

## 알츠하이머병 환자의 혈청에서 Transthyretin 단백질의 발현 양상

손지훈 · 홍현주 · 서대근\* · 김만호<sup>†</sup>  
묵인희

서울대학교 의과대학 생화학교실  
로렌스빌 스쿨\*  
서울대학교 의과대학 신경과학교실<sup>†</sup>

### Serum Transthyretin Expression Levels in Patients with Alzheimer's Disease

Ji-Hoon Sohn, Hyun Joo Hong, Dae Keun Suh\*, Manho Kim, M.D.<sup>†</sup>,  
Inhee Mook-Jung, Ph.D.

Department of Biochemistry, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea; The Lawrenceville School\*, Lawrenceville, New Jersey, USA; Department of Neurology<sup>†</sup>, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

**Background:** Amyloid plaques, composed of the sticky A $\beta$  peptide, is a major neurological feature of Alzheimer's disease (AD). Lately, several lines of evidence have suggested that transthyretin (TTR), a 55 kDa homotetrameric protein, is able to bind soluble A $\beta$  preventing amyloid fibrillization *in vitro*. Attenuated production of TTR could therefore be related to the pathogenesis of AD. In the present study, the levels of serum TTR in AD patients were compared with healthy normal controls. The correlation between MMSE score and serum TTR levels was also analyzed to investigate whether the levels of serum TTR were related to the cognitive dysfunction of individuals. **Methods:** Blood sera were collected from 28 patients with AD and from the same number of healthy controls. The level of serum TTR was determined by immunoblotting. Statistical differences between AD patients and normal controls were analyzed and noted. **Results:** The levels of serum TTR were markedly decreased in patients with AD ( $p < 0.0001$ ) compared with controls. Moreover, serum TTR levels showed a significant correlation ( $p < 0.0001$ ) with mini-mental state exam (MMSE) score. **Conclusions:** The present study is the first report that shows a significant difference in the levels of serum TTR between AD patients and normal controls, suggesting the possibility of TTR as a putative biomarker for AD.

**Key Words:** Alzheimer's disease, Transthyretin (TTR), Serum, Biomarker

#### Address for correspondence

Inhee Mook-Jung, Ph.D.  
Department of Biochemistry, Seoul National  
University College of Medicine, 28 Yungun-dong,  
Jongno-gu, Seoul 110-799, Korea  
Tel: +82-2-740-8245  
Fax: +82-2-3672-7352  
E-mail: inhee@snu.ac.kr

\*이 연구는 21C Frontier Functional Proteomics Project와 Molecular & Cellular Biodiscovery grant로 수행되었습니다.

## 서론

Transthyretin (TTR)은 분자량 55 kDa (508 amino acid)의 homotetrameric 단백질로서 베타 평면구조를 가지는 동일한 4개의 monomer subunit (14 kDa)으로 구성된 단백질이다[1].

TTR의 합성과 발현은 뇌척수액(cerebrospinal fluid; CSF)과 혈액에서 독립적으로 조절되는데, 중추 신경계 내에서는 뇌 안의 뇌랑(choroid plexus)에서 합성되어 CSF로 분비되며 5-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  정도의 농도로 존재한다[2, 3]. 반면, 혈액 내의 TTR은 간에서 대부분 합성되는 것으로 알려져 있으며, 170-420  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 CSF와 비교하여 보다 많은 양이 존재한다[4]. 이렇게 생성된 TTR은 간과 근육, 그리고 피부조직에서 대사된다[5]. 현재까지 가장 잘 연구되어진 TTR의 기능은 L-thyroxine (T4)과 retinol (vitamin A)의 전달자로서의 기능이다. TTR은 CSF 내, 그리고 혈액 내 thyroxine 전달에 각각, 80%와 20%를 담당

하는 주 전달자로 작용하며[6], retinol과 retinol-binding protein (RBP) 복합체에 결합하여 retinol-RBP의 결합을 안정화 시키고 retinol의 주요 저장 장소인 간으로부터 원하는 세포로 retinol을 운반하는 간접 운반자의 역할을 수행한다[7]. 이외에도, 영양저하와 장기적인 염증(chronic inflammation)을 반영하는 척도로도 주목을 받아 왔으며[5], TTR 유전자에 변이가 일어난 경우 familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)라는 치명적인 유전 질환을 일으킬 수 있다는 것이 알려져 있다[8].

알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD)은 아밀로이드 전구 단백질(amyloid beta precursor protein; APP)이  $\beta$ -와  $\gamma$ -secretase에 의해 순차적으로 절단되어 생성되는 베타 아밀로이드 펩타이드(A $\beta$  peptide)의 뇌 조직 내 침착이 주된 병리학적 특징으로 나타난다[9]. A $\beta$ 의 침착으로 인해 형성되는 노인반(senile plaque)은 AD 환자의 뇌에서 발견되는 주된 특징일 뿐 아니라 세포사멸이나 염증반응을 포함하는 다양한 일련의 작용들을 촉

발시킴으로서 결국 기억 소실을 일으키는 일차 요인으로 작용한다는 것이 다양한 증거들에 의해 뒷받침되고 있다[10]. A $\beta$ 와 AD를 연결하는 기작은 A $\beta$ 의 과생성과 soluble A $\beta$ 의 섬유화(fibrillization) 증가라는 두 가지 기전으로 분류할 수 있는데[11], TTR이 *in vitro* 조건에서 합성 A $\beta$ 와 결합하여 섬유화를 차단한다는 결과가 Schwarzman 등에 의해 보고 되었다[12]. TTR과 A $\beta$ 와의 상관관계를 뒷받침하는 실험으로서 이외에도 mutant APP (APP695SWE)를 과발현 하는 AD 동물모델 쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서 TTR의 발현이 hippocampus에서 증가되어 있는 경우 AD-like neurodegeneration의 감소가 관찰되었으며[13], estrogen이 TTR 유전자 발현을 증가 시킴으로써 AD의 발병 위험을 낮춘다는 보고가 있다[14]. 뿐만 아니라, 임상 연구에서는 AD 환자와 정상인을 대상으로 CSF에 존재하는 TTR의 농도를 측정해 보았을 때, AD 환자에서 TTR의 농도가 정상인과 비교하여 유의하게 감소해 있음이 관찰되었다[15, 16].

본 연구에서는 기존의 실험적 증거들을 바탕으로 하여 혈액 내에 존재하는 TTR의 농도가 AD 환자에서 정상인과 다르게 발현되고 있는지를 알아보고자 AD 환자와 정상 노인을 포함한 56명으로부터 혈청을 채취하여 TTR의 농도를 확인하였으며, 개 개인의 인지능력을 반영하는 척도의 하나인 mini-mental state examination (MMSE) score와 혈청 TTR 농도와의 상관 관계를 분석함으로써, 혈청 TTR의 농도가 인지능력을 반영할 수 있는지 조사하였다. 또한, 최근 소정온 등에 의해 발표된 보고에 근거하여[18], 혈청 TTR의 농도가 낮아져 있는 AD 환자에서 anti-A $\beta$  autoantibody의 농도를 측정하여 이전에 보고된 진단 표적과 혈청 TTR 농도를 조합하여 AD 진단의 변별력을 높일 수 있는지에 대한 가능성을 연구하였다.

## 대상과 방법

### 1. 환자군

본 연구에는 서울대학교병원에 내원한 28명의 probable AD 환자(평균 나이 63.9 $\pm$ 7.8세)와 28명의 정상인(평균 나이 61.5 $\pm$ 8.4세)으로 부터 채혈된 혈액이 사용되었다. AD로 진단된 환자들은 문진, 신경학적 진찰, 뇌 영상촬영기법인 자기공명영상(magnetic resonance imaging; MRI) 혹은 양전자방사단층촬영(positron emission tomography; PET) 등의 검사를 통하여

National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)에서 제시하는 probable AD 진단의 척도에 해당하였다[17]. 검사에 사용된 56명 중, 4명을 제외한 52명을 대상으로는 MMSE가 수행되었으며, AD 환자군에서는 평균 MMSE score=20.9 $\pm$ 2.9 (범위 12-24), 정상군에서는 평균 MMSE score=26.7 $\pm$ 1.4 (범위 25-30)를 기록하였다 (Table 1).

### 2. 혈액 채취 및 혈청 분리

환자의 혈액은 표준채혈기법에 따라 채혈된 이후, 곧바로 clot activator가 처리되어 진 polypropylene 진공채혈관(Vacuplus®, Medigene, Seoul)에 옮겨졌다. 옮겨진 혈액은 상온에서 30분간 배양 후, 1,100 $\times$ g에서 15분간 원심분리 하여 fibrinogen과 혈액 내 세포성분을 제거한 후 상층액으로 분리된 혈청을 사용하였다.

### 3. Western blotting

분리된 혈청은 1X radioimmunoprecipitation (RIPA: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS and 50 mM Tris, pH 8.0) buffer에서 1:25로 희석한 후, 5  $\mu$ L의 혈청을 10% Tricine SDS polyacrylamide gel에서 전개하여 단백질을 분획하고 polyvinylidene difluoride (PDVF) membrane (Millipore, Bedford, MA)으로 transfer 하였다. Membrane은 rabbit anti-human TTR 1차 항체(Lab frontier, Seoul, 1:2,000)를 처리하여 4°C에서 12시간 이상 반응 시킨 후, horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-rabbit IgG 2차 항체 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK, 1:5,000)를 이용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 일어난 단백질은 Enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)로 검출되어 Image analyzer (LAS-3000, Fuji, Japan)을 이용하여 분석하였다.

### 4. 통계 분석

검출된 단백질의 양은 densitometer (Multi gauge 3.0, Fuji, Japan)로 분석하였고, 모든 비교 수치는 % of mean control $\pm$ S.E.M.으로 표현되었다. 정상군과 AD 환자군 사이의 통계적 유

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients and controls

	MMSE score (mean $\pm$ S.D.)	Age sex	40-49		50-59		60-69		70-79	
			M	F	M	F	M	F	M	F
Normal control	26.7 $\pm$ 1.4	n=28	1	3	1	4	4	12	1	2
Alzheimer's disease	20.9 $\pm$ 2.9	n=28	1	0	0	7	5	8	2	5

MMSE, mini-mental state examination; S.D., standard deviation.

의성은 Unpaired *t*-test로, MMSE score와 TTR 발현량과의 상관관계는 Pearson correlation 방법으로 분석하였다. 모든 통계적 자료처리는 Graphpad Instat 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)과 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 수행하였다.

## 결 과

Western blotting으로 확인된 개개인의 혈청에 존재하는 TTR 단백질의 양은, 정상군의 혈청에서 검출된 TTR 단백질의 signal density를 densitometer로 읽어 그 평균값을 100%로 기준하였을 때, 이에 대한 상대적인 증가, 감소 퍼센트로 분석하였으며, 정상군과 환자군 사이의 signal density의 차이는 동일한 10% Tricine SDS polyacrylamide gel 내에서 비교되었다. 정상인과 AD 환자의 혈청내에 존재하는 TTR의 발현량을 비교해 보았을 때, AD 환자군에서 정상인의 평균값과 비교하여  $18 \pm 2.8\%$ 의 유의한 감소( $p < 0.0001$ )를 보였다(Fig. 1). 정상군과 환자군에 포함된 개개인이 나타내는 TTR 농도의 변화는 정상군( $\pm 3\%$ )과 환자군( $\pm 2.8\%$ ) 사이에서 차이를 보이지 않았으며 정상군에서 보이는 TTR 농도의 평균을 100으로 보았을 때, AD 환자의 경우 총 28명 중 10.7%에 해당하는 3명을 제외하고는 모두 정상군에서의 평균값(100)보다 낮은 혈청 내 TTR 농도를 나타냈다. 더욱이 본 연구에 사용된 56명 중, MMSE 검사를 수행한 52명의 MMSE score와 TTR의 농도간에 통계적으로 유의한 상관관계( $r = 0.516$ ;  $p < 0.0001$ )가 확인되었다(Fig. 2). TTR의 농도와 환자의 연령 사이에는 유의한 상관관계가 관찰되지는 않았으나, 노화가 진행됨에 따라 TTR의 농도가 감소하는 추이( $r = -0.223$ )를 보였다. 또한, 혈청 TTR의 농도가 낮아져 있는 AD 환자

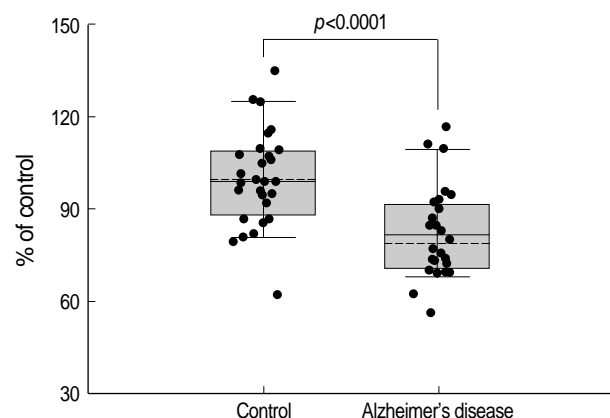


Fig. 1. Comparison of serum TTR levels. The levels of serum TTR were attenuated significantly in AD patients. Box plot denoted 10th, 25th, 75th and 90th percentiles for each group. Solid and dotted lines within the box represent median and mean scores, respectively. Closed circles represent individuals. Data are percentage change from mean TTR level of control.

에서 anti-A $\beta$  autoantibody의 농도를 측정된 결과[18] 정상인과 비교하여 anti-A $\beta$  autoantibody의 농도가 유의하게 낮아져 있음( $p < 0.05$ )을 확인하였다.

## 고 찰

TTR은 초기 발생 단계에서부터 생성이 시작되며, 진화의 단계를 거치면서 잘 보존되어 온 단백질이다[19]. TTR과 AD의 병리학적 기전을 연결 짓는 최근 연구들은, TTR이 *in vitro* 조건에서 soluble A $\beta$ 에 결합하여 AD 환자의 뇌에 형성되는 A $\beta$ 의 섬유화를 차단하는 능력이 밝혀지며 여러 각도에서 연구가 수행되었다[12]. 이후 보고된 연구들로 인체 내 CSF ( $5\text{--}20 \mu\text{g/mL}$ )와 혈액( $170\text{--}420 \mu\text{g/mL}$ )에 존재하는 TTR의 농도 범위만으로 *in vitro*에서 A $\beta_{25-35}$ 의 섬유화를 차단할 수 있다는 보고가 있으며[4], AD 환자의 뇌 조직에서 나타나는 병변의 하나인 neurofibrillary tangle과 neuritic plaques에서 TTR의 존재가 확인되었다[20]. 더욱이, 정상인의 사후 신장조직을 이용하여 수행한 *in vitro* binding assay 결과 TTR이 A $\beta_{40}$  그리고 A $\beta_{42}$ 와 복합체를 형성하고 있음이 확인되었다[21]. 보고된 연구들을 토대로, TTR은 AD에서 노인반을 형성하는 주된 원인물질인 A $\beta$ 와 결합하여 A $\beta$ 의 섬유화를 막음으로써 AD 환자에게서 일어나는 유해한 병리학적 사건들을 차단하는 기능을 할 것으로 생각되어 진다. TTR은 뇌량과 간에서 생성되어 각각 CSF와 혈액으로 분비되어 기능을 하는 것으로 알려져 있는데 뇌량에서 생성되는 단백질의 20%를 차지한다고 보고되어 있다[2]. 따라서, 지금까지 TTR을 대상으로 한 연구는 CSF내에 존재하는 TTR의 변화에 초점을 맞추어 왔는데 CSF 내 TTR의 농도를 측정된 이전 보고에 따르면, TTR의 농도가 AD 환자에서 유의하게 감소

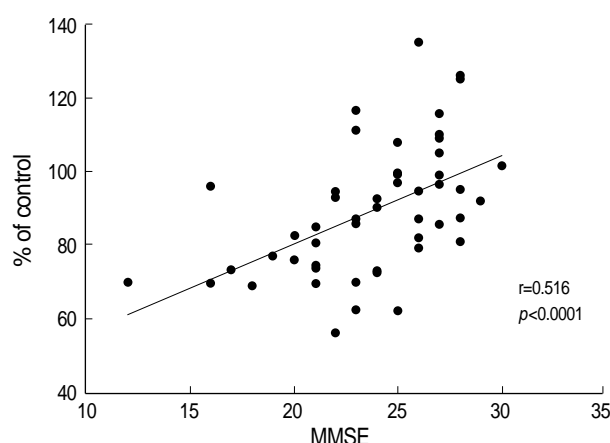


Fig. 2. Correlation between serum TTR levels and MMSE score. Plots show a significant correlation between MMSE scores and serum levels of TTR. The pearson correlation coefficient was  $r = 0.516$ ,  $p < 0.0001$ . Data are percentage change from mean TTR level of control.

되어 있었으며[15, 16], 이는 TTR이 A $\beta$ 와 결합하여 A $\beta$ 의 섬유화를 막는 기전을 간접적으로 증명하는 결과이다. 반면, AD 환자의 혈액 내에 존재하는 TTR의 변화 양상에 관련된 보고는 전혀 이루어지지 않은 상태이며, 본 실험은 AD와 혈청 내에 존재하는 TTR의 양과의 상관 관계를 처음으로 규명하였다. 본 실험 결과에 따르면 AD 환자의 혈액에서 TTR의 발현량이 정상인과 비교하여 현저히 감소해( $p<0.0001$ ) 있었으며, 이는 개개인의 MMSE score와도 유의한 상관관계( $p<0.0001$ )를 보였다. Vata-ssery 등이 발표한 논문에서 CSF와 혈청에 존재하는 TTR의 양 사이에는 비례적 상관관계( $p<0.01$ )가 성립하는데 이는 본 실험 결과를 간접적으로 증명하는 보고이다[3].

TTR 이외에도  $\alpha$ -1-antichymotrypsin이나 apolipoprotein E (apoE) 그리고 apolipoprotein J (apoJ) 등 A $\beta$ 에 대한 결합능력이 확인된 다양한 단백질들이 AD 환자의 뇌 조직에서 존재하고 있는 것이 밝혀져 있으며, 이들이 인체 내에서 적절한 균형을 유지하며 A $\beta$ 의 섬유화를 조절하고 있을 것으로 생각되어 진다[22]. 따라서, 아직까지 알려지지 않은 기전으로 이들 단백질의 균형이 깨졌을 때, A $\beta$ 의 섬유화를 가속시켜 노인반 형성에 기여할 것으로 추측할 수 있다. AD는 현재까지 간단한 생화학적 방법으로 초기단계에서 확진을 내릴 수 있는 수단이 없는 상태이며, 원인을 근본적으로 치료하는 치료제 역시 아직 개발되어 있지 못한 실정이다. 그러므로, 이들 단백질의 변화는 AD 환자에서 일어나는 다양한 생화학적/생리학적 변화들을 반영하여 AD 진단에 응용할 수 있을 것이다. 새로운 진단 표적을 찾는 시도 이외에도 현재까지 밝혀진 다양한 진단 표적들을 조합하여 한 가지의 기준만을 사용하였을 때 반영하지 못하였던 AD의 여러가지 병리학적 변화들을 측정하여 진단의 변별력을 높일 수 있다. 이러한 시도의 일환으로 TTR의 농도를 측정한 환자군을 대상으로 혈청 내 anti-A $\beta$  autoantibody의 농도를 측정해 본 결과 TTR의 농도가 낮아져 있는 AD 환자군에서 anti-A $\beta$  autoantibody의 농도 역시 유의하게 낮아져 있음( $p<0.05$ )을 관찰하였다[18]. 이 결과는 CSF와 비교하여 상대적으로 채취가 간편하고 안전한 환자의 혈액을 사용하여 TTR과 anti-A $\beta$  autoantibody 라는 두 가지 표적으로 AD를 보다 정확하게 진단할 수 있다는 가능성을 보여준다.

본 연구는 CSF 뿐만 아니라, 혈액 내에 존재하는 TTR이 AD 환자에서 정상인에 비교하여 유의하게 감소하여 있다는 것을 관찰한 첫 보고로서, 혈액 내에 존재하는 soluble A $\beta$ [23]와 TTR이 결합하여 A $\beta$ 의 섬유화를 제어함으로써 AD의 병변에 영향을 미칠 것이라는 새로운 기전을 제시한다.

## 참고문헌

1. Blake CC, Geisow MJ, Oatley SJ, Rerat B, Rerat C. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol* 1978; 121: 339-56.
2. Dickson PW, Howlett CJ, Schreiber G. Rat transthyretin (prealbumin). Molecular cloning, nucleotide sequence, and gene expression in liver and brain. *J Biol Chem* 1985; 260: 8214-9.
3. Vataassery GT, Quach HT, Smith WE, Benson BA, Eckfeldt JH. A sensitive assay of transthyretin (prealbumin) in human cerebrospinal fluid in nanogram amount by ELISA. *Clin Chim Acta* 199; 197: 19-25.
4. Giunta S, Valli MB, Galeazzi R, Fattoretti P, Corder EH, Galeazzi L. Transthyretin inhibition of amyloid beta aggregation and toxicity. *Clin Biochem* 2005; 38: 1112-9.
5. Ingenbleek Y, Young V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu Rev Nutr* 1994; 14: 495-533.
6. Hagen GA, Elliot WJ. Transport of thyroid hormones in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol* 1973; 37: 415-22.
7. Goodman DS, Raz A. Extraction and recombination studies of the interaction of retinol with human plasma retinol-binding protein. *J Lipid Res* 1972; 13: 338-47.
8. Ando Y, Nakamura M, Araki S. Transthyretin-Related Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Arch Neurol* 2005; 62: 1057-62.
9. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-66.
10. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6.
11. Selkoe DJ. Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron* 2001; 32: 177-80.
12. Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, et al. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 9: 8368-72.
13. Stein TD, Johnson JA. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci* 2002; 22: 7380-8.
14. Tang YP, Haslam SZ, Conrad SE, Sisk CL. Estrogen increases brain expression of the mRNA encoding transthyretin, an amyloid beta scavenger protein. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 413-20.
15. Riisoe H. Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 1988; 78: 455-9.
16. Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 506-8.
17. Mckhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
18. So JO, Huh JY, Sim HJ, Kim JW, Na DL, Lee PH, et al. Measurement of anti-amyloid beta antibody in serum of Alzheimer's disease patients: devel-

1. Blake CC, Geisow MJ, Oatley SJ, Rerat B, Rerat C. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fou-

- opment of biomarker for Alzheimer's disease diagnosis. Dementia and Neurocognitive Disorders* 2004; 3: 37-41.
19. Schreiber G, Pettersson TM, Southwell BR, Aldred AR, Harms PJ, Richardson SJ, et al. *Transthyretin expression evolved more recently in liver than in brain. Comp Biochem Physiol B* 1993; 105: 317-25.
20. Shirahama T, Skinner M, Westermarck P, Rubinow A, Cohen AS, Brun A, et al. *Senile cerebral amyloid. Prealbumin as a common constituent in the neuritic plaques, in the neurofibrillary tangle and in the microangiopathic lesions. Am J Pathol* 1982; 107: 41-50.
21. Tsuzuki K, Fukatsu R, Yamaguchi H, Tateno M, Imai K, Fujii N, et al. *Transthyretin binds amyloid beta peptides, Abeta1-42 and Abeta1-40 to form complex in the autopsied human kidney-Possible role of transthyretin for abeta sequestration. Neurosci Lett* 2000; 281: 171-4.
22. Wisniewski T, Castano E, Ghiso J, Frangione B. *Cerebrospinal fluid inhibits beta amyloid fibril formation in vitro. Ann Neurol* 1993; 34: 631-3.
23. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, et al. *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. Nature* 1992; 359: 322-5.