

EL TROPISMO DEL VIH Y SU FENOTIPIFICACIÓN.

Humberto H. Lara Villegas, Liliana del C. Ixtepan Turrent y Cristina Rodríguez Padilla.

Laboratorio de Bioseguridad Nivel III. Departamento de Inmunología y Virología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León, México)

Dr_lara@lycos.com

Introducción.

El día mundial del SIDA es el día 1° de Diciembre con la intención de que el mundo tome conciencia de esta mortal enfermedad . Según la ONUSIDA ,en México viven 150,000 personas con SIDA, lo que nos coloca en tercer lugar , después de los Estados Unidos y Brasil .Ocupando en México el cuarto lugar en relación a muertes en hombres y el séptimo lugar en mujeres y jóvenes entre los 25 y 34 años de edad. Los grandes esfuerzos realizados por el sector de Salud en México han sido importantes y se calculan en unos 250 millones de Dólares. El SIDA es un problema de Salud importante en México y el mundo siendo cada vez es mas alto el nivel de incidencia en mujeres .



Siendo una urgencia el implementar medidas preventivas para evitar la transmisión del VIH, aun no hay una vacuna segura, efectiva y lista para usarse contra el SIDA. Mientras los antiretrovirales actuales mejoran la salud del enfermo , en unos años estos desarrollaran resistencia a estos medicamentos.

El tropismo del Virus de Inmunodeficiencia Humana se define como la atracción altamente específica del virus hacia el tejido del huésped, determinado en parte por los marcadores de superficie de las células de este (por ejemplo las células CD4). Los virus desarrollan una habilidad específica para atacar las células en forma selectiva, así como los órganos del huésped y a menudo, ciertas poblaciones de células que se encuentran en los órganos del cuerpo del huésped.

En 1983 se aisló por primera vez el retrovirus de la familia de los lentivirus en pacientes con SIDA (1,2). A partir de esta fecha, la comunidad científica ha intensificado su búsqueda en conocer mas la biología molecular y patogénesis del VIH.

Los pacientes con SIDA presentan disminución de linfocitos CD4+ según progresa su enfermedad, así en 1984 se planteó que era precisamente la molécula CD4, el receptor específico para que el virus del VIH entrara a la célula(3,4). En 1986 se demostró que la proteína gp120, de la envoltura viral, se acoplaba al CD4 y ambas moléculas co-precipitaban como un complejo inmune , demostrando así la unión gp120-CD4.

La expresión del CD4 en la membrana es necesaria pero no suficiente para que el virus se funda con la célula blanco, la búsqueda del posible coreceptor se extendió por unos 10 años. Actualmente, a partir de 1996 se han identificado el CCR5 y el CXCR4 como principales quimosinas (citocinas quimiotácticas) co-receptoras para el VIH lo cual ha llevado a entender el tropismo viral y la patogénesis en el ámbito molecular(5,6) (Ver Figura 1)

La Fenotipificación del tropismo del VIH.

En el caso del VIH, el fenotipo lo podríamos describir como las características y/o el comportamiento que resulta de la interacción del genotipo individual del virus con el medio o células que lo rodean. Así nos resulta posible hacer una clasificación molecular del virus aislado según el uso que haga este de los coreceptores y dando así su fenotipo. La correcta clasificación Fenotípica del tropismo al VIH es de suma importancia, en la patogénesis y en el estudio de la progresión de la enfermedad.

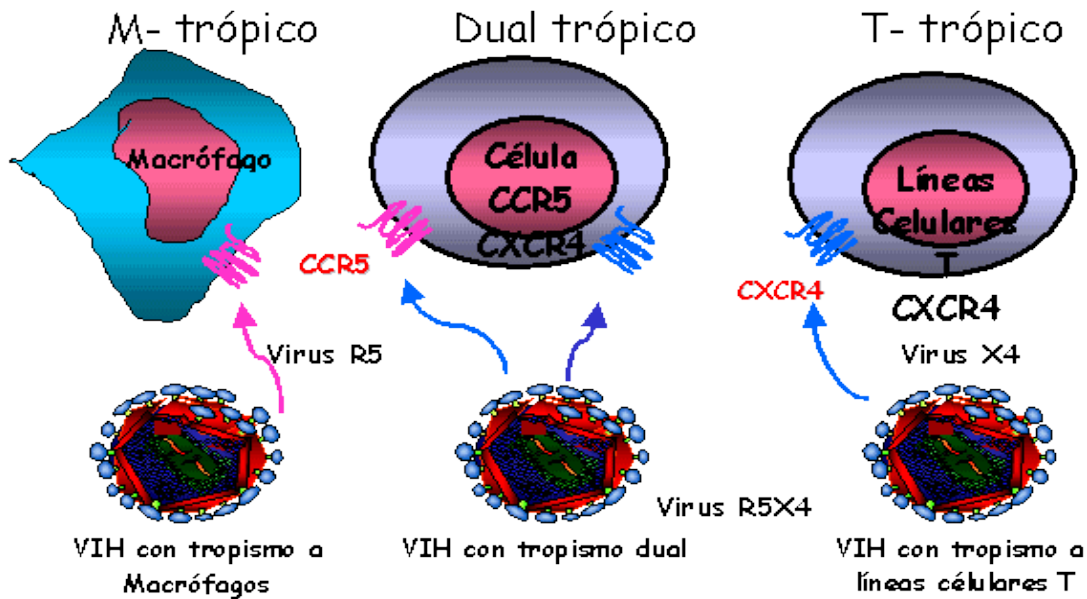


Figura 1. Células con co-receptores CCR5 o CXCR4 o ambos . Los virus del VIH-1 , según su tropismo. Son: R5 , R5X4 y X4 . Los R5 se dirigen a CCR5 , las X4 se dirigen a los CXCR4 y los restantes aceptan a los duales o a todos. (Dibujo cortesía de la Dra. Lydia Rivera)

Según su habilidad para infectar macrófagos, no inducir sincitia (NIS), no infectar las células T, se le denomina M-tropicos. Además, según su cinética lenta de los virus en cultivos celulares (in Vitro), a los M-tropicos, se les conoce como lento, bajo (slow/low SL).

En cambio tenemos otro virus que tiene habilidad para infectar a las células T, inducir sincitia (IS) en estas células T, especialmente en células MT-2 y MT-4 (7). Estos virus T-tropicos o X4, se les conoce, también por la cinética de crecimiento en cultivos celulares In-vitro, rápido/alto (rapid/high RH). (8,9,10)

En síntesis se observó desde el principio que todos los aislados de VIH-1 tenían diferente tropismo según las células que infectaban. Unos aislados virales infectan más fácilmente a macrófagos, mientras que otros, a líneas celulares de linfocitos T. Por lo tanto, existen los llamados aislados virales M-tropicos (R5) y los T-tropicos (X4), así como los que infectan a ambos o Dual-Tropicos (R5 X4), (la M y la T por macrófagos y linfocitos, respectivamente).

El sistema de clasificación fenotípica que describe las propiedades biológicas de los virus aislados continúa en uso al mismo tiempo que con la adaptación de la nomenclatura nueva y deberá ser interpretado en el contexto de las interacciones moleculares en que se sustentan. De cualquier forma, muchos aspectos de las relaciones moleculares involucradas con el fenotipo viral aún se están estudiando. Sabemos que las bases para el uso de las células sanguíneas periféricas

mononucleares en el aislamiento del virus del VIH en su gran variedad radica en que los linfocitos activados CD4 + T , que contienen poblaciones que expresen ya sea el CCR5 o el CXCR4 para que puedan ser infectadas por los virus , ya sea con alguna o con ambas quimosinas . En aislamientos de virus que incluyen cultivos mixtos de donadores de células sanguíneas mononucleares los patrones de la replicación del virus del VIH se puede encontrar como: lentos o rápidos, titulaciones altas o bajas respectivamente y según el nivel de expresión del coreceptor relevante en las células sanguíneas periféricas mononucleares, siendo este último determinante para la capacidad de replicación.

CXCR4

Para 1996, Berger y sus colaboradores clonaron una proteína que cuando era co-expresada con el CD4, permitía la infección de células no humanas(11,12). En este propio artículo de Berger se demuestra de forma impecable que esa proteína candidata (Estas moléculas forman una familia de receptores del tipo de la proteína G, con siete dominios transmembrana) , cumplía con los requisitos para ser catalogada como el coreceptor del VIH. A la proteína se le dio el nombre de fusina por estar involucrada en la fusión de la membrana del retrovirus con la de la célula, en este caso, el linfocito T. La fusina luego fue renombrada CXCR4, Cuando células no humanas eran transfectadas con esta proteína y con CD4 humano se volvían sensibles a la infección por aislamientos T-trópicos del VIH-1 pero no para los M-trópicos.

CCR5

Tres grupos simultáneamente publicaron los trabajos que demostraban que el CCR5 (Estas moléculas forman una familia de receptores del tipo de la proteína G, con siete dominios transmembrana) era, en efecto, el coreceptor para los aislamientos M-trópicos del VIH(13,14). Esta molécula funciona como receptor para una particular familia de sustancias conocidas como quimosinas, del inglés chemokines . Las quimosinas son citocinas quimiotácticas liberadas por una gran variedad de células y cumplen el papel de atraer macrófagos, células T y granulocitos a los sitios de inflamación.

El cofactor CC CKR-5 (por la sigla inglesa Cysteine -Cysteine Chemokine Receptor-5) actúa sinérgicamente con el receptor CD4, favoreciendo la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, con lo que facilita la infección. Por el contrario, al funcionar como receptor y aceptar como ligando a las quimosinas RANTES, MIP 1a y MIP 1b, inhibe la infección viral. Aún no se sabe con certeza si este último efecto tiene lugar como consecuencia de un bloqueo competitivo de las quimosinas sobre el receptor o si la interacción quimosinas - CC CKR5 induce una regulación por lo bajo (down regulation) del receptor CD4 .

Siendo CCR5 y CCR3 cofactores para la entrada de los virus M-trópicos y no inductores de sincitio (NIS), que son los que en la mayoría de los casos infectan in vivo, se explica parcialmente por qué la delección de CCR5 confiere en algunos casos protección frente a la infección por el VIH-1; esta delección de CCR5 se encuentra en aproximadamente el 1% de la población caucásica de descendencia europea, debido a una delección de 32 pares de bases. Un 15 o 20% de esta misma población sería heterocigótica, lo que podría conferir una protección parcial o una progresión más lenta hacia la enfermedad, siendo susceptibles a la infección pero menos que la población general.(15,16,17,18)

Como dato novedoso en dos de estos trabajos se reportan que otros miembros de la familia de receptores de quimosinas como el CCR2b y el CCR3 pueden mediar la entrada de algunas cepas de virus a la célula.

Otros receptores como CCR1, CCR2a, CCR3 y CCR4 no permiten la fusión, y diferentes quimosinas como RANTES, MIP-1a y MIP-1b son capaces de bloquearla. CCR3 y CCR2b se

piensa que son cofactores de entrada del VIH con tropismo dual (19,20). Estudios en células derivadas de la microglia cerebral han demostrado que CCR5 y CCR3 facilitan la entrada del VIH en estas células nerviosas.

Podríamos decir en sentido figurado que la proteína gp120 del virus es la llave que utiliza el VIH para entrar en la célula. Esta llave necesita engarzarse con dos dientes de la cerradura; uno de esos dientes es siempre el receptor CD4 y el otro diente es el receptor de quimosinas CCR5 o el CXCR4 o ambos.

Únicamente cuando “la llave” (la proteína viral gp120) -- se ha unido a los dos receptores, se abre la “cerradura” presente en la membrana plasmática, permitiendo la entrada del virus. Esta cerradura en lenguaje científico se denomina poro de fusión, ya que es la consecuencia de la fusión de la membrana plasmática celular con la membrana de la envuelta del virus. Por el poro de fusión el VIH introduce su material genético y la célula se convierte en una fábrica de reproducción de nuevas partículas virales.

Los virus con tropismo de células T tienden a tener más residuos con cargas positivas, particularmente en ciertas posiciones de la región V3, mientras que los virus con tropismo de macrófagos tienden a tener residuos negativamente cargados en la región V3, incluyendo la tal llamada secuencia consenso V3 (21).

Antagonistas de las quimosinas receptoras CCR5 , CXCR4 y su efecto en la inhibición del VIH.

Los receptores de las quimosinas son utilizadas como co-receptores por las cepas del VIH en las células T trópicas y también en los macrófagos trópicos ,respectivamente para así poder entrar a las células huésped.

Los ligandos naturales del CXCR4 pueden inhibir la entrada viral del VIH, como es la quimosina CXCL12 y para el CCR5 , los ligandos naturales son las quimosinas CC, como RANTES ,mip-1 a y mip-1 b .

Se han identificado varios compuestos peptídicos como antagonistas al CXCR4 con actividad antiviral como son el T22 , T134 , el ALX40-4C , y el CGP 64222 siendo este último un inhibidor de Tat (22,23,24,25). Uno de los más potentes y específicos antagonistas del CXCR4 son los derivados Biciclamos que bloquean potentemente la replicación del VIH X4.El Biciclamo AMD3100 es antagonista altamente específico al CXCR4 que además bloquea las variantes de T-trópicos y los dual-trópicos (R5/X4) las cuales necesitan del CXCR4 para poder entrar a las células (26). El primer compuesto no peptídico que interactúa con el CCR5, es un derivado del amonio cuaternario llamado TAK-779 con potente actividad antiviral (27).

En el Hospital Kaplan de Israel se han investigado los novedosos compuestos CAA (Conjugados Amino-Argininos) siendo algunos de estos el R4K y el R3G, los cuales bloquean al coreceptor de las células CD4 , el CXCR4 . Realizamos estos estudios en colaboración con nuestro grupo en Israel (28,29,30).

Los Conjugados Argininos- Aminoglicosidos (CAA) inhiben la replicación del VIH y actúan como antagonistas del Tat .Además los AAC compiten con la unión al CXCR4 , al SDF-1 a y en la unión al gp120 , lo cual nos indica que pudiera interferir en los pasos iniciales de la infección por VIH . El más potente de los AAC es el NeoR6 , y al desarrollar virus del VIH resistentes a este compuesto, encontramos mutaciones características , lo cual nos sugiere fuertemente que el NeoR6 interfiere en el paso de fusión el cual es dependiente de los cambios conformacionales en el gp120 y la interacción con la gp41. Así, estos novedosos medicamentos desarrollados en el Instituto Weizmann, pueden ser una familia nueva de inhibidores a la fusión del VIH.

Se ha encontrado que los aislados virales resistentes al NeoR6 desarrollaron las siguientes mutaciones en el gp120: I339T en la región C3 , S372L en la región V4 región, y Q395K en la región C4; además en tenemos gp41: S668R y F672Y en el 'heptad repeat' 2 de la region (HR2). Con estos resultados tenemos pruebas que sugieren muy seguramente que el CAA NeoR6 obstruye la replicación del VIH-1 interfiriendo en le paso de fusión , el cual es dependiente de cambio conformacionales tanto de gp120 después de interactuar con el CD4 y el CXCR4 , asi como de la interacción del gp41 inducidos por el HR1 y HR2. De esta forma tenemos una familia de nuevos inhibidores de Fusión al VIH-1 (31).

Conclusiones

Conforme aumentan los descubrimientos sobre las formas de entrada que utiliza el virus para poder hacer fusión en las células se han abierto muchas nuevas puertas de investigación para los científicos al VIH.

Esta gran cantidad de descubrimientos sobre la forma que el VIH penetra en las células ha llevado a buscar terapias que detengan los pasos de entrada de los virus hacia las células sanas . Los diferentes enfoques incluyen el desarrollo de moléculas pequeñas que se ligarán a los receptores de las quimosinas, bloqueando así la infección; Otra sería la vacunación contra ligandos que previenen o controlan la infección, otra opción podría ser el mimetizar los efectos de la mutación genéticamente inducida.

Los receptores de las quimosinas proveen un objetivo tentador como terapia contra el SIDA, ya que representa un punto muy temprano de intervención contrario a los inhibidores de las proteasas, pues los inhibidores de las proteasas atacan al virus una vez que ya ha entrado a la célula de forma exitosa. Aunque los inhibidores de las proteasas han alcanzado un gran éxito contra el VIH, este antiviral no ha podido acabar del todo con el virus del VIH, permitiéndole mutar y desarrollar la resistencia contra los inhibidores de las proteasas. Así mientras los inhibidores de las proteasas son un objetivo que se mueve, en contraste los receptores de las quimosinas son objetivos fijos (como en el tiro al blanco) pues hipotéticamente no desarrollarían mutaciones.

Favorecer el bloqueo del CCR5 con moléculas pequeñas sería ideal, ya que se ha demostrado que sin ambas copias del gen que codifica el CCR5 muestran que son altamente resistentes al VIH. Estos estudios también indican que los individuos sin CCR5 son saludables. Una droga efectiva dirigida contra el CCR5 pudiera no tener ningún efecto secundario.

Los nuevos CAA que hemos estudiado y aun estamos estudiando podrán ayudarnos a comprender mas los mecanismos de fusión del VIH a las células , así como la función y las formas de combatir al VIH in Vitro.

Será de gran impacto para la salud publica desarrollar nuevos medicamentos antiretrovirales que no permitan la fusión del virus a las células. Mientras mas conozcamos estos mecanismos moleculares, mejor podremos desarrollar nuevos medicamentos y mejores terapias contra el SIDA.

Resumen

El objetivo de nuestra investigación en el BL-3 empieza al enfocarnos para entender las interacciones específicas entre los componentes moleculares del VIH y las proteínas humanas . Este proceso nos definirá cuales son los factores del huésped que son requeridos para una infección productiva. Un objetivo inmediato de esos estudios son el proveer con nuevas terapias para el desarrollo de nuevos medicamentos. Usando lo que hemos conocido sobre estos trabajos moleculares intentamos estudiar las interacciones moleculares del VIH y el sistema inmune del huésped .

Palabras clave : Tropismo , HIV, CD4, CXCR4, CCR5, Compuestos Arginino Aminoglicosidos , mutaciones , antiretrovirales

Abstract

The research focus in the BSL-3 begins with obtaining an understanding of the specific interactions between HIV viral components and human proteins. This process will define which host factors are required for a productive infection. An immediate objective of these studies is to provide new targets for the development of novel drug therapies. Using what is learned from these molecular studies, they are attempting to develop small animal models to study the interaction of HIV with the host's immune system.

Key words: Tropism, HIV, CD4, CXCR4, CCR5, Arginine aminoglicosid, Mutations, Antiretroviral

Referencias

1. Barre-Sinoussi F, JC. Chermann ,F. Rey ,MT. Nugeyre ,S. Chamaret ,J. Gruest ,C. Dauguet ,C. Axler-Blin ,F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*;220(4599):868-871
2. Gallo, RC, PS. Sarin, EP. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, VS. Kalyanaraman, D. Mann, GD. Sidhu, RE. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch and M. Popovic. 1983 Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*;220(4599):865-867
3. Alkhatib G, CC. Broder and EA. Berger. 1996a. Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol.* 70(8):5487-5494
4. Alkhatib G, C. Combadiere, CC. Broder, Y. Feng, PE. Kennedy, PM. Murphy and EA. Berger. 1996b. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*;272(5270):1955-1958.
5. Trkola A, T. Dragic, J. Arthos, JM. Binley, WC. Olson, GP. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, PJ. Maddon, and JP. Moore. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature*;384(6605):184-187.
6. Wu L, NP. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, AA. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*.;384(6605):179-183.
7. Koot M., A.H.V. Vos, R.P.M. Keet,R.E.Y. de Goede, W. Dercksen, F.G. Terpstra, R.A. Coutinho, F. Miedema, and M. Tersmette 1992 HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 6:49–54.
8. Asjo B., L. Morfeldt-Manson, J. Albert, G. Biberfeld, A. Karlsson, K. Lidman, and EM. Fenyo 1986 .Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet.* ii:660–662.
9. Fenyo, E.M, L. Morfeldt-Manson, F. Chiodi, A. Lind, A. von Gegerfelt, J. Albert, E. Olausson, and B. Asjo, 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol.* 62:4414–4419.

10. Tersmette M., R E. de Goede, B.J. Al, I.N. Winkel, R.A. Gruters, H.T. Cuypers, H.G. Huisman, and F. Miedema 1988 Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol*, 62:2026–2032.
11. Alkhatib G,C.*et al*, *Op. cit.* 1996a
12. Alkhatib G,C.*et al*, *Op. cit* 1996b
13. Trkola A. *et al*, *Op. cit*
14. Wu L, *et al*, *Op. cit*
15. Furci L, G. Scarlatti and S. Burastero.1997. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med*; 186: 455-460.
16. Trkola A, T. Dragic, and J. Arthos. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5- *Nature*; 384 (6605): 814-817
17. Balfe P, Y. Churcher and M. Penny 1998. Association between a defective CCR-5 gene and progression to disease in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 14: 1229-1234.
18. Gorry PR, C. Zhang, S. Wu, K. Kunstman, E. Trachtenberg, J. Phair, S. Wolinsky and D. Gabuzda. 2002 Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5 Delta 32 allele. *Lancet*. May 25;359(9320):1832-1834.
19. Moriuchi H, M. Moriuchi, C. Combadiere, PM. Murphy and AS. 1996 Fauci.CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages *Proc Natl Acad Sci U S A.*;93(26):15341-15345.
20. Ahmed RK, B. Makitalo, K. Karlen, C. Nilsson, G. Biberfeld and R. Thorstensson. 2002 Spontaneous production of RANTES and antigen-specific IFN-gamma production in macaques vaccinated with SHIV-4 correlates with protection against SIVsm challenge. *Clin Exp Immunol*;129(1):11-18.
21. Trujillo JR, WK. Wang, TH. Lee and M. Essex. 1996 Identification of the envelope V3 loop as a determinant of a CD4-negative neuronal cell tropism for HIV-1. *Virology.*;217(2):613-617.
22. Doranz BJ., K. Grovit-Ferbas, MP. Sharron, SH. Mao, MB. Goetz, ES. Daar , RW. Doms and WA. O'Brien.1997 **A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor.** *J Exp Med.*;186(8):1395-1400
23. Tamamura H, T. Murakami, M. Masuda, A. Otaka, W. Takada, T. Ibuka, H. Nakashima, M. Waki, A. Matsumoto and N. Yamamoto. 1994. Structure-activity relationships of an anti-HIV peptide, T22. *Biochem Biophys Res Commun.*;205(3):1729-1735.
24. De Clercq E and D. Schols 2001.Inhibition of HIV infection by CXCR4 and CCR5 chemokine receptor antagonists. *Antivir Chem Chemother.*;12 Suppl 1:19-31
25. Daelemans D, D. Schols, M. Witvrouw, C. Pannecouque, S. Hatse, S. van Dooren, F. Hamy, T. Klimkait, E. de Clercq and AM.VanDamme .2000 A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: inhibition of human immunodeficiency

virus replication by blocking CXC-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol Pharmacol.* 57(1):116-124.

26. Armand-Ugon M, ME. Quinones-Mateu , A. Gutierrez, J. Barretina, J. Blanco, D. Schols, E. De Clercq, B. Clotet, JA. Este. 2003 Reduced fitness of HIV-1 resistant to CXCR4 antagonists. *Antivir Ther*;8(1):1-8.

27. De Clercq E. 2002 New developments in anti-HIV chemotherapy *Biochim Biophys Acta.*;1587(2-3):258-275.

28. Litovchick A, A. Lapidot, M. Eisenstein, A. Kalinkovich and G. Borkow. 2001 Neomycin B-arginine conjugate, a novel HIV-1 Tat antagonist: synthesis and anti-HIV activities. *Biochemistry.*;40(51):15612-15623.

29. Lapidot A., M. Eisenstein, A. Kalinkovich and G. Borkow, 2002 Neomycin B-arginine conjugate, a novel HIV-1 Tat antagonist: synthesis and anti-HIV activities, *Antivir. Res.* 53 (3): 26 Sp. Iss.

30. Borkow G., V. Vijayabaskar , HH. Lara, A. Kalinkovich and A. Lapidot,2003. Structure-activity relationship of neomycin, paromomycin and neamine- arginine conjugates, targeting HIV-1 gp120-CXCR4 binding step. *Antiviral Res.*;60(3):181-192.

31. Borkow G, HH. Lara and A. Lapidot . 2003. Mutations in gp41 and gp120 of HIV-1 isolates resistant to hexa-arginine neomycin B conjugate. *Biochem Biophys Res Commun.*;312(4):1047-1052.