

PPAR δ 启动子克隆及活性分析

何成强* 李丛丛 吴艳红 安利国 李云龙

(山东师范大学生命科学学院动物抗性实验室, 济南 250014)

摘要 过氧化物酶体活化的受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) α 、 δ 、 γ 是核受体超家族成员, 它们是配体调节的转录因子, 在脂类代谢过程中起非常重要的作用. PPAR δ 在骨骼肌中的表达分别要比 PPAR α 和 PPAR γ 高 10 倍和 50 倍, 它的活化将导致骨骼肌细胞中有氧代谢相关的基因表达升高. 为研究 PPAR δ 在骨骼肌中的表达调节, 克隆了 PPAR δ 基因 5'侧翼区 2 kb 的 DNA 片段, 体外实验证明该片段可以启动 GFP 表达. 然后通过不同的限制酶消化获得不同长度的 PPAR δ 启动子, 经启动子活性实验分析发现, 转录起始位点 5'侧翼区上游 179 bp 的片段就具有启动子活性. 通过在线工具对 2 kb 启动子上潜在的转录因子和结合位点进行分析, 发现有 4 个肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2) 潜在的结合位点, 在 MEF2A 共转染实验中, 发现随着 MEF2A 浓度升高, 2 kb 的 PPAR δ 启动子转录活性增强, 表明 MEF2A 确实能提高 PPAR δ 启动子活性. 上述结果为研究 PPAR δ 在肌肉中的表达调节和功能提供了依据.

关键词 PPAR δ , MEF2A, 骨骼肌

学科分类号 Q507

过氧化物酶体活化的受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 是核受体超家族成员, 它们是配体调节的转录因子. 小鼠存在 3 类 PPARs, PPAR α 、PPAR δ (又叫 PPAR β) 和 PPAR γ . 这些受体与视黄酸 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 结合形成异源二聚体后, 活化许多与脂代谢有关的基因表达^[1]. PPAR α 和 PPAR γ 研究得比较清楚, 但 PPAR δ 功能尚未完全清楚. 目前发现, PPAR δ 可能参与骨形成、脂代谢和表皮成熟^[2]. 最近发现 PPAR δ 与结肠癌形成有关. 有关的证据表明, 结肠癌细胞中 PPAR δ 的表达升高, 推测该基因可能参与结肠癌细胞的分化调节^[3,4]. PPAR δ 缺失鼠大部分不能发育到原肠期, 能存活的个体表现为体内脂肪明显减少^[5]. PPAR δ 在许多组织中表达, 包括肝、肌肉和脂肪等代谢活跃的位置. 对 PPAR δ 的生理功能研究的主要障碍是目前还不清楚究竟谁是它的生理配体. 几个饱和脂肪酸(14~18 碳)可以结合到 PPAR δ 的配体结合结构域^[6]. 白三烯类激素包括前列腺素 A1、前列环素 PGI₂ 等也可以活化 PPAR δ ^[7]. 然而究竟是哪一种脂肪酸或前列腺素是 PPAR δ 的生理配体还是不清楚. 合成的 PPAR δ 高亲和力激动剂 (agonist) GW501516 处理小

鼠后发现高密度脂蛋白胆固醇升高^[8,9], 体重下降. 当持续用 GW501516 处理时, 还可以调节肌纤维类型转换^[10,11]. 看来在肌肉和脂肪组织中, PPAR δ 调节脂肪分解和氧化磷酸化过程.

肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF 2) 是一种最初在骨骼肌管核发现的蛋白质, 具有 DNA 的结合活性, 可与肌肉肌酸激酶 (muscle creatine kinase, MCK) 基因启动子中富含 AT 的 DNA 序列结合^[12]. MEF2 属于转录调节因子 MADS2Box 家族, 在小鼠中有 4 种类型, MEF2A、MEF2B、MEF2C 和 MEF2D, 它们在肌肉的发育和分化过程中有非常重要的作用^[12]. 因为 PPAR δ 在肌细胞中呈现高表达模式, 暗示有些相应的转录因子可能增强其在肌细胞中的表达. 我们对 PPAR δ 转录起始位点侧翼序列进行分析, 发现其上有多多个 MEF 2 的结合位点.

研究 PPAR δ 的表达调节可能为研究该基因的功能提供一些新的数据, 但这方面的研究还少有报

* 通讯联系人. Tel: 0531-86180745, E-mail: hchqiang@yahoo.com.cn
收稿日期: 2006-10-19, 接受日期: 2006-12-06

道. 基于此, 我们分离了 PPAR δ 的转录起点上游 2 kb 的片段, 在 3T3 和 COS7 细胞中进行分析, 发现其有启动子活性. 通过构建 MEF2A 过度表达的细胞模型, 我们也发现该基因的启动子活性受到转录因子 MEF2A 上调.

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

细胞系 COS7 和小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH3T3 在 37℃, 5% CO₂ 条件下, 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养.

MEF2A 真核表达载体 pMEF2A 由 Russo AF 教授(Iowa 大学)友情提供. 启动子活性分析对照质粒为 pRL-TK(Promega 产品).

为了克隆 PPAR δ 启动子, 根据小鼠染色体序列设计和合成引物, 参照已经发表的数据, 确定 PPAR δ 的转录起始位点. 使用合成的引物对(5' → 3'), TGAAGCCCTTGTTCCTACTC (Fpp) 和 CT-GTCCCGGCCGCCTCTCGC (Rpp), 以昆明种小白鼠肝 DNA 为模板, 用 PCR 扩增了一条位于第一个外显子的 5'侧翼区序列, 长度为 2 000 bp. 为了克隆方便, 分别在正、反向引物 5'前加 *Nhe* I 或 *Sma* I 限制酶位点. 将扩增产物克隆到 T 载体(Promega 产品), 获得质粒 pTPP. 经测序(由三博生物技术公司完成)确证质粒正确后, 将启动子亚克隆到 pEGFP-N3 后, 用 PCR 将 PPAR δ 启动子、GFP 和 polyA 加尾信号扩增出来, 亚克隆到 pGEM-T, 得到质粒 pTPPGFP, 同样获得没有 PPAR δ 启动子, 但载有 GFP 和 polyA 加尾信号的 pGEM-T 对照质粒 pTEGFP, 以消除 pEGFP-N3 上真核启动子对 PPAR δ 启动子活性的干扰. 或将启动子亚克隆到 pGL₂-basic(Promega 产品)中, 获得质粒 pGLPP, 并分别用 *Nsi* I、*Stu* I、*Nde* I、*Pst* I 和 *Sac* II 消化 pGLPP 获得不同长度的启动子片段, 分别命名为 pGLPP/*Sac* II、pGLPP/*Pst* I、pGLPP/*Nde* I、pGLPP/*Stu* I 和 pGLPP/*Nsi* I.

1.2 启动子活性实验

为了定性研究 PPAR δ 启动子活性, 将 pTPPGFP 和 pTGFP 分别转染到 COS7 细胞中, 在荧光显微镜下观察 GFP. 为了定量确定启动子活性, 按照适当的细胞数将 NIH 3T3 和 COS7 接种到 24 孔细胞培养板或 35 mm 培养皿中. 培养 18 h 后将 pRL-TK(参照质粒)和重组质粒 pGLPP 共转染到细胞中. 在共转染实验中, pGLPP 或其衍生的质粒与

pRL-TK 比为 5 : 1. 采用 Lipofect AMINE2000 脂质体(Life Technologies, Inc.), 按照厂商提供的方法转染. 转染后 24 h, 将细胞裂解, 荧光素酶活性采用双荧光素酶分析系统(Promega 产品)确定, 方法按厂商提供的手册进行. 每个定量实验至少重复 3 次.

1.3 转录因子在线分析

利用在线工具 TRANSFAC 和 MatInspector software (<http://www.genomatix.de/>) 对 PPAR δ 启动子进行分析, 以确定启动子上转录因子的种类和相应的结合位置.

1.4 过度表达实验

为确定 MEF2A 对 PPAR δ 启动子活性的调节作用, 将不同浓度的 pMEF2A 和 pGLPP 连同的 pRL-TK 共转染 NIH 3T3. 用空质粒 pCDNA 维持转染的质粒总量恒定. 分别测量不同浓度 pMEF2A 对荧光素酶活性的影响. 实验重复 3 次.

1.5 数据分析

为了统计分析, 定量实验至少重复 3 次. 以 $\bar{x} \pm s$ 来表示两种荧光素酶活性的比值 Fluc/Rluc. 用成对 Student's *t*-test 对数据进行分析, 如果 $P < 0.05$ 视为差异显著.

2 结 果

2.1 PPAR δ 启动子序列和转录因子分析

PPAR δ 基因位于小鼠 17 号染色体, 通过 PCR 方法扩增了第一个外显子的 5'侧翼区的 2 kb 长的序列, 经测序后将所得序列在 GenBank 中做比对, 发现与 Balb/c 小鼠 17 号染色体上相应的序列仅差 4 bp, 表明所克隆的确为所需的目标序列, 在染色体上相当于 14552702 至 14552706 位置(图 1). 该序列已经提交 GenBank, 编号为 EF057405. 进一步对该序列用 DNAMAN 软件进行限制酶谱分析, 发现所得的 DNA 片段从 5'~3'依次有 *Nsi* I (-1 453)、*Stu* I (-970)、*Pst* I (-179、-191 和 -564)、*Nde* I (-443)和 *Sac* II (+24) (第一个外显子 5'为 +1). 对所得启动子区用在线工具进行可能的转录因子种类和结合位点分析, 没有找到典型的 TATA 框, 但发现近端启动子除 CREB (CRE-binding protein)和 SP1 (Stimulating protein 1)等基本转录所需的转录因子外, 还有 4 个典型的 MEF2 结合位点(如图 1 所示), 而且, 在 -261 处(图 1 中 1 595)的序列 (tttaaagcttTAAAtatcgtttc)与 MEF2A 标准应答元件的一致性为 100%.

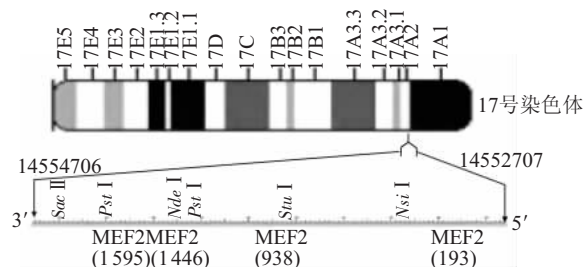


Fig. 1 A schematic representation of 2 kb PPAR δ promoter location in mouse chromosome 17 and its mapping of restriction endonucleases

The 2 kb promoter is located from 14552707 to 14554706 in mouse chromosome 17. Several restriction endonucleases found in the 2 kb promoter are marked above the promoter schematic representation. And several potential MEF2 *cis*-acting elements are marked under the promoter schematic representation.

2.2 PPAR δ 启动子活性分析

为了定性检测所得的 PPAR δ 的 5'侧翼区片段是否有启动子功能, 将 pTPPGFP 和 pTGFP 转染到

COS7 细胞中, 在荧光显微镜下观察发现, 仅 pTPPGFP 可以启动 GFP 的表达, 而对照质粒 pTGFP 转染的细胞没有观察到 GFP 表达(图 2). 表明我们确实分离到了 PPAR δ 启动子.

为了定量研究 PPAR δ 启动子活性, 将带有不同长度 PPAR δ 启动子的质粒分别与 pRL-TK 共转染 NIH 3T3 和 COS7 细胞, 24 h 后检测 2 种荧光素酶活性. 发现在这 2 种细胞中, *Sac* II 消化过的启动子没有转录活性, 与对照 (pGL2 基本质粒) 转录活性差异不显著 ($P = 0.1389$, NIH 3T3) 甚至更低. 其余长度的质粒均有转录活性. 其中近端启动子 (-179~+120, pGLPP/*Pst* I) 也具有基本的启动子活性, 与对照质粒 pGL2-basic 转录活性差异极显著 (双尾检验, $P = 0.0014$, NIH 3T3; $P = 0.00398$, COS7) (图 3). 虽然不同长度启动子在 2 种不同细胞中的转录活性不同, 但不同长度的启动子在 2 种细胞中有类似的规律, 即 2 kb 的启动子反而较其他截短的启动子活性低, 表明在 *Nsi* I 截断的片段中可能有抑制启动子转录的转录因子存



Fig. 2 The 2 kb PPAR δ promoter has ability to transcribe GFP in COS7 cells

(a) COS7 cells transfected with the control plasmid pTGFP is observed under brightlight. (b) GFP is not found in COS7 cells transfected with the control plasmid pTGFP. (c) A strong GFP signal is found in COS7 cells transfected with the plasmid pTPPGFP.

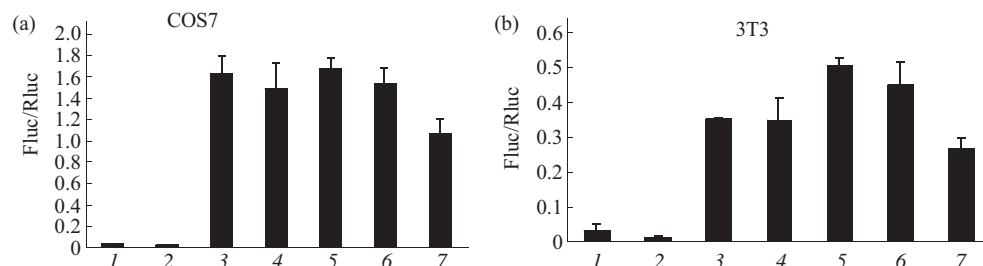


Fig. 3 Deletion analysis of the PPAR δ promoter fragment in COS7 and NIH 3T3 cells COS7 and NIH 3T3 cells were transiently transfected with luciferase reporter constructs containing serial deletions of the 2 kb DNA

Cells were transfected with reporter constructs (0.4 μ g/well) and a Rluc expression vector pRL-TK was added as an internal control. After 24 h, cells were lysed and Fluc and Rluc activities were measured. Results are $\bar{x} \pm s$ of three or more independent experiments. 1: pGL2-basic; 2: pGLPP/*Sac* II; 3: pGLPP/*Pst* I; 4: pGLPP/*Nde* I; 5: pGLPP/*Stu* I; 6: pGLPP/*Nsi* I; 7: pGLPP.

在. 用 *Nhe* I 截短的启动子在 2 种细胞中的转录活性都较用其他酶截短的启动子转录活性低, 转录活性最高的都是 *Stu* I 截短的启动子. 但在两种细胞中, 差异并不明显.

2.3 MEF2A 提高 PPAR δ 启动子转录活性

既然 PPAR δ 在肌细胞中高度表达, 可能受一些与之相适应的转录因子调节. 肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF 2)是一类在 3 种肌肉组织中高度表达的转录因子, 在肌肉的发育过程中有重要的作用. 将 MEF2A 表达质粒与 pGLPP 共转染后, 检测相对荧光素酶活性发现, 过度表达 MEF2A 的 NIH 3T3 细胞中, PPAR δ 启动子的转录活性增加 (图 4). 而且, 这种效应随 MEF2A 浓度升高而增加. 这些结果表明, MEF2A 确实可以提高 PPAR δ 启动子的转录活性.

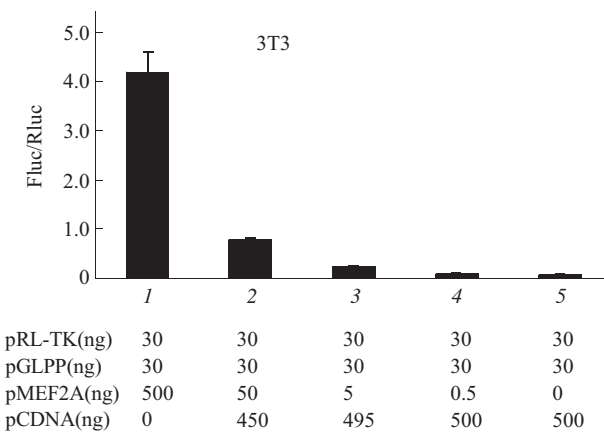


Fig. 4 MEF2A enhances the activity of the mouse PPAR promoter in NIH 3T3 cells

Co-transfection experiments of the PPAR promoter reporter and pMEF2A. pTK-Rluc was cotransfected with 30 ng of -2000 PPAR δ -luc construct, pGLPP and increasing amounts of pCMV-YY1 (0.5 ng, 5 ng, 50 ng and 500 ng, respectively). The total amount of DNA in all transfections was kept constant (560 ng) by the addition of the plasmid pCDNA3.1.

3 讨 论

骨骼肌是一个非常重要的代谢组织, 它吸收 80%的由胰岛素刺激产生的葡萄糖^[13]. PPAR δ 在骨骼肌中的表达分别要比 PPAR α 和 PPAR γ 高 10 倍和 50 倍^[14, 15]. PPAR δ 主要在有氧氧化而不是酵解型肌纤维中表达. 在啮齿类, 将 PPAR δ 持续靶向表达于骨骼肌后发现, 在快肌纤维占绝大多数的肌肉中, 慢肌纤维的比例升高^[15]. PPAR δ 介导的这种肌纤维重新编程作用与某些基因表达升高有关, 这些

基因参与脂肪酸氧化、线粒体呼吸、有氧代谢和慢肌纤维收缩颗粒(slow-twitch contractile apparatus). 类似的结果在体外培养的骨骼肌细胞 L6 和 C2C12 中观察到, 在这些细胞中, PPAR δ 的活化会升高氧化代谢相关的基因表达^[14, 16]. 这些结果表明, PPAR δ 在肌肉的有氧氧化过程中有非常重要的作用. 然而, PPAR δ 的天然配体至今没有定论, 因此关于该基因在肌细胞中的表达调节目前尚未见报道. 这里, 我们分离了 2 kb 的 PPAR δ 表达调节序列, 并发现, 这段序列可以在 COS7 细胞中启动 GFP 的表达(图 2), 表明它具有了启动子功能. 在 COS7 和 NIH 3T3 细胞中对不同长度的启动子进行活性分析发现, 2 kb 的启动子活性在这 2 种细胞中反而没有其他截短的启动子活性强, 提示在 *Nsi* I 截除的片段中可能含有抑制 PPAR δ 启动子转录的顺式元件. 在 COS7 和 NIH 3T3 这 2 种细胞系中, 虽然 PPAR δ 启动子活性有差异, 在 COS7 细胞中明显高于 NIH 3T3, 但不同长度启动子转录活性的规律基本一致. 我们发现, 只有 179 bp 的近端启动子也具有基本的转录活性. 总之, 我们获得了有转录活性的 PPAR δ 启动子, 这为研究其表达调节机制奠定了基础.

MEF 2 是一类调节神经和肌肉发育的转录因子^[17]. 目前发现 MEF2 最突出的功能是控制肌细胞分化过程中的基因转录. 其主要作用是在骨骼肌、心肌和平滑肌发育过程中介导细胞分化. MEF2 作为钙依赖性调节因子, 在神经系统的发育和分化中也发挥着重要的作用^[18]. MEF2A 在骨骼肌和心肌细胞中高度表达, 其基因敲除鼠在出生后 5~10 天突然出现心死亡, 而且线粒体不足^[19]. PPAR δ 在骨骼肌细胞中也高度表达, 我们通过在线工具分析发现, 在 PPAR δ 2 kb 以内的启动子中, 有 4 个打分极高的 MEF2A 潜在的结合元件, 其中在近端启动子区 (离转录起始位点约 260 bp 处) 的结合位点与 MEF2 阳性应答元件的一致性为 100%, 暗示 MEF2 对 PPAR δ 的转录可能有调节作用. 从我们的实验看来, MEF2A 确实可以上调 PPAR δ 启动子的活性, 高浓度 MEF2A (500 ng) 实验组的相对荧光素酶活性要比对照组高 70 倍以上. 而且, 随着转染的 MEF2A 质粒浓度升高, 这种活化作用增强. 因此, 我们的实验初步证明了 MEF2A 能提高 PPAR δ 启动子的转录活性.

总之, 我们分离了有转录活性的 PPAR δ 启动子, 并且发现 MEF2A 能提高 PPAR δ 启动子活性,

我们的工作为进一步研究在肌细胞中 PPAR δ 基因的表达调节机制提供了有意义的线索。

参 考 文 献

- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999, **20** (5): 649~688
- Matsuura H, Adachi H, Smart R C, *et al.* Correlation between expression of peroxisome proliferator-activated receptor beta and squamous differentiation in epidermal and tracheobronchial epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, **147** (1~2): 85~92
- Gupta R A, Tan J, Krause W F, *et al.* Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (24): 13275~13280
- Harman F S, Nicol C J, Marin H E, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med*, 2004, **10** (5): 481~483
- Barak Y, Liao D, He W, *et al.* Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (1): 303~308
- Takada I, Yu R T, Xu H E, *et al.* Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Mol Endocrinol*, 2000, **14** (5): 733~740
- Forman B M, Ruan B, Chen J, *et al.* The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (20): 10588~10593
- Oliver W R, Jr Shenk J L, Snaith M R, *et al.* A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (9): 5306~5311
- Leibowitz M D, Fievet C, Hennuyer N, *et al.* Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett*, 2000, **473** (3): 333~336
- Wang Y X, Lee C H, Tiep S, *et al.* Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 2003, **113** (2): 159~170
- Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (26): 15924~15929
- Naya F J, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, **11** (6): 683~688
- Barish G D, Narkar V A, Evans R M. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2006, **116** (3): 590~597
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, *et al.* Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 1996, **137** (1): 354~366
- Wang Y X, Zhang C L, Yu R T, *et al.* Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*, 2004, **2** (10): e294
- Abbot E L, McCormack J G, Reynet C, *et al.* Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells. *Febs J*, 2005, **272** (12): 3004~3014
- Black B L, Olson E N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, **14**: 167~196
- 张文炜, 徐列明. 转录因子 MEF2 对多种信号通路的调节及其生物学作用. *生物化学与生物物理学报*, 2004, **20** (4): 423~427
Zhang W W, Xu L M. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2004, **20** (4): 423~427
- Naya F J, Black B L, Wu H, *et al.* Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat Med*, 2002, **8** (11): 1303~1309

Cloning and Analyzing The Promoter of PPAR δ

HE Cheng-Qiang*, LI Cong-Cong, WU Yan-Hong, AN Li-Guo, LI Yun-Long

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of nuclear hormone receptors belonging to the steroid receptor superfamily. Three PPAR isoforms, PPAR α , PPAR δ (also known as PPAR β) and PPAR γ have been found in the mouse. They can activate expression of many genes, including those involved in lipid metabolism. PPAR δ is ubiquitously expressed, but the level of expression differs markedly between different cell types. PPAR δ is expressed in skeletal muscle at 10- and 50-fold higher levels compared with PPAR α and PPAR γ , respectively. A role for PPAR δ in skeletal muscle is to increase the genes expression with relation to oxidative metabolism. In order to determine the molecular mechanisms governing PPAR δ gene expression in muscle, a 2 kb 5' flanking region was cloned and analyzed. The DNA fragment is able to transcribe GFP in COS7 cells. Dual luciferase assay is used to quantify promoter activity. Deletion analysis of the 2 kb PPAR δ promoter fragment in COS7 and NIH 3T3 cells shows that the proximal promoter sequence, nt -197 to +120, confers basal transcriptional activity of the mouse PPAR δ gene. Computational analysis of putative *cis*-acting elements located within the $\sim$ 2.0 kb mouse PPAR δ 5'-flanking sequence was performed using the TRANSFAC database and MatInspector software and 4 potential MEF2A binding sites were found. And there is a potential binding site sharing 100% identity with positive element of MEF2A in the proximal promoter (nt -261). Co-transfection experiments of the PPAR δ promoter reporter and pMEF2A expression plasmid (pMEF2A) showed that MEF2A significantly enhanced transcription activity of PPAR δ promoter in NIH 3T3. Moreover, the enhancive effect depended on the concentration of plasmid pMEF2A transfected into cells. The results suggested that MEF2A may enhance transcription activity of the PPAR promoter in muscle cells.

Key words PPAR δ , MEF2A, skeletal muscle

*Corresponding author . Tel: 86-531-86180745, E-mail: hchqiang@yahoo.com.cn

Received: October 19, 2006 Accepted: December 6, 2006