Biol.* **279**, 1045-1051.
4. Grangesse, C., P. Doublet, C. V. E. Vaganay, B. Duclos and A. J. Cozzone. 1988. Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine-protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii* *J. Mol. Biol.* **278**, 339-347.
5. Hong, S. K., M. Kito, T. Beppu and S. Horinouchi. 1991. Phosphorylation of AfsR product, global regulatory protein for secondary-metabolite formation in *Streptomyces coelicolar* A3(2). *J. Bacteriol.* **173**, 2311-2318.
6. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith,

J. M. Ward and H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual, John Innes foundation, Norwich.

7. Horinouchi, S., M. Kito, M. Nishiyama, K. Furuya, S. K. Hong, K. Miyake and T. Beppu. 1990. Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolar* A3(2). *Gene* **95**, 49-56
8. Ilan. O., Y. Bloch, G. Frankle, H. Ullrich, K. Geider and I. Rosenshine. 1999. Protein tyrosine kinase in bacterial pathogens are associated with virulence and production of exopolysaccharide. *EMBO J.* **18**, 3241-3248.
9. Ishizuka, H., S. Horinouchi, H. M. Kieser, D. A. Hopwood and T. Beppu. 1992. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **174**, 7585-7594.
10. Li, Y. and W. R. Strohl. 1996. Cloning, purification and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolar* A(3)2. *J. Bacteriol.* **178**, 136-142.
11. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
12. Matsumoto, A., H. Ishizuka, S. Horinouchi and T. Beppu. 1994. Phosphorylation of AfsR protein secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**, 47-56.
13. Takano, E., J. White, C. J. Thompson and M. Bibb. 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for in *Streptomyces* spp. *Gene* **166**, 133-137.
14. Urabe, H and H. Ogawara. 1995. Cloning, sequencing and expression of serine/threonine kinase-encoding genes from *Steptomyces coelicolar* A3(2). *Gene* **153**, 99-104.
15. Waters, B., D. Vujaklija, M. R. Gold and J. Davies. 1994. Protein phosphorylation in *Streptomyces. FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 187-190.
16. Wo, Y. Y. P., A. L. Mccormack, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. P. Davis, G. L. Mitchell and R. L. Van Etten. 1992. Sequencing, cloning, and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 10856-10865.

(Received January 29, 2002; Accepted February 18, 2002)